

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



**Léčba závažné tyreoidální orbitopatie
hemoreoferézou, význam změn vybraných
patogenetických činitelů**

Disertační práce doktorandského studijního programu vnitřní nemoci

HRADEC KRÁLOVÉ

2015

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Vnitřní nemoci

**Léčba závažné tyreoidální orbitopatie hemoreoferézou, význam změn vybraných
patogenetických činitelů**

**Haemorheopheresis in treatment of severe thyroid associated orbitopathy, the role of
changes in selected pathogenetic indicators**

MUDr. Věra Ceeová

Školitel: prof. MUDr. Jan Čáp, CSc.
Školitel konzultant: Prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.

Hradec Králové

Obhajoba dne:

Prohlášení:

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

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

V Hradci Králové dne

MUDr. Věra Ceeová

Poděkování

Děkuji svým školitelům prof. MUDr. Janu Čápovi, CSc. a prof. MUDr. Milanu Bláhovi, CSc. ze IV. interní kliniky FN Hradec Králové za odborné vedení, cenné připomínky, inspiraci při realizaci mé práce a trpělivost.

Děkuji také kolegům z Kliniky nukleární medicíny Fakultní nemocnice Motol MUDr. Michalovi Škáchovi a Doc. MUDr. Petrovi Vlčkovi, CSc. za obětavou spolupráci a přístup.

Práce vznikla za podpory grantu grantové agentury IGA Ministerstva zdravotnictví České republiky (IGA MZ ČR NR/9181-3).

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Klinický obraz.....	10
3. Rizikové faktory rozvoje TAO.....	12
3.1. Kouření.....	12
3.2. Způsob léčby hyperfunkce štítné žlázy.....	12
4. Klasifikace a vyšetření.....	14
5. Patogeneze TAO.....	16
5.1 Genetika.....	16
5.2 Úloha cytokinů v patogeneze TAO.....	18
5.3. Adipogenese.....	19
6. Léčba TAO.....	20
6.1. Glukokortikody.....	21
6.2. Zevní iradiace orbit.....	22
6.3. Cyklosporin.....	23
6.4. Somatostatinová analoga.....	24
6.5. Intravenózní imunoglobuliny.....	25
6.6. Rituximab.....	26
6.7. Ophthalmochirurgické zákroky. Dekomprese orbit.....	27
6.9. Ablace štítné žlázy.....	28
6.10. Aferetické metody.....	28
7. Cíle dizertační práce.....	31
7.1 Pracovní hypotézy.....	31
8. Nemocní a metodika.....	32
8.1. Charakteristika nemocných.....	32
8.2. Základní hematologické a biochemické parametry.....	34
8.3. Specializovaná hematologická vyšetření.....	35
8.4. Aktivita destičkových znaků a destičkové mikroagregáty, cirkulující endoteliální buňky.....	36
8.5. Stanovení vitamínů.....	36
8.6. Protilátky.....	36

8.7. Další vyšetření.....	37
8.8. Protilátky proti očnímu svalu.....	37
8.9. Vizuální evokované potenciály (VEP).....	38
8.10. Klinické skóre aktivity.....	41
8.11. Naše modifikace hemoreoferézy.....	41
8.12. CT vyšetření orbit.....	43
8.13. Statistické hodnocení.....	43
8.14. Parametry sledované před procedurou a po ní.....	43
8.14.1. Základní vyšetření.....	44
8.14.2. Specializovaná vyšetření.....	44
9. Výsledky.....	47
9.1. Klinická účinnost hemoreoferézy.....	47
9.1.1. Skóre klinické aktivity (CAS)	47
9.1.2. Vizuální evokované potenciály (VEP)	49
9.1.3. Hodnocení CT.....	52
9.2. Ovlivnění imunologických ukazatelů včetně patogenetických faktorů tyreoidální orbitopatie.....	57
10. Zhodnocení sekundárních cílů práce.....	62
10.1. Klinická bezpečnost a snášenlivost metody.....	62
10.2. Změny navozené hemoreoferézou.....	64
10.2.1. Hodnocení reologických změn.....	64
10.2.2. Biochemické a hematologické ukazatelé bezpečnosti terapie.....	65
10.2.3. Funkční stav a agregace destiček.....	67
10.2.4. Adhezní schopnost endotelu a aktivita fibrinolýzy	67
10.2.5. Expres solubilních adhezních molekul.....	68
10.2.6. Povrchové znaky a ukazatelé apoptózy	70
10.2.7. Markery lipoperoxidace	70
10.2.8. Cirkulující endoteliální partikule.....	75
10.2.9. Hladiny hormonů štítné žlázy	77
11. Diskuse.....	78
12. Závěry.....	82
13. Doporučení pro praxi.....	83
14. Použitá literatura.....	84

Použité zkratky

ALT – alaninaminotransferáza
ALP – alkalická fosfatáza
A2M – alfa2 makroglobulin
ApoA – apolipoprotein A
ApoB - apolipoprotein B
AST - aspartátaminotransferáza
ATA - American Thyroid Association
ATG - protilátky proti tyreoglobulinu
ATPO – protilátky proti tyreoperoxidáze
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
CAS – clinical activity score – klinické skóre aktivity
CEC – cirkulující endoteliální buňky
CK – kreatinkináza
COL – kolagen
CRP – C-reaktivní protein
CTLA-4 - cytotoxický T lymphocytární antigen-4
EMA – eye muscle antibodies – protilátky proti očnímu svalu
EMP – endoteliální mikropartikule
EPI – epinephrin
EPC – endoteliální progenitorové buňky
EUGOGO - European Group on Graves orbitopathy
GAG - glykosaminoglykany
GMT – gamaglutamyltranspeptidáza
hsCRP – vysoce citlivý C- reaktivní protein
Gy - gray (jednotka absorbované dávky záření v soustavě SI)
Hb – hemoglobin
15-HETE - 15-hydroxyeicosatetraenová kyselina
HLA – human leukocyte antigen
HTC – hematokrit
IgA – imunoglobulin A
IGF-I - inzulínu podobný růstový faktor

IgM - imunoglobulin M
IL- 6 - interleukin 6
MCV - střední objem erytrocytů
MCP - 1 – chemotaktický protein monocytů
MPV - střední objem trombocytů
MRI - musculus rectus inferior
MRL - musculus rectus lateralis
MRM - musculus rectus medialis
MRS - musculus rectus superior
PAI - inhibitor aktivátoru plasminogenu
PCT - destičkový hematokrit
PDW - šíře distribuce histogramu destiček podle jejich objemu
PGHS-2 - prostaglandin H syntáza-2
PLT - celkový počet trombocytů
PPAR γ - peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTPN-22 - protein tyrozin fosfatáza-22
RIA - radioimunoanalýza
RTX - rituximab
TAG - triacylglyceroly
TAO - thyroid-associated ophthalmopathy – tyreoidální orbitopatie
TIMP - tkáňové inhibitory metaloproteináz
TNF - tumor necrosis factor
TP - total protein - celková bílkovina séra
t-PA - tkáňový aktivátor plasminogenu
TRAK - protilátky proti TSH receptoru
TSH - tyreostimulační hormon
VEP - vizuální evokované potenciály
vWF - von Willebrandův faktor
WBC - celkový počet leukocytů

1. Úvod

Tyreoidální orbitopatie (TAO – z angl. thyroid-associated ophthalmopathy) je autoimunitní onemocnění, charakterizované zánětlivým prosáknutím a buněčnou infiltrací tkání očníce.

Incidence TAO je udávána asi 16 žen a 3 muži na 100 000 obyvatel ročně (1, 2), přičemž incidence středně závažných a závažných forem TAO je mnohem nižší – dle dánské studie je to 16,1 případů na million obyvatel ročně (26,7 žen a 5,4 mužů) (3).

Výskyt onemocnění vykazuje u obou pohlaví dvoufázový vrchol - nejčastěji jsou postiženy ženy ve věku 40-44 let a 60-64 let a muži ve věkové kategorii 45-49 let a 65-69 let (4). Výskyt onemocnění je rovněž významně závislý na rase – např. je udáván asi 6x častější výskyt TAO u Evropanů než u Asiatů (5,6).

TAO se nejčastěji objevuje u pacientů s Graves-Basedowovou chorobou - asi 25-50% pacientů má jakékoliv klinické příznaky TAO v době stanovení diagnózy (7). Ještě větší procento nemocných (až 90%), bez zjevných klinických příznaků TAO, má prokazatelné změny na svalech orbity, zjistitelné při vyšetření ultrazvukem (7), počítačovou tomografií nebo magnetickou rezonancí (7,8). Většinou se však jedná o lehkou formu TAO, zrak ohrožující forma TAO se vyskytuje jen asi u 5 % těchto pacientů.

Příznaky TAO se mohou objevit před manifestací Graves-Basedowovy nemoci, současně s prvními příznaky tyreotoxikózy nebo mohou následovat v různě dlouhém intervalu po začátku onemocnění. TAO se může vyskytnout i u pacientů s hypotyreózou na podkladě chronické autoimunitní tyreoiditidy (asi 10%) či u pacientů bez evidentního onemocnění štítné žlázy (5-10%) – tzv. eutyreoidní orbitopatie (2).

2. Klinický obraz

Klinický obraz je dán kombinací postižení různých anatomických struktur očníce a stadiem onemocnění. Základním příznakem je retrakce víček, častěji horních (Dalrympleův příznak) – zpočátku je stav intermitentní, akcentuje např. při fixaci a postupně se stává trvalým. Důsledkem retrakce jsou i další příznaky – ztráta souhybu víčka s bulbem při pohledu dolů (Graefeho příznak), snížená frekvence mrkání (Stelwagův příznak), nedovírání oční štěrbin (lagofthalmus). Důsledkem nedovírání oční štěrbin ve spánku jsou typické pocity pálení a řezání po probuzení, v těžkých případech dochází k expoziční keratopatii až ke vzniku vředu rohovky.

Další příznaky jsou způsobeny prosáknutím cílových tkání – tj. orbitálního tuku a zevních očních svalů (především dolních a vnitřních přímých) a orbitálních sept. Histologickým korelátem tohoto obrazu je lymfocytární infiltrace a ukládání glykosaminoglykanů.

Otoky víček postihují pouze jejich preseptální část, pretarzální část víček zůstává nepostižena. Častěji jsou postižena víčka horní. Otoky víček bývají největší ráno, během dne se zmenší, ale nikdy nevyjmí zcela. Důsledkem prosáknutí a zmnožení retrobulbárního tuku je zvýšený tlak v očníci, kdy je bulbus vytlačován dopředu – dochází k protruzi očního bulbu, čili exophthalmu.

Dalším projevem přetlaku v očníci může být chemóza spojivky, nejčastěji v temporální polovině oční štěrbin. Přetlak v očníci způsobuje i zhoršení venózního odtoku z očníce s dilatací episklerálních žil, zvýšení žilní náplně na očním pozadí, event. i sekundární glaukom. Vzhledem k tomu, že zrakový nerv probíhá v očníci esovitě, neohroží ani rychlý vývoj protruze zrakové funkce. Větší riziko v tomto směru představuje prosáknutí zevních očních svalů., kdy zduřelé okohybné svaly mohou způsobit v hrotu očníce útlak optiku (kompresivní neuropatie).

Zánětlivé prosáknutí okohybných svalů je příčinou dvojitého vidění (diplopie). Ta často začíná nenápadně, zpočátku bývá jen v určitém pohledovém směru, nejčastěji při pohledu nahoru (nekonstatní diplopie), postupně se může diplopie objevit ve všech pohledových směrech a to i při pohledu přímo (konstantní diplopie). Prosáknutí svalů v první fázi onemocnění bývá reverzibilní, následné jizvení již vede k nevratné poruše okohybných funkcí.

U většiny postižených je TAO onemocněním přechodným, nemoc neprogreduje

a příznaky nevyžadují specifickou léčbu. U malé části nemocných (3-5%) dochází k postupné progresi a průběh bez léčby ohrožuje zrakové funkce. Léčba onemocnění je svízelná, ne vždy s dobrými výsledky a vyžaduje podávání léků, vykazujících řadu závažných nežádoucích účinků. Těžká TAO vede k expoziční keratopatii či kompresivní neuropatii optiku, která může vyústit ve ztrátu zraku.

Pacienti mladší 40 let mají větší sklon k velkým protruzím (zřejmě pro zachovanou transformační potenci orbitálních fibroblastů), naopak u starších osob bývá protruze menší, ale je větší sklon k neuropatiím optiku a diplopii při predilekčním postižení pojiva svalů.

TAO se vyskytuje častěji u žen než u mužů (9). Dosavadní znalosti nevysvětlují, proč jsou ženy postiženy častěji, proč mají větší pohotovost k těžkým orbitopatiím.

3. Rizikové faktory rozvoje tyreoidální orbitopatie

3.1. Kouření:

Všeobecně je známý negativní vliv kouření na rozvoj a průběh TAO. Mechanismus působení kouření není zcela jasný. Jedním z předpokládaných mechanismů je snížení parciálního tlaku kyslíku - kouřením indukována hypoxie v orbitálních tkáních zvyšuje produkci glykosaminoglykanů a může také zvyšovat uvolňování cytokinů endoteliálními buňkami a tím zvyšovat expresi adhezivních molekul (10)

Kouření cigaret je spojeno s mírnými a nepříliš jasnými změnami v tyreoidálních funkčních testech, patofyziologický význam těchto změn je nejasný. Řada prací (i když ne všechny) popisuje zvýšenou prevalenci kuřáků mezi pacienty s Graves -Basedowovou toxikózou.

Kouření zvyšuje incidenci TAO, prodlužuje trvání onemocnění a je i spojeno s výskytem závažnějších forem TAO a to jak při kuřáctví před vznikem TAO, tak i v průběhu onemocnění (11,12). U kuřáků je prokázána nižší a opožděná odpověď na léčebné intervence a větší procento onemocnění, rezistentních na léčbu (13,14).

Rovněž pasivní kouření může mít negativní vliv na rozvoj TAO, a to zejména u dětí (15). V některých pracích bylo prokázáno, že je relativně vyšší riziko rozvoje TAO u aktivních kuřáků, než u kuřáků bývalých (16). Riziko rozvoje TAO se pravděpodobně zvyšuje s počtem vykouřených cigaret denně (16).

3.2. Způsob léčby hyperfunkce štítné žlázy:

U pacientů s hyperfunkcí štítné žlázy je nezbytné co nejdříve dosáhnout a udržet eutyreoidní stav. Mezi léčebné možnosti v současné době patří medikamentózní léčba tyreostatiky, chirurgická léčba – tj. provedení totální tyreoidektomie a léčba radiojodem (podání radioaktivního jodu v tyreostatické dávce).

Zatímco léčba tyreostatiky a chirurgická léčba pravděpodobně nemají vliv na průběh TAO (17, 18), léčba radioaktivním jodem může vest k rozvoji TAO či progresi již preexistující TAO (19,20,21). Riziko výskytu pak stoupá u kuřáků, u pacientů s vysokou

hladinou TRAK před zahájením léčby a u pacientů s pozdně korigovanou hypotyreózou, vzniklou po léčbě radiojodem (22).

Tomuto nežádoucímu efektu lze předejít krátkodobým perorálním podáváním nízkých dávek kortikoidů po terapii radiojodem (tzv. steroidní profylaxi) (23,24). Standardně doporučená profylaktická dávka je 0,4 mg/kg prednisonu/den s postupným snižováním dávky v průběhu 3 měsíců. Dle nedávno publikované retrospektivní studie bylo dosaženo stejného efektu při podávání poloviční dávky prednisonu – tj. 0,2 mg/kg a den po dobu 6 týdnů (25).

Profylaktické podávání kortikoidů není nutné, vzhledem k nízkému absolutnímu riziku rozvoje závažné TAO, u pacientů bez předchozích známek očního postižení. Je však doporučeno u pacientů s preexistující TAO a u kuřáků (9).

4. Klasifikace a vyšetření

Existuje několik klasifikací a skórovacích schémat TAO. V současnosti je platná klasifikace, která byla navržena v roce 2008 Evropskou pracovní skupinou pro endokrinní orbitopatii EUGOGO (European Group on Graves orbitopathy) (9) a kterou s malými úpravami doporučuje i ATA (American Thyroid Association) (26). Vychází z oddělené klasifikace aktivity a závažnosti TAO.

Tyto klasifikace nejsou samoúčelné – dle nich se řídí strategie léčby. Pro určení aktivity je používán upravené Mouritsovo skóre klinické aktivity CAS z r. 1989 - původně 10-ti bodové, po úpravě byly vypuštěny 3 body (viz tabulka č.1). Za aktivní je považováno onemocnění s přítomností alespoň 3 bodů.

Hodnocení závažnosti TAO je uvedeno v tabulce č. 2. Proptózu očních bulbů měříme Hertelovým exophthalmometrem – horní limit je závislý na pohlaví a rase (běloši: ženy 19 mm a muži 21 mm, afroameričané: ženy 23 mm a muži 24 mm, asiati: ženy 16 mm a muži 17 mm – Thajci nebo 18,6 mm – Číňané).

Tabulka č. 1: Skóre klinické aktivity TAO dle EUGOGO 2008

Skóre klinické aktivity TAO dle EUGOGO 2008
<ul style="list-style-type: none">- spontánní retrobulbární bolest- bolest při pohledu nahoru či dolů- zarudnutí víček- zarudnutí spojivky- otok víčka- zánětlivý otok karunkuly- otok spojivky

Za přítomnost každého příznaku 1 bod

Aktivní TAO ≥ 3 body

Tabulka č. 2: Klasifikace závažnosti TAO dle EUGOGO 2008 a ATA 2011

	Lehká	Střední až těžká	Zrak ohrožující
Vliv na kvalitu života	malý	významný	významný
Retrakce víčka	<2 mm	≥2 mm	-
Postižení měkkých tkání	mírné	střední až těžké	-
Proptóza	<3 mm	≥3 mm	-
Diplopie	žádná nebo intermitentní	nekonstantní nebo konstatní	-
Postižení rohovky	není	lehké	těžké
Postižení n. opticus	není	není	komprese

5. Patogeneze tyreoidální orbitopatie

Zatímco patogeneze Graves-Basedowovy nemoci je jasná – jde o stimulaci receptoru pro TSH autoprotilátkou – patogeneze postižení pojivové tkáně očnice (TAO) a podkoží (pretibiální myxedém) je mnohem méně objasněná.

Všeobecně je akceptováno, že se jedná o autoimunitní onemocnění. Významnou roli zde zřejmě hraje přítomnost společného antigenu mezi štítnou žlázou a tkáněmi orbity, konkrétní antigen však není znám. Potenciálním antigenem je TSH receptor či některá jeho část. V časných stádiích onemocnění stoupá produkce protilátek proti TSH receptoru (TRAK, TSH-Rab) – jejichž hladiny u většiny pacientů (ne vždy) korelují s aktivitou TAO (27,28), jsou ale i případy TAO s negativními TRAK.

Dalšími možnými antigeny, které mohou hrát roli, jsou receptor pro inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-I), 1D protein, G2s protein, kolagen typu XIII či tyreoglobulin (29).

Tento antigen je rozpoznáván autoreaktivními T- lymfocyty, které migrují do štítné žlázy a okoohybných svalů. Po rozpoznání antigenu dochází k sekreci cytokinů T-lymfocyty CD4+, dále pak k aktivaci CD8+ T-lymfocytů a B-lymfocytů s následnou produkcí autoprotilátek. Cytokiny rovněž vedou k proliferaci fibroblastů a produkci glykosaminoglykanů (GAG) – chondroitinsulfát B a chondroitinsulfát C – s následným zadržováním vody v tkáních orbity (fibroblasty v orbitě nepocházejí z mezenchymu, ale jsou derivovány z neurální lišty, proto se patrně chovají odlišně). Dochází tak ke zvětšení objemu orbitálních tkání, k vytlačování očních bulbů (exophthalmu) a vzhledem k ohraničení retrobulbárního prostoru kostěnou orbitou hrozí komprese zrakového nervu. Zároveň dochází k prosáknutí a rozšíření okoohybných svalů (klinicky se projeví diplopií či deviací očních bulbů). Z periferní krve je na glykosaminoglykany vychytáván tyreoglobulin, na něj se váží autoprotilátky, což je patrně další mechanismus udržující aktivitu TAO.

5.1. Genetika

Genetická predispozice onemocnění byla jasně doložena. Studie s jednovaječnými dvojčaty(30) zjistila 35% konkordanci Basedowovy choroby a výsledky ukazují na 79% genetickou podmíněnost vzniku nemoci. Současné poznatky ukazují na úlohu pěti genů:

CD40, cytotoxického T lymfocytárního antigenu-4 (CTLA-4), proteinu tyrozin fosfatázy-22 (PTPN-22), HLA-MHC a genů asociovaných s chromozomem X.

CD40

Patří do superrodiny receptorů pro tumor necrosis factor (TNF) a byl původně identifikován jako důležitý receptor pro aktivaci B-lymfocytů při vzniku humorální imunitní odpovědi(30). Později byl zjištěn na povrchu mnoha buněk, včetně tyreocytů(31) a orbitálních fibroblastů(32).

Vzájemné působení mezi tyreocyty nebo fibroblasty orbity na jedné straně a infiltrujícími lymfocyty na straně druhé tak může být zprostředkováno molekulárním mostem CD40–CD40L. Orbitální fibroblasty nemocných s Graves-Basedowovou chorobou proliferují při inkubaci s autologními T-lymfocyty a tento efekt je závislý na dráze CD40-CD154(33). Působení CD-40 vede k buněčné aktivaci upregulací specifických genů, včetně těch, kódujících interleukin 6 a 8, prostaglandin H syntázu-2 (PGHS-2) a ke zvýšené tvorbě hyaluronanů. Všechny tyto faktory mají význam v patogenezi TAO (33).

Polymorfismus jednoho nukleotidu C/T v netranslační oblasti genu pro CD40 je spojen s vyšším výskytem Graves-Basedowovy choroby(34). Zdá se, že tento polymorfismus zvyšuje expresi CD-40 na povrchu buněk a vede tak k jejich větší aktivaci během tkáňového poškození a tím predisponuje ke vzniku autoimunitního onemocnění.

Cytotoxický T lymfocytární antigen-4 (CTLA-4)

CTLA-4 kóduje negativní regulátor aktivace a proliferace lymfocytů. U myši vzniká po vyřazení tohoto genu letální lymfoproliferace. Polymorfismus jednoho nukleotidu (CT60) v genu pro CTLA-4 je spojen se zvýšenou vnímavostí ke vzniku Graves-Basedowovy choroby(35). Byl zjištěn význam i dalších polymorfismů tohoto genu A49G a aT-n. Saverino se spol.(36) zjistili, že hladina solubilního proteinu CTLA-4 je u nemocných s Graves-Basedowovou chorobou zvýšena.

Protein tyrozin fosfatáza-22 (PTPN-22)

Lymfocidní protein tyroxin fosfatáza (LYP, aka PTPN-22) představuje další negativní regulátor aktivace T-lymfocytů. Polymorfismus jednoho nukleotidu 620AT v genu PTPN-22, který kóduje LYP, byl zjištěn ve vyšší frekvenci u nemocných s autoimunitními chorobami včetně Graves-Basedowovy choroby(37). LYP inhibuje aktivaci T-lymfocytů tak, že defosforyluje kinázy spřažené s T-buněčným receptorem. Mutace vede ke zvýšení funkci

fosfatázy a tak k větší blokádě signálu.

Geny HLA třídy I

Antigeny HLA třídy II mají vztah k výskytu Graves-Basedowovy choroby. Kódují receptory na povrchu buněk, zúčastněné v prezentaci antigenu, stejně jako v selekci/deleci T-buněk v thymu.

Nedávno byla zjištěna úloha HLA antigenů třídy I. Simmonds se spol.(38) provedli analýzu genů DRB1, DQB1 a DQA1 u 871 nemocných s Graves-Basedowovou chorobou a 621 kontrol. Všechny tři lokusy byly asociovány s výskytem Graves-Basedowovy choroby. Podrobnější analýzou bylo zjištěno, že nejtěsnější vztah ke Graves-Basedowově chorobě má protein B74 lokalizovaný v exonu 2 lokusu DRB1. Je možné, že se přímo podílí na antigenní prezentaci u této nemoci.

Monosomie X chromozomu

U žen se vyskytuje autoimunitní postižení štítné žlázy asi desetkrát častěji než u mužů. Monosomie X-chromozomu, zvláště v buňkách imunitního systému jako jsou T a B lymfocyty, je častější u žen s autoimunitními chorobami štítné žlázy.

Častěji se také vyskytuje asymetrická inaktivace X-chromozomu (<80% inaktivace stejného chromozomu)(39). Tato asymetrická inaktivace může způsobit nedostatečnou expozici autoantigenů, kódovaných X chromozomem, v thymu(40).

5.2. Úloha cytokinů v patogeneze TAO

Interleukin 6 (IL-6) hraje velmi významnou roli v aktivaci a diferenciaci B-lymfocytů. Stimuluje syntézu imunoglobulinů a je nezbytný pro normální vývoj plazmatických buněk. Chen se spol.(41) zjistili, že produkce IL-6 byla výrazně stimulována interleukinem 1 β ve fibroblastech orbity, ale nikoliv ve fibroblastech získaných z jiných tkání. Stejná skupina prokázala, že interleukin 4 indukoval ve fibroblastech orbity gen pro 15-lipoxygenázu-1 a tím zvýšil produkci 15-hydroxyeicosatetraenové kyseliny (15-HETE) (42). Podobný účinek byl vyvolán i interleukinem 13, dalším Th2 cytokinem a byl specifický pro fibroblasty získané od nemocných s TAO. 15-HETE přitom může indukovat tvorbu vaziva.

Extracelulární proteolytické prostředí obklopující buňky určuje řadu molekulárních dějů, mimo jiné obrát extracelulární matrix a změnu molekul na povrchu buňky. Toto prostředí zahrnuje jak proteázy, tak jejich fyziologické inhibitory, jako tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP). TIMP-1 je odlišně regulovaná ve fibroblastech od nemocných s TAO interleukinem 1β , který zde způsobuje indukci genu zvýšením aktivity jeho promotoru (41).

5.3. Adipogenese

Součástí obrazu TAO je expanze orbitálního tuku. Orbitální fibroblasty a adipocyty exprimují receptor pro TSH ve tkáňové kultuře(43). Nabízí se proto, že proliferace tuku může být způsobena stimulací protilátkou proti tomuto receptoru. Zhang se spol.(44) zavedli do orbitálních fibroblastů pomocí retrovirového vektoru konstitučně aktivované receptory pro TSH (L629F a M453T). Přítomnost aktivovaného receptoru překvapivě vedla ke snížení buněčné proliferace a k rezistenci buněk na peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) indukovanou adipogenezu. V jiné studii(45) bylo prokázáno zvýšení exprese receptoru pro TSH po indukci adipogenese a tento receptor byl funkční, protože byl schopen zprostředkovat zvýšení cAMP po stimulaci TSH i autoprotiátkou. Diferenciace orbitálních fibroblastů v adipocyty může být způsobena infiltrujícími aktivovanými T-buňkami, které jsou schopny secernovat ligandy PPAAE- γ receptoru(46).

6. Léčba tyrepodální orbitopatie

Léčebné postupy u TAO záleží na stadiu a aktivitě onemocnění. Léčba je obvykle zdlouhavá, používané metody mají velké množství vedlejších účinků a v některých případech se ani při použití všech terapeutických možností nedaří dosáhnout cíle léčby. Cílem léčby TAO je v maximální možné míře zabránit poškození zrakových funkcí, nebo již v případě jejich postižení, jejich reparace. K zabránění progresu je nutné zklidnit autoimunitní zánětlivý proces v orbitách..

Při léčbě TAO je nezbytná psychologická příprava pacienta – je nutné jej připravit zejména na dlouhé trvání choroby, vysvětlovat nutnost časové posloupnosti jednotlivých kroků, aby zdlouhavostí léčby nebyla zhoršena jeho compliance.

Z režimových opatření jsou nutné intervence směřující k zanechání kouření . Kouření je jedním z mála ovlivnitelných faktorů, podílejících se na vzniku TAO a majících nepříznivý vliv na průběh onemocnění (jak již bylo uvedeno v kapitole 3.1.). Pacientům je tedy třeba důrazně doporučit nekouřit, což platí zejména v akutních stádiích onemocnění. Při vysoké aktivitě onemocnění je nezbytná pracovní neschopnost.

Lokální léčba. Spojivku a rohovku chráníme, zejména při lagofthalmu kapkami či mastmi. Doporučuje se vyhýbat se prašnému prostředí, chránit oči tmavými brýlemi. Diplopii lze někdy korigovat prismatickými skly či použitím matového skla vyřadit jedno oka, čímž je pacientům s těžkou diplopií usnadněna orientace v prostoru. V případě zvýšeného nitroočního tlaku je nutná terapie antiglaukomatiky (zvýšený nitrooční tlak je většinou sekundárního původu při retrobulbárním přetlaku či v důsledku “klešťového mechanismu” při postižení okoohybných svalů). .

Normalizace tyreoidální funkce. Pacienty s TAO je třeba udžovat v eutyreóze, odchylky tyreoidální funkce mohou způsobit zhoršení orbitopatie. Protože u pacientů s TAO se nejčastěji setkáváme s hyperfunkcí štítné žlázy (na podkladě Graves-Basedowovy nemoci), máme k dispozici tři léčebné metody k dosažení eutyreózy. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.2., jedná se o medikamentózní léčbu tyreostatiky, chirurgickou léčbu – tj. provedení totální tyreoidektomie a léčbu radioaktivním jodem. Vzhledem k možnosti zhoršení očních obtíží po léčbě radiojodem (jak bylo rovněž uvedeno v kapitole 3.2.), je doporučeno u pacientů se středně závažnou a závažnou orbitopatií vyhnout se podání radiojodu v tyreostatických dávkách a dát přednost léčbě medikamentózní či chirurgické (9).

6.1. Glukokortikoidy

Jsou indikovány u pacientů s aktivní formou střední a těžké TAO. Již řadu let se jedná o léčebnou metodu první volby. Při terapii je využíváno nescifických protizánětlivých a imunosupresivních účinků kortikoidů. Kortikosteroidy mají prokazatelně příznivý efekt na průběh onemocnění. Podání je možné perorálně či intravenózně, při vědomí známých nežádoucích účinků této terapie. Při perorální léčbě se dlouhodobě podává nejčastěji prednison či metylprednisolon. Potřebné dávky se řídí závažností a aktivitou onemocnění, v akutní fázi je podáváno obvykle 0,5-1 mg prednisonu na kg hmotnosti pacienta denně (či ekvivalent jiného steroidu) po dobu nejméně 2-3 měsíců, poté při ústupu známek aktivity jsou obvykle dávky postupně snižovány, až do úplného vysazení. Podávání je nutné dlouhodobé. Intravenózně se podávají kortikosteroidy v pulzech – nejčastěji metylprednisolon ve vysokých dávkách (0,5-1,0 g), na tuto léčbu navazuje dlouhodobá léčba nízkými dávkami perorálních kortikosteroidů. Existují různá dávkovací schemata, která se liší velikostí jednotlivé dávky, četností podání a intervaly mezi dávkami. Zatím neexistují velké studie, které by spolehlivě zodpověděly na otázky, týkající se optimálního dávkování vzhledem k účinnosti a výskytu nežádoucích účinků.

Ve dvou randomizovaných studiích byla prokázána vyšší účinnost intravenózního podání glukokortikoidů před podáním perorálním (47, 48). Toto bylo rovněž potvrzeno v metaanalýze z roku 2009 (49). U pacientů, léčených kortikoidy intravenózně došlo k většímu poklesu klinického skóre aktivity (CAS), a to zejména u těch, kteří měli před započítím léčby skóre vysoké (v celém souboru byl rozdíl CAS $-0,64$, u nemocných, kteří měli vstupně CAS >5 byl rozdíl $-0,86$). Způsob podávání kortikoidů ale neovlivnil exoftalmus, diplopii, vzdálenost víček a visus.

Při intravenózním podání glukokortikoidů bylo zaznamenáno méně nežádoucích účinků, než při podání perorálním (47,48,49,50). Byly však popsány i závažné nežádoucí příhody při podání intravenózních pulzů kortikoidů, včetně hepatotoxicity, kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních příhod (51,52). Zdá se, že riziko se zvyšuje při dávce vyšší než 0,5 g methylprednisolonu v jednu pulzu (53) a při kumulativní dávce vyšší než 8,5 g methylprednisolonu (54).

Nedávno EUGOGO publikovala výsledky velké multicentrické kontrolované studie, hodnotící účinnost a bezpečnost tří různě velkých kumulativních dávek methylprednisolonu

(55). Do studie bylo zahrnuto 157 pacientů z 8 evropských center, kterým byly podávány pulsy metylprednisolonu v průběhu 12 týdnů v různých kumulativních dávkách (nízká dávka - 2,25 g, střední dávka – 4,98 g, vysoká dávka 7,47 g metylprednisolonu). Tato studie znovu potvrdila, že intravenózní podání glukokortikoidů je léčbou efektivní. Po léčbě pokleslo klinické skóre aktivity (CAS) nejméně o 2 body u 81% pacientů ve skupině s vysokou dávkou, u 83% ve skupině se střední dávkou, ale signifikantně méně ve skupině s nízkou dávkou – 58%. Na konci léčby byla zjištěna nulová aktivita onemocnění u 60 % pacientů s vysokou dávkou kortikoidů, u 65% pacientů se střední dávkou a u 45% s nízkou dávkou. Kvalita života se zlepšila ve všech třech skupinách, ale nejvýrazněji ve skupině s vysokou dávkou. Ve skupině s vysokou dávkou metylprednisolonu došlo rovněž k signifikantnímu zlepšení motility očních bulbů. Nicméně ve skupině léčené vysokou dávkou metylprednisolonu byl zaznamenán vyšší výskyt nežádoucích účinků. Jednotlivé případy progresu TAO, včetně výskytu neuropatie optiku byly zaznamenány ve všech třech skupinách.

Lokální terapie (retrobulbární injekce kortikoidů) byla hodnocena ve studii, ve které bylo srovnáváno 25 pacientů léčených retrobulbární injekcí triamcinolonu – výsledek byl srovnáván se skupinou 25 pacientů léčených placebem (56). U pacientů léčených retrobulbární aplikací triamcinolonu došlo ke zlepšení perimetru, diplopie a poklesu šířky okohybných svalů, měřených na CT, oproti skupině léčené placebem. Nicméně vzhledem k relativně nízkému efektu léčby a riziku poranění očního bulbu je lokální terapie kortikoidy využívána jen při absolutní kontraindikaci systémového podání kortikoidů. (57).

6.2. Zevní iradiace orbit

Zevní ozáření orbity je další léčebnou možností TAO, používanou však méně. Přesný mechanismus radioterapie není dosud objasněn. Předpokládá se, že se jedná o nespecifický protizánětlivý efekt – ozáření vede k supresi radiosenzitivních lymfocytů a fibroblastů infiltrujících orbitu, dochází ke snížení produkce glykosaminoglykanů.

Tři studie (58-60) porovnávaly výsledek radioterapie s kontrolami (slepým ozařováním). Dvě z těchto studií (58,59) prokázaly pozitivní efekt radioterapie, kdy u pacientů, kteří podstoupili radioterapii, došlo k sigifikantnímu zlepšení motility očních

bulbů, ústupu diplopie a ústupu otoků víček. Terapie však měla jen minimální efekt na exophthalmus. Narozdíl od výsledků těchto dvou studií, třetí jmenovaná studie (60) neprokázala žádný efekt radioterapie na průběh TAO.

Ve dvou sestavách byl porovnáván výsledek radioterapie a léčby perorálně podávanými kortikoidy s kortikoidy v monoterapii – rovněž podávanými perorálně(61,62) a v jedné práci se samotou radioterapií(63). Kombinovaná léčba přinesla lepší výsledky. Exoftalmus a visus se u obou skupin na konci terapie nelišily. Studie, které by porovnalý efekt intravenózně podávaných kortikoidů a radioterapie, nebyly dosud provedeny.

Posouzení efektu zevní iradiace orbit u pacientů s TAO je rovněž věnována nedávno publikovaná zpráva Americké ophthalmologické akademie (64) a review italských autorů (65). Dle těchto prací nedosahuje zevní ozáření orbit takového efektu jako léčba kortikoidy. Nicméně vzhledem k její bezpečnosti a dobrému efektu na některé příznaky TAO (zejména motilitu očních bulbů), je považovaná tato léčba za přínosnou, zejména v kombinaci s léčbou glukokortikoidy. Radioterapie orbit je kontraindikována u pacientů s diabetickou retinopatií nebo těžkou hypertenzí. Neměla by být používána u pacientů mladších 35 let (9).

V současné době se nejčastěji používá lineární urychlovač s ozářením z bočních polí. Celková dávka ozáření je obvykle 20 Gy, podávaná v deseti frakcích po 2 Gy v průběhu dvou týdnů. Dvě studie zkoumaly vliv snížení dávky radioterapie. V první byly porovnávány výsledky 16 a 26 Gy(66) a ve druhé 10 a 20 Gy(67). V obou sestavách byl efekt nižší dávky srovnatelný s dávkou vyšší.

Výskyt nežádoucích účinků je nízký, dříve častá katarakta se nyní vyskytuje vzácně, a to díky lepšímu cílení záření a jeho frakcionaci. Nebyl prokázán vyšší výskyt tumorů po ozáření. Použití radioterapie v léčbě TAO při respektování kontraindikací je v současné době považováno za bezpečné (68).

6.3. Cyklosporin

Autoimunitní původ TAO vedl k použití klasických imunosupresív – zkušenosti s cyklofosfamidem či methotrexátem jsou kontroverzní. Využití těchto imunosupresív zatím nebylo systematicky zkoumáno. V literatuře jsou popsány jen jednotlivé případy pacientů s rezistentní TAO, léčených těmito imunosupresívami (69,70).

Dalším slibným imunosupresivem se zdál být cyklosporin. Cyklosporin inhibuje proliferaci Th lymfocytů a produkci cytokinů, zabraňuje aktivaci cytotoxických T lymfocytů a suprimuje tvorbu protilátek. Cyklosporin je využíván zejména u transplantovaných pacientů či u pacientů s těžkými autoimunitními chorobami. Při léčbě pacientů s TAO však nelze zanedbávat jeho nežádoucí účinky – zejména jeho potenciální nefrotoxicitu - při léčbě je nutné pravidelné sledování renálních funkcí. Nelze opominout ani finanční náročnost léčby.

Cyklosporin v monoterapii TAO má minimální efekt, ale může hrát pozitivní roli v kombinaci s glukokortikoidy u pacientů, kteří neodpovídají na léčbu samotnými kortikoidy. V randomizované studii (71) vyšla monoterapie kortikoidy lépe než léčba samotným cyklosporinem. Tento fakt byl potvrzen v jiné sestavě (72), kde monoterapie prednisonem v dávce 60 mg měla po 12 týdnech lepší výsledky než cyklosporin v dávce 7,5 mg/kg/den. Kombinovaná terapie cyklosporinem a kortikoidy potom přinesla zlepšení u značné části pacientů, u nichž nebyla monoterapie dostatečně účinná.

6.4. Somatostatinová analoga

V orbitách nemocných s aktivní formou TAO bylo zjištěno vysoké vychytávání značeného octreotidu. Toto zjištění poukázalo na možnost využití somatostatinových analog k léčbě TAO (samostatný somatostatin není pro svůj krátký poločas k léčbě vhodný, v praxi jsou používána analoga somatostatinu – octreotid a lanreotid). Přesný mechanismus působení analogů somatostatinu není zatím spolehlivě vysvětlen. Jedním z možných mechanismů může být přímá inhibice působení IGF-1. Druhým mechanismem pak inhibice uvolnění cytokinů a zánětlivých mediátorů T lymfocyty. Analoga somatostatinu mohou rovněž působit přímo na cílových buňkách přes specifické buněčné receptory.

Léčebné užití analog somatostatinu u TAO bylo poprvá popsáno v roce 1992 Changem a spol. (73), kdy byl podáván octreotid šesti pacientům v dávce 0,1 mg subkutánně 3x denně po dobu tří měsíců. Při léčbě došlo ke zlepšení zánětlivých změn měkkých tkání a ústupu postižení okohybných svalů. Při léčbě byl rovněž prokázán pokles močové extrakce glykosaminů. Jednalo se o nekontrolovanou studii. V nerandomizované studii z roku 1995 (74) Krassas a spol. pozorovali příznivou odpověď na léčbu octreotidem v dávce 0,1 mg subkutánně 3x denně po dobu 3 měsíců u sedmi z dvanácti pacientů s aktivní TAO. Tento

příznivý efekt byl u pacientů, kteří měli před léčbou pozitivní octreoscan.

Výsledky zjištěné v randomizovaných, dvojitě slepých studiích však nebyly jednoznačné (75-78). Některé neprokázaly žádný efekt (75,76), v jedné studii došlo překvapivě ke zmírnění exoftalmu (77), další prokázala snížení CAS (78). Při metaanalýze těchto studií (49) byl prokázán při spojení všech publikovaných dat pokles CAS (-0.63). Diplopie, exoftalmus a vzdálenost víček se neměnily.

Analoga somatostatinu mají tedy při léčbě TAO jen omezený význam.

6.5. Intravenózní imunoglobuliny

Intravenózní imunoglobuliny jsou s úspěchem užívány u řady autoimunitních chorob (myasthenia gravis, membranózní glomerulonefritida, idiopatická trombocytopenická purpura). Jejich léčebný efekt spočívá v inhibici aktivace komplementu a cytokinů, poskytují antiidiotypové protilátky, blokují Fc receptor a působí na T a B lymfocyty.

Léčba intravenózními imunoglobuliny byla porovnáována s léčbou perorálními kortikoidy v randomizované studii (79) – po dobu 20 týdnů byly 21 pacientům podávány imunoglobuliny v dávce 1 g/kg tělesné hmotnosti intravenózně – ve 2 následujících dnech, každé 3 týdny (celkem 6 cyklů). Kontrolní skupina 20 pacientů dostávala po celou dobu kortikoidy perorálně (prednisolon v úvodní dávce 100 mg/den). Úspěšnost léčby byla v obou skupinách srovnatelná (62% ve skupině léčené imunoglobuliny, 63% ve skupině léčené glukokortikoidy).

V kontrastu s těmito výsledky následně publikována práce – Seppel et al. (80) neprokázala signifikantní zlepšení u 10 pacientů léčených 4 g intravenózních imunoglobulinů, podávaných 5 dní po sobě, celkem 5x ve 4-týdenních intervalech.

V nerandomizované prospektivní studii (81) byl hodnocen efekt intravenózních imunoglobulinů a glukokortikoidů u 34 pacientů. Procento pacientů odpovídajících na léčbu se nelišilo v obou skupinách (76 % ve skupině léčené imunoglobuliny, 66% ve skupině léčené glukokortikoidy), nežádoucí účinky léčby byly vyšší ve skupině léčené kortikoidy.

Vzhledem k vysoké ceně, není léčba intravenózními imunoglobuliny příliš používaná. Vzhledem k minimu nežádoucích účinků může být optimálním řešením při výskytu těžké formy TAO u dětí či gravidních žen.

6.6. Rituximab

Rituximab (RTX) je humanizovaná chimérická monoklonální protilátka proti CD20, jejíž variabilní (antigen vázající) doména je myšího původu. Vazba RTX na antigen CD20 blokuje aktivaci a diferenciaci B lymfocytů, protože protein CD20 je exprimován na povrchu pre-B a zralých B lymfocytů, ale ne na kmenových buňkách, pro-B lymfocytech a plasmatických buňkách. Účinek rituximabu tedy spočívá v redukci počtu CD20 pozitivních B lymfocytů. Terapie rituximabem byla původně schválena pro léčbu non-Hodgkinových lymfomů vycházejících z B-buněk, postupně byl Rituximab použit i u dalších autoimunitních nemocí, jako např. u revmatoidní artritidy, systémového lupus erythematoses či idiopatické trombocytopenické purpury, kde byla rezistence na jinou terapii.

Protože Graves-Basedowova choroba je autoimunitní onemocnění, zprostředkované rovněž do značné míry B-buněčnou autoimunitou, byl i u této nemoci předpokládán pozitivního efekt léčby Rituximabem – snížením počtu CD20 pozitivních B lymfocytů dojde k redukci počtu antigen prezentujících buněk, zároveň pak dojde ke snížení hladin cirkulujících protilátek (TRAK), produkovaných těmito buňkami.

Nejprve byli léčeni tři nemocní s TAO (82, 83) s příznivým efektem na aktivitu choroby. Následná otevřená studie (84) přinesla povzbudivé výsledky. Pacienti dostávali Rituximab 1000 mg i.v. dvakrát v dvoutýdenním intervalu. Rituximab byl velmi dobře tolerován. Všichni pacienti měli periferní depleci B lymfocytů po první infúzi rituximabu. Jakkoliv RTX neovlivnil hladinu protilátek a neodstranil hypertyreózu, snížil statisticky významně klinické skóre activity u pacientů s TAO (více než intravenózně podané glukokortikoidy), měl prokazatelně příznivý vliv na exoftalmus a rovněž snížil frekvenci relapsů.

Následovala randomizovaná studie (85), která potvrdila, že RTX nesnižuje výrazně protilátky u nemocných s jejich vysokou hladinou, ale může navodit trvalou remisi u nemocných s málo aktivní nemocí. Podobné výsledky přinesla i další studie (86). Tyto však nebyly zaměřeny na TAO (pouze na průběh Graves-Basedowovy nemoci).

V současné době probíhají 3 randomizované kontrolované studie – v Itálii je porovnáván efekt rituximabu s intravenózními glukokortikoidy, v USA probíhá studie srovnávající rituximab s placebem, ve Švédsku pak studie srovnávající efekt kombinované léčby rituximab + metotrexát s kombinovanou léčbou perorálními glukokortikoidy + metotrexátem. Tyto studie by měli objasnit, zda lze skutečně považovat rituximab za efektivní léčebnou metodu u pacientů s TAO (87).

6.7. Oftalmochirurgické zákroky. Dekomprese orbit

V případě zrak ohrožující neuropatie je na místě dekompresní operace (9)

Akutními indikacemi dekompresní operace jsou: ulcerace rohovky, hrozící perforací, neuropatie optiku, která se projevuje zhoršením zrakové ostrosti, výpady zrakového pole či změnami na VEP (vizuální evokované potenciály). Dalšími indikacemi jsou: luxace bulbů víčky, orbitální městnání a velká protruze, činící obtíže díky lagofthalmu nebo způsobující kosmetický defekt.

Cílem dekompresní operace je zvětšení objemu orbity a tím snížení přetlaku v očnici (při TAO dochází ke zvětšení objemu retrobulbárních tkání v neměnném prostoru kostěné orbity). Parciální odstranění kostěné stěny orbity vytváří více prostoru, čímž dojde ke snížení retrobulbárního tlaku, zlepšení prokrvení s snížení ischemie tkání,

Z popisného hlediska je možno dekompresní operace třídit dle lokalizace dekomprese (laterální, spodní, mediální, horní), podle počtu stěn orbity, na kterých byla dekomprese provedena, či dle operační techniky (endoskopicky či chirurgickým přístupem). Čím větší je počet stěn, tím větší je efekt dekomprese, ale též větší počet nežádoucích účinku (88,89). Po dlouhá léta byla nejčastěji používanou metodou metoda dle Ogury-Walsh (publikována v r. 1954), kdy je transantrálním přístupem odstraněna část spodní stěny orbity mediálně od 2. větve trigeminu a mediální stěna orbity s důrazem na uvolnění zvláště ve vrcholu očnice. Při tomto postupu byl vynikající efekt nejen na ústup protruze, ale i při neuropatii optiku. Operace však nese riziko diplopie, infekce a poškození infraorbitálního nervu s následnou necitlivostí tváře a části rtu.

V současné době je nejčastěji používanou technikou endoskopická endonasální dekomprese, kdy je očnice uvolňována do ethmoidálních sklípků. Výhodou tohoto přístupu je větší šetrnost, lepší přístup do hrotu orbity a méně vedlejších příznaků. Efekt na ústup protruze bývá výborný, pooperační diplopie obvykle jen přechodná (90).

Dekompresní operace nezasahuje do patogenetických mechanismů nemoci, je ji nutno chápat pouze jako léčbu symptomatickou, v případě aktivity onemocnění je nutné i při užití dekomprese pokračovat v imunosupresivní terapii.

K dalším oftalmochirurgickým zákrokům patří korekční operace víček a úprava strabismu při diplopii. Tyto postupy je možno provádět pouze v případě již zcela vyhaslého autoimunitního procesu (tj. nulové skóre CAS, fibrotizované okoohybné svaly dle zobrazovacích metod). Pokud jsou výkony provedeny v terénu aktivního procesu, je pacient

ohrožen recidivou obtíží. Korektivní zákrok je nejčasteji nutný na m. rectus medialis a m. rectus superior, ojediněle na m. rectus lateralis. Zákroky na víčkách jsou prováděny s cílem překrytí rohovky víčkem – obvykle se jedná o přetěti Müllerova svalu. Při blefarochaláze (duplikatura povolené kůže horního víčka se přesouvá na řasy a vadí v zorném poli) bývá nutné provedení blefaroplastiky.

6. 8. Ablace štítné žlázy

V patogenezi TAO hraje důležitou úlohu antigen společně sdílený tkáněmi orbity a štítnou žlázou. Odstranění antigenu štítné žlázy cestou totální tyreoidiektomie a ablace zbytků radiojodem se proto zdá být logickým krokem, dlouho praktikovaným v naší zemi pod vlivem Motolské školy. V sestavě z roku 2005(91) nevedla totální tyreoidiektomie k lepším výsledkům léčby středně těžké TAO než subtotální tyreoidiektomie a byla spojena s více nežádoucími účinky. Naproti tomu novější sestava(92) prokázala lepší výsledky za 9 měsíců po operaci u nemocných po totální tyreoidiektomii.

6.9 Aferetické metody

Použití plazmaferézy v léčbě TAO vychází z představy, že odstranění imunoglobulinů či imunitních komplexů, hrajících důležitou roli v patogenezi onemocnění bude mít příznivý efekt na průběh choroby, tak jako je to pozorováno u jiných autoimunitních nemocí.

Za počátek používání plazmaferézy, jako moderní léčebné metody, je možno považovat padesátá léta minulého století, kdy byla plazmaferéza použita při léčbě hyperviskozního syndromu u Waldeströmovy makroglobulinémie. Při plazmaferéze je využíváno rozdílné specifické hmotnosti jednotlivých krevních složek a tím jejich oddělení centrifugací. Při výměnné plazmaferéze se odebraná plazma nahrazuje náhradními roztoky - krystaloidy (fyziologický roztok, Ringerův roztok) nebo koloidními roztoky (albumin, čerstvá zmražená plazma). Hlavním cílem léčebné výměnné plazmaferézy je odstranění patologických látek v plazmě (autoprotilátek, aloprotilátek, imunokomplexů, monoklonálních proteinů) nebo odstranění nadměrně zmnožených fyziologických součástí plazmy (cytokinů,

interleukinů, TNF alfa, solubilních adhezních molekul, složek komplementu atd.) a tím zlepšení klinického stavu nemocných. K rozšíření této léčebné metody došlo především v osmdesátých letech minulého století – tehdy začala být využívána v různých medicínských odvětvích, zejména při léčbě onemocnění revmatologických, hematologických, neurologických, kožních, metabolických a ledvinových.

Z tohoto období pochází několik prací o použití této léčebné metody u pacientů s TAO. U řady prací byly výsledky velmi povzbudivé, jiné studie efekt plazmaferézy neprokázaly.

Příznivý efekt byl popsán v první práci, referující o této léčebné metodě (93), kde u 4 ze 7 pacientů s rychle progredující TAO došlo k výraznému zlepšení průběhu onemocnění. Neúspěch léčby u 3 nemocných byl vysvětlován dlouhým průběhem nemoci s fibrotickými změnami. Následně Glinoyer et al. publikovali výsledky léčebného použití plazmaferézy u 9 pacientů (94). Ti byli léčeni 4 cykly plazmaferézy v průběhu 5-8 dní, s následnou 3-6 měsíční léčbou prednisolonem a azathioprimem. K významnému klinickému zlepšení došlo u 8 z 9 pacientů. V jiné práci bylo poukázáno na příznivý efekt plasmaferézy v kombinaci s kortikoidy – u pacientů byl příznivější průběh onemocnění, dale pak menší počet relapsů po ukončení imunosuprese (95). Povzbudivé výsledky jsou dokumentovány i v další práci z r. 1990 (96). Naopak neuspokojivý efekt plazmaferézy je referován jinými autory (97, 98). Atabay et al. prokázali pokles protilátek proti okohybným svalům v průběhu léčby plazmaferézou (což vychází z principů metody), vliv na průběh onemocnění však nebyl hodnocen (99). Práce z roku 1987 – Yamamoto et al., hodnotila efekt plasmaferézy na ulcerace rohovky a protruzi bulbu, efekt byl však jen přechodný (100).

Žádná ze studií, posuzující efekt plazmaferézy, bohužel není randomizovaná ani kontrolovaná, interpretace výsledku je navíc obtížná, vzhledem k současně použitým dalším léčebným metodám (glukokortikoidy, azathioprim, cyklofosfamid).

Další zdokonalení aferetických metodik vedlo ke snaze o specifitější odstranění patogeneticky účinných substancí, nové metody jsou dnes s úspěchem používány u řady onemocnění (101,102). Dříve používaná standardní výměna plazmy s řadou nevýhod (není selektivní, možnost přenosu infekce při náhradě odebrané plazmy) je v současné době nahrazována selektivnějšími a bezpečnějšími metodami – např. membránovou diferenční filtrací (103), hemoreoferézou (104) či specifickou imunoabsorpční.

Jediná publikovaná práce s použitím nových metod popisuje příznivý efekt imunoabsorpce u 2 případů refrakterní TAO (105). Oba pacienti (58-letý muž a 50-letá žena) měli za sebou delší historii trvání těžké formy TAO, oba podstoupili řadu léčebných procedur

(iv. pulzní léčba kortikoidy, ozáření orbit, chirurgická léčba, azathioprim), bez výraznějšího efektu na průběh TAO a s výskytem závažných nežádoucích účinků. U pacientů byla tedy zahájena léčba pomocí imunoabsorpce – oba podstoupili úvodní cyklus 6 procedur ve dvou po sobě následujících týdnech, dále pak udržovací léčbu, s postupně se prodlužujícími intervaly mezi procedurami (2-3 procedury za týden s odstupem 2-7 týdnů). Oba pacienti pocítili signifikantní zlepšení obtíží již po úvodním cyklu a udávali zlepšení kvality života po provedení několika procedur. Efekt léčby byl potvrzen při vyšetření oftalmologem. U obou pacientů došlo k ústupu diplopie a zlepšení motility bulbů. Ani u jednoho pacienta nedošlo k relapsu onemocnění po ukončení léčby. Při stanovení hladin protilátek (TRAK, anti TPO, anti TG) nebyl po provedení imunoabsorpce prokázán signifikantní pokles.

Tato práce nás inspirovala k navržení výzkumné práce – ke zhodnocení efektu hemoreoferézy na průběh TAO.

7. Cíle dizertační práce

Cílem dizertační práce bylo:

- a) Prokázat příznivý efekt hemoreoferézy na průběh TAO u nemocných s velmi těžkou formou onemocnění (kritéria viz výše) a to randomizovanou studií: klasickým losováním randomizovat dvě skupiny pacientů – 10 pacientů léčených vysokými dávkami kortikoidů a 10 pacientů, léčených kombinací vysokých dávek kortikoidů a hemoreoferózou. Hlavními kritérii úspěšnosti léčby bylo: klinické skóre aktivity zjišťované před léčbou a za 1, 3 a 6 měsíců, dále vizuální evokované potenciály měřené před terapií, za 3 a za 6 měsíců a konečně změna exoftalmu a šířky okoohybných svalů zjištěné za základě CT vyšetření před léčbou, za 3 a za 6 měsíců.
- b) Sekundárním cílem bylo posoudit bezpečnost a snášenlivost vlastní modifikace léčebné metody, posoudit hematologické, reologické, imunologické a biochemické změny navozené touto terapií.

7.1. Pracovní hypotézy

1. Kombinovaná léčba vysokými dávkami kortikoidů a hemoreoferézou bude mít příznivější terapeutickou odpověď v porovnání s léčbou samotnými kortikoidy
2. Naše modifikace léčebné hemoreoferézy bude léčbou bezpečnou a dobře tolerovanou pacienty

8. Nemocní a metodika

8.1. Charakteristika nemocných

Do studie bylo zařazeno celkem 20 pacientů se závažnou TAO. Protokol studie byl schválen Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové a všichni nemocní podepsali informovaný souhlas. Podmínkou zařazení do studie byla aktivní (klinické skóre aktivity ≥ 3) a závažná TAO (exoftalmus, postižení okohybných svalů). Vyloučení byli nemocní mladší 18ti let, neschopní spolupracovat, s aktivní malignitou, diabetem, závažným postižením jater, nedostatečností ledvin, srdečním selháním, nekorigovanou hypertenzí, těhotné a kojící ženy. Vyloučení byli také pacienti s neuropatií optiku (postižení vizu, perimetru, závažné změny při vyšetření evokovaných potenciálů), kteří jsou podle současných guidelines indikováni k dekompresní operaci.

Charakteristiky zařazených nemocných jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. Všichni nemocní byli léčeni intravenózními pulzy glukokortikoidů – metylprednisolon v dávce 1 g v infúzi trvající 3 hodiny 3x týdně v 1. týdnu, 2.a 3. týden – metylprednisolon v dávce 0,5 g rovněž 3x týdně, v infúzi trvající 3 hodiny – tj. celkem 9 pulzů (kumulativní dávka 4,5 g). Deset náhodně vybraných pacientů bylo kromě stejné léčby glukokortikoidy léčeno navíc hemoreoferézou (celkem 10 procedur, v prvních dvou týdnech 2 procedury za týden, dále udržovací léčba –2 procedury jednou za 3 týdny).

Tabulka 1: Klinické charakteristiky nemocných zařazených do skupiny léčené hemoreoferézou a glukokortikoidy

nemocný	věk (let)	pohlaví	trvání choroby (měsíce)	kumulativní dávka prednisonu(g)	dekompresní operace	totální tyroidektomie
1	60	žena	16	11,4	ano	ano
2	50	žena	34	20	ano	ano
3	49	žena	66	40	ne	ano
4	48	žena	120	72	ano	ano
5	48	žena	16	7	ne	ano
6	41	žena	93	33	ne	ano
7	45	žena	6	7	ne	ano
8	39	žena	9	16	ne	ano
9	49	žena	60	30	ne	ano
10	50	žena	24	8	ne	ano

Tabulka 2: Klinické charakteristiky nemocných zařazených do skupiny léčené jen glukokortikoidy

nemocný	věk (let)	pohlaví	trvání choroby (měsíce)	kumulativní dávka prednisonu(g)	dekompresní operace	totální tyroidektomie
1	60	žena	17	10	ne	ano
2	50	muž	48	34	ano	ano
3	49	žena	11	2	ano	ano
4	48	žena	34	18	ne	ne
5	48	muž	11	6	ne	ano
6	41	žena	4	4	ne	ano
7	48	žena	16	8,7	ne	ano
8	39	žena	18	12	ne	ano
9	52	žena	70	58	ano	ano
10	59	žena	36	54	ne	ano

Medián trvání TAO byl 29 měsíců ve skupině léčené hemoreoferézou a 18,5 měsíce ve skupině kontrolní ($p=0,5$ při použití Mann-Whitney Rank Sum Testu). Medián kumulativní dávky Prednisonu byl 18 g ve skupině léčené hemoreoferézou a glukokortikoidy a 11 g ve skupině léčené pouze glukokortikoidy ($p = 0,52$ při použití Mann-Whitney Rank Sum Testu). Průměrný věk (47,9 a 49,4 let) se také nelišil statisticky významně ($p=0,59$ v t-testu).

8.2. Základní hematologické a biochemické parametry

Stanovení základních hematologických a biochemických parametrů bylo prováděno v rutinní klinické laboratoři naší Fakultní nemocnice standardizovanými metodami.

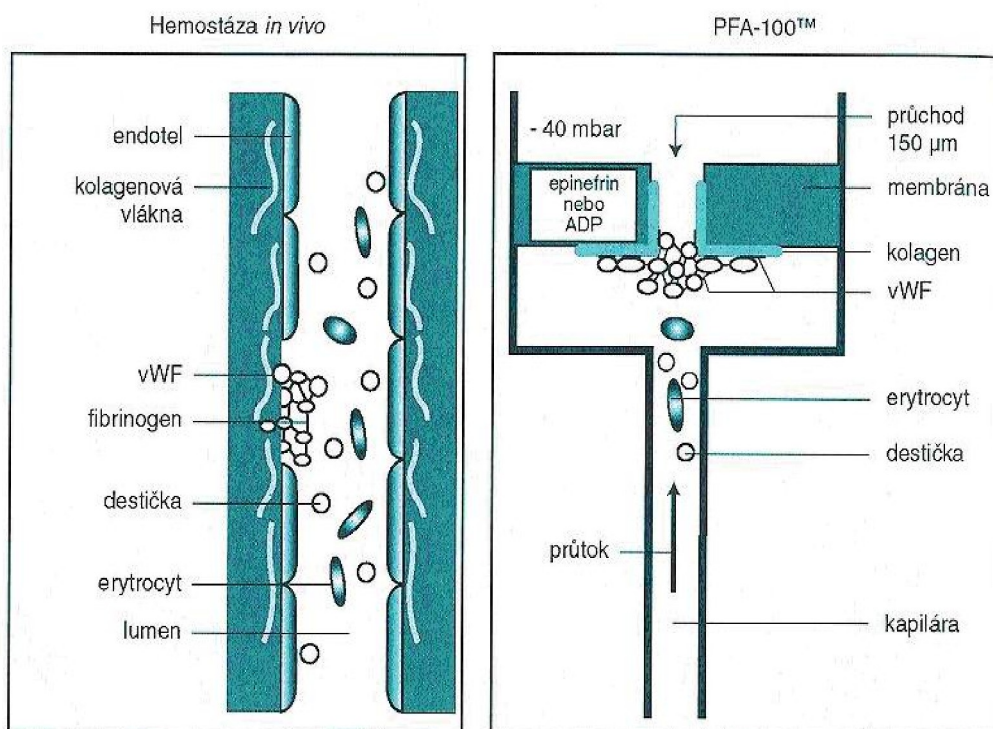
8.3. Specializovaná hematologická vyšetření

Vyšetření primární hemostázy a funkce destiček byla provedena analyzátozem Dade Behring PFA-100. (Marburg, Německo), který umožňuje měřit destičkami zprostředkovanou hemostázu z materiálu nesrážlivé, resp. citrátové krve.

Metoda napodobuje aktivaci destiček mechanickou zátěží a kolagenem *in vivo* (obr. č. 1). Použitá membrána v diagnostickém modulu je potažena kolagenem (COL), tedy proteinem, který se obecně považuje za iniciátor počáteční fyziologické aktivace trombocytů. Dále jsme použili modul s membránou potaženou adrenalinem, resp. epinephrinem (výrobce analyzátoru užívá označení epinephrin, EPI) nebo ADP, tedy dalšími fyziologicky významnými agonisty agregace trombocytů. Přítomnost těchto destičkových biochemických induktorů a vysoký stupeň střížných sil indukovaný standardizovaným průtokem krve kapilárou vede k destičkové adhezi, aktivaci a agregaci, tím se postupně vytváří stabilní destičkový trombus v mikroskopickém otvoru diagnostické kapiláry.

Výstupním parametrem je čas potřebný od aktivace primární hemostázy k uzavření diagnostické kapiláry destičkovým trombem, tzv. CT (closure-time), který je ovlivněn stavem destičkových funkcí (tabulka č. 3).

Obr. č 1: Princip hodnocení primární hemostázy pomocí analyzátoru PFA-100, legenda v textu. (převzato a upraveno dle Blažek se spol (106)



Tabulka č.: 3 Vyšetření primární hemostázy analyzátozem Dade Behring PFA-100 (převzato a upraveno Blažek se spol. (106); legenda v textu

POUŽITÝ MODUL	ČAS Norma COL/EPI: 82–150 s (3,2% citrátová krev) Norma COL/ADP: 62–100 s (3,2% citrátová krev)		
	zdravý jedinec	kyselina acetylsalicylová	von Willebrandův faktor
COL/EPI	normální	čas prodloužen	čas prodloužen
COL/ADP	normální	normální	čas prodloužen

8.4. Aktivita destičkových znaků a destičkové mikroagregáty, cirkulují endoteliální buňky

Vyšetřili jsme fluocytometricky změny destičkových markerů CD41 a tvorbu destičkových agregátů s leukocyty či erytrocyty s využitím exprese znaku CD45/CD41, dále počty trombocytárních agregátů s endoteliálními mikropartikulemi (EMP), základy metodiky viz v literatuře Blažek 2007 se spol. a Bláha 2009 se spol (106, 107)

Dále jsme zavedli metodu vyšetření cirkulujících endoteliálních buněk(CEC), jejichž stav odráží míru poškození endoteliální výstelky a ukazuje i jejich přímý vztah k angiogenezi. Metoda je založena opět na měření na průtokovém cytometru. Pomocí monoklonálních protilátek lze určit míru jejich zralosti, aktivace nebo apoptózy. Kvantifikace proběhla za pomoci fluorescenčních polystyrenových kuliček při sběru minimálně 500 000 buněk. Provedli jsme měření počtu EMP u kontrolní skupiny 15 zdravých lidí stejného věku - míra poškození endotelu je závislá i na věku a dalších faktorech (váha, kouření). Samotné EMP byly detekovány pomocí exprese CD105 a agregáty trombocytů s EMP na základě ko-exprese CD105 (endoglin) a CD41 (trombocytární marker).

8.5. Stanovení vitamínů

Stanovení vitamínu v séru a jednotlivých lipoproteinových frakcích proběhlo metodou plynové chromatografie jak bylo popsáno (108).

8.6. Protilátky

Protilátky proti receptoru proti TSH (TRAK) byly měřeny RIA metodou (Immunotech, Praha) a protilátky proti tyreoidální peroxidáze a tyreoglobulinu kvantitativně metodou ELISA.

8.7. Další vyšetření

Hladina solubilního antigen CD30 a solubilního proteinu Fas/Apo-1 (CD95) byly stanoveny metodou ELISA (Bender MedSystems GmbH, Rakousko); monocytární chemotaktický protein 1, p-selectin, ligand pro CD40, interleukin 10 a endoglin pomocí komerčního ELISA kitu (R&D Systems, USA); hladiny vysoce citlivého C-reaktivního proteinu, IgG, IgA and IgM byly měřeny imunonefhelometrickou analýzou na přístroji IMMAGE 800 (Beckman Coulter, USA). Hladiny IgE potom chemiluminescenční imunoanalýzou (Immulate, Siemens Coulter, U). Normální hladiny stanovení v naší laboratoři jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 4: Normální hodnoty speciálních parametrů zjištěných v naší laboratoři u 63 zdravých dárců krve (31 mužů) ve věku 34,5±9 let

	n	průměr	SD	jednotky
A2M	63	150,73	53,44	mg/dl
hsCRP	63	1,44	1,01	mg/l
IgM	63	1,52	0,72	g/l
IL-10	63	6,9	2,08	pg/ml
MCP-1	63	238,9	92,9	pg/ml
sAPO-Fas	63	841,1	407,4	pg/ml
sCD30	63	37	20,63	ng/ml
sCD40L	63	5978	2003	pg/ml
sPselektin	63	90,78	21,98	ng/ml
endoglin	63	4,88	0,95	ng/ml
věk	63	34,5	8,8	let

8.8. Protilátky proti očnímu svalu

(Eye Muscle Antibodies – EMA) svalu byly vyšetřeny naší vlastní metodou nepřímé imunofluorescence. Kryostatové řezy očních svalů (od zemřelého krevní skupiny 0, Rh-) byly inkubovány s vyšetřovaným sérem nemocného a po promytí ve druhém kroku s prasečí

protilátkou proti lidskému imunoglobulinu (SwaHu) značenou fluoresceinem. Po dalším promytí byla hodnocena intenzita fluorescence, odpovídající přítomnosti protilátek, které se navázaly na tkáň očního svalu. Hodnocení je semikvantitativní ve stupnici negativní tři stupně pozitivita od + do +++).

8.9. Vizuální evokované potenciály

Pacienti absolvovali následující sadu VEPů:

1. Pro ověření funkce parvocelulárního systému a primární zrakové korové oblasti (V1) bylo použito VEPs vyvolaných reverzací šachovnice (R-VEPs) – záměna černých a bílých čtverců šachovnice (velikost čtverců 40', 20', 10', kontrast 96% podle Michelsona, frekvence 2 reverzace/s), snímaných z centrální okcipitální oblasti (svod OZ). Hodnoceny byly parametry (latence a amplitudy) dominantního vrcholu P100.

2. K posouzení funkce magnocelulárního systému zrakové dráhy a asociačních zrakových center v mediotemporální kůře (V5) byly testovány „motion-onset“ VEPs při zrakové stimulaci pohybem (M-VEPs). Byly aplikovány tyto varianty stimulací:

a) Translační pohyb ($v = 10 \text{ deg/s}$) izolovaných nízkokontrastních čtverců (úhlová velikost 40', kontrast 10%, vzdálenost čtverců ve vertikální i horizontální rovině 120', perioda opakování 160') s pseudonáhodným směrem pohybu, který byl použit kvůli redukci adaptace směrově specifických neuronů.

b) Radiální pohyb kruhů

b1) celé zorné pole

b2) zamaskování centrálních 20°

b3) stimulace pouze centrálních 8°

střídavá „expanze/kontrakce“ (centrifugální/centripetální pohyb) koncentrické kruhové struktury. Rychlost pohybu kruhů 5 - 25 deg/s s konstantní temporální frekvencí 5 Hz v celém rozsahu stimulačního pole s použitím sinusoidální modulace kontrastu jež eliminuje výskyt vysokých prostorových frekvencí.

Všechny varianty zrakové stimulace pohybem využívaly nízkokontrastní strukturu (kontrast = 10% podle Michelsona), v zájmu selektivní stimulace magnocelulárního systému a dorzálního proudu zrakové dráhy - parvocelulární systém reaguje až při vyšších kontrastech. U všech pohybových stimulací byly dodrženy stejné časové podmínky (pohybová fáze 200 ms,

stacionární fáze 1s). Relativně dlouhou stacionární fází a krátkou fází pohybovou jsme omezili adaptací na pohyb .

Vyhodnocovány byly parametry (latence a amplitudy) hlavního negativního vrcholu N160, který se jeví jako specifická reakce na začátek pohybu v zorném poli. Maximální odpověď byla zaznamenána buď v pravé nebo levé temporo-okcipitální oblasti (svod OR a OL), nebo v centro-parietální oblasti (svod PZ).

Při všech vyšetřovaných VEPs byly jednotně dodrženy následující stimulační a registrační podmínky. Stimulace byly generovány pomocí vlastního software (viz <http://www.lfhk.cuni.cz/ELF>) na 21“ monitoru Iyama s vertikální obrazovou frekvencí 105 Hz. Při pozorovací vzdálenosti 0,6 m měla stimulační plocha (s centrálním fixačním bodem) rozsah 28° x 37°. Průměrný jas podnětů byl 17 cd/m². Prostřednictvím PC Pentium (A/D převodník Data Translation, USA) bylo snímáno a průměrováno 40 jednotlivých odpovědí (délka snímaného úseku 440 ms, vzorkovací frekvence 500 Hz) po zesílení signálu 20 000 krát v pásmu 0,1 – 45 Hz (zesilovače Contact Precision, UK).

VEPs byly snímány pomocí plošných, nepolarizovatelných (Ag-AgCl) elektrod připevněných na povrch hlavy. Na základě předchozích pokusů k lokalizaci maxima jednotlivých odpovědí byly ke snímání potenciálů použity svody OZ, OR, OL a PZ. Elektrody OZ a PZ jsou umístěny v bodech ležících ve střední čáře lebky - OZ v 10% a PZ v 30% vzdálenosti inion – nasion nad protuberantia occipitalis externa, OR a OL - 5 cm vpravo a vlevo od OZ. Referenční elektroda byla umístěna na ušním lalůčku.

Prezentovány jsou vždy výsledné hodnoty latencí a amplitud ze svodu s maximální amplitudou reakce. Všechny typy stimulací byly snímány monokulárně. Vyšetřované jsme po dobu snímání monitorovali infračervenou kamerou pro kontrolu stálé zrakové fixace středu stimulační plochy.

Při vyšetření pacientů reverzační stimulací (R-VEPs) nedochází k významným změnám latencí v souvislosti s věkem pacienta. Byla použita velikost čtverců 40' (R40), 20' (R20) a 10' (R10). Norma byla vytvořena vyšetřením 70 zdravých dobrovolníků. Horní limit latencí vlny P100 (průměr + 2,5 SD) pro R40 je 125 ms do 39 let a 126 ms nad 39 let, pro R20 je limit 131 ms do 31 let, 132 ms v rozmezí 32 - 51 let a 133 ms nad 51 let a pro R10 je

to 143 ms do 23 let, 144 ms v rozmezí 24 - 43 let a 145 ms nad 43 let.

Reakce na začátek pohybu struktury v zorném poli (M-VEPs) však vykazuje mnohem větší závislost latencí na věku vyšetřované osoby. U latencí vrcholu N160 dochází nejprve ke zkracování, které trvá do 18 let. Od 19 let pozorujeme jejich systematické signifikantní prodlužování. S pomocí lineárních regresních rovnic byly vytvořeny věkové normy z M-VEPs 70ti zdravých osob v rozmezí 6 - 60 let.

Norma naší laboratoře (viz tab. 3) pro interokulární rozdíly latencí činí maximálně 6,5 ms u reverzační stimulace a 20 ms u stimulace pohybem. Norma pro interokulární rozdíl amplitud vlny P100 a N160 (průměr + 2,5 SD) byla také vytvořena vyšetřením 70 zdravých dobrovolníků, nicméně vzhledem k příliš velké interindividuální variabilitě amplitud R-VEPs i M-VEPs, nepoužíváme tento limit pro interokulární rozdíl průměrných mezivrcholových amplitud jako striktní diagnostické kritérium.

Tabulka číslo 5. Normální hodnoty vizuálně evokovaných potenciálů v naší laboratoři

Normální hodnoty latencí respektující lineární závislost na věku

Dospělí

translační pohyb - L500

$$146,1401589 + 0,6221 * \text{věk} + 2,5 * \text{SDr} \text{ (SDr směrodatná odchylka dat zbavených lineární závislosti na věku)}$$

věk [roky]	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38
latence [ms]	185	186	187	188	190	191	192	193	195	196	197
věk [roky]	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60
latence [ms]	198	200	201	202	203	205	206	207	208	209	211

radiální pohyb - plně stimulační pole

$$139,2187385 + 0,668063 * \text{věk} + 2,5 * \text{SDr} \text{ (SDr směrodatná odchylka dat zbavených lineární závislosti na věku)}$$

věk [roky]	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38
latence [ms]	175	177	178	179	181	182	183	185	186	187	189
věk [roky]	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60
latence [ms]	190	191	193	194	195	197	198	199	201	202	203

Děti

translační pohyb - L500

$$253,8736356 + -5,56717 * \text{věk} + 2,5 * \text{SDr} \text{ (SDr směrodatná odchylka dat zbavených lineární závislosti na věku)}$$

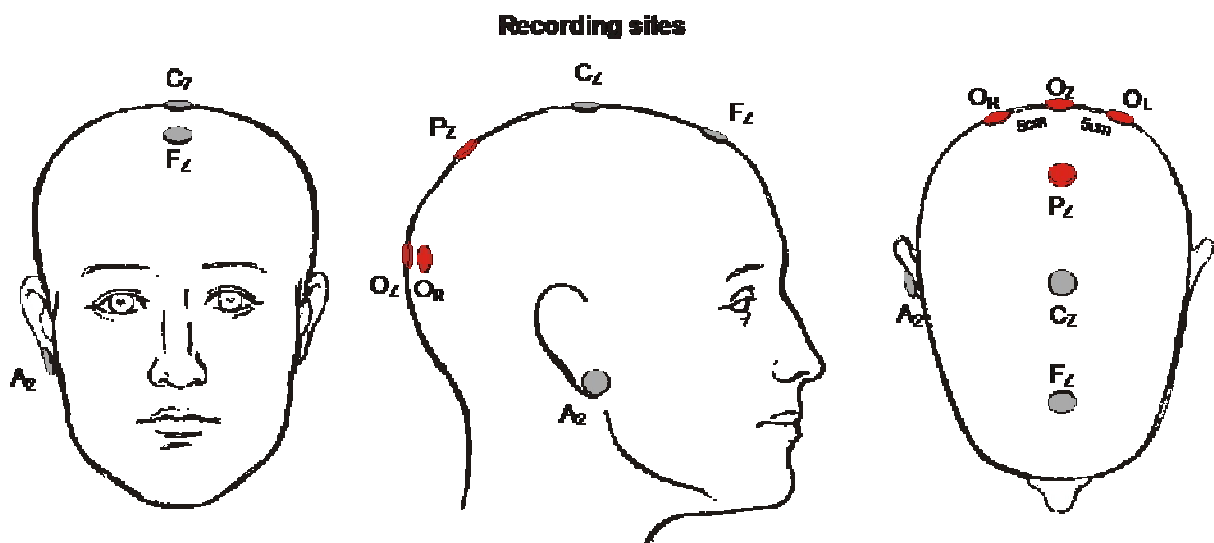
věk [roky]	2	3	4	5	6	7	8	9	10
latence [ms]	304	299	293	287	282	276	271	265	260
věk [roky]	11	12	13	14	15	16	17	18	19
latence [ms]	254	248	243	237	232	226	221	215	210

radiální pohyb - plně stimulační pole

$$282,9939127 + -7,434299 * \text{věk} + 2,5 * \text{SDr} \text{ (SDr směrodatná odchylka dat zbavených lineární závislosti na věku)}$$

věk [roky]	2	3	4	5	6	7	8	9	10
latence [ms]	316	308	301	293	286	279	271	264	256
věk [roky]	11	12	13	14	15	16	17	18	19
latence [ms]	249	241	234	227	219	212	204	197	189

Obraz 2. Poloha svodů při metodě VEP



8.10. Klinické skóre aktivity

Klinické skóre aktivity (clinical activity score) bylo hodnoceno podle přítomnosti sedmi příznaků (9):

- Spontánní bolest za okem
- Bolest při pohledu nahoru nebo dolů
- Zarudnutí víček
- Zarudnutí spojivek
- Otoky víček
- Otok karunkuly
- Otok spojivek

Hodnotící lékař věděl, do jaké skupiny je pacient zařazen.

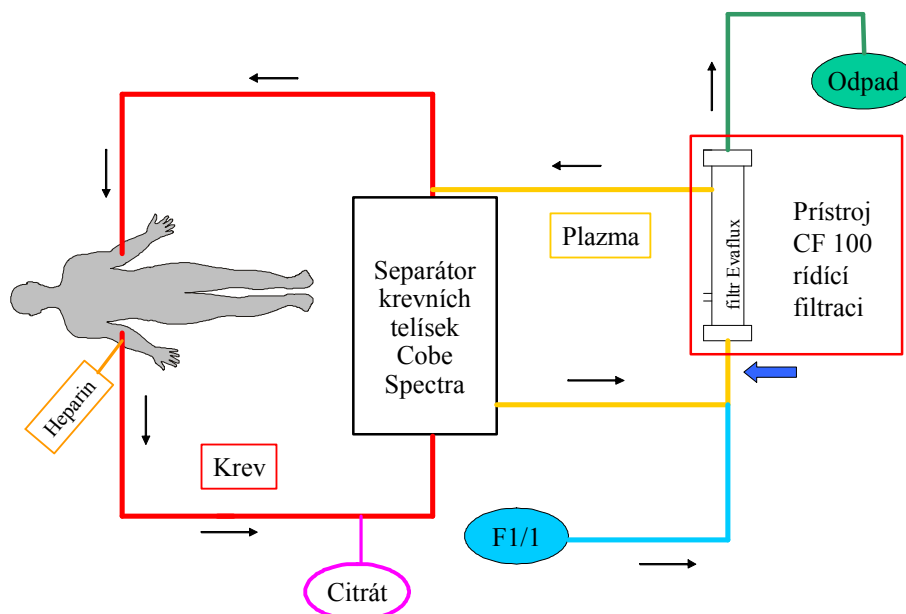
8.11. Naše modifikace hemoreferézy:

Zavedli jsme a při výzkumu používáme reoferetickou léčbu kaskádovou metodikou, kdy plazma, perfektně prostá buněčných elementů po vysokootáčkové centrifugaci, získaná kvalitním separátorem (Cobe-Spectra) je proháněna “druhým stupněm” – filtrem. Jako sekundární filtry se doporučují filtry Asahi, Kuraray, Kaneka, Ciprex, Excorim i další (109).

Vzhledem k účelům naší práce a vlastnostem filtrů i ceně jsme vybrali a používáme v naší práci filtry Evaflux 4A (Kuraray). Průtok plazmy je kontinuální, antikoagulace je prováděna heparinem, základní množství zpracovávané plazmy – 1 tělní objem, vypočtený počítačem separátoru Cobe (byl zpracován při první proceduře, v dalších 1,5 objemu). Velikost pórů filtru umožňuje záchyt značného množství LDL-cholesterolu, lipoproteinu(a), fibrinogenu, alfa2makroglobulinu a imunoglobulinů, zejména IgM.

Bližší bylo nutné výzkumem přesněji vymezit a určit v jednotlivých indikacích u filtrů Evaflux (v ČR nejsou žádné, jinde nejsou s konkrétními filtry dostatečné soubory a zkušenosti). Technické detaily metody jsou obvyklé jako při aferetických procedurách - bližší popis je uveden v dříve publikovaných pracích (110, 111). Schématicky je princip naší modifikace metodiky hemoreferézy uveden na obr. č. 3.

Obraz 3. Schéma naší modifikace procedury



8.12. CT vyšetření orbit

Bylo provedeno na spirálním CT přístroji (Siemens) při použití řezů 1 mm a kroků 2/3 mm. Šířka okohybných svalů (čtyři přímé svaly a šikmý sval) byla měřena kalibrem. Pro měření byly vybrány koronární řezy v mediální třetině orbity. Na axiálních skenech byl stanoven exoftalmus (vzdálenost laterálního kostěného okraje očnice k limbu rohovky v rovině středu čočky). Odečítající lékař nevěděl, do které skupiny vyšetřovaný nemocný patří.

8.13. Statistické hodnocení

Pro statistické hodnocení byl použit software SigmaStat verze 3.5 (Systat Software, San Jose, USA). Pro posouzení rozdílů uvnitř dané skupiny nemocných byl použit párový T-test, případně Wilcoxonův Signed Rank Test v závislosti na normalitě rozložení. Pro testování rozdílů dvou skupin potom nepárový T-test, nebo Wilcoxonův rank-sum test.

8.14. Parametry sledované před procedurou a po ní

8.14.1. Základní vyšetření:

a) V hematologických parametrech:

- hemoglobin (Hb), hematokrit (HTC), střední objem erytrocytu (MCV),
- celkový počet leukocytů (WBC) a trombocytů (PLT)

b) Z biochemického profilu v séru :

- glykémie
- sodík (Na), draslík (K), chloridy (Cl), vápník (Ca), fosfor (P)
- urea, kreatinin
- kyselina močová
- celkový bilirubin, alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST)
gamaglutamyltranspeptidáza (GMT)

- kreatinkináza (CK)
- alkalická fosfatáza (ALP)
- celková bílkovina séra (TP), albumin

c) Spektrum lipoproteinů:

- celkový cholesterol
- LDL cholesterol
- HDL cholesterol
- triacylglyceroly (TAG)
- apolipoprotein A (Apo A)
- apolipoprotein B (Apo B)
- lipoprotein (a)

8.14.2. Specializovaná vyšetření:

a) V literatuře je udáván pokles středního objemu krevních destiček a nevelké změny v celkovém počtu, proto jsme vyšetřovali: [základní parametry patofyziologie a funkce krevní destičky:](#)

- počet trombocytů (PLT), střední objem trombocytu (MPV), event. šíři distribuce histogramu destiček podle jejich objemu (PDW) a destičkový hematokrit (PCT)
- Aktivita a funkce destiček: Jako součást analýzy primární hemostázy a funkce krevních destiček byla ve smyslu pilotní sondy vyšetřena komerčním analyzátozem Dade \square Behring \square , PFA-100 \square (PFA, platelet function analyse). Tato diagnostika byla nově zavedenou laboratorní metodou.

Dále byla věnována pozornost funkčnímu stavu a agregační schopnosti destiček. Předně jsme ve výzkumné sondě provedli u 9 pacientů při reoferéze, ale s jinou chorobou - familiární hypercholesterolémií, (opakovaně) *standardní spektrum agregačních vyšetření*, kde jediné změny byly naznačeny po stimulaci ADP. Proto jsme dále provedli námi modifikovaný test a vyšetřili agregace s použitím 3 různých ředění ADP – konkrétně 2,5 $\mu\text{mol/l}$, 1,25 $\mu\text{mol/l}$ a 0,625 $\mu\text{mol/l}$.

Výsledky: Ve všech případech se po separaci hodnoty CT (Closure Time) prodloužily, avšak míra prodloužení CT po procedurách nedosáhla statistické významnosti ($p < 0,14$). Nebyly rozdíly mezi homozygoty a heterozygoty. V modifikovaných testech agregace trombocytů

dochází po aferéze ke zmenšení strmosti agregační křivky a ke snížení maximální amplitudy ($p < 0,05$). Uzavřeli jsme tedy, že ke sledování reoferézy je to možnost, může odhalit, že procedura při extrakorporální eliminaci zlepšuje poměry primární hemostázy. Jde však o relativně technicky a ekonomicky náročná vyšetření(110). Proto jsme v těchto vyšetřeních při sledování TAO nepokračovali.

b)Z reologických faktorů byla vyšetřena:

- viskozita plné krve a plazmy, fibrinogen, alfa2makroglobulin, LDL-cholesterol, imunoglobulin M - ovlivňují změny způsobené v mikrocirkulaci smykovým stresem („shear-stress“).

c)K posouzení adhezní schopnosti endotelu bylo vyšetřeno :

- von Willebrandův faktor (vWF antigen, STA LIAtest vWF)
- trombomodulin (Asserachrom Thrombomodulin)

d)K posouzení aktivity fibrinolýzy:

- fibrinogen (Fibri-Prest Automate 5),
- inhibitor aktivátoru plazminogenu (Asserachrom PAI-1) a tkáňový aktivátor plazminogenu (Asserachrom t-PA)

e) Vyšetření exprese solubilních adhezních molekul sP-selektinu a chemotaktického proteinu monocyty MCP-1 (monocyte chemotactic protein) technikou ELISA a vysoce sensitivní CRP (hsCRP), endoglin

f) Povrchové znaky: sCD28, sCD30 ligand; interleukin 10

g) Ukazatelé apoptosy: Annexin V, sFas ligand, sAPO Fas

h) Stav lipoperoxidace ve vztahu ke složení buněčných membrán při hemoreoferéze: cholesterol v jednotlivých vrstvách lipoproteinů, dále změny antioxidantů (vitamin E) v séru,

ale i v membránách buněk pomocí HPLC s využitím monolitních kolon

i) změny aktivity destičkových znaků nebo tvorby destičkových agregátů s leukocyty či erytrocyty pomocí exprese znaku CD45/CD41.

j) Monitorování klinického stavu pacientů při výkonech včetně základních vitálních funkcí (puls, krevní tlak, dechová frekvence, případně monitorování EKG). Byl připraven podrobný protokol ke sledování vedlejších reakcí, a to okamžitých nebo dlouhodobých (26 položek, vycházejících z předchozích výsledků a sledování) (110).

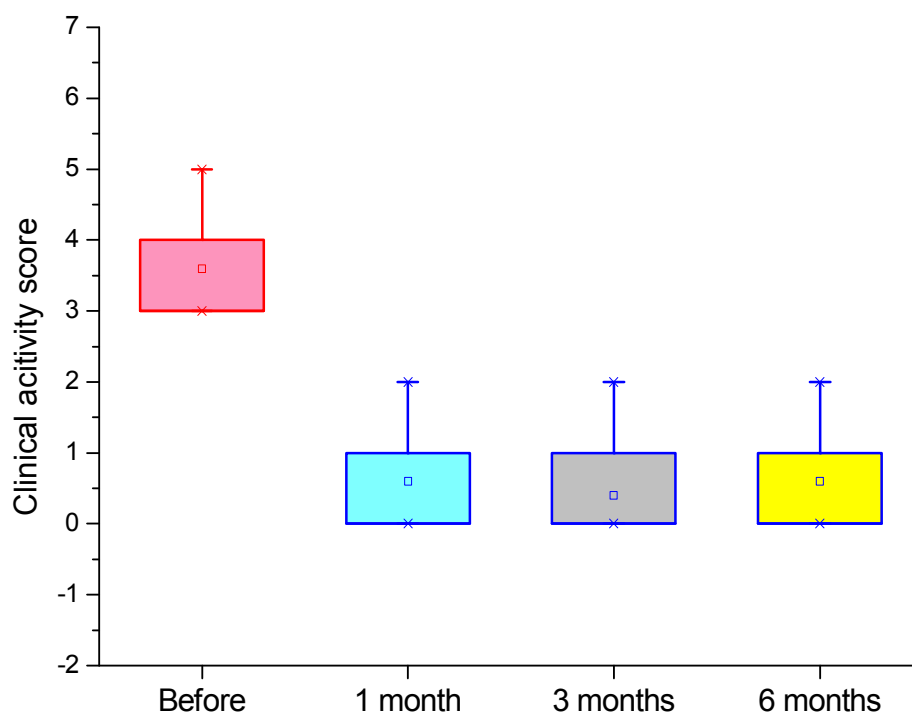
9. Výsledky

9.1. Klinická účinnost hemoreoferézy

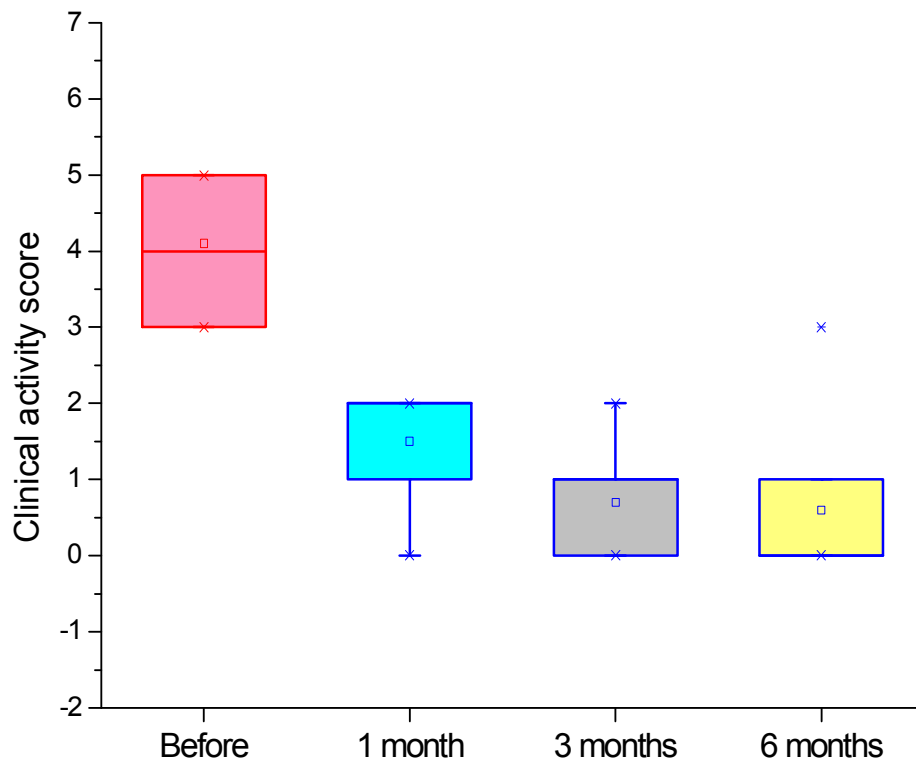
9.1. 1. Skóre klinické aktivity (CAS)

Klinické skóre aktivity (CAS) se snižovalo jak u nemocných léčených hemoreoferézou, tak v kontrolní skupině. Pokles byl však při použití hemoreoferézy rychlejší. Viz obraz číslo 12.

Obraz č. 12.: Pokles CAS u nemocných léčených hemoreferézou

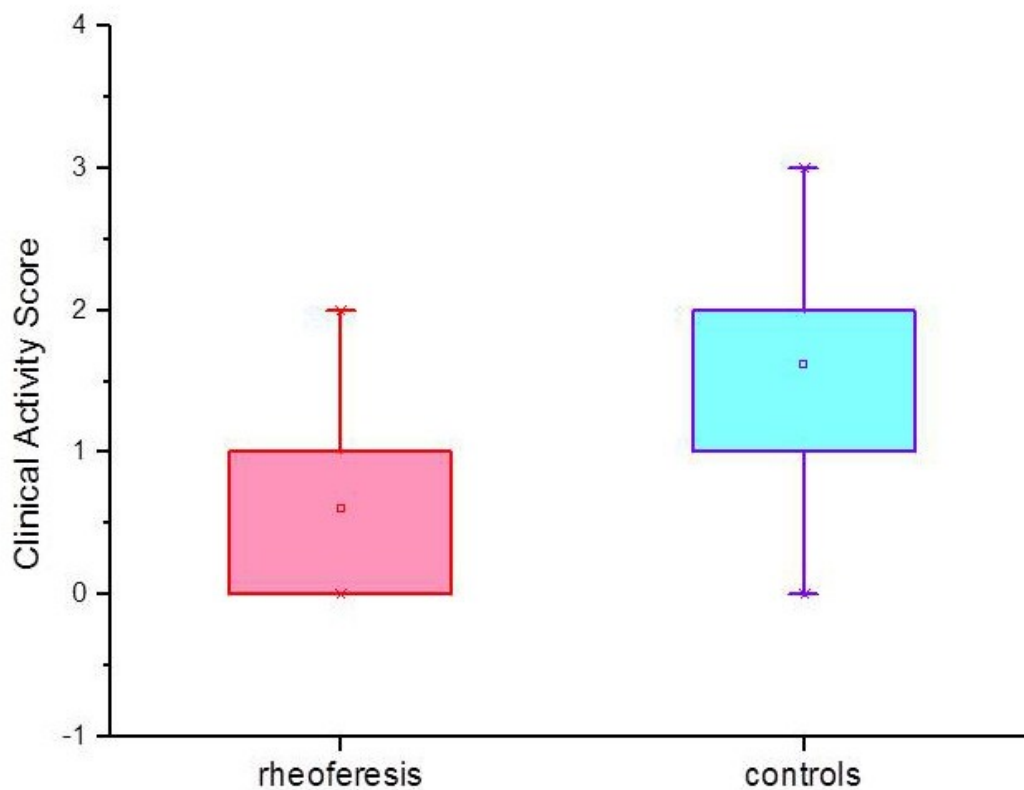


Obraz č. 13.: Pokles CAS u kontrolní skupiny



Pokles CAS jeden měsíc od počátku terapie byl statisticky významný v obou skupinách ($p < 0,001$ párovým t-testem ve skupině hemoreoferetické a $p = 0,002$, Wilcoxon Signed Rank Test ve skupině kontrolní). Byl však větší ve skupině léčené aktivně z 3,6 na 0,6 (medián), než ve skupině kontrolní (medián ze 4 na 2). Zatímco v hemoreoferetické skupině se již CAS po jednom měsíci statisticky významně nesnižoval, v kontrolní skupině došlo k dalšímu poklesu od 1. do 3.měsíce ($p = 0,016$, Wilcoxon Signed Rank Test). Rozdíl po jednom měsíci byl mezi skupinami statisticky významný ($p = 0,027$, Mann-Whitney Rank Sum Test) – obraz 14.

Obraz č. 14: Rozdíl v klinickém skóre aktivity po jednom měsíci léčby mezi skupinou léčenou hemoreferézou a skupinou kontrolní.

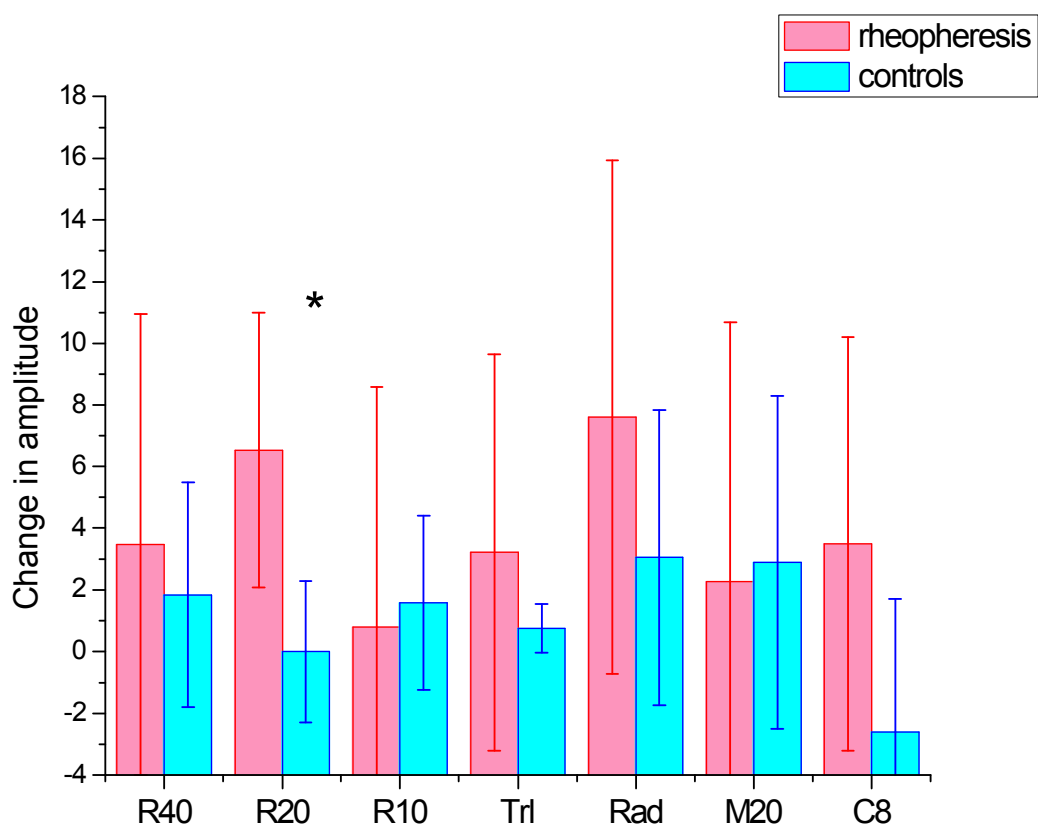


9. 1.2. Vizuální evokované potenciály (VEP)

Zjištěné hodnoty VEP byly u většiny nemocných v normálním rozmezí. V průběhu léčby nedošlo ke statisticky významným změnám jak v rámci jednotlivých skupin, tak v celém souboru pacientů.

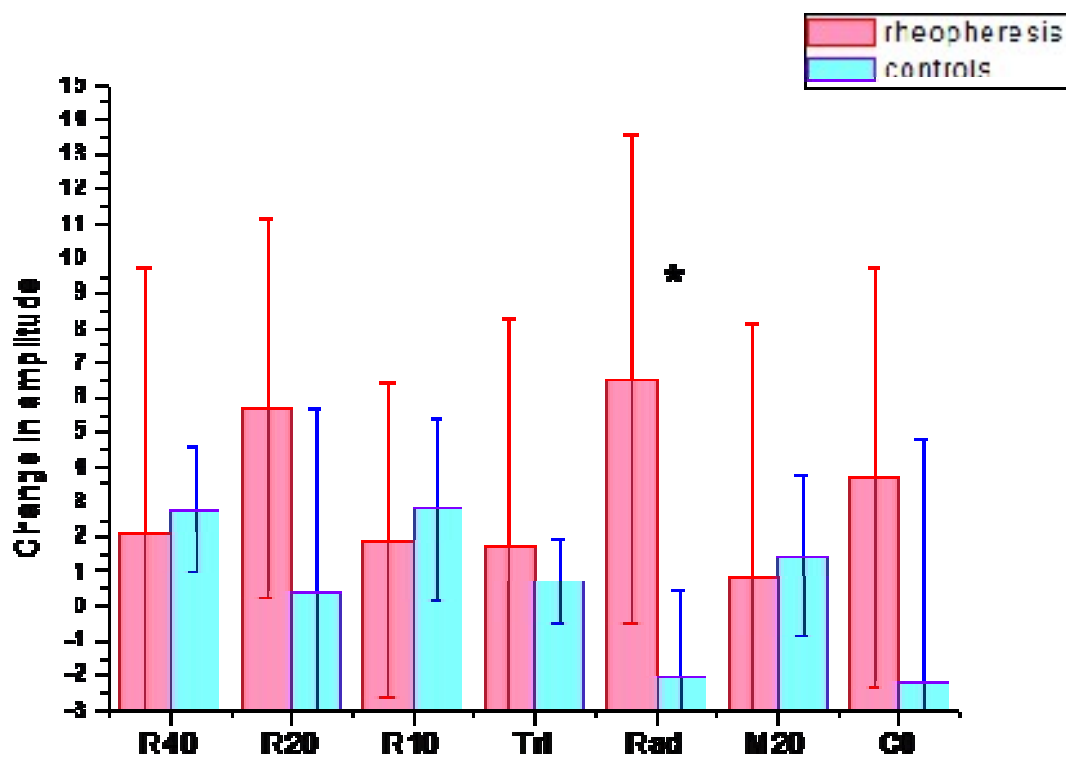
Jediný statisticky významný rozdíl mezi skupinami byl zjištěn za 3 měsíce po zahájení terapie a to v amplitudě VEP. Tato se zlepšila na levém oku při použití objektu 20' o 6.5 μ V v reoferetické skupině, ve srovnání s -2.1 μ V ve skupině kontrolní ($p=0,05$ Equal Variance Test), viz obraz č. 15,

Obraz č. 15.: Změna amplitudy evokovaných potenciálů po 6 měsících terapie u nemocných léčených hemoreferézou a kontrolní skupiny. Oko levé.



Na pravém oku byl statisticky významný rozdíl při použití radiálního pohybu. V hemoreferetické skupině se zvýšila amplituda o 6.5 μV , zatímco v kontrolní skupině se neměnila ($p=0.03$ Equal Variance Test) – viz obraz 16.

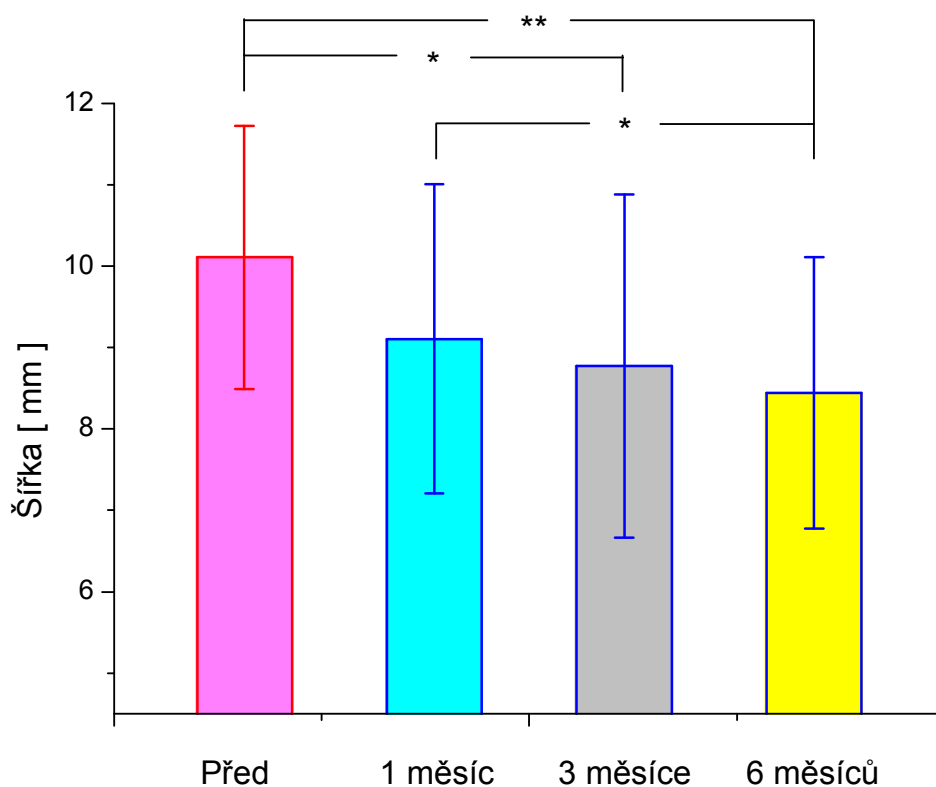
Obraz č. 16.: Změna amplitudy evokovaných potenciálů po 6 měsících terapie u nemocných léčených hemoreferézou a kontrolní skupiny. Oko pravé.



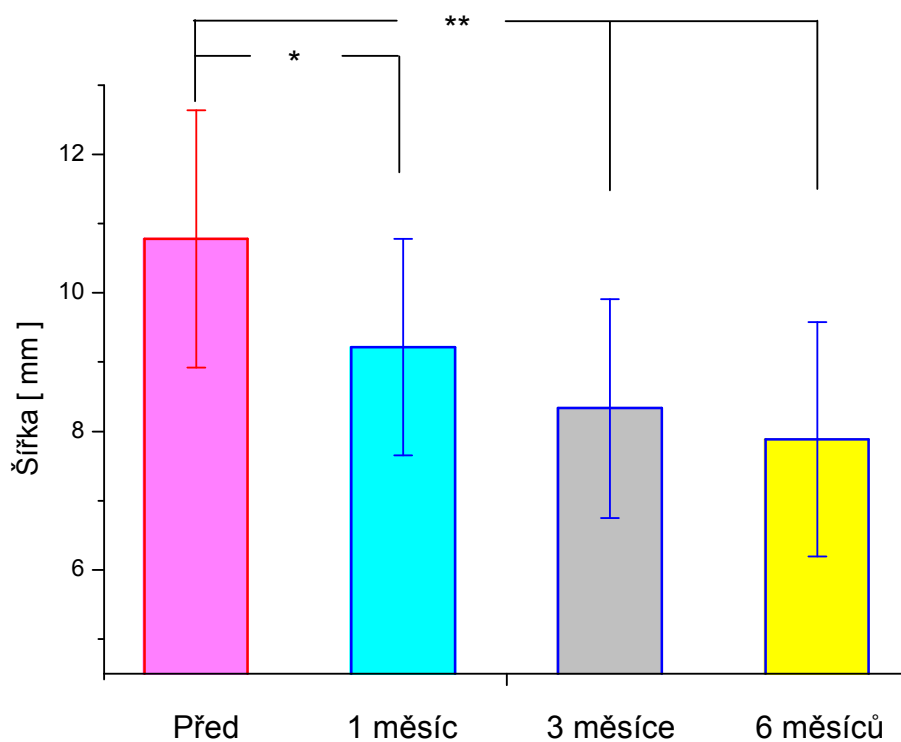
9.1.3 Hodnocení CT

Šířka okohybných svalů byla na počátku terapie zvětšená jen u některých z nich, zejména u m. rectus inferior. V průběhu terapie došlo ke zlepšení jen tam, kde byla šířka podstatně zvětšena oproti normě. Statisticky významné zmenšení bylo zjištěno jen u m. rectus inferior. Výsledky pro skupinu léčenou hemoreoferézou jsou uvedeny na obrazu 17. a 18.

Obraz 17.: Změna šířky m. rectus inferior na pravém oku u nemocných léčených hemoreoferézou. Ke statisticky významnému zlepšení došlo až po 3 měsících léčby a během dalších 6 měsíců se šířka dále zmenšila. Statistická významnost v párovém t-testu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

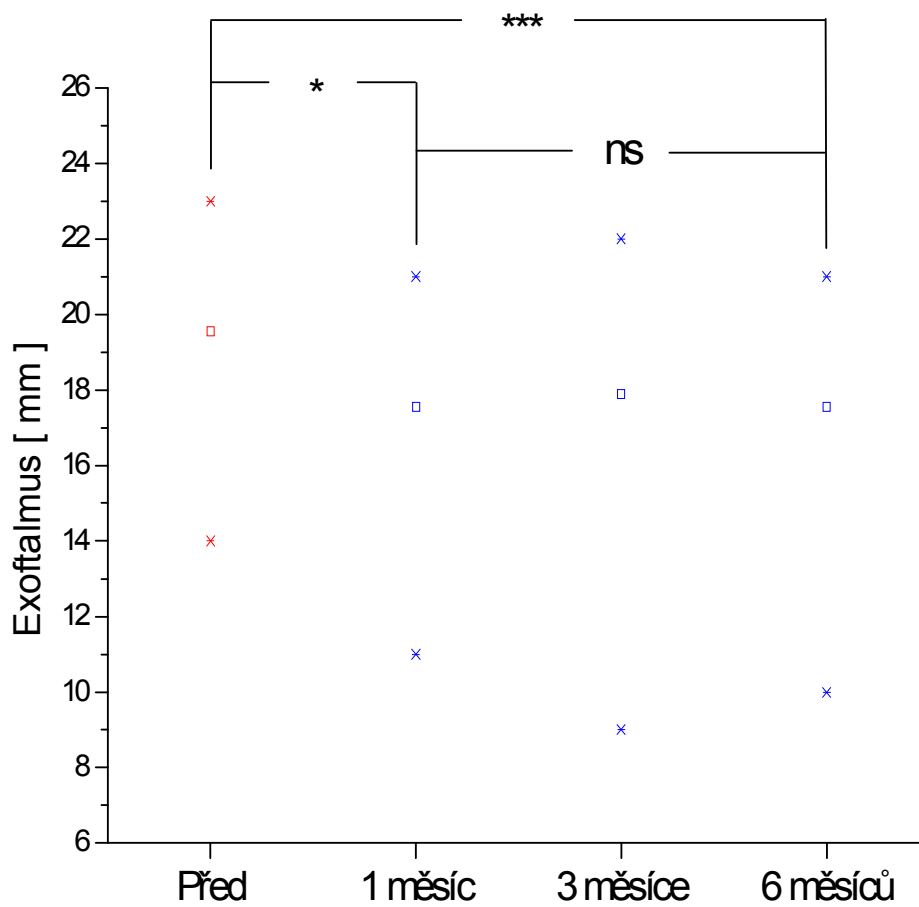


Obraz č. 18: Změna šířky m. rectus inferior na levém oku u nemocných léčených hemoreoferézou. Ke statisticky významnému zlepšení došlo již za 1 měsíc léčby, ale během dalšího období se šířka dále zmenšila. Statistická významnost v párovém t-testu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

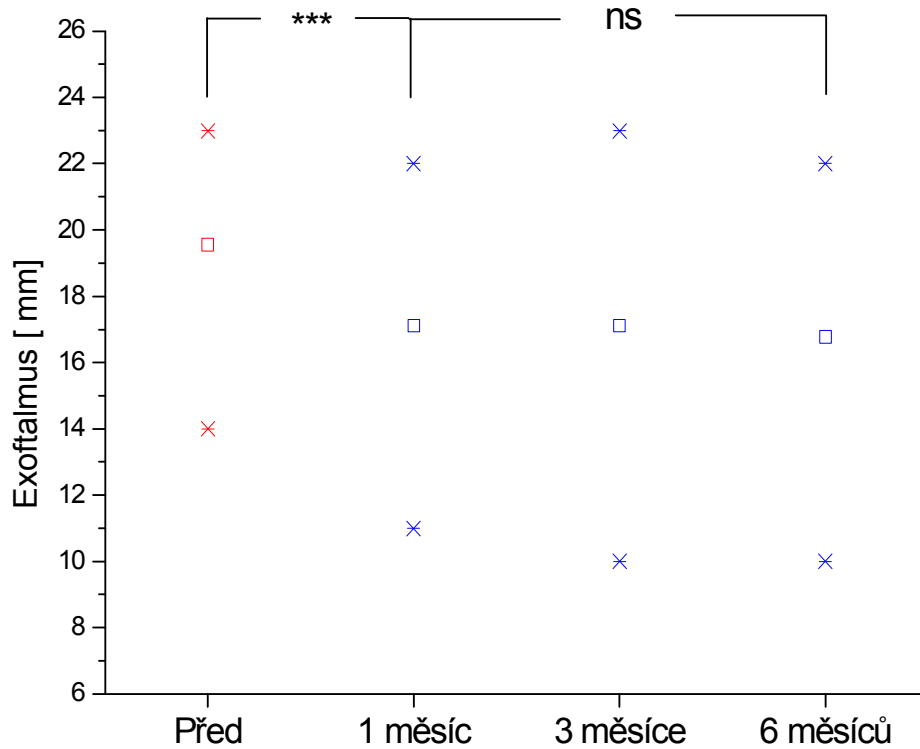


Protruze bulbu měřená na podélném CT snímku se zmenšovala v obou skupinách. Změny u nemocných léčených hemoreoferézou jsou uvedeny v grafech 19 a 20.

Obraz č. 19.: Protruze bulbu na oku pravém u nemocných léčených hemoreoferézou. Ke statisticky významnému zmenšení došlo již po prvním měsíci. Na konci sledování po 6 měsících byla hodnota nižší velmi významně. Statistické hodnocení pomocí Wilcoxonova Signed Rank Testu. * = $p < 0,05$, * = $p < 0,001$**

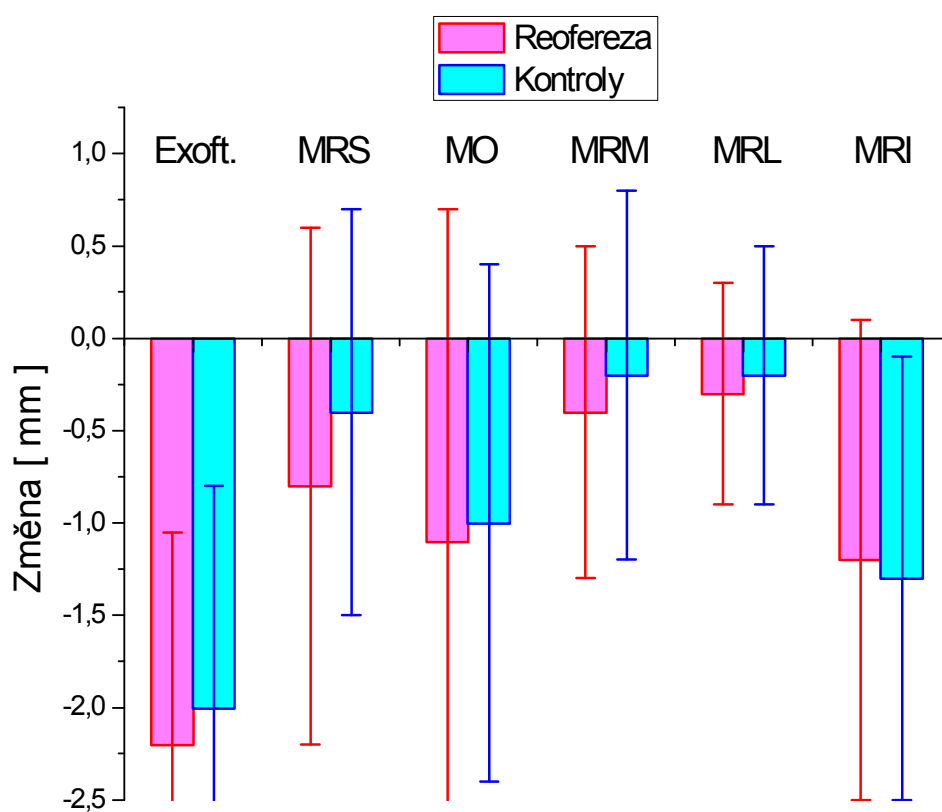


Obraz č. 20.: Protruze bulbu na oku levém u nemocných léčených hemoreoferézou. Ke statisticky významnému zmenšení došlo již po prvním měsíci a dále se hodnota významněji neměnila. Statistické hodnocení pomocí Wilcoxonova Signed Rank Testu. * = $p < 0,001$**



U kontrolního souboru došlo k podobným změnám v šířce m. rectus inferior a exoftalmu. Porovnání skupiny nemocných, léčených hemoreoferézou a kontrolní po 6 měsících léčby skupiny je uvedeno na obrazu 21. Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

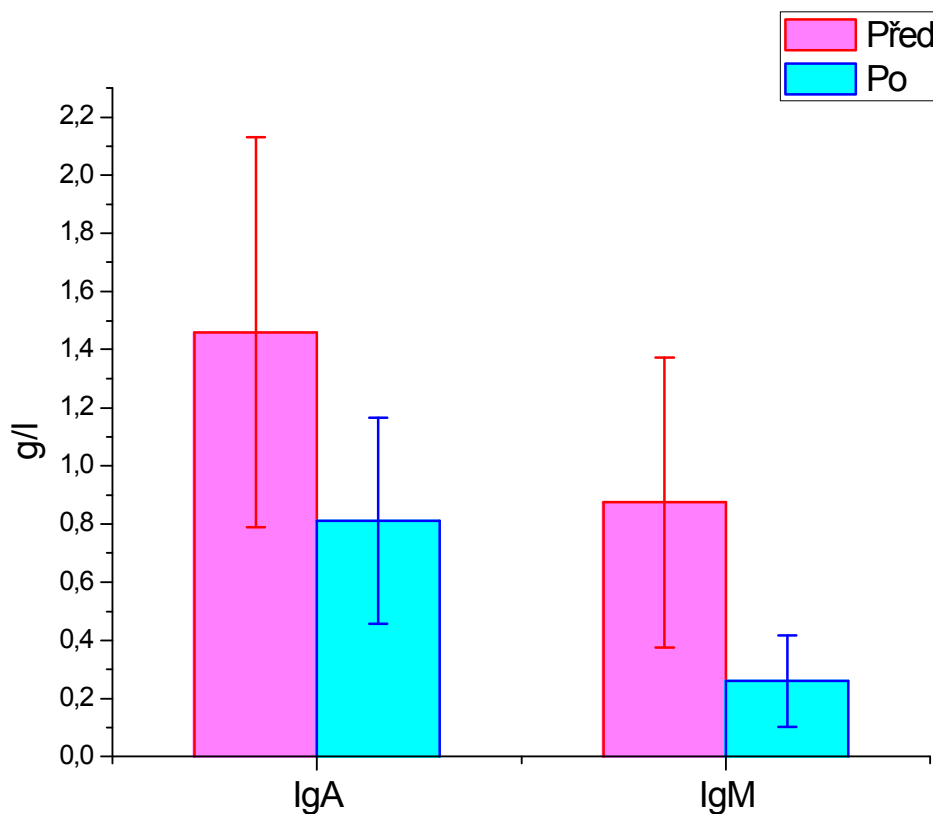
Obraz č. 21.: Změny v exoftalmu (Exoft.) a šířce m. rectus superior (MRS), m. obliquus (MO), m. rectus medialis (MRM), m. rectus lateralis (MRL) a m. rectus inferior (MRI) po 6 měsících terapie. U obou skupin nemocných se zmenšil exoftalmus a šířka MRI. Mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl.



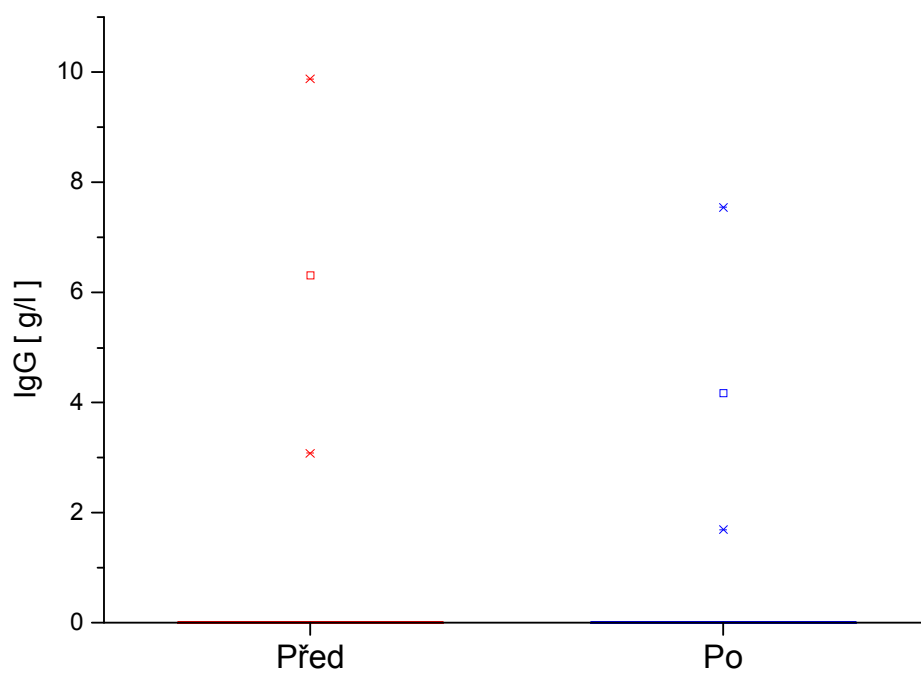
9.2. Ovlivnění imunologických ukazatelů včetně patogenetických faktorů TAO

Smyslem léčby bylo odstranění patologických imunoglobulinů. Léčba vedla ke statisticky významnému poklesu hladiny imunoglobulinů třídy G, M, E. Došlo také k poklesu specifických protilátek proti receptoru pro TSH (TRAK), tyreoglobulinu a tyreoidální peroxidáze.

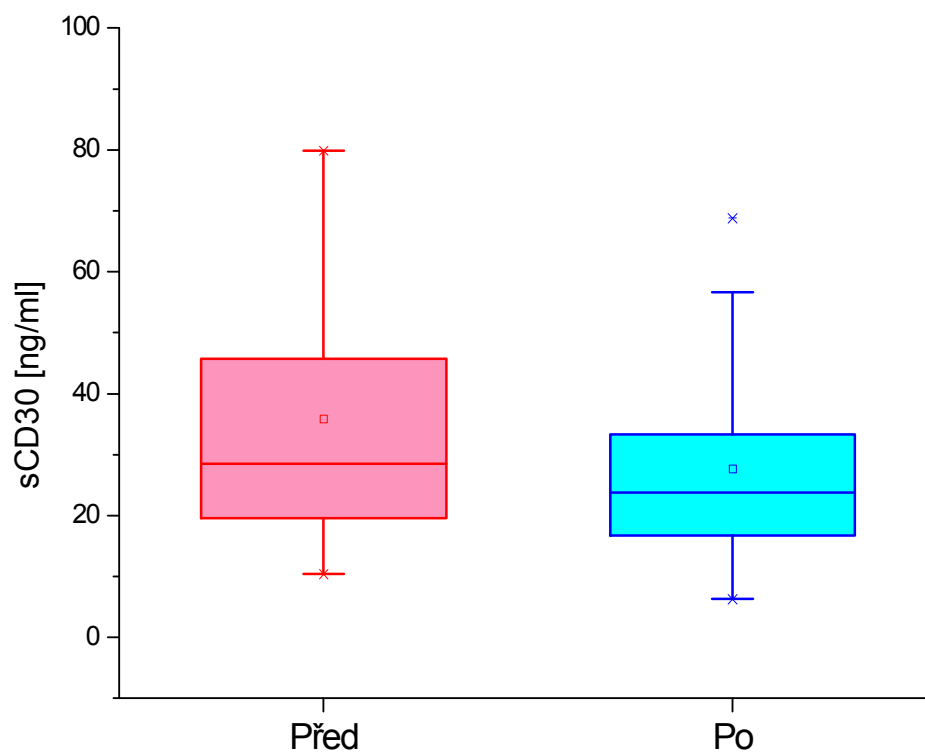
Obraz č. 8.: Změna hladiny protilátek třídy IgA a IgM během hemoreofézy. Změny jsou statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,001$.



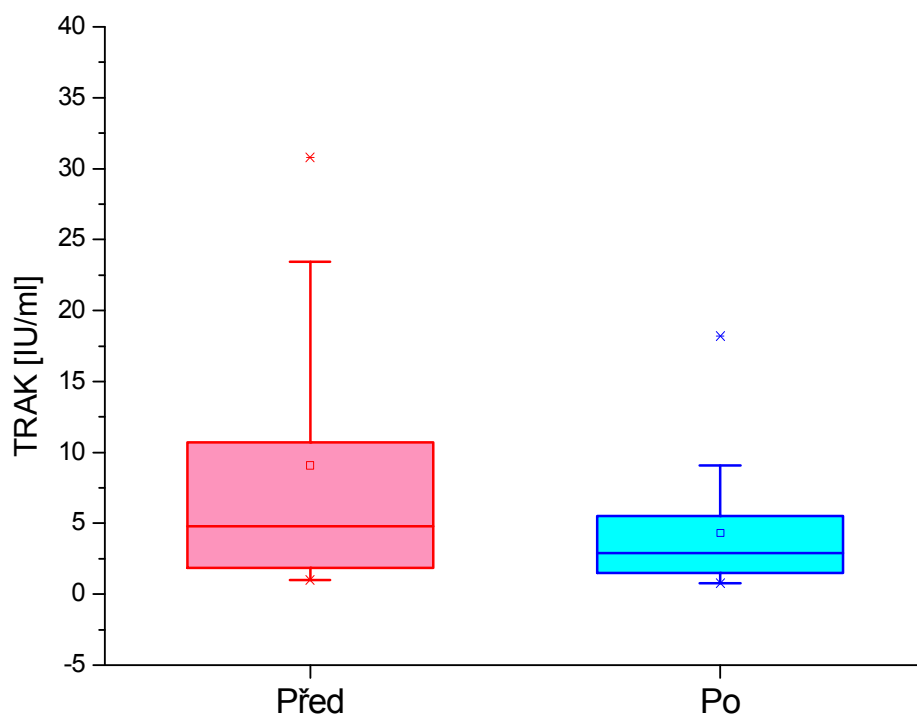
Obraz č. 9.: Změna hladiny protilátek třídy IgG během hemoreoferézy. Změny jsou statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,001$.



Obraz 10.: Změna hladiny solubilního CD30 během hemoreofézy. Změny jsou statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,001$.



Obraz 11.: Změna hladiny protilátky proti receptoru pro TSH během hemoreoferézy. Změny jsou statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,001$.



Tabulka 17a: Změny imunologických parametrů před a po hemoreoferéze (nenormální rozložení) - Wilcoxon Signed Rank Test

Veličina	před			po			p
	medián	25. perc	75. perc	medián	25. perc	5. perc	
IgG	5,995	4,970	7,585	4,155	3,32	4,75	<0,001
IgE	19,5	9,5	73,5	10	6	47,5	<0,001
TRAK	4,105	1,9	9,0	2,7	1,105	5,1	<0,001
ATG	51,6	45,7	81,55	49,9	32,9	78,05	0,003
ATPO	13,5	6,25	17,05	12,95	5,6	15,3	0,03
EMA	2	1	2	1,5	1	2	0,5
CIK	15,0	2,0	18,0	2,0	1,0	11,0	0,067
CMP1	344,2	259,6	507,9	287,9	230,1	356,9	0,003
CD30	30,369	19,56	45,7	23,916	16,68	33,3	<0,001

TRAK – autoprotilátky proti receptoru pro TSH, ATG – protilátky proti tyreoglobulinu, ATPO – protilátky proti tyreoperoxidáze, EMA – protilátky proti očnímu svalu, MCP-1 – chemotaktický protein monocytů 1 (monocyte chemotactic protein), CIK – cirkulující imunokomplexy, hsCRP – vysoce citlivý C-reaktivní protein. Tučně jsou označeny veličiny, jejich změny dosáhly statistické významnosti.

Tabulka 17b: Změny imunologických parametrů před a po hemoreoferéze (normální rozložení) – párový t-test

Veličina	před		po		p
	průměr	Sm. odchylka	průměr	Sm. Odchylka	
IgA	1,459	0,671	0,811	0,354	<0,001
IgM	0,874	0,498	0,26	0,157	<0,001
sApoFas	730,327	248,811	680,140	258,658	0,16
IL10	69,431	24,668	62,918	26,189	0,002
CD40L	5138	1971	5075	2091	0,816

sApoFas – solubilní protein Fas/Apo-1 (CD95); CD30 – solubilní antigen CD30; IL10 – interleukin 10; CD40L – vazebný protein pro CD40 (CD40 ligand). Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti

10. Zhodnocení sekundárních cílů práce

10.1. Klinická bezpečnost a snášlivost léčby

V naší práci hodnocená vlastní modifikace léčebné hemoreoferézy i LDL-aférezý jsou v rukou zkušeného personálu bezpečné. Za dodržování pravidel uvedených výše, v metodické části (subkapitola o klinickém sledování) bylo jen 6,8% vedlejší příhod a při tom všechny byly klinicky nezávažné. Nevyžadovaly medikamentózní terapii. Tento údaj odpovídá i podstatně větším zkušenostem světového registru hemaferéz WWA, jak bylo zveřejněno na sjezdu ISFH v roce 2008 (European Interdisciplinary Society for Hemaphereses and Hemotherapy, Düsseldorf, 6.-9.9. 2008, kde bylo zaznamenáno při terapeutických hemoferézách 5,6% vedlejších reakcí.

I tolerance naší modifikace procedury je přijatelná. Jako únosnou hranici, kdy je možno docílit žádaného klinického výsledku a je ještě velmi přijatelná tolerance ze strany nemocných, se jeví promytí 1,5 objemu plazmy a doba trvání procedury do 3 hodin.

Tabulka č. 16: Výskyt vedlejších reakcí

		TYP VEDLEJŠÍ REAKCE	Počet
časné	cévního původu	1. Nutná katetrizace velké žíly	0
		2. Hematomy v místě vpichu	0
		3. Zcela nezdařený odběr	0
		4. Gangrény	0
		5. Centrálně nervové příhody (embolie)	0
		6. Perforace velkých žil	0
		7. Infekce z míst vpichu (až sepse)	0
Reakce	kardio vasku- lární	1. Přechodná slabost, nevolnost, bolesti na hrudi	0
		2. Hypotenze	1
		3. Krátkodobá vasovagální reakce až mdloba	0
		4. Nadměrné zatížení tekutinou	0
		5. Arytmie	0
	vliv náhrad. roztoků	1. Citrátová toxicita: a) obličejové parestesie	1
		b) pocit svalového napětí	0
		4. Jiné roztoky: pyroxeny (horečka)	0
	další reakce	1. Celkové příznaky (nevolnost, nausea, neuroveg. labilita, třesavka, teplota, cephalaea)	2
		2. Hypokalémie	0
		3. Hemolýza	0
		4. Vzduchová embolie	0
		5. Hypovolémie	0
6. Alergické reakce nejasného původu (svědění kůže, vyrážky)		0	
7. Asthmatický záchvat		0	
8. Obtíže ze ztrnulé polohy při výkonu		0	
pozdní reakce	pozdní reakce		

10.2. Změny navozené hemoreoferézou

10.2.1. Hodnocení reologické účinnosti

Léčba vede ke statisticky významným změnám reologických parametrů (α_2 -makroglobulinu, fibrinogenu, imunoglobulinu M, LDL-cholesterolu a dalších lipoproteinů, včetně lipoprotein(a) i triglyceridů) – viz tabulka č. 6. Lipoprotein(a) byl nízký i před terapií. Vysoká statistická významnost svědčí o reologické efektivitě naší modifikace procedury.

Tabulka 6a: Změny reologických parametrů a lipoproteinů před a po hemoreoferéze (nenormální rozložení) – Wilcoxon Signed Rank Test

veličina	před			po			p
	medián	25. perc	75. perc	medián	25. perc	75. perc	
Viskozita P	1,935	1,835	2,26	1,69	1,615	1,9	<0,001
TAG	2,590	2,025	3,483	1,180	0,770	1,623	<0,001
LP(a)	0,07	0	0,118	0	0	0,007	<0,001

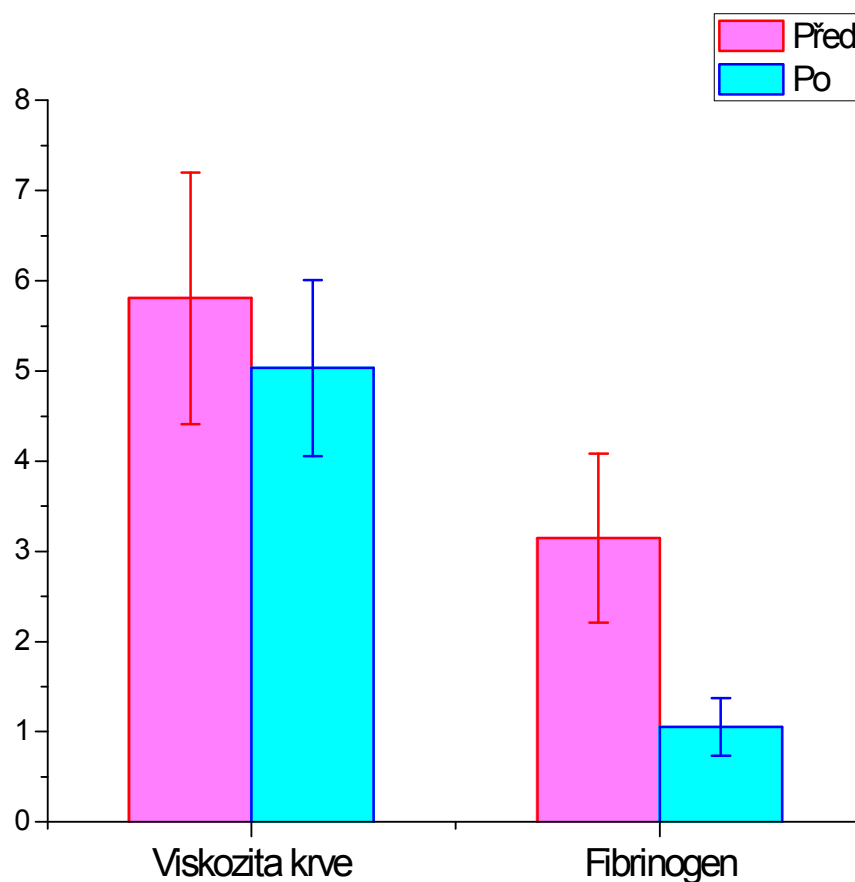
Viskozita P – viskozita plazmy, TAG – triacylglyceroly, Lp(a) – lipoprotein (a)

Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti

Tabulka 6b: Změny reologických parametrů a lipoproteinů před a po hemoreoferéze (normální rozložení) – párový t-test

veličina	před		po		p
	průměr	sm. odchylka	průměr	sm. odchylka	
Cholesterol	5,72	1,16	2,154	0,46	<0,001
HDL	1,401	0,355	0,796	0,222	<0,001
LDL	3,431	0,989	1,010	0,356	<0,001
Fibrinogen	3,147	0,935	1,051	0,322	<0,001
Viskozita K	5,805	1,397	5,032	0,974	<0,001
ApoA	1,578	0,244	0,981	0,184	<0,001
ApoB	0,992	0,244	0,306	0,095	<0,001
IgM	1,034	0,588	0,279	0,176	<0,001
A2M	161,15	52,6	83,577	41,35	<0,001

HDL – HDL cholesterol, LDK – LDL cholesterol, Viskozita K - viskozita krve, Apo A – apolipoprotein A, ApoB – apolipoprotein B, IgM – imunoglobulin M, A2M – alfa₂ makroglobulin. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti



Obraz č. 4. Změny viskozity krve a hladiny fibrinogenu při hemoreoferéze

Hladina fibrinogenu klesá významně, je jedním ze základních měřítek reologické účinnosti. Jako dolní limit, který se udává jako ještě bezpečný, jsme ve shodě s literaturou volili 0,7 g/l. Jen u jedné nemocné bylo nutno po léčbě fibrinogen substituovat. Protože to prodloužilo hospitalizaci o jeden den, nemocná vzala zpět souhlas s účastí ve studii.

10.2.2. Biochemické a hematologické ukazatelé bezpečnosti terapie

Změny sledovaných základních biochemických ukazatelů neovlivňují klinický stav. Dosavadní výsledky ukázaly jen výkyvy bez klinické významnosti, i když byly někdy statisticky významné. Většinou jde o pokles hodnot – diluční změny (po procedurách dojde k nevelké krevní diluci, která činí asi 5-10%).

Tabulka 7a: Změny biochemických parametrů před a po hemoreoferéze (nenormální rozložení) - Wilcoxon Signed Rank test

veličina	před			po			P
	medián	25. perc	75. perc	medián	25. perc	75. perc	
FW1	8	3,75	18,5	1	0	2	<0,001
K	3,7	3,5	3,85	3,55	3,45	3,8	0,635
Cl	102,5	101,0	105,0	105,0	102,5	107,0	<0,001
Ca	2,195	2,115	2,230	2,145	1,990	2,265	0,375
Bilirubin	5,50	4,5	7,0	5,0	4,0	7,5	0,084
ALT	0,325	0,285	0,430	0,285	0,24	0,35	<0,001
GMT	0,34	0,31	0,47	0,22	0,185	0,27	<0,001
ALP	0,81	0,74	1,255	0,52	0,455	0,875	<0,001
TP	62,1	59,4	66,63	47,45	44,7	51,4	<0,001

FW1 – sedimentace erytrocytů za první hodinu, K – draslík, Cl- chloridy, Ca – vápník, ALT – alaninaminotransferáza, GMT – gama glutamin transferáza, ALP – alkalická fosfatáza, TP – celková bílkovina. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti

Tabulka 7b: Změny biochemických parametrů před a po hemoreoferéze (normální rozložení) – párový t-test

Veličina	Před		po		p
	průměr	sm. odchylka	průměr	sm. odchylka	
FW2	21,2	13,73	3,16	3,32	<0,001
Glykémie	5,567	0,881	6,158	1,557	0,056
Albumin	40,578	2,672	33,433	4,042	<0,001
Na	140,7	2,7	142,1	2,9	0,013
P	1,178	0,241	1,1	0,217	0,139
Urea	4,844	1,109	4,331	0,925	<0,001
Kreatinin	62,25	4,933	54,750	4,297	<0,001
Kyselina močová	221,313	46,953	196,438	47,897	<0,001
AST	0,368	0,12	0,329	0,113	<0,001
CK	0,786	0,319	0,619	0,276	<0,001

FW2 – sedimentace erytrocytů za druhou hodinu, Na – natremie, P – fosfatémie, AST – aspartátaminotransferáza, CK – kreatinfosfokináza. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

Tabulka 8: Změny hematologických parametrů před a po hemoreoferéze (normální rozložení) – párový t-test

veličina	před		po		p
	průměr	sm. odchylka	průměr	sm. odchylka	
Leukocyty	10,4	4,2	12,0	4,8	0,025
Hemoglobin	123,4	13,4	122,6	16,1	0,861
Hematokrit	0,367	0,0349	0,367	0,0446	0,757
MCV	89,5	4,3	90,1	4,5	0,128
trombocyty	304,9	59,4	286,1	59,7	0,01
MTV	9,493	0,509	9,506	0,417	0,716
Trombocyt. hematokrit	0,29	0,063	0,274	0,062	0,025

MCV – průměrný objem červené krvinky, MTV – střední objem trombocytů. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

Počet trombocytů klesá statisticky významně, ale klinicky tento malý pokles význam nemá. Rovněž očekávaný pokles hladin celkové bílkoviny a albuminu není klinicky významný a hladiny se rychle upravují. Zaznamenali jsme také zvýšení počtu leukocytů.

10.2.3. Funkční stav a agregace destiček

Jako standardní screeningové testy pro zjištění dysfunkce primární hemostázy se v současnosti používají při měření pomocí přístroje PFA 100 měřící moduly kolagen/epinephrin (COL/EPI), k další základní diferenciální diagnostice slouží modul kolagen/ADP (COL/ADP). Tímto se rozpoznají hlavní z defektů primární hemostázy, ať již primární či sekundární etiologie (tabulka 11). To vedlo k hypotéze, že by uvedené vyšetření mohlo být vhodným markerem též ke sledování účinnosti reoferézy u TAO.

Výsledky analýzy PFA-100 před a po výkonu u pacientů s FH :
Zprvu jsme provedli k ověření metody 70 vyšetření v případě familiární hypercholesterolémie, kde pacienti rovněž prodělávají opakované hemoreoferézy. Míra prodloužení po procedurách ovšem nedosáhla statistické významnosti.

Vzhledem k tomu, i k ekonomické náročnosti jsme proto provedli jen 20 vyšetření u pacientů s TAO, tj. 5 párů vyšetření pomocí COL/EPI membrány (kolagen/epinephrin, resp. kolagen/adrenalin) a 5 párů vyšetření pomocí COL/ADP membrány (kolagen/ADP). Ve

4 vyšetřeních pomocí COL/EPI a v 6 COL/ADP jsme zaznamenali překročení referenčních mezí již před léčebnou procedurou. Po hemoreoferéze došlo ve všech případech k prodloužení CT oproti hodnotám před výkonem, z toho překročení referenčních mezí jsme stanovili v 6 vyšetřeních pomocí COL/EPI a ve 4 COL/ADP. Míra prodloužení po procedurách ovšem nedosáhla statistické významnosti ($p < 0,16$).

Uzavíráme, že vyšetření destičkami zprostředkované hemostázy pomocí přístroje PFA-100 při hemoreoferéze je dobře proveditelné a může být užitečné. Je rozhodně technicky lépe proveditelné, nežli soubor agregací standardního typu. Prodloužení CT, které nastávalo ve všech případech, napovídá pro sníženou aktivitu destiček po výkonech. Statistické významnosti však nebylo dosaženo zřejmě pro nízký počet nemocných a variabilitu jejich stavu. Bude třeba prověření na větších počtech vyšetření, hlavně ovšem u většího počtu nemocných, a to za definovaného celkového klinického stavu pacientů, což soustavně provádíme i po ukončení výzkumu.

10.2. 4. Adhezní schopnost endotelu a aktivita fibrinolýzy

Tabulka 9a: Změny koagulačních parametrů před a po hemoreoferéze (normální rozložení) – párový t-test

Veličina	před		po		p
	průměr	Sm. odchylka	průměr	Sm. odchylka	
PAI	19,113	9,7	15,8	13,8	0,632
Trombomoduli	5,072	0,655	4,050	0,704	0,038
n					
vWF	129,1	29,3	66,0	25,8	0,012

PAI – inhibitor aktivátoru plasminogenu, vWF – vonWillebrandův faktor. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

Tabulka 9b: Změny koagulačních parametrů před a po hemoreoferéze (nenormální rozložení) - Wilcoxon Signed Rank Test

Veličina	před			po			P
	medián	25. perc	75. perc	medián	25. perc	75. perc	
t-PA	4,35	3,75	6,7	2,2	1,7	2,95	0,008

T-PA – tkáňový aktivátor plasminogenu. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

Hladina vonWillebrandova faktoru i trombomodulinu statisticky významně po hemoreoferéze klesá, což bylo očekáváno, ale klinicky tyto změny významné nejsou.

Procedura nevede k aktivaci fibrinolýzy. Hladina inhibitoru aktivátoru plasminogenu se statisticky významně nemění a aktivita tkáňového aktivátoru plasminogenu dokonce statisticky významně klesá.

10.2.5. Expres solubilních adhezních molekul

Tabulka 11: Změny speciálních parametrů před a po hemoreoferéze (normální rozložení) – párový t-test

Veličina	před		Po		p
	průměr	Sm. odchylka	průměr	Sm. odchylka	
Selectin	138,38	29,9	132,353	25,9	0,169
Endoglin	6,34	1,59	6,073	1,59	0,616
MCP1	344,2	510,527	520,414	456,982	0,001

MCP-1 – chemotaktický protein monocytů 1 (monocyte chemotactic protein). Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti

Hladiny adhezních solubilních molekul se při hemoreoferéze snižovaly. Vysoce statisticky významné bylo snížení chemotaktického proteinu monocytů 1.

10.2. 6. Povrchové znaky a ukazatelé apoptózy

Tabulka 11: Změny speciálních parametrů před a po hemoreoferéze (normální rozložení) – párový t-test

veličina	před		po		p
	průměr	Sm. odchylka	průměr	Sm. odchylka	
sApoFas	804,92	280,33	785,858	310,884	0,7
CD30	34,636	19,402	29,837	18,967	<0,001
IL10	73,493	21,061	62,899	23,307	<0,001
CD40L	4714,357	1844,428	4451,600	1720,223	0,564

ApoFas – solubilní protein FAS/Apo-1 (CD 95MCP-1 – chemotaktický protein monocytů 1 (monocyte chemotactic protein). Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

Hladina ukazatele apoptózy - solubilní Fas/Apo-1 se neměnila. Došlo k poklesu sérové koncentrace CD30, což svědčí pro snížení aktivity T lymfocytů. Tento nálezn je významný, protože buněčná imunita má v patogenezi TAO podstatný význam.

V poslední době se ukazuje také význam CD40, jehož zvýšená exprese byla popsána vazivovou tkání z orbity (113). Hladiny ligandu CD40 se u našich nemocných hemoreoferézou neměnily. Procedura také vedla ke statisticky významnému poklesu interleukinu 10.

10.2. 7. Markery lipoperoxidace

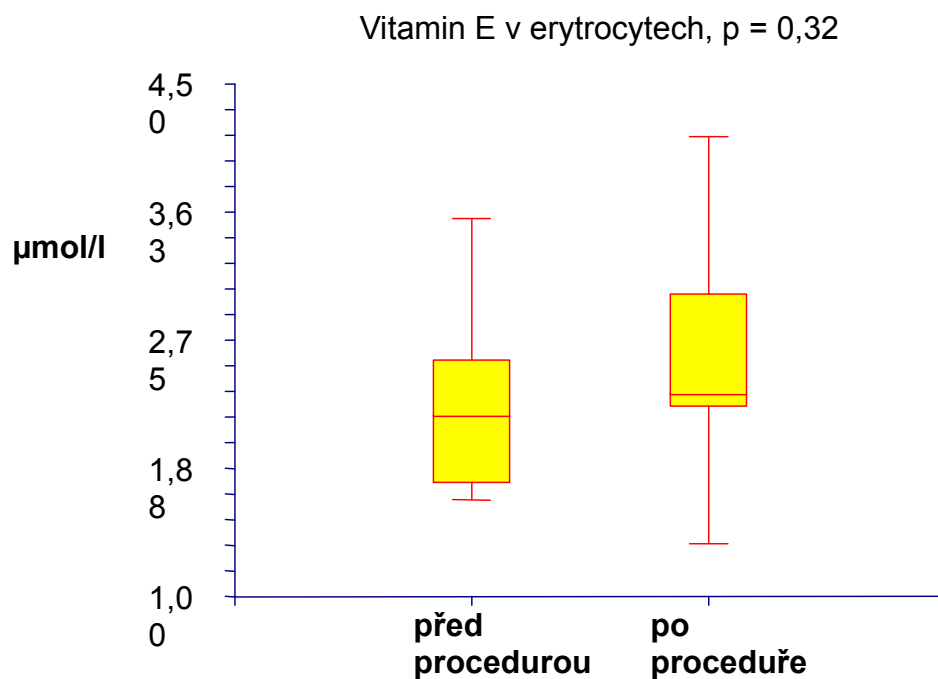
Výsledky jsou uvedeny v tabulce číslo 8 společně s výsledky vyšetření cholesterolu ve frakcích lipoproteinů, (frakce VLDL, LDL a HDL), které byly získány pomocí ultracentrifugace. Jsou shrnuty v tabulce číslo 12.

Tabulka č. 12: Markery peroxidace a hladiny cholesterolu u pacientů s tyreoidální orbitopatií

sledovaný parametr	N	před procedurou		po proceduře		statistická významnost p
		Mean	SD	Mean	SD	
Vitamin E v erytrocytech	8	2,33	0,61	2,58	0,81	0,3264
Vitamin E-HDL	15	9,74	3,73	3,21	1,10	0,0007
Vitamin E-LDL	15	10,28	2,47	3,23	0,74	0,0007
Vitamin E-VLDL	15	5,60	1,78	3,24	0,82	0,0007
Vitamin A v seru	15	1,98	0,50	1,61	0,39	0,0007
Vitamin E v seru	15	24,10	4,70	10,30	1,92	0,0007
Cholesterol-VLDL	15	1,36	0,54	0,40	0,14	0,0007
Cholesterol-LDL	15	3,27	0,81	0,94	0,19	0,0007
Cholesterol-HDL	15	1,08	0,24	0,64	0,14	0,0007

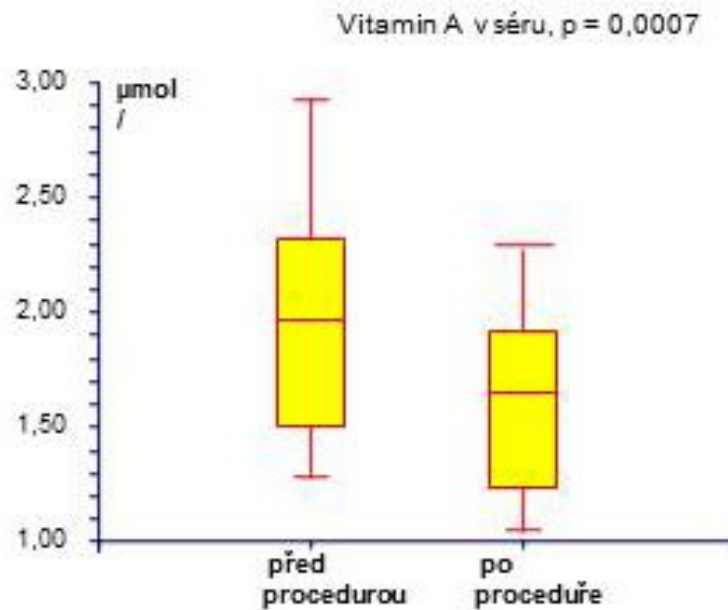
Vitamin E-HDL = vitamin E ve vrstvě HDL, Vitamin E-LDL = vitamin E ve vrstvě LDL, Vitamin E-VLDL = vitamin E ve vrstvě VLDL. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

Obraz č. 5: Změny hladin vitamínu E v erytrocytech u nemocných s tyreoidální orbitopatií



U souboru pacientů jsme potvrdili pokles hladin vitamínu E ve frakcích HDL, LDL i VLDL, neboť při proceduře je odstraňován cholesterol. To dokazuje tabulka č. 1 - pokles cholesterolu ve všech lipoproteinových frakcích. Stejně tak byl zjištěn pokles hodnot vitamínů E, A v séru. Jako příklad uvádíme hladinu vitamínu A - viz graf na obrazu č. 6.

Obraz č. 6: Změny hladin vitamínu A v séru u nemocných s TAO



Ve skupině pacientů léčených hemoreoferézou byl také statisticky zhodnocen poměr vitamínu E a cholesterolu v séru a jednotlivých lipoproteinových frakcích. Důležitý byl výsledek, kdy nedošlo ke snížení poměru vitamínu E ku cholesterolu ve všech frakcích lipoproteinů a také v séru, naopak tento poměr vzrostl, ve vrstvě totálního cholesterolu i statisticky významně – viz tabulka číslo 13.

Tab. 13: Poměr vitamínu E a cholesterolu v séru a jednotlivých lipoproteinových frakcích u pacientů s tyreoidální orbitopatií

sledovaný parametr	N	před procedurou		po proceduře		statistická významnost P
		Mean	SD	Mean	SD	
Vitamin E-VLDL/ Cholesterol-VLDL	15	7,45	2,31	8,44	2,94	0,1183
Vitamin E-LDL/ Cholesterol-LDL	15	3,2	0,66	3,47	0,61	0,1322
Vitamin E-HDL/ Cholesterol-HDL	15	5,13	0,94	5,15	1,06	1,0226
Vitamin E- serum/Cholesterol sérum	15	4,16	0,78	4,96	0,77	0,0010

Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

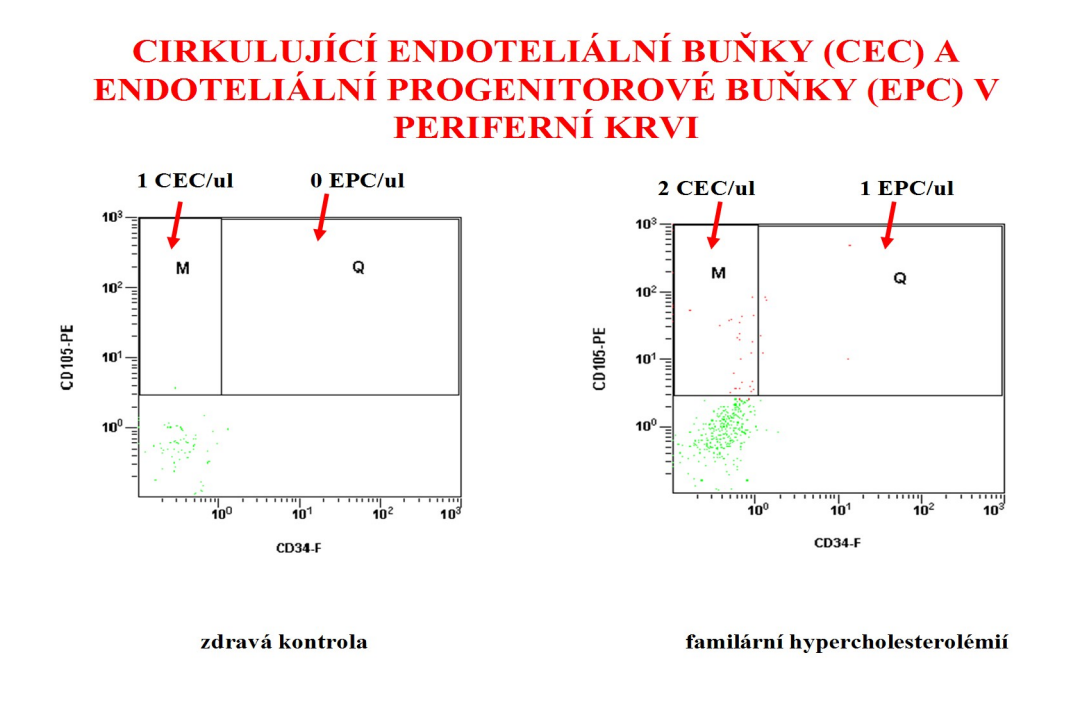
Lze tedy shrnout: Významným výsledkem je vyšetření vitamínu E v buněčných membránách (v erythrocytech) – po hemoreoferéze hladina vitamínu E neklesá. Tkáňové koncentrace vitamínu E tak tedy zůstávají zachovány i přes dramatické snížení jeho tukového nosiče v krvi. Ve frakcích HDL, LDL i VLDL hladina vitamínu E klesá, stejně tak byl zjištěn pokles hodnot vitamínu E a A v séru. To bylo očekávané, protože je značně snížen i cholesterol. Mnohem zásadnější význam má však poměr vitamínu E a cholesterolu v séru a jednotlivých lipoproteinových frakcích, kde se relativní obsah vitamínu E neměnil, byla dokonce tendence k vzestupu. Intervence, které vedou k redukci oxidace LDL cholesterolu jsou považovány za antiaterogenní a obecně prospěšné. Sledovaní jedinci nevykazovali klinické známky deficitu vitamínu E, a jejich sérové koncentrace vitamínu E se nelišily od normálních hodnot. Popsaná změna vypovídá o relativním zvýšení obsahu vitamínu E v lipoproteinových frakcích v situaci, kdy dochází k dramatického snížení koncentrace jejich tukového nosiče.

Sledování uvedených markerů lipoperoxidace tedy potvrdilo významný a pozitivní efekt procedur při léčbě uvedených nemocných.

10.2.8. Cirkulující endoteliální partikule

Pokusili jsme se rozvinout problematiku cirkulujících endoteliálních buněk (CEC), jejichž stav odráží míru poškození endoteliální výstelky a ukazuje i jejich přímý vztah k angiogenezi. Pomocí monoklonálních protilátek lze určit míru jejich zralosti, aktivace nebo apoptózy. Vyšla řada prací (Beerepoot et al., 2004; Makin et al., 2004; Moroni et al., 2005; Tepper et al., 2002) popisujících endoteliální poškození u některých jiných chorob. Endoteliální buňky se uvolňují do krevního oběhu, vznikají cirkulující endoteliální buňky (CEC) a je tak možno je detekovat v periferní krvi. CEC v periferní krvi je možné detekovat imunocytochemicky na základě exprese specifických proteinů na jejich povrchu pomocí průtokové cytometrie. Nicméně výskyt CEC je velmi nízký mezi 0,01% a 0,0001% periferních mononukleárních buněk, proto musí být metoda pro jejich detekci velmi přesná a reprodukovatelná. Technickou obtížnost dokumentuje obr. č. 7.

Obraz č. 7:



Metoda stanovení CEC (cirkulující endoteliální buňky) a také EPC (endoteliální progenitorové buňky) však přesto byla úspěšně zavedena. CEC jsme identifikovali na základě určitých parametrů FS a SS, kde FS podává informace o velikosti buněk, SS o její granularitě. Dále jsme CEC charakterizovali jako CD45-/CD105+ buňky a dále jako CD45-/CD105+

CD34low buňky. Kvantifikace proběhla za pomoci fluorescenčních polystyrenových kuliček při sběru minimálně 100 000 buněk. EPC byly detekovány na základě ko-exprese CD105 (endoglin) a CD34high (marker kmenových progenitorových buněk). Využili jsme multiparametrickou gatovací strategii a použili ji pro detekci endoteliálních buněk v periferní krvi pacientů s diagnózou TAO. Měření bylo provedeno u pacientů tak, jak přicházeli k léčbě vždy na začátku a na konci léčebné série. Celkem bylo hodnoceno 10 párových vzorků (před a po proceduře), to znamená, že bylo provedeno 20 měření u 5 pacientů. Jako kontroly bylo vyšetřeno 31 zdravých dobrovolníků. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 14.

Tabulka 14: Výsledky měření CEC a EPC

	CEC ($\times 10^3/m$) - před výkonem	CEC ($\times 10^3/ml$)- po výkonu	EPC ($\times 10^3/ml$)- před výkonem	EPC ($\times 10^3/ml$) – po výkonu
Thyreoidální orbitopatie	0.46(s.d.0,37)	0.64(s.d.0,71)	0.30(s.d.0,57)	0,76(s.d.0,22)
Kontroly	0.49(s.d.0,76)	-	0.14(s.d.0,11)	-

CEC= cirkulující endoteliální buňky, EPC = endoteliální progenitorové buňky

Počty CEC se před a po výkonu neliší. Po výkonech se počet EPC i CEC lehce zvýšil (zvýšení však bylo statisticky významné jen u EPC). Domníváme se, že jde o obvyklý následek styku krve s lehce smáčivým povrchem hadiček v aparaturách při extrakorporální eliminaci. Z tohoto důvodu by bylo zajímavé provést vyšetření u pacientů 24 – 48h po výkonu. Toto nebylo v našem výzkumu plánováno ani ekonomicky zajištěno. Etickou komisí nebyla tato vyšetření schválena.

Provedli jsme také srovnání počtu CEC a EMP u kontrol a nemocných, výsledky se statisticky významně neliší ($p = 0,91/0,14$).

Závěrem lze tedy shrnout:

- Byla zavedena metoda vyšetření EMP, dále byla zavedena metoda vyšetření CEC a EPC.-
- Výsledky: Počet EMP a EPC není při tyreoidální orbitopatii zvýšen. Nesnižuje se po hemoreoferéze.
- I když jsou výsledky vesměs negativní, námi zjištěná pozorování o hladině EMP, CEC

a EPC při TAO jsou pravděpodobně unikátní.

Protože výsledky se nelišily od kontrol ani neměnily po výkonech, byla vyšetření prováděna jen první dva roky výzkumu.

10.2.9. Hladiny hormonů štítné žlázy

Hemoreoferéza neovlivnila hladiny hormonů štítné žlázy ani hladinu tyreostimulačního hormonu TSH. Tyto výsledky jsou v souladu s naší zkušeností s léčbou tyreotoxické krize výměnou plazmy (obdobnou metodou, s nespecifickou extrakorporální eliminací).

**Tabulka 15a: Změny hladiny hormonů před a po hemoreoferéze (nenormální rozložení)
- Wilcoxon Signed Rank Test**

Veličina	před			po			P
	Medián	25. perc	75. perc	medián	25. perc	75. perc	
fT4	20,24	17,072	20,997	18,530	15,262	19,785	0,005
TSH	0,720	0,138	2,505	0,570	0,115	1,615	0,023

fT4 – volný tyroxin. Tučně jsou označeny veličiny, jejichž změny dosáhly statistické významnosti.

**Tabulka 15b: Změny p hladiny hormonů před a po hemoreoferéze (normální rozložení)
– párový t-test**

Veličina	před		po		P
	průměr	Sm. odchylka	průměr	Sm. odchylka	
fT3	3,526	0,718	3,649	0,685	0,098

fT3 – volný trijodtyroin

11. Diskuse

Tyreoidální orbitopatie (TAO) je onemocněním, které významně ovlivňuje kvalitu života pacienta a představuje terapeuticky obtížnou komplikaci autoimunitních chorob štítné žlázy. I mírné formy jsou pro nemocného nepříjemné a často obtížně léčebně ovlivnitelné. Závažná orbitopatie je pak onemocněním znetvořujícím a invalidizujícím, představuje pro nemocného ohrožení zraku, jednak pro riziko poškození zrakového nervu při významné infiltraci orbity, útlaku a sekundární nitrooční hypertenzi, jednak pro možnost poškození rohovky při exoftalmu.

Přestože v posledních letech došlo k velkému pokroku v pochopení mechanismu vzniku a rozvoje TAO, přesná imunopatogeneze onemocnění není dosud zcela objasněna.

Navíc průběh onemocnění je obtížně predikovatelný, často dochází k nečekaným relapsům onemocnění a u žádného nemocného nelze v jakékoliv fázi nemoci vyloučit zhoršení stavu, a to pomalé či velmi prudké. Výsledky léčby jsou často ne zcela uspokojivé, velké procento pacientů zůstává nespokojeno s konečným výsledkem léčebného procesu.

Relativně nízká incidence a prevalence onemocnění je důvodem obtížného zavádění nových terapeutických metod do praxe.

Již více než 50 let jsou u pacientů s TAO léčbou první volby glukokortikoidy. Bohužel se nejedná o léčbu kauzální, je využíváno nescifických imunosupresivních a protizánětlivých účinků glukokortikoidů. Perorální léčba glukokortikoidy v dávkách, které jsou nutné k ovlivnění autoimunitního procesu, je však u většiny pacientů provázena nežádoucími účinky. V posledních 20 letech se pro léčbu tyreoidální orbitopatie začala používat léčba megadávkami kortikoidů intravenózně, tzv. pulzní léčba - která se ukázala být bezpečnější a účinnější. Tato léčba je v současné době považována za léčebnou metodu první volby.

Stále znovu je však kladena otázka, jak přistupovat k nemocným, kde je efekt glukokortikoidní léčby ne zcela neuspokojivý, u kterých dochází k relapsům onemocnění po ukončení terapie, či u kterých dojde při glukokortikoidní terapii k výskytu závažných nežádoucích účinků.

O dalších léčebných přístupech u závažné TAO existuje celá řada prací, s výsledky a stanovisky často zcela protichůdnými. Mnoho zpočátku slibných léčebných metod, u kterých byl často pozitivní efekt prokázán na malém souboru nemocných v nerandomizovaných studiích (např. léčba somatostatinovými analogy, atd.) – byl později

při dobře navržených randomizovaných studiích prokázán jen okrajový benefit (zdali vůbec nějaký).

V polovině minulého století byla do praxe uvedena extrakorporální eliminační léčebná metoda - výměnná plazmaferéza. První léčebnou indikací byl hyperviskozní syndrom u Waldeströmovy makroglobulinémie, postupně nová léčebná metoda našla uplatnění v dalších medicínských oborech, s úspěchem začala být používána u mnoha autoimunitních onemocnění. Vzhledem k autoimunitnímu původu TAO upoutala tato léčebná metoda rovněž pozornost odborníků, zabývajících se léčbou pacientů s TAO. V 80. letech minulého století se objevilo několik prací s použitím plasmaferézy u pacientů s velmi závažnou formou TAO (93-100,114), výsledky studií jsou nejednotné. Vesměš šlo ale o kasuistická sdělení, nebo o popis nevelkého souboru nemocných a nikdy nebyla zařazena skupina kontrolní. Ve většině prací bylo navíc použito několik léčebných metod zároveň. Navíc je známo, že TAO má variabilní průběh a přičíst zlepšení jen jedné použité terapeutické modalitě je obtížné (115). Plazmaferéza tedy nedoznala většího rozšíření při léčbě pacientů s TAO – jedním z důvodů byl jistě i fakt že dříve používaná standardní výměna plazmy nebyla bez rizika (nebyla selektivní, možnost přenosu infekce při náhradě odebrané plazmy atd.).

Koncem minulého století došlo ke zdokonalení aferetických metodik – standardní výměna plazmy byla nahrazena selektivnějšími a bezpečnějšími metodami – např. membránovou diferenční filtrací, hemoreoferézou či specifickou imunoadsorpcí. Možnost využití nových aferetických technik znovu upoutala zájem odborníků, zabývajících se léčbou TAO. Velmi nadějnou se jevila práce německých autorů (105), kteří referovali o příznivém efektu imunoadsorpce u pacientů s refrakterní TAO. U těchto nemocných byly prakticky vyčerpány všechny konvenční léčebné metody pro nízký efekt či kvůli závažným nežádoucím účinkům. Pacientům byla tedy navržena léčba pomocí imunoadsorpce. Následně pak podstoupili celkem 20 procedur imunoadsorpce. Oba pacienti pocítili signifikantní zlepšení obtíží již po úvodním cyklu (6 procedur), u obou došlo k významnému zlepšení kvality života, pozitivní efekt léčby byl potvrzen oftalmologickým vyšetřením.

Tato práce nás inspirovala k navržení naší studie. K terapii nemocných jsme zvolili léčbu hemoreoferézou, která již byla na našem pracovišti používaná u nemocných z jiných indikací (věkem podmíněná makulární degenerace, komplikace diabetu – diabetická noha, diabetická retinopatie, akutní idiopatická hluchota). Námi použitá hemoreoferéza má proti imunoadsorpci u TAO výhodu v tom, že je asi o jednu třetinu kratší (výkon trvá v průměru 3 hodiny) a je také v našich podmínkách asi o třetinu levnější. Podle literárních údajů není u TAO nijak méně účinná než imunoadsorpce, což souhlasí s našimi dosavadními

zkušenostmi u výše uvedených chorob.

Vzhledem k finančnímu limitu bylo možné zařadit jen velmi omezený počet nemocných, rovněž bylo možné využít jen omezené množství léčebných procedur.

Naše sestava tak představuje první randomizovanou studii, zabývající se léčbou závažné TAO hemoreoferézou. Do studie byli zařazeni nemocní, u nichž přetrvávala výrazná aktivita choroby přes mnohdy dlouhou léčbu vysokými dávkami kortikoidů. Všichni pacienti byli léčeni standardní léčbou pulzy metylprednisolonu a polovina z nich také hemoreoferézou. Ukázalo se, že aktivita choroby poklesla u obou skupin pacientů. To potvrzuje předchozí sdělení, že parenterální léčba pulzy kortikoidů je účinnější než léčba perorální (49,50). U pacientů, léčených kombinovaně pulzy metylprednisolonu a hemoreoferézou došlo k poklesu aktivity choroby (posuzované pomocí klinického skóre aktivity) rychleji než při samotné kortikoterapii. Při sledování po dobu 6 měsíců však nebyl mezi oběma skupinami zjištěn žádný klinicky významný rozdíl ve výsledku léčby.

Vyšetření evokovaných potenciálů je velmi citlivým ukazatelem postižení očního nervu. Krátce po zahájení léčby jsme zjistili zlepšení jen ve skupině pacientů, léčených hemoreoferézou. V dlouhodobém sledování však opět nebyl rozdíl signifikantní. Zde je třeba zdůraznit, že významné poškození očního nervu bylo vylučovacím kritériem pro účast ve studii, protože tito pacienti jsou indikováni k dekompresní operaci. Výsledky vizuálních evokovaných potenciálů byly tedy u nemocných již před léčbou prakticky normální, takže nebylo možno očekávat významnější změnu během terapie.

Rovněž šíře okohybných svalů, měřená na CT, byla na začátku studie výrazně abnormální jen u některých nemocných. U těch nemocných, kde byla šířka okohybných svalů na počátku terapie zvýšena, došlo ke zlepšení. Při porovnání obou skupin však nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Omezený přínos terapie hemoreoferézou by bylo možno vysvětlit i tím, jak bylo rozvedeno podrobně v kapitole patogeneze TAO, že význam v patogenezi onemocnění nemají jen protilátky a imunitní komplexy, které je možno aferetickými technikami odstranit, ale především buněčná imunita, která je touto terapií zjevně ovlivněna podstatně méně.

Naše studie má několik omezení.

Především bylo zařazeno jen nevelké množství pacientů, především z důvodů finanční náročnosti hemoreoferézy. Hodnota zejména negativních statistických hodnocení je proto omezená.

Toto však neplatí o hodnocení změn sledovaných parametrů během procedury- vzhledem k tomu, že každý z deseti nemocných podstoupil 10 procedur, bylo možno

vyhodnotit sledované parametry u celkem 100 hemoreoferéz. Podle očekávání jsme prokázali jednoznačný pokles imunoglobulinů všech tříd a také snížení specifických protilátek – proti receptoru pro TSH, tyreoglobulinu a tyreoidální peroxidáze. Došlo také k poklesu markerů buněčné imunity – konkrétně solubilního antigenu CD30 a monocytárního chemotaktického proteinu. Význam signální dráhy CD30 je přitom v patogeneze TAO dobře prokázán a jeho hladina může předpovídat odpověď na radioterapii orbit (116, 117). Procedura také vedla ke statisticky významnému poklesu interleukinu 10. Protože tento je především cytokinem protizánětlivým, pro danou chorobu to není nález příznivý.

Po hemoreoferéze byl rovněž zaznamenáno navýšení počtu leukocytů. Zvýšení počtu leukocytů po proceduře je považován některými autory za znak lehké aktivace komplementu (74).

Po procedurách bylo prokázáno relativní zvýšení obsahu vitamínu E v lipoproteinových frakcích v situaci, kdy dochází k dramatického snížení koncentrace jejich tukového nosiče. Pokud jde o hemoreoferézy, nenašli jsme v dosavadní literatuře podobné práce a tato zjištění.

Limitaci naší studie představuje rovněž soubor nemocných. Vstupním kritériem pro výběr nemocných byla trvající aktivita choroby i po delším období podávání kortikoidů v terapeutických dávkách. Medián trvání TAO u vybraných nemocných byl 29, respektive 17,5 měsíce. Je tedy dobře možné, že při časnějším zařazení nemocných - t.j. nemocných s nově diagnostikovanou chorobou, by výsledky byly příznivější. Je totiž dlouho známo, že fibrotické změny v orbitě již nejsou ovlivnitelné konzervativní terapií.

Dle našich předpokladů se metoda ukázala být pro pacienty bezpečná. Nežádoucí účinky byly málo časté a jen mírné. Ze všech sledovaných parametrů byl klinický významný pokles fibrinogenu. Pouze u jedné pacientky byl pokles hladin fibrinogenu tak výrazný, že byla nutná substituce.

Závěrem je možno shrnout, že randomizovaná studie prokázala rychlejší pokles klinického skóre aktivity orbitopatie při léčbě hemoreoferézou, než při samotné terapii pulzy kortikoidů. Dlouhodobý výsledek terapie se však významně nelišil a proto má tato metoda v terapii jen omezený význam.

12. Závěry:

1. Naše studie je první randomizovanou studií, zabývající se léčbou závažné tyreoidální orbitopatie hemoreoferézou.
2. Z důvodu finanční náročnosti metody bylo do studie zařazeno jen nevelké množství nemocných, což omezuje zejména hodnotu negativních statistických hodnocení.
3. Limitací naší studie představuje rovněž soubor nemocných. Dle vstupních kritérií byly zařazeni nemocní s delším trváním onemocnění. Výraznějšího efektu by bylo pravděpodobně možno dosáhnout při zařazení nemocných s nově diagnostikovanou chorobou.
4. Léčba hemoreoferézou se ukázala být účinnou a bezpečnou – u všech pacientů došlo k poklesu aktivity i závažnosti nemoci – v dlouhodobém sledování však nebyl zjištěn statistický významný rozdíl při porovnání se skupinou pacientů léčených samotnou kortikoterapií.

13. Doporučení pro praxi:

1. Léčba hemoreoferézou zřejmě nebude na základě naší práce patřit mezi standardně používané metody v léčbě tyreoidální orbitopatie – nebyl přesvědčivě prokázán výraznější efekt při porovnání s terapií, používanou v současné době při léčbě pacientů s TAO (pulzní léčbou kortikoidy)
2. K zařazení hemoreoferézy mezi běžně metody používané při léčba pacientů TAO by bylo potřeba randomizovaných kontrolovaných studií se zařazením většího počtu pacientů
3. V naší práci byla prokázána bezpečnost námi zavedené modifikace léčebné hemoreoferézy – této léčebné možnosti by bylo tedy možné využít u pacientů, kde selhávají jiné, dosud používané léčebné metody, při těžkých nežádoucích reakcích či u těhotných žen
4. Vzhledem k prokázané bezpečnost námi zavedené modifikace léčebné hemoheoferézy bude možné tuto léčebnou metodu bez obav využívat při terapii pacientů z jiných indikací

14. Použitá literatura

1. **BARTLEY, GB.** *The epidemiologic characteristics and clinical course of ophthalmopathy associated with autoimmune thyroid disease in Olmsted County, Minnesota.* Trans Am Ophthalmol Soc. 1994;92: p.477–588
2. **SOETERS, M.R., van ZEIJL, C.J.J., BOELEN, A., KLOOS, R., SAEED, P., VRIESENDORP, T.M., MOURITS, M.P.** *Optimal management of Graves' orbitopathy: a multidisciplinary approach.* The Netherland Journal of Medicine, 2011, Vol. 69, 7/8: p. 302-308
3. **LAURBERG, P., BERMAN DC., BULOW PEDERSEN I., ANDERSEN, S., CARLÉ, A.** *Incidence and clinical presentation of moderate to severe Graves' orbitopathy in a Danish population before and after iodine fortification of salt.* J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97: p.2325–2332
4. **HIROMATSU, I., EGUCHI, H., TANI, J., KASAOKA M., TESHIMA, Y.** *Graves' ophthalmopathy: epidemiology and natural history,* Intern. Med., 2014; 53(5):p.353-60.
5. **TELLEZ, M., COOPER, J., EDMONS, C.** *Graves' ophthalmopathy in relation to cigarette smoking and ethnic origin,* Clin. Endocrinol. (Oxf.), 1992, Vol. 36, p. 291-294
6. **STAN, MN., BAHN, R.S.** *Risk factors for development or deterioration of Graves' ophthalmopathy.* Thyroid, 2010, Vol. 20(7), p. 777-783
7. **BAHN, RS.** *Graves' ophthalmopathy.* N Engl J Med, 2010, 362: p. 726-738.
8. **FORBES, G .,GORMAN, C.A., BRENNAN, M.D., GEHRING, D.G., ILSTRUP, D.M., EARNEST, F.** *Ophthalmopathy of Graves' disease: computerized volume measurement of the orbital fat and muscle.* Am J Neuroradiol, 1986, 7(4): p. 651-656.
9. **BARTALENA, L., BALDESCHI, L., DICKINSON, A., ECKSTEIN, A., KENDALL-TAYLOR, P., MARCOCCI, C., MOURITS, M., PERROS, P., BOBORIDIS, K., BOSCHI, A., CURRÒ, N., DAUMERIE, C., KAHALY, G,J., KRASSAS, G.E., LANE C.M., LAZARUS, J.H., MARINÒ, M., NARDI, M., NEOH, C., ORGIAZZI, J., PEARCE, S., PINCHERA, A., PITZ, S., SALVI, M., SIVELLI, P., STAHL, M., VON ARX, G., WIERSINGA, W.M.** *Consensus statement of the European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of GO.* Eur J Endocrinol, 2008, 158, p. 273-285.
10. **METCALFE RA., WEETMAN AP.** *Stimulation of extraocular muscle fibroblasts by cytokines and hypoxia, possible role in thyroid associated ophthalmopathy.* Clin. Endocrinol. (Oxf.), 1994, 40, p. 67-72

11. HEGEDUS, L., BRIX, T.H., VESTERGAARD, P. *Relationship between cigarette smoking and Graves' ophthalmopathy*. Journal of Endocrinological Investigation 2004, 27, p.265–271.
12. HAGE, E., ASPLUND K. *Is endocrine ophthalmopathy related to smoking?* BMJ 1987, 295, p. 634-635
13. BARTALENA, L., MARCOCCI C., TANDA ML., MANETTI, L., DELL'UNTO, E., BARTOLOMEI, MP., NARDI, M., MARTINO, E., PINCHERA, A. *Cigarette smoking and treatment outcomes in Graves' ophthalmopathy*. Ann Intern Med. 1998; 129:, p.632–635.
14. ECKSTEIN, A., QUADBECK, B., MUELLER, G., RETTENMEIER, AW., HOERMANN, R., MANN, K., STEUHL, P., ESSER, J. *Impact of smoking on the response to treatment of thyroid associated ophthalmopathy*. Br J Ophthalmol. 2003;87: p. 773–776.
15. KRASSAS, GE., SEGNI, M., WIERSINGA, WM. *Childhood Graves' ophthalmopathy: results of a European questionnaire study*. Eur J Endocrinol. 2005; p.153:515–520
16. PFEILSCHIFTER, J., ZIEGLER, R. *Smoking and endocrine ophthalmopathy: impact of smoking severity and current versus lifetime cigarette consumption*. Clin Endocrinol (Oxf) 1996;45:477–481.
17. BARTALENA, L., MARCOCCI, C., BOGAZZI, F., MANETTI, L., TANDA ML., DELL'UNTO, E., BRUNO-BOSSIO, G., NARDI, M., BARTOLOMEI, MP., LEPRI, A., ROSSI, G., MARTINO, E., PINCHERA, A. *Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy*. N Engl J Med. 1998;338:p.73–78.
18. MARCOCCI, C., BRUNO-BOSSIO, G., MANETTI, L., TANDA, ML., MICCOLI, P., LACCONI, P., BARTOLOMEI, MP., LEPRI, A., NARDI, M., PINCHERA, A. *The course of Graves' ophthalmopathy is not influenced by near total thyroidectomy: a case-control study*. Clin Endocrinol (Oxf) 1999;51: p.503–508.
19. TALLSTEDT, L., LUNDELL, G., TORRING, O., WALLIN, G., LJUNGGREN, JG., BLOMGREN, H., TAUBE, A., SJOBERG, HE., SAAF, M., THOREN, M., ALINDER, I., FARNEBO, LO., HAMBERGER B., HALL, P., TENGROTH, B., LOWHAGEN, T., NORBERG R., CORSTEDT, T. *Occurrence of ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism*, N Engl J Med. 1992;326:p. 1733–1738.
20. TRAIK, F., TALLSTEDT, L., ABRAHAM-NORDLING, M., ANDERSSON, T., BERG, G., CALISSENDORFF, J., HALLENGER, B., HALLENGREN, B., HEDREN, P., LANTZ, M., NASTROM, E., PONJAVIC, V., TAUBE, A., TORRING, .

- O., WALLIN, G., ASMAN, P., LUNDELL, G.** *Thyroid-associated ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism with antithyroid drugs or iodine-131.* J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:p. 3700–3707
- 21. ACHARYA, SH., AVENELL, A., PHILIP, S., BURR, J., BEVAN, JS., ABRAHAM, P.** *Radioiodine therapy (RAI) for Graves' disease (GD) and the effect on ophthalmopathy: a systematic review.* Clin Endocrinol (Oxf) 2008;69:943–950
- 22. STAN MN., DURSKI MN., BRITO JP., BHAGRA S., THAPA P., BAHN RS.** *Cohort study on radioactive iodine-induced hypothyroidism: implications for Graves' ophthalmopathy and optimal timing for thyroid hormone assessment.* Thyroid 2011, 98 (9), p. 3671-3677
- 23. BARTALENA, L.** *The dilemma and how to manage Graves' hyperthyroidism in patient with associated orbitopathy,* J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96 (3), p. 592-599.
- 24. BARTALENA, L., MARCOCCI, C, BOGAZZI, F., PANICUCCI, M., LEPRI, A., PINCHERA, A.** *Use of corticosteroids to prevent progression of Graves' ophthalmopathy after radioiodine therapy for Graves' hyperthyroidism.* N Engl J Med. 1989;321: p.1349–1352
- 25. LAI, A., SASSI, L., COMPRI, E., MARINO, F., SIVELLI, P., PANTANIDA, E., TANDA, ML., BARTALENA L.** *Lower dose prednisone prevents radioiodine-associated exacerbation of initially mild or absent Graves' orbitopathy: a retrospective cohort study.* J Clin Endocrinol Metab. 2010;95: p. 1333–1337
- 26. BAHN, R.S., BURCH, H.B., COOPER, D.S., GARBER, J.R., GREENLEE, M.C., KLEIN, I., LAURBERG, P., MC DOUGALL, I.R., MONTORI, V.M., RIVKEES, S.A., ROSS, D.S., SOSA, J.A., STAN, MN., AMERICAN THYROID ASSOCIATION, AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGIST.** *Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists.* Thyroid. 2011 Jun;21(6): p.593-646
- 27. ECKSTEIN, A.K., PLICHT, M., LAX, H., NEUHAUSER, M., MANN, K., LEDERBOGEN, S., HECKMANN, C., ESSER, J., MORGENTHALER, N.G.** *Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 2006, 91(9), p.3464-3470
- 28. WIERSINGA, WM., PRUMMEL, MF.** *Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy.* Clin endocrinol (OXF), 2000, 52, p.

267-271.

29. DREXHAGE, H.A. *Are there more than antibodies to the thyroid stimulating hormone receptor that meet the eye in Graves' disease?* Endocrinology, 2006, 147, p. 9-12.

30. BRIX, T.H., KYVIK, K.O., CHRISTENSEN, K., HEGEDÜS, L. *Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts.* J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86, p. 930-934.

30. BANCHEREAU, J., BAZAN, F., BLANCHARD, D., BRIÈRE, F., GALIZZI, J.P., VAN KOOTEN, C., LIU, Y.J., ROUSSET, F., SAELAND, S. *The CD40 antigen and its ligand.* Annu Rev Immunol, 1994, 12, p. 881-922.

31. SMITH, T.J., SCIAKY, D., PHIPPS, R.P., BRIÈRE, F., GALIZZI, J.P., VAN KOOTEN, C., LIU, Y.J., ROUSSET, F., SAELAND, S. *CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases.* Thyroid, 1999, 9, p. 749-755.

32. SEMPOWSKI, G.D., ROZENBLIT, J., SMITH, T.J., PHIPPS, R.P. *Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production.* Am J Physiol, 1998, 274, p. C707-714.

33. FELDON, S.E., PARK, D.J., O'LOUGHLIN, C.W., NGUYEN, V.T., LANDSKRONER-EIGER, S., CHANG, D., THATCHER, T.H., PHIPPS, R.P. *Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46, p. 3913-3921.

34. TOMER, Y., CONCEPCION, E., GREENBERG, D.A. *A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease.* Thyroid, 2002, 12, p. 1129-1135.

35. KAVVOURA, F.K., AKAMIZU, T., AWATA, T., BAN, Y., CHISTIAKOV, D.A., FRYDECKA, I., GHADERI, A., GOUGH, S.C., HIROMATSU, Y., PLOSKI, R., WANG, P.W., BAN, Y., BEDNARCZUK, T., CHISTIAKOVA, E.I., CHOJM, M., HEWARD, J.M., HIRATANI, H., JUO, S.H., KARABON, L., KATAYAMA, S., KURIHARA, S., LIU, R.T., MIYAKE, I., OMRANI, G.H., PAWLAK E, TANIYAMA, M., TOZAKI, T., IOANNIDIS, J.P. *Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis.* J Clin Endocrinol .Metab, 2007, 92, p. 3162-3170.

36. SAVERINO, D., BRIZZOLARA, R., SIMONE, R., CHIAPPORI, A., MILINTENDA-FLORIANI, F., PESCE, G., BAGNASCO, M. *Soluble CTLA-4 in autoimmune thyroid diseases: relationship with clinical status and possible role in the*

immune response dysregulation. Clin Immunol, 2007, 123, p. 190-198.

37. HEWARD, J.M., BRAND, O.J., BARRETT, J.C., CARR-SMITH, J.D., FRANKLYN, J.A., GOUGH, S.C. *Association of PTPN22 haplotypes with Graves' disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92, p. 685-690.

38. SIMMONDS, M.J., HOWSON, J.M., HEWARD, J.M., CORDELL, H.J., FOXALL, H., CARR-SMITH, J., GIBSON, S.M., WALKER, N., TOMER, Y., FRANKLYN, J.A., TODD, J.A., GOUGH, S.C. *Regression mapping of association between the human leukocyte antigen region and Graves disease*. Am J Hum Genet, 2005, 76, p. 157-163.

39. YIN, X., LATIF, R., TOMER, Y., DAVIES, T.V. *Thyroid epigenetics: X chromosome inactivation in patients with autoimmune thyroid disease*. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1110, p. 193-200.

40. BRIX, T.H., KNUDSEN, G.P., KRISTIANSEN, M., KYVIK, K.O., ORSTAVIK, K.H., HEGEDÜS, L. *High frequency of skewed X-chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to thyroid autoimmunity*. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90, p. 5949-5953.

41. CHEN, B., TSUI, S., SMITH, T.J. *IL-1 beta induces IL-6 expression in human orbital fibroblasts: identification of an anatomic-site specific phenotypic attribute relevant to thyroid-associated ophthalmopathy*. J Immunol, 2005, 175, p. 1310-1319.

42. CHEN, B., TSUI, S., BOEGLIN, W.E., DOUGLAS, R.S., BRASH, A.R., SMITH, T.J. *Interleukin-4 induces 15-lipoxygenase-1 expression in human orbital fibroblasts from patients with Graves disease. Evidence for anatomic site-selective actions of Th2 cytokines*. J Biol Chem, 2006, 281, p. 18296-18306.

43. BAHN, R.S. *Thyrotropin receptor expression in orbital adipose/connective tissues from patients with thyroid-associated ophthalmopathy*. Thyroid, 2002, 12, p. 193-195.

44. ZHANG, L., BAKER, G., JANUS, D., PADDON, C.A., FUHRER, D., LUDGATE, M. *Biological effects of thyrotropin receptor activation on human orbital preadipocytes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47, p. 5197-5203.

45. AGRETTI, P., DE MARCO, G., DE SERVI, M., MARCOCCI, C., VITTI, P., PINCHERA, A., TONACCHERA, M. *Evidence for protein and mRNA TSHr expression in fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) after adipocytic differentiation*. Eur J Endocrinol, 2005, 152, p. 777-784.

46. FELDON, S.E., O'LOUGHLIN, C. W., RAY, D.M., LANDSKRONER-EIGER, S., SEWERYNIAK, K.E., PHIPPS, R.P. *Activated human T lymphocytes express cyclooxygenase-2 and produce proadipogenic prostaglandins that drive human orbital*

fibroblast differentiation to adipocytes. Am J Pathol, 2006, 169, p. 1183-1193.

47. MARCOCCI, C., BARTALENA, L., TANDA ML., MANETTI, L., DELL'UNTO, E., ROCCHI, R., BARBESINO G., MAZZI, B., BARTOLOMEI, MP., LEPRI, P., CARTEI, F., NARDI, M., PINCHERA, A. *Comparison of the effectiveness and tolerability of intravenous or oral glucocorticoids associated with orbital radiotherapy in the management of severe Graves' ophthalmopathy: results of a prospective, single-blind, randomized study*. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86: p.3562–3567.
48. KAHALY, GJ., PITZ, S., HOMMEL, G., DITTMAR, M., *Randomized, single-blind trial of intravenous versus oral steroid monotherapy in Graves' orbitopathy*. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90: p. 5234–5240.
49. STIEBEL-KALISH, H., ROBENSHTOK, E., HASANREISOGLU, M., EZRACHI, D., SHIMON, I., LEIBOVICI, L. *Treatment modalities for Graves' ophthalmopathy: systematic review and metaanalysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94, p. 2708-2716.
50. ZANG, S., PONTO, K.A., KAHALY, G.J. *Intravenous glucocorticoids for Graves' orbitopathy: efficacy and morbidity*. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96: p.320–332.
51. MARCOCCI, C., WATT, T., ALTEA, M.A., KROGH RASMUSSEN, A., FELDT-RASMUSSEN, U., ORGIAZZI, J., BARTALENA L., EUROPEAN GROUP ON GRAVES' ORBITOPATHY (EUGOGO) *Fatal and non-fatal adverse events of glucocorticoid therapy for Graves' orbitopathy: a questionnaire survey among members of the European Thyroid Association*. Eur J Endocrinol. 2012;166: p. 247–253.
52. MARINO, M., MORABITO, E., BRUNETTO, M.R., BARTALENA, L., PINCHERA, A., MARCOCCI, C. *Acute and severe liver damage associated with intravenous glucocorticoid pulse therapy in patients with Graves' ophthalmopathy*. Thyroid. 2004;14: p.403–406
53. ZANG, S., PONTO, K.A., PITZ, S., KAHALY, G.J., *Dose of intravenous steroids and therapy outcome in Graves' orbitopathy*. J Endocrinol Invest. 2011;34:p.876–880
54. LE MOLI, R., BALDESCHI, L., SAEED, P., REGENSBURG, N., MOURITS, MP, WIERSINGA WM. *Determinants of liver damage associated with intravenous methylprednisolone pulse therapy in Graves' ophthalmopathy*. Thyroid. 2007;17: p., 357–362
55. BARTALENA, L., KRASSAS, G.E., WIERSINGA, W., MAROCCI, C., SALVI, M., DAUMERIE, C., BOURNAUD, C., STAHL, M., SASSI, L., VERONESI, G., AZZOLINI, C., BOBORIDIS, K.G., MOURITS, M.P., SOETERS, M.R., BALDESCHI, L., NARDI, M., CURRO, N., BOSCHI, A., BERNARD, M., WON ARX, G. *European Group on Graves' Orbitopathy Efficacy and safety of three different cumulative doses of*

intravenous methylprednisolone for moderate to severe and active Graves' orbitopathy. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97:p. 4454–4463

56. EBNER, R., DEVOTO, M.H. WEIL, D., et al. *Treatment of thyroid associated ophthalmopathy with periocular injections of triamcinolone.* Br J Ophthalmol. 2004;88: p.1380–1386.

57. BARTALENA, L., MARCOCCI, C., TANDA, ML, PIANTANIDA, E., LAI, A., MARINO, M., PINCHERA A. *An update on medical management of Graves' ophthalmopathy.* J Endocrinol Invest. 2005;28: p. 469–478.

58. MOURITS, M.P., VAN KEMPEN-HARTEVELD, M.L., GARCIA, M.B., KOPPESCHAAR, H.P., TICK, L., TERWEE, C.B. *Radiotherapy for Graves' orbitopathy: randomised placebo-controlled study.* Lancet, 2000, 355, p. 1505-1509.

59. PRUMMEL, M.F., TERWEE, C.B., GERDING, M.N., BALDESCHI, L., MOURITS, M.P., BLANK, L., DEKKER, F.W., WIERSINGA, W.M. *A randomized controlled trial of orbital radiotherapy versus sham irradiation in patients with mild Graves' ophthalmopathy.* J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89, p. 15-20.

60. GORMAN, C.A., GARRITY, J.A., FATOURECHI, V., BAHN, R.S., PETERSEN, I.A., STAFFORD, S.L., EARLE, J.D., FORBES, G.S., KLINE, R.W., BERGSTRALH, E.J., OFFORD, K.P., RADEMACHER, D.M., STANLEY, N.M., BARTLEY, G.B. *A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study of orbital radiotherapy for Graves' ophthalmopathy.* Ophthalmology, 2001, 108, p. 1523-1534.

61. BARTALENA, L., MARCOCCI, C., CHIOVATO, L., LADDAGA, M., LEPRI, G., ANDREANI, D., CAVALLACCI, G., BASCHIERI, L., PINCHERA, A. *Orbital cobalt irradiation combined with systemic corticosteroids for Graves' ophthalmopathy: comparison with systemic corticosteroids alone.* J Clin Endocrinol Metab, 1983, 56, p. 1139-1144.

62. NG, C.M., YUEN, H.K., CHOI, K.L., CHAN, M.K., YUE, N K.T, NG, Y.W., TIU, SC. *Combined orbital irradiation and systemic steroids compared with systemic steroids alone in the management of moderate-to-severe Graves' ophthalmopathy: a preliminary study.* Hong Kong Med J, 2005, 11, p. 322-330.

63. MARCOCCI, C., BARTALENA, L., BOGAZZI, F., BRUNO-BOSSIO, G., LEPRI, A., PINCHERA, A. *Orbital radiotherapy combined with high dose systemic glucocorticoids for Graves' ophthalmopathy is more effective than radiotherapy alone: results of a prospective randomized study.* J Endocrinol Invest, 1991, 14, p. 853-860.

64. BRADLEY, E.A., GOWER, E.W., BRADLEY, D.J., MEYER, D.R., CAHILL, K.V., CUSTER, P. L, HOLCK D.E., WOOG, J.J. *Orbital radiation for Graves' ophthalmopathy:*

- a report by the American Academy of Ophthalmology. Ophthalmology. 2008;115: p.398–409*
- 65. DOLMAN, P.J., RATH, S.** *Orbital radiotherapy for thyroid eye disease. Curr Opin Ophthalmol. 2012;23: p.427–432*
- 66. GERLING, J., KOMMERELL, G., HENNE, K., LAUBENBERGER, J., SCHULTE-MÖNTING, J., FELLS, P.** *Retrobular irradiation for thyroid-associated orbitopathy: double-blind comparison between 2.4 and 16 Gy. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55, p. 182-189.*
- 67. KAHALY, G.J., ROSLER, H.P., PITZ, S., HOMMEL, G..** *Low- versus high-dose radiotherapy for Graves' ophthalmopathy: a randomized, single blind trial. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85, p. 102-108.*
- 68. WHELKAMP, I.M., TAN H., SAEED, P., SCHLINGEMANN, R.O., VERBRAAK, F.D., BLANK, L.E., PRUMMEL, M.F., WIERSINGA, W.M.** *Orbital irradiation for Graves' ophthalmopathy. Is it safe? A long- term follow-up study, Ophthalmology. 2004;111, p. 1557–1562*
- 69. BIGOS, S.T, NISULA, B.C., DANIELS, H.G, EASTMAN, R.C., JOHNSTON, H.H., KOHLER, P.O.** *Cyclophosphamide in the management of advanced Graves' ophthalmopathy. A preliminary report. Ann Intern Med, 1979; 90 (6), p. 921-3*
- 70. SMITH, J.R., ROSENBAUM, J.T.** *A role of methotrexate in the management of non-infectious orbital inflammatory disease. Br J Ophthalmol., 2001; 85: p. 1220-4*
- 71. PRUMMEL, M.F., MOURITS, M.P., BERGHOUT, A., KRENNING, E.P., VAN DER GAAG, R., KOORNNEEF, L., WIERSINGA, W.M.** *Prednisone and cyclosporine in the treatment of severe Graves' ophthalmopathy. N Engl J Med, 1989, 321, p. 1353-1359.*
- 72. KAHALY, G., SCHREZENMEIR, J., KRAUSE, U., SCHWEIKERT, B., MEUER, S., MULDER W., DENNEBAUM, R., BEYER, J.** *Cyclosporin and prednisone v. prednisone in treatment of Graves' ophthalmopathy: a controlled, randomized and prospective study. Eur J Clin Invest, 1986;16(5), p. 415-22*
- 73. CHANG, T.C., KAO, S.C.S., HUANG, K.M.** *Ocreotide and Graves' ophthalmopathy and pretibial myxoedema, Br. Med.J. 1992, 304, p. 158*
- 74. KRASSAS, G.E., DUMAS, A., PONTIKIDES, N., KALTSAS, T.** *Somatostatin receptor scintigraphy and octreotide treatment in patients with thyroid eye disease. Clin Endocrinol (Oxf)., 1995, 42, p. 571-80*
- 75. DICKINSON, A.J., VAIDYA, B., MILLER, M., COULTHARD, A., PERROS, P., BAISTER, E., ANDREWS, C.D., HESSE, L., HEVERHAGEN, J.T., HEUFELDER, A.E., KENDALL-TAYLOR, P.** *Double-blind, placebo-controlled trial of octreotide long-*

- acting repeatable (L thyroid-associated ophthalmopathy. Thyroid, 2002, 12, p. 193-195*
- 76. CHANG, T.C., LIAO, S.L.** *Slow-release lanreotide in Graves' ophthalmopathy: A double-blind randomized, placebo-controlled clinical trial. J Endocrinol Invest, 2006, 29, p. 413-422.*
- 77. STAN, M.N., GARRITY, J.A., BRADLEY, E.A., WOOG, J.J., BAHN, M.M., BRENNAN, M.D., BRYANT, S.C., ACHENBACH, S.J., BAHN, R.S.** *Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of long-acting release octreotide for treatment of Graves' ophthalmopathy. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91, p. 4817-4824.*
- 78. WEMEAU, J.L., CARON, P., BECKERS, A., ROHMER, V., ORGIAZZI, J., BORSON-CHAZOT, F., NOCAUDIE, M., PERIMENIS, P., BISOT-LOCARD, S., BOURDEIX, I., DEJAGER, S.** *Octreotide (long-acting release formulation) treatment in patients with Graves' orbitopathy: clinical results of a four-month, randomized, placebo-controlled, double-blind study. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90, p. 841-848. 63*
- 79. KAHALY, G., PITZ, S., MULLER-FORELL, W., HOMMEL, G.** *Randomized trial of intravenous immunoglobulins versus prednisolone in Graves' ophthalmopathy. Clin Exp Immunol, 1996, 106, p. 197-202.*
- 80. SEPPEL, T., SCHLAGHECKE, R., BECKER, A., ENGELBRECHT, V., FELDKAMP, J., KORNELY E.** *High-dose intravenous therapy with 7S immunoglobulins in autoimmune endocrine ophthalmopathy, Clin Exp Rheumatol, 1996, 14, suppl. 15, p. 109-14*
- 81. BASCHIERI, L., ANTONELLI, A., NARDI S., ALBERTI, B., LEPRI, A., CANAPICCHI, R., FALLAHI, P.** *Intravenous immunoglobulin versus corticosteroid in treatment of Graves' ophthalmopathy. Thyroid. 1997;7 p:579-585*
- 82. EL FASSI, D., NIELSEN, C.H., HASSELBALCH, H.C., HEGEDÜS, L.** *Treatment-resistant severe, active Graves' ophthalmopathy successfully treated with B lymphocyte depletion. Thyroid, 2006, 16, p. 709-710.*
- 83. SALVI, M., VANNUCCHI, G., CAMPI, I., ROSSI, S., BONARA, P., SBROZZI, F., GUASTELLA, C., AVIGNONE, S., PIROLA, G., RATIGLIA, R., BECK-PECCOZ, P.** *Efficacy of rituximab treatment for thyroid-associated ophthalmopathy as a result of intraorbital B-cell depletion in one patient unresponsive to steroid immunosuppression. Eur J Endocrinol, 2006, 154, p. 511-517.*
- 84. SALVI, M., VANNUCCHI, G., CAMPI, I., CURRÒ, N., DAZZI, D., SIMONETTA, S., BONARA, P., ROSSI, S., SINA, C., GUASTELLA, C., RATIGLIA, R., BECK-PECCOZ, P.** *Treatment of Graves' disease and associated ophthalmopathy with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: an open study. Eur J Endocrinol, 2007, 156, p. 33-40.*

- 85. EL FASSI, D., NIELSEN, C.H., BONNEMA, S.J., HASSELBALCH, H.C., HEGEDÜS, L.** *B lymphocyte depletion with the monoclonal antibody rituximab in Graves' disease: a controlled pilot study.* J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92, p. 1769-1772.
- 86. HEEMSTRA, K.A., TOES, R.E., SEPERS, J., PEREIRA, A.M., CORSSMIT, E.P., HUIZINGA, T.W., ROMIJN, J.A., SMIT, J.W.** *Rituximab in relapsing Graves' disease, a phase II study.* Eur J Endocrinol, 2008, 159, p. 609-615
- 87. BARTALENA, L.** *Imperfect treatments for a rare disease.* Eur Thyroid J.,2013,2, p. 259-269
- 88. BRADLEY E.A., GARRITY, J.A.** *Surgical management of Graves' ophthalmopathy:* The Endocrinologist 1999, 9, p. 371-378
- 89. TALLSTEDT L.** *Surgical treatment of thyroid eye disease.* Thyroid 8, 1998, p. 448-452
- 90. BARTALENA, L., PINCHERA, A., MARXOCCI, C.** *Management of Graves' ophthalmopathy : reality and perspectives.* Endocr. Rev. 2000, 21(2), p. 168-199
- 91. JARHULT, J., RUDBERG, C., LARSSON, E., SELVANDER, H., SJÖVALL, K., WINSÄ, B., RASTAD, J., KARLSSON, F.A., TEO STUDY GROUP.** *Graves' disease with moderate-severe endocrine ophthalmopathy-long term results of a prospective, randomized study of total or subtotal thyroid resection.* Thyroid, 2005, 15, p. 1157-1164.
- 92.MENCONI, F., MARINO, M., PINCHERA, A., ROCCHI, R., MAZZI, B., NARDI, M., BARTALENA, L., MARCOCCI, C.** *Effects of total thyroid ablation versus near-total thyroidectomy alone on mild to moderate Graves' orbitopathy treated with intravenous glucocorticoids.* J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92, p. 1653-1658.
- 93. DANDONA, P., MARSHALL, N., BIDEY, S., NATHAN, A., HAVARD, C.W.** *Successful treatment of exophthalmos and pretibial myxoedema with plasmapheresis.* Br Med J, 1979, 10, p. 374-376.
- 94. GLINOER, D., ETIENNE-DECERF, J., SCHROOYEN, M., SAND, G., HOYOUX, P., MAHIEU, P., WINAND, R.** *Beneficial effects of intensive plasma exchange followed by immunosuppressive therapy in severe Graves' ophthalmopathy.* Metab Pediatr Syst Ophthalmol, 1988, 11, p. 133-140.
- 95. GLINOER, D., SCHROOYEN, M.** *Plasma exchange therapy for severe Graves' ophthalmopathy.* Horm Res, 1987, 26, p. 184-189.
- 96.BERLIN, G., HJELM, H., LIEDEN, G., TEGLER, R.** *Plasma exchange in endocrine ophthalmopathy.* J Clin Apher, 1990, 5, p. 192-196.
- 97. KELLY, W., LONGSON, D., SMITHARD, D., FAWCITT, R., WENSLEY, R.,**

- NOBLE, J., KEELEY, J.** *An evaluation of plasma exchange for Graves' ophthalmopathy.* Clin Endocrinol (Oxf), 1983, 18, p. 485-493.
- 98. SAWERS, J.S., IRVINE, W.J., TOFT, A.D., URBANIAK, S.J., DONALDSON, A.A.** *Plasma exchange in conjunction with immunosuppressive drug therapy in the treatment of endocrine exophthalmos.* J Clin Lab Immunol, 1981, 6, p. 245-250.
- 99. ATABAY, C., SCHROOYEN, M., ZHANG, Z.G., SALVI, M., GLINOER, D., WALL, J.R.** *Use of eye muscle antibody measurements to monitor response to plasmapheresis in patients with thyroid-associated ophthalmopathy.* J Endocrinol Invest, 1993, 16, p. 669-674.
- 100. YAMAMOTO, K., SAITO, K., TAKAI, T., YOSHIDA, S.** *Diagnosis of exophthalmos using orbital ultrasonography and treatment of malignant exophthalmos with steroid therapy, orbital radiation therapy, and plasmapheresis.* Prog Clin Biol Res, 1983, 116, p. 189-205.
- 101. KLINGEL, R., FASSBENDER, C., FASSBENDER, T., ERDTRACHT, B., BERROUSCHOT, J.** *Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects.* Ther Apher, 2000, 4, p. 348-357.
- 102. KLINGEL, R., FASSBENDER, T., FASSBENDER, C., GÖHLEN, B.** *From membrane differential filtration to lipidfiltration: technological progress in low-density lipoprotein apheresis.* Ther Apher dial, 2003, 7, p. 305-358
- 103. VALBONESI, M.** *Therapeutic plasmapheresis and cascade filtration – Advances in technology and clinical applications.* Transfus Apher Sci, 2006, 34, p. 100-102.
- 104. BORBERG, H., TAUCHERT, M.** *Rheohaemapheresis of ophthalmological diseases and diseases of the microcirculation.* Transfus Apher Sci, 2006, 34, p. 41-49.
- 105. PROPHET, H., MATIC, G.B., WINKLER, R.E., TIESS, M., SCHNEIDEWIND, J.M., HEBESTREIT, G., MICHELSEN, A., RAMLOW, W.** *Two cases of refractory endocrine ophthalmopathy successfully treated with extracorporeal immunoabsorption.* Ther Apher, 2001, 5, p. 142-146.
- 106. BLAZEK, M., BLAHA, M., PECKA, M., BLAHA, V., MASIN, V., MALY, J.** *Primary hemostasis in patients treated with LDL-apheresis for severe familial hypercholesterolemia: a prospective pilot trial using PFA-100 analysis to rationalize therapeutic LDL-apheresis procedure.* Hematology, 2007, 12, p. 571-576
- 107. BLAHA, M., ZADAK, Z., BLAHA, V., ANDRYS C., HAVEL E., VYROUBAL P., BLAZEK M., FILIP, S., LANSKA, M., MALY, J.** *Extracorporeal LDL cholesterol elimination (25 years of experience in CZ).* Atheroscler Suppl, 2009, 10, p. 17-20
- 108. BLAHA, V., SOLICHOVA, D., CERNOHORSKY, D., HYSPLER R., ZDÁNSKÝ P., ZADÁK Z.** *Fluorometric assay of lipoperoxides and chromatographic analysis of alpha-*

- tocopherol and fatty acids as biomarkers of risk from coronary atherosclerosis*. Talanta, 2003, 60, p. 505-513.
- 109. NAKAJI, S.** *Current topics on immunoabsorption therapy*. Ther Apher, 2001, 5, p. 301-305.
- 110. BLAHA, M.** *Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2003, 46, p. 3-7.
- 111. BORBERG, H.** *Quo vadis haemapheresis. Current developments in haemapheresis*. Transfus Apher Sci, 2006, 34, p. 51-73.
- 112. PTAK, J.** 2004 Immunoabsorption in the therapy of myasthenia gravis. . Praha: 2004 Galen
- 113. HWANG, C.J., AFIFIYAN, N., SAND, D., NAIK, V., SAID, J., POLLOCK, S.J., CHEN, B., PHIPPS, R.P., GOLDBERG, R.A., SMITH, T.J., DOUGLAS, R.S.** *Orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy overexpress CD40: CD154 hyperinduces IL-6, IL-8, and MCP-1*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50, p. 2262-2268.
- 114. LEWIS, R.A., SLATER, N., CROFT, D.N.** *Exophthalmos and pretibial myxoedema not responding to plasmapheresis*. Br Med J, 1979, 2, p. 390-391.
- 115. BARTALENA, L., TANDA, M.L.** *Clinical practice. Graves' ophthalmopathy*. N Engl J Med, 2009, 360, p. 994-1001.
- 116. TERWEE, C.B., PRUMMEL, M.F., GERDING, M.N., KAHALY, G.J., DEKKER, F.W., WIERSINGA, W.M.** *Measuring disease activity to predict therapeutic outcome in Graves' ophthalmopathy*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005, 62, p. 145-155.
- 117. WAKELKAMP, I.M., GERDING, M.N., VAN DER MEER, J.W., PRUMMEL, M.F., WIERSINGA, W.M.** *Both Th1- and Th2-derived cytokines in serum are elevated in Graves' ophthalmopathy*. Clin Exp Immunol, 2000, 121, p. 453-457.