

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



MUDr. Libuše Křížová

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

**Research of vitreous and vitreoretinal interface in microvascular retinal disorders
focussed on eye complications of diabetes mellitus**

Disertační práce

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

Konzultantka: Prof. MUDr. Marta Kalousová, PhD

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 22.11.2015

Libuše Křížová

Podpis

Identifikační záznam:

KŘÍŽOVÁ, Libuše. *Výzkum sklivce a vitreoretinálního rozhraní u mikrovaskulárních chorob sítnice se zaměřením na oční komplikace diabetes mellitus. [Research of vitreous and vitreoretinal interface in microvascular retinal disorders focussed on eye complications of diabetes mellitus]*. Praha, 2015.116 s., 2 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Školitel Zima Tomáš.

ABSTRAKT

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

SEZNAM ZKRATEK

ACCORD	Action to control Cardiovascular risk in Diabetes
ACE	angiotensin konvertující enzym
AGE	advanced glycation endproducts (konečné produkty pokročilé glykace)
ApoA1	apolipoprotein A1
ApoB	apolipoprotein B
bFGF	basic fibroblast growth factor (základní růstový faktor fibroblastů)
BM	bazální membrána
CAT	cube average thickness (průměrná tloušťka sítnice v makule)
CRP	C-reaktivní protein
CRT	central retinal thickness (centrální tloušťka sítnice)
CTGF	connective tissue growth factor (růstový faktor pojivové tkáně)
CV	cube volume (objem makulární oblasti)
DAG	diacylglycerol
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM	diabetes mellitus
DME	diabetický makulární edém
DR	diabetická retinopatie
ECM	extracelulární matrix
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
FIELD	Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes
FP	flebopatie
GLUT	membránový transportér glukózy
HbA _{1c}	glykovaný hemoglobin
HDL	high density lipoprotein (vysokodenzní lipoprotein)
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor-1 alfa (faktor indukovaný hypoxií 1 alfa)

HRB	hematoretinální bariéra
HRE	hypoxia response element (částice odpovědi na hypoxii)
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1 (nitrobuněčná adhezí molekula-1)
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry (mezinárodní federace klinické chemie)
IGF-1	insuline-like growth factor-1 (insulinu podobný růstový faktor-1)
IL	interleukin
IQR	interquartil range (mezikvartilové rozmezí)
IRMA	intraretinální mikrovaskulární abnormality
KSME	klinicky signifikantní makulární edém
LDL	low density lipoprotein (nízkodenzní lipoprotein)
MA	mikroaneurysma
MAP-kináza	mitogen-activated protein-kinasa (mitogenem aktivovaná proteinkináza)
NADH	nikotinamid dinukleotid
NADPH	nikotinamid dinukleotid fosfát
NF- κ B	nukleární faktor kappaB
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NPDR	neproliferativní diabetická retinopatie
NVD	neovaskularizace na disku zrakového nervu
NVI	neovaskularizace na duhovce (iris)
NVS	neovaskularizace na sítnici
OCT	optická koherenční tomografie
PAD	perorální diabetika
PDGF	platelet-derived growth factor (růstový faktor odvozený od destiček)
PDR	proliferativní diabetická retinopatie
PEDF	pigment epithelium-derived factor (faktor odvozený od pigmentového epitelu)

PKC	proteinkinasa C
RAAS	renin angiotensin aldosteronový systém
RAGE	receptor pro konečné produkty pokročilé glykace
RH	retinální hemoragie
RO [·]	alkoxylové radikály
RON	reaktivní formy dusíku
RONS	reaktivní formy dusíku a kyslíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPE	retinální pigmentový epitel
SD	směrodatná odchylka
SK-KM	sklivcová koncentrace kyseliny močové
sRAGE	solubilní receptor pro konečné produkty pokročilé glykace
SRD	serous retinal detachment (sérózní odchlípení sítnice)
TE	tvrdé exsudáty
TGF-β	transforming growth factor beta (transformující růstový faktor beta)
TNF	tumor necrosis factor (faktor způsobující nekrózu nádorů)
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
UWFA	ultrawide field fluorescein angiography (širokouhlá fluorescenční angiografie)
VCAM	vascular cell adhesion protein (protein pro vaskulární buněčnou adhezi)
VEGF	vascular endothelial growth factor (cévní endoteliální růstový faktor)
WESDR	Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy

OBSAH

1 ÚVOD.....	11
1.1 EPIDEMIOLOGIE DR.....	11
1.2 SYSTÉMOVÉ FAKTORY V PATOGENEZI DR.....	12
1.2.1 Doba trvání a typ diabetu	13
1.2.2 Chronická hyperglykémie	14
1.2.3 Dyslipidemie	15
1.2.4 Systémová arteriální hypertenze	16
1.2.5 Genetické faktory	16
1.3 BIOCHEMICKÉ MECHANISMY V PATOGENEZI DR.....	17
1.3.1 Polyolová (sorbitolová) cesta	19
1.3.2 Neenzymatická glykace proteinů	20
1.3.3 Aktivace proteinkinasy C	22
1.3.4 Oxidační stres	23
1.3.5 Renin-Angiotensin-Aldosteronový systém	28
1.3.6 Růstové faktory	29
1.4 LOKÁLNÍ FAKTORY V PATOGENEZI DR.....	31
1.4.1 Poškození buněk cévní stěny a autoregulace toku krve	32
1.4.2 Ztlustění bazálních membrán	35
1.4.3 Porucha hematoretinální bariéry	35
1.4.4 Sklivec	39
1.5 KLASIFIKACE A KLINICKÝ OBRAZ DR.....	41
1.5.1 Neproliferativní diabetická retinopatie.....	41
1.5.2 Proliferativní diabetická retinopatie	44
1.5.3 Diabetická makulopatie	46
1.6 DIAGNOSTIKA	48
1.6.1 Biomikroskopické vyšetření.....	48
1.6.2 Stereoskopická či digitální fotografie	48
1.6.3 Fluorescenční angiografie	48
1.6.4 Optická koherenční tomografie	50
1.7 TERAPIE DR.....	51
1.7.1 Laserová koagulace	53
1.7.2 Inravitreální aplikace léčiv	54

1.7.3 Vitrektomie.....	56
2 HYPOTÉZA, CÍLE PRÁCE	58
2.1 HYPOTÉZA	58
2.2 CÍLE PRÁCE	59
3 METODIKA	60
3.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ.....	60
3.2 OPTICKÁ KOHERENČNÍ TOMOGRAFIE	65
3.3 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	65
3.4 LABORATORNÍ STANOVENÍ.....	66
3.5 STATISTICKÁ ANALÝZA	67
4 VÝSLEDKY VLASTNÍ PRÁCE	69
4.1 STUDIE STANOVENÍ KYSELINY MOČOVÉ A GLUKÓZY	69
4.2 VZTAH KYSELINY MOČOVÉ A VEGF	74
4.3 OCT PARAMETRY.....	80
5 DISKUSE.....	83
6 ZÁVĚR	90
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94

1 ÚVOD

Diabetes mellitus (DM) je skupina chronických, etiopatogeneticky heterogenních onemocnění, jejichž základním rysem je hyperglykémie. Vzniká v důsledku nedostatečného účinku inzulínu při jeho absolutním nebo relativním nedostatku a je provázen komplexní poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin (Pelikánová T. et al., 2012). V závislosti na vzrůstající celosvětové prevalenci bývá DM označován za civilizační chorobu. Mezi chronické komplikace DM řadíme především retinopatii, nefropatii a neuropatii. Postižení cév při DM je dále predispozičním faktorem pro vznik závažných kardiovaskulárních onemocnění (Pelikánová T. et al., 2012).

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

1.1 EPIDEMIOLOGIE DR

Diabetická retinopatie byla v České republice v letech 2005 - 2012 nejčastější mikrovaskulární komplikací DM. V roce 2013 bylo dokumentováno více pacientů s diabetickou nefropatií a DR se tak mezi mikrovaskulárními komplikacemi diabetu posunula na druhé místo (UZIS, 2015).

V roce 2013 bylo v České republice registrováno celkem 102 783 osob s diagnostikovanou DR. Prevalence tohoto onemocnění u všech diabetiků v ČR tak dosahuje 11,9 %. Z toho byla proliferativní forma (PDR) evidována u 27 073 diabetiků, což jsou 3,41 % z celkového počtu diabetiků a 26,3% z počtu diabetiků s DR (UZIS, 2015).

Výskyt diabetického makulárního edému (DME), tedy stadia DR, které může ohrozit centrální zrakovou ostrost, není v ČR statisticky evidován. Evropská epidemiologická data o DME jsou chudá a značně nekonzistentní. Celková celosvětová prevalence DME u pacientů s diabetem je 6,81% (6,74 - 6,89%) (Yau JW. et al., 2012). Téměř 30 let stará americká „The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR) je zatím největší epidemiologickou studií sledující prevalenci DME, která definovala přítomnost makulárního edému především pomocí biomikroskopického vyšetření. Z WESDR vyplývá, že výskyt DME souvisí s délkou trvání diabetu, hladinou glykovaného hemoglobinu a stupněm postižení sítnice u DR. U neproliferativní DR je uváděn výskyt DME v 6-63%, zatímco u proliferativní DR se DME vyskytuje až v 74% (Klein R. et al., 1989). Zajímavá data o DME můžeme očekávat ze studie PREAVAIL, která bude sledovat prevalenci DME v sedmi evropských zemích, mimo jiné pomocí moderních diagnostických metod jako je optická koherenční tomografie (Sosna T. et al., 2012).

I přes současné terapeutické možnosti zůstává v průmyslových zemích DR, jmenovitě diabetický makulární edém a komplikace proliferativní DR, jako je krvácení do sklivce nebo odchlípení sítnice, nejčastější příčinou praktické slepoty u pacientů v produktivním věku (mezi 20 a 74 lety) (Yonekura H. et al., 2005, American Diabetes Association, 2015). Medicínský, sociální a finanční dopad této nemoci je značný. Podle odhadů bylo v roce 2005 celosvětově přes 330 milionů nemocných diabetem, do roku 2025 se předpokládá, že množství diabetiků po celém světě bude zhruba 380 milionů (Tarr JM. et al., 2013). Příčinou tohoto nárůstu je, díky stále se zdokonalující zdravotnické péči, vzrůstající délka života diabetiků a celkový vzestup incidence diabetu. S tím souvisí i předpokládaný nárůst počtu pacientů s diabetickou retinopatií, která je přítomná téměř u všech pacientů s dobou trvání diabetu přes 20 let (Kalvodová B. et al., 2012).

1.2 SYSTÉMOVÉ FAKTORY V PATOGENEZI DR

Oko je u diabetu pouze jedním z konečných orgánů reprezentujícím mikrovaskulární komplikace. Ostatní přidružená systémová onemocnění mají nemalý podíl na vzniku a progresi DR a ovlivňují klinický průběh, odpověď na terapii i výslednou zrakovou ostrost. Vznik a progresi DR a DME souvisí úzce s typem, dobou trvání diabetu a

stavem metabolické kontroly (glykémie a glykovaný hemoglobin HbA_{1c}), jak potvrzují epidemiologické studie (Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993, 1995, 1998 a 2000, UK Prospective Diabetes Study Group 1998, Porta M. et al., 2001, Zhang L. et al., 2001, Raman R. et al., 2012). Důležitou roli mimoto hraje přidružená systémová arteriální hypertenze (Klein R. et al., 1985, 1996, 1998, Marshall G. et al., 1993, Agardh CD. et al., 1997, Zander E. et al., 1997, UK Prospective Diabetes Study Group, 1998, Raman R. et al., 2012), dyslipidemie (Ferris FL. et al., 1996, Chew EY., 1997, Porta M. et al., 2001, Chowdhury TA. et al., 2002, Leiter LA., 2005, Chew EY. et al., 2010), současný výskyt nefropatie (Haaslachter C. et al., 1993, Klein R. et al., 1993, 1995, Mathiesen ER. et al., 1995, Estacio RO. et al., 1998, Kotlarsky P. et al., 2014), či anemie (Shorb SR., 1985, Melberg NS. et al., 1995, Davis MD. et al., 1998, Thomas M. et al., 2005, Karoli R. et al., 2013).

Mezi nejdůležitější faktory, které se podílejí na rozvoji DR, patří:

- doba trvání DM
- typ DM
- chronická hyperglykémie/ HbA_{1c}
- dyslipidemie
- systémová arteriální hypertenze
- genetické faktory

1.2.1 Doba trvání a typ diabetu

Diabetes mellitus je rozdělován na dva základní typy; typ 1 (závislý na insulinu) a typ 2 (na insulinu nezávislý). Postupně s rozšiřujícími vědeckými poznatky o patofyziologických mechanismech lze rozlišit stále více podskupin DM, nejčastějším ovšem zůstává 2. typ, který zahrnuje 90 až 95% všech případů (American Diabetes Association, 2014). Metaanalýza 35 studií s celkovým počtem více než 20 000 pacientů s DR potvrdila, že přítomnost DR je závislá především na délce trvání DM (Yau JW. et al., 2012). Retinopatie u mladých pacientů s diabetem 1. typu se nerozvine dříve než po 3-5 letech trvání základního onemocnění (Valešová L., Hycl J., 2002). U diabetiků 2. typu, jejichž prevalence stoupá, je stanovení počátku onemocnění často obtížné. Je dokázáno, že sítnicové změny se začínají vyvíjet přinejmenším 7 let před stanovením klinické diagnózy (Harris MI., 1993), a tak je u diabetiků 2. typu DR nezhádka prvním

symptomem diabetu. Prevalence některé z forem DR po více než 20ti letech trvání diabetu je podle Yau 76,3% (Yau JW. et al., 2012), oproti 21,1% u pacientů s dobou trvání DM méně než 10 let. Ačkoli jsou pravidla kontroly glykémie u obou typů DM obdobná, studie ukazují, že prevalence DR je odlišná. V “Seoul Metropolitan City-Diabetes Prevention Program study” byla DR přítomná u 52,2% diabetiků 2. typu s délkou trvání DM 10 a více let, oproti 12,6% s trváním DM méně než 10 let. (Park CY. et al., 2012).

Výskyt proliferativní formy DR u DM 1. typu je po 15 letech trvání diabetu 25-50 %, oproti tomu u DM 2. typu dosáhne prevalence 25% až po 25 letech trvání choroby (Fišer I., 2007). Vysvětlení lze nalézt buď v odlišnosti metabolismu sítnice mladých diabetiků, nebo ve skutečnosti, že ke vzniku PDR je třeba dlouhodobé trvání vysokých hladin glykémie, což nastává pouze u diabetiků 1. typu (Fišer I., 2007).

Typ diabetu je také jedním z určujících faktorů k načasování terapie při DR. Dle Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) je účinek časně laserové koagulace sítnice lepší u diabetiků 2. typu a snižuje riziko zhoršení zraku po třech letech o 50 % (Ferris FL. et al., 1996). U diabetiků 1. typu se přistupuje k fotokoagulaci až se vznikem proliferativní formy DR (Fišer I., 2007).

1.2.2 Chronická hyperglykémie

Dvě epidemiologické klinické studie, Diabetes Control and Complication Trial (DCCT, 1993, 1995, 1998 a 2000) a United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS, 1998), prokázaly pozitivní efekt intenzivní kontroly glykémie ($HbA_{1c} \leq 7,0$ %) u pacientů s 1. a 2. typem diabetu. DCCT a UKPDS ukázaly téměř lineární závislost mezi HbA_{1c} a přítomností mikrovaskulárních komplikací. Zároveň tyto dvě studie naznačili, že další snížení HbA_{1c} ze 7,0% na 6,0% vede k dalšímu snížení progresu DR, ačkoli celkové riziko vzniku mikrovaskulárních komplikací již výrazně neklesne.

Novější studie Action to control Cardiovascular risk in Diabetes (ACCORD) (Chew EY. et al., 2010) rozdělila pacienty s DM 2. typu do dvou skupin (intenzivní kontrola: $HbA_{1c} \leq 6,0$ % vs. konvenční kontrola: $HbA_{1c} = 7,0 - 8,0$ %). U pacientů s intenzivní kontrolou DM docházelo ve srovnání s konvenční skupinou ke zvýšené incidenci úmrtí pravděpodobně následkem hypoglykémie. Následná analýza dat ukázala, že u pacientů s $HbA_{1c} \leq 7,0$ % byla mortalita srovnatelná s konvenční skupinou.

Yau prokázal, že prevalence některé z forem diabetické retinopatie u pacientů s $HbA_{1c} \leq 7,0 \%$ je 18 %, zatímco pokud byl $HbA_{1c} > 9,0 \%$, byla prevalence DR 51,2 % (Yau JW. et al., 2012). Podle autorů Zhang a Zhu snižuje intenzivní kontrola glykemie ($HbA_{1c} \leq 6,5 \%$) riziko vzniku diabetického makulárního edému a progresu DR (Zhu CH. et al., 2013, Zhang X. et al., 2014).

Mechanismus, kterým hyperglykemie způsobuje vznik a progresi mikrovaskulárního poškození, však dosud není jednoznačně objasněn. Bylo popsáno několik navzájem souvisejících biochemických cest, které se snaží vysvětlit spojitost mezi hyperglykemií a DR (White NH. et al., 2001, Matthews DR. et al., 2004) a jejichž principy dosud trvají. Mezi ty patří aktivace polyolové cesty, aktivace diacylglycerol-proteinkinasy C (DAG-PKC), zvýšená exprese růstových faktorů jako vascular endothelial growth factor (VEGF) a insulin-like growth factor 1 (IGF-1), hemodynamické změny, zvýšená tvorba konečných produktů pokročilé glykace (advanced glycation endproducts AGEs), hexosaminová dráha, oxidativní stres, aktivace renin-angiotensin-aldosteronového systému (RAAS), subklinický zánět a leukostáza. Jednotlivé změny spolu souvisí a navzájem se ovlivňují, jak bude detailně popsáno v kapitole 1.3.

1.2.3 Dyslipidemie

Dyslipidemie je jednoznačným rizikovým faktorem v rozvoji DM (Ravid M. et al., 1998) a je spojena i se zvýšeným rizikem progresu NPDR a PDR, jak bylo prokázáno v epidemiologických studiích. Hladina celkového cholesterolu u diabetiků 1. i 2. typu souvisí s množstvím tvrdých exsudátů u diabetické makulopatie (Klein BE. et al., 1991, Chew EY. et al., 1996), a s tím spojeným zhoršením zrakové ostrosti. Stejně tak při zvýšené sérové hladině triglycerolů je rozvoj tvrdých exsudátů a DME rychlejší (Ferris FL. et al., 1996, Miljanovic B. et al., 2004). Dvě novější intervenční studie „Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes“ (FIELD) (Keech et al., 2007) a „Action to control Cardiovascular risk in Diabetes“ (ACCORD) (Chew EY. et al., 2010) poukazují na pozitivní vliv fenofibrátu a statinů v prevenci i léčbě diabetického makulárního edému.

Chang a Wu shrnují poznatky nejenom o zmíněných „tradičních“ parametrech lipidového metabolismu, ale i o méně častých lipidových markerech a jejich vztahu k DR. Závažnost DR je nepřímo úměrná koncentraci apolipoproteinu A1 (ApoA1) a

přímo úměrná hladině apolipoproteinu B (ApoB) a poměru ApoB/ApoA1 (Chang YC., Wu WC., 2013).

1.2.4 Systémová arteriální hypertenze

Pacienti s diabetem často trpí přidruženou systémovou arteriální hypertenzí (Simonson DC., 1988). Wisconsin Epidemiology Study of Diabetic Retinopathy a United Kingdom Prospective Diabetes Study a další studie naznačují, že u diabetiků s hypertenzí se DR rozvine s vyšší pravděpodobností a v závažnější formě (Marshall G. et al., 1993, Agardh CD. et al., 1997, Klein R. et al., 1998, Zander E. et al., 1997) a progreduje rychleji než u kontrolní skupiny bez hypertenze (Agardh CD. et al., 1997, Klein R. et al., 1998). V aktuálním souhrnném článku, který porovnává závěry patnácti randomizovaných studií, autoři potvrzují, že snižování tlaku krve má pozitivní vliv ve 4-5ti leté prevenci incidence DR (Do DV. et al., 2015). Další studie též ukázaly, že korekce krevního tlaku má přímý vliv na incidenci DR (Matthews DR. et al., 2004, Yau JW. et al., 2012).

Bylo dokázáno, že vysoký krevní tlak u diabetických pacientů spolupůsobí při poškození endotelu retinálních cév (Hsueh WA., Anderson PW., 1992, Meyer-Rüsenberg B. et al., 2006). Poškozený endotel produkuje poté ve zvýšené míře růstové faktory vedoucí k progresi jak diabetické, tak hypertenzní retinopatie (Suzuma I. et al., 2001).

1.2.5 Genetické faktory

Pro skutečnost, že genetické faktory určují predispozici ke vzniku mikrovaskulárních komplikací, svědčí klinická pozorování a epidemiologické studie. Ve prospěch genetické hypotézy u DR mluví závěry několika studií, které poukazují na diskrepance v prevalenci DR u populace z USA (Ng DP., 2010, Kuo JZ. et al., 2014). Signifikantně vyšší je prevalence DR u hispánců, afroameričanů a Američanů pocházejících z Číny ve srovnání s bělochy. Mimo to podporuje genetickou teorii i fakt, že někteří nemocní jsou po desetiletích trvání diabetu přes prokazatelně dlouhodobě špatnou metabolickou kompenzaci bez orgánových komplikací, a naopak u jiných pacientů je jejich rozvoj extrémně urychlen, ačkoli podle objektivních kritérií nevybočuje jejich kompenzace z průměru (Pelikánová T., 2007).

V posledních několika dekádách roste počet studií hledajících geny predisponující ke vzniku DR, přesto ale DR zůstává jedním z nejkompexnějších, heterogenních a multifaktoriálních onemocnění. Ke genetickému výzkumu se používají studie dvojčat, rodinné studie, identifikace kandidátních genů a tzv. genome-wide association studie, ale žádné z nich zatím nepotvrdily významný výsledek a často přinášejí protikladné a nepřesvědčivé výsledky (Kuo JZ. et al., 2014). Ze závěrů metaanalýz vyplývá, že polymorfizmy genů pro aldózoreduktázu (*AKR1B1*), *VEGF*, *angiotensin-I konvertující enzym*, a *intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)* souvisejí s DR, ačkoli jednotlivé studie mají často nesourodé nebo dokonce protikladné závěry (Abhary S. et al., 2009, Ng DP., 2010).

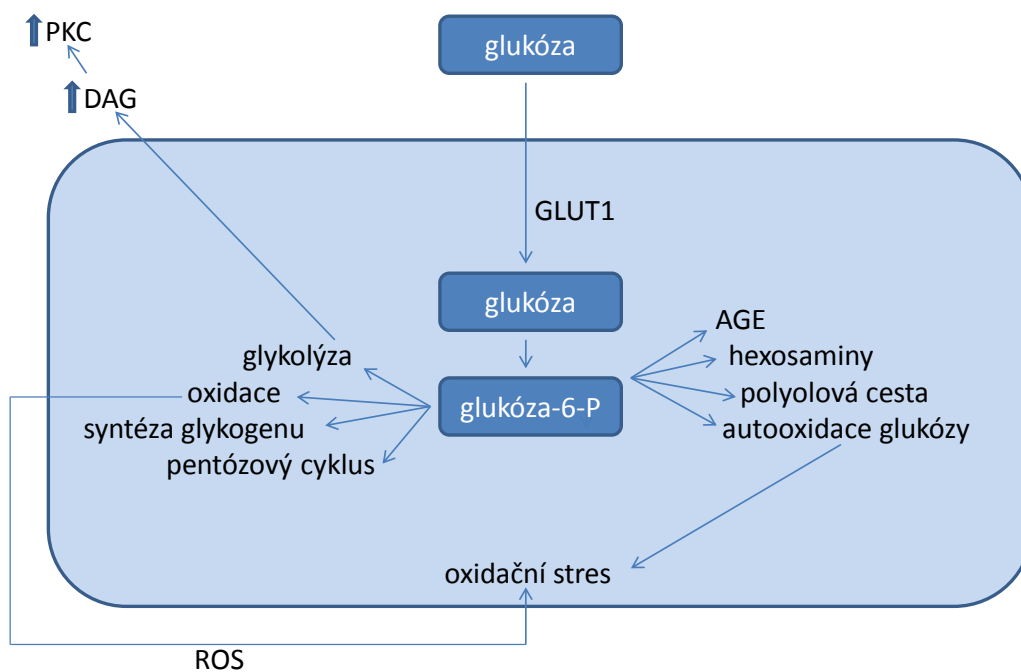
1.3 BIOCHEMICKÉ MECHANISMY V PATOGENEZI DR

Patofyziologie diabetické retinopatie a diabetického makulárního edému je studována mnoho desítek let, přesto zůstává přesný biochemický a molekulární mechanismus jejich vzniku stále ne zcela objasněný. Ačkoli se etiopatogeneticky DM 1. typu a DM 2. typu zřetelně liší, mají společný faktor, který je zodpovědný za vznik a rozvoj DR a DME. Tímto společným patologickým jevem je, jak bylo zmíněno výše, kolísání koncentrace glukózy v krvi, především hyperglykémie (Bhagat N. et al., 2009, Coscas G. et al., 2010, Sosna T. et al., 2010).

Intracelulární metabolismus glukózy znázorňuje schéma na obrázku 1. Po vstupu glukózy do buněk je glukóza fosforylována na glukóza-6-fosfát. Její metabolické cesty za fyziologických podmínek znázorňuje levá část obrázku: probíhá oxidace glukózy, glykolýza, která je provázena tvorbou diacylglycerolu (DAG) a je syntetizován zásobní glykogen. V případě nadbytku glukózy intracelulárně, k němuž dochází při hyperglykemii zejména v non-inzulin-dependentních tkáních, jsou patologicky zvýšené náhradní metabolické cesty, které se za fyziologických podmínek uplatňují pouze minimálně. Jde o:

- a) akcentaci polyolové cesty,
- b) neenzymatickou glykaci proteinů,
- c) aktivaci proteinkinasy C a
- d) indukci oxidačního stresu.

Obrázek 1: *Intracelulární metabolismus glukózy* (zdroj: Pelikánová T., 2007).



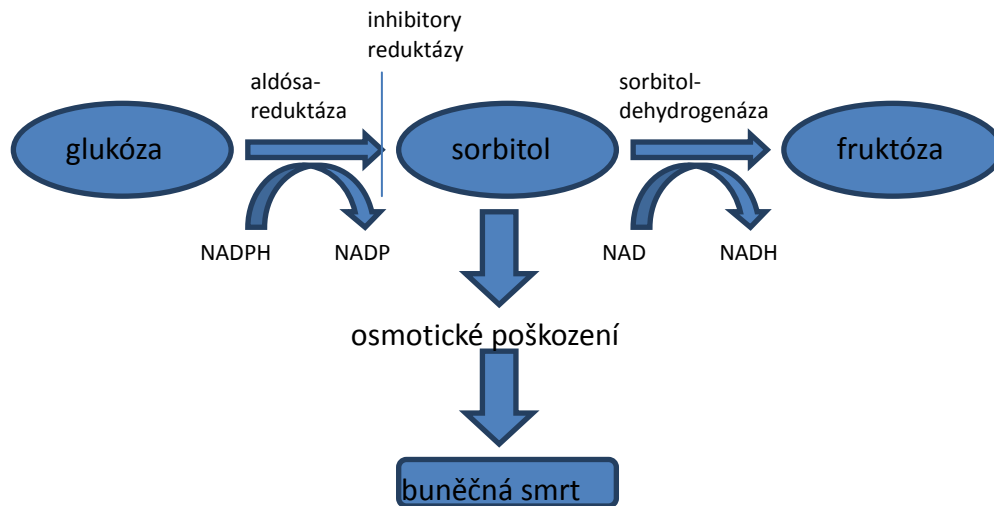
Tyto náhradní metabolické cesty glukózy poté spouští další biochemické reakce, které vedou k uvolňování cytokinů, adhezivních molekul, mediátorů zánětu a růstových faktorů. Klíčová role v patogenezi DR patří vedle hyperglykemie a oxidačního stresu také lokální zánětlivá reakce. Aktivace rezidentních buněk sítnice a infiltrujících buněk vede k produkci mnoha mediátorů, které můžeme rozdělit na skupinu působků s vazomotorickými vlastnostmi, ať již vazokonstrikčními či vazodilatačními, skupinu růstových faktorů, a skupin látek, které se uplatňují jako mediátory zánětu či mají prokoagulační trombotické vlastnosti. Jednotlivé faktory mají téměř pravidelně více různých funkcí a vzájemně se ovlivňují. Některé z nich působí synergicky, jako je tomu např. u angiotensinu II a VEGF, nebo se mohou naopak uplatňovat jako antagonisté. Příkladem může být vazokonstrikční účinek angiotensinu II a vazodilatační efekt oxidu dusnatého nebo protikladný vliv VEGF a pigment epithelium-derived factor (PEDF) na angiogenezi (Pelikánová T. et al., 2003). Také koncentrace mediátoru podmiňuje způsob jeho účinku. Například oxid dusnatý, který má při nižších koncentracích řadu „příznivých“ účinků, může mít při vyšších hladinách efekty opačné, indukuje apoptózu

buněk a řadu toxických reakcí na podkladě tvorby peroxinitrátu. Podobně je tomu i u kyseliny močové, která má při vyšších koncentracích za následek posun redoxní rovnováhy (Hayden MR., Tyagi SC., 2004).

1.3.1 Polyolová (sorbitolová) cesta

U diabetu dochází ke zvýšené metabolizaci glukózy polyolovou cestou (obrázek 2). Enzym aldózureduktáza je přítomný v sítnici a za použití nikotinamid dinukleotid fosfátu (NADPH) jako kofaktoru redukuje glukózu na glucitol (sorbitol) v případě, že jsou nasyceny normální cesty metabolismu glukózy při hyperglykemii (Murray RK. at al., 2013). Vzniklý glucitol je sorbitoldehydrogenázou dále konvertován na fruktózu. Glucitol vznikající intracelulárně však neprochází buněčnými membránami a hromadí se uvnitř buněk, což vede ke zpomalení jeho metabolizace na fruktózu (Gabbay KH., 1975, Kinoshita JH., 1990) a jeho hromadění má za následek například osmotické poškození buněk sítnice (Gabbay KH., 1973).

Obrázek 2: Polyolová cesta metabolismu glukózy (zdroj: Tarr JM. et al., 2013)



Fruktóza produkovaná polyolovou cestou může být dále fosforylována na fruktóza-3-fosfát, který může být degradován na 3-deoxyglukoson. Obě tyto molekuly mají vysoce reaktivní potenciál a mohou vést ke zvýšené produkci AGEs (Szwergold BS. et al., 1990).

Spotřeba NADPH jako kofaktoru polyolové cesty snižuje jeho dostupnost v buňkách. NADPH je ale zároveň kofaktorem glutathion-reduktázy, která regeneruje intracelulární

hladinu glutathionu. Nedostatek NADPH tak snižuje antioxidační kapacitu buněk (Barnett PA. et al., 1986). Vniklý posun rovnováhy NADH/NAD⁺ je označován jako spouštěcí mechanismus NADH oxidázy, která zvyšuje produkci volných kyslíkových radikálů v buňkách (Lasségue B., Clempus RE., 2003).

Studie zabývající se rolí polyolové cesty v patogenezi diabetické retinopatie ukazují, že hladina aldózoreduktázy a glucitolu je zvýšená v různých sítnicových strukturách jako kapilárních pericytech (Li W. et al., 1986, Hohman TC. et al., 1989), retinálních endoteliálních buňkách (Chakrabarti S. et al., 1987, Dagher Z. et al., 2004, Darel VR. et al., 2008), gangliových buňkách (Chakrabarti S. et al., 1987, Cheung AKH. et al., 2005), Müllerových buňkách (Chakrabarti S. et al., 1987), buňkách retinálního pigmentového epitelu (Chakrabarti S. et al., 1987) a neuronech (Cheung AKH. et al., 2005). Tyto studie také dokazují, že zvýšená hladina aldózoreduktázy zároveň koreluje s poruchou sítnicových buněk.

Polyolová cesta také souvisí s dalšími patofyziologickými změnami, které se objevují u DR. Jednou z nich je ztluštění bazální membrány sítnicových kapilár (Roy S., Lorenzi M., 1996, Lee SE. et al., 2010), nebo leukostáza (Chibber R. et al., 2007). Díky vysokým koncentracím glucitolu v buňkách čočkového epitelu dochází u diabetiků také k rychlejší progresi katarakty (Murray RK. et al., 2013).

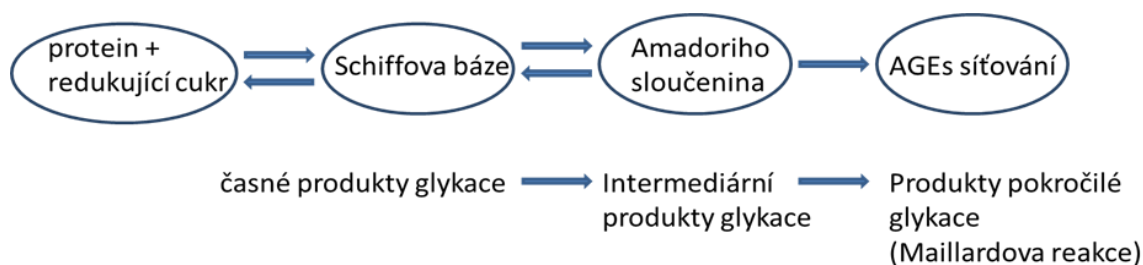
Hypotéza, považující roli aldózoreduktázy ve vzniku DR za klíčovou, má své odpůrce vzhledem k nepřesvědčivým výsledkům klinických studií. Několik studií in vitro a na zvířecích modelech ukázalo, že podávání inhibitorů aldózoreduktázy může mít přínos v prevenci DR snížením adheze leukocytů, a zachováním funkce hemoretinální bariéry (Lightman S. et al., 1987, Kato N. et al., 2003, Cusick M. et al., 2003). Avšak klinická studie s podáváním inhibitorů aldózoreduktázy „Sorbinil retinopathy study“ neukázala statisticky signifikantní klinický prospěch (Oates PJ., Mylari BL., 1999, Obrosova IG. et al., 2003).

1.3.2 Neenzymatická glykace proteinů

Tvorba a hromadění konečných produktů pokročilé glykace (AGEs) patří mezi další metabolickou cestu, jež hraje roli v etiologii diabetické retinopatie (Peppia M. et al., 2003, Shin ES. et al., 2014). AGEs se za normálních okolností tvoří v lidském těle již od embryonálního období a v průběhu života se hromadí. U diabetiků je jejich tvorba,

díky zvýšené dostupnosti glukózy, výrazně urychlena (Peppia M. et al., 2003). AGEs představují heterogenní skupinu molekul a vznikají neenzymatickou reakcí karbonylových skupin redukujícího cukru s volnou aminovou kyselinou bílkovin, tuků nebo nukleových kyselin. Tato reakce byla poprvé popsána Louistem Maillardem, který pozoroval hnědnutí bílkovin při zahřívání s cukry. Maillardova reakce probíhá ve třech krocích: iniciace, propagace, terminace (obrázek 3) (Obšil T., Pavlíček Z., 1997, Kalousová M. et al., 2006).

Obrázek 3: Vznik pokročilých produktů glykace (zdroj: Kalousová M. et al., 2006)



Iniciace – reakce je iniciována neenzymovou kondenzací aldehydové skupiny redukujícího cukru a aminové skupiny za vzniku nestabilní Schiffovy base. Tvorba base probíhá rychle a k dosažení rovnováhy dochází v průběhu pár hodin. Tento typ reakce je reverzibilní.

Propagace – Schiffova base během několika dní podléhá chemickému přesmyku za vzniku stabilnějších struktur, které se označují jako tzv. Amadoriho produkty. Tyto struktury mají charakter ketoaminu. Amadoriho produkty jsou do určité míry reverzibilní, jejich rovnováha je značně posunuta ve směru jejich tvorby. Ustálený stav nastává během 20–30 dní. Dále během propagace mohou být Amadoriho produkty rozkládány na karbonylové sloučeniny jako glyoxal, methylglyoxal, deoxyglukoson. Deoxyglukoson vzniká při vyšším pH, kdy Amadoriho produkty enolizují v pozici mezi druhým a třetím uhlíkem a tím eliminují amin z prvního uhlíku. Tyto sloučeniny jsou velmi reaktivní a jsou to vlastní propagátory neenzymatické glykace, které způsobují nevratné molekulární změny proteinů.

Terminace – v poslední fázi reagují Amadoriho produkty nebo jeho degradační sloučeniny s volnými aminoskupinami proteinů s dlouhou životností (kolagen, elastin, myelin). Vznikají konečné produkty pokročilé glykace – AGEs. Dané procesy jsou

ireverzibilní a trvale poškozují tkáň, ve kterých se ukládají. Klíčová charakteristika prekurzorů AGEs je jejich schopnost tvořit příčné kovalentní vazby mezi proteiny a tím měnit jejich strukturu a funkci. K tomuto dochází v buněčné matrix, v bazálních membránách a cévních stěnách. Kromě toho se AGE mohou vázat na AGE-vzájemné receptory buněčných povrchů a modulovat tak buněčné funkce. Interakcí s receptory mohou AGE spustit prooxidační a prozánětlivé procesy (Hammes HP. et al., 1991, Knels L. et al., 2008, Wang AL. et al., 2007).

AGEs jsou důležitým patogenetickým mediátorem téměř všech komplikací diabetu. Přítomnost AGEs je popsána u diabetické nefropatie a jejich hladina koreluje se závažností diabetické retinopatie (Zong H. et al., 2011). Nadměrné hromadění AGE přispívá k mikrovaskulárním změnám sítnicových cév, mění jejich rigiditu a poškozuje pojivovou tkáň. In vitro byla prokázána jejich toxicita pro pericyty i mitogenní působení na endotelové buňky (Sosna T. et al., 2012). Tento proces pak má za následek hypoxii, ischemii, zánět a alteraci vitreomakulárního rozhraní.

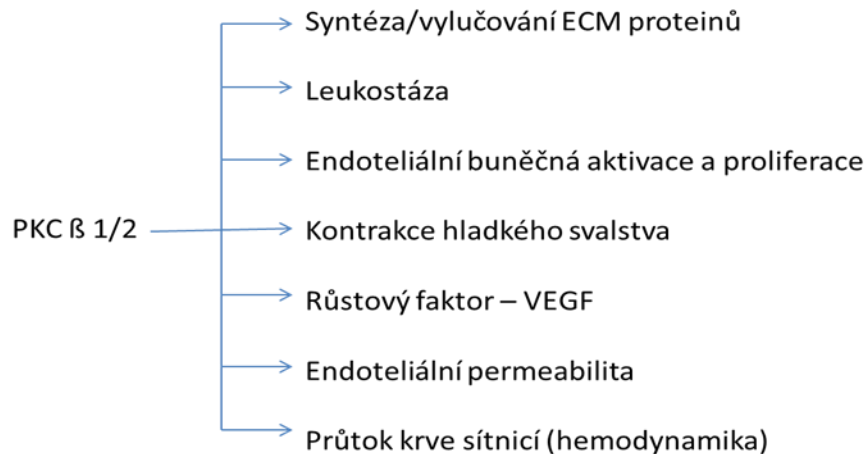
Na vývoji diabetické retinopatie se podílí interakce AGEs se specifickými receptory buněčného povrchu. Mezi tyto AGE receptory patří RAGE, galektin-3, CD36 a macrophage scavenger receptor (Zong H. et al., 2011). Vazba AGEs na tkáňový RAGE vede, mimo jiné aktivací exprese VEGF-A, k endoteliální dysfunkci a porušení hemoretinální bariéry u diabetické retinopatie a diabetického makulárního edému (Okamoto T. et al., 2002, Matter K., Balda MS., 2003). Experimentální studie dokazují, že solubilní RAGE (sRAGE) blokuje mechanismy vedoucí k cévní dysfunkci a progresi diabetické retinopatie (Kaji Y. et al., 2007, Grossin N. et al., 2008).

1.3.3 Aktivace proteinkinasy C

Proteinkinasa C (PKC) je rodina asi 12 enzymů, z nichž isoforma $\beta_{1/2}$ je u diabetiků zvýšená a hraje nejdůležitější roli v rozvoji diabetické retinopatie (Koyta D., King GL., 1998). PKC je serin-threonin kinasa, která je součástí mnoha fyziologických molekulárních kaskád, a účastní se odpovědi na specifické stimuly růstových faktorů, hormonální a neuronální impulzy. U diabetu zvyšuje hyperglykemie de-novo syntézu diacylglycerolu, který je přirozeným aktivátorem PKC (Koyta D., King GL., 1998, Wang QJ., 2006). Aktivací PKC dochází k up-regulaci mnoha patologických metabolických procesů, které se podílejí na patogenesi a progresi diabetické retinopatie (obrázek 4). PKC se tak podílí na změně syntézy proteinů extracelulární matrix a její

remodelaci. Mimo to má PKC vliv na endoteliální dysfunkci a leukostázu, které vedou ke kapilární okluzi, zvýšené endoteliální permeabilitě a poruše retinální hemodynamiky. V sítnicové tkáni zvyšuje PKC expresi VEGF (Koyta D., King GL., 1998, Aiello LP. et al., 1997, 2006) a zároveň indukuje apoptózu retinálních neuronů.

Obrázek 4: Role PKC v up-regulaci patologických metabolických procesů, podílejících se na patogenezi a progresi DR (zdroj: Tarr JM. et al., 2013)



I v případě PKC byla snaha najít vhodný terapeutický cíl ve formě specifického inhibitoru PKC- $\beta_{1/2}$ a jsou popsány úspěchy experimentálních i klinických studií (Joy SV. et al., 2005, Clarke M., Dodson PM., 2007). Užití inhibitorů PKC v intervenčních studiích sice nevedlo k prevenci DR, ale snížilo významně riziko ztráty zraku (Clarke M., Dodson PM., 2007). I přesto nebylo doporučeno jejich podávání v klinické praxi z toho důvodu, že inhibice PKC by mohla narušit fyziologické metabolické procesy (Tarr JM. et al., 2013).

1.3.4 Oxidační stres

Oxidační stres, který provází hyperglykémii, je definován jako porušená rovnováha mezi tvorbou volných radikálů a antioxidačním obranným systémem organismu. Oxidační stres a výsledné poškození tkáně jsou hlavními znaky chronických onemocnění a buněčné smrti. V současné době je oxidační stres považován za klíčovou příčinu rozvoje pozdních komplikací DM (Škrha J., 2010).

Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Prooxidační potenciál mají reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS), souhrnně RONS. Mezi RONS řadíme jak radikály (např. superoxidový, hydroxylový), tak látky které sice radikály nejsou (např. peroxid vodíku, oxid dusný, kyselina chlorná), ale radikál z nich může snadno vznikat (Kalousová M. et al., 2006). Zpravidla se jedná o vysoce reaktivní částice, které reagují s biologicky aktivními molekulami, jako jsou mastné kyseliny a lipidy, aminokyseliny a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleové kyseliny). Po reakci s RONS se pak molekula sama mění na radikál a dochází k řetězové propagaci reakce (Štípek S. et al., 2000). Produkce RONS je v organismu velice přísně regulována. Pokud však dojde k selhání regulačních mechanismů, může dojít k patologické reakci způsobené oxidačním poškozením.

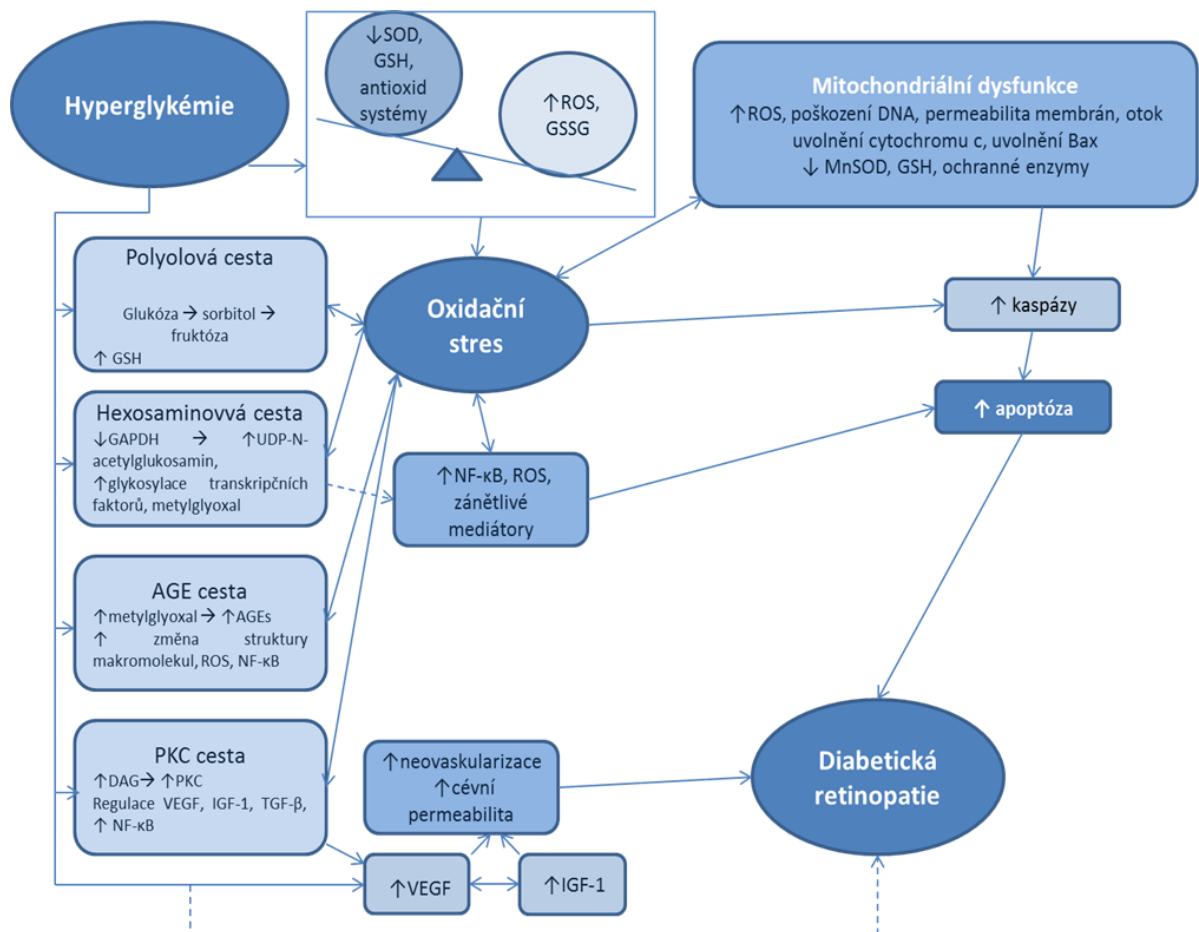
RONS vznikají v těle za normálních podmínek v mitochondriálním elektronovém transportním řetězci, v reakcích katalyzovaných např. cytochrom P450 monooxygenasou, NADPH-oxidasou a isoformami syntázy oxidu dusného (NOS). V případě, že zvýšená produkce RONS vede k překročení antioxidační kapacity organismu, dochází k poškození DNA, proteinů a lipidů v buněčných membránách. V diabetické sítnici byl současně s vyšší koncentrací ROS prokázán také nedostatek enzymů a vychytávačů volných radikálů, jako superoxid dismutázy, glutathion reduktázy a glutathion peroxidázy, které za normálních okolností udržují redoxní rovnováhu (Haskins K. et al., 2003). RONS jsou velice reaktivní, v tkáni mění chemickou strukturu a biologické vlastnosti makromolekul a tím se spouští mechanismy účastnící se patogeneze DR (Hartnett ME. et al., 2005, Kowluru RA., Chan PS., 2007).

V endoteliálních buňkách při hyperglykemii dochází k transportu glukózy do buňky podle koncentračního gradientu. Zvýšená intracelulární koncentrace glukózy podmíní vystupňovanou glykolýzu s následným zpracováním pyruvátu v Krebsově cyklu. Tím se zvyšuje nabídka elektronů pro dýchací řetězec v mitochondriích. Přenašeče elektronů NADH a FADH₂ však dodávají při hyperglykemii do řetězce tolik elektronů, že gradient napětí na membráně mitochondrie dosáhne kritické hodnoty a elektrony z komplexu Q pak alternativně vytvářejí z molekulárního kyslíku superoxidový radikál. Jeho vyšší tvorba znamená nebezpečí pro normální průběh reakcí uvnitř buňky, včetně vzniku mutací DNA. Ty jsou opravovány reparačními enzymy, jako např. polymeráza ADP-

ribózy. Zvýšená tvorba superoxidového radikálu aktivuje polymerázu ADP-ribózy, která inhibuje klíčový enzym glykolýzy, glyceraldehydfosfátdehydrogenázu. Tím se blokuje přeměna glukózy na pyruvát a zvyšuje se nabídka pro alternativní cesty zpracování glukózy cestou PKC, polyolovou cestou, neenzymatickou glykací a hexosaminovou cestou (Škrha J., 2010). Metabolické souvislosti hyperglykemie a oxidačního stresu při rozvoji DR jsou schématicky znázorněny na obrázku 5.

Vysoké koncentrace ROS v sítnici diabetiků byly popsány v souvislosti se ztrátou pericytů, vznikem acelulárních sítnicových kapilár, zvýšenou cévní permeabilitou a ztluštěním bazálních membrán (Shin ES. et al., 2014).

Obrázek 5: Cesty, které vedou, vlivem oxidačního stresu, v sítnici diabetiků k rozvoji DR (zdroj: Kowluru RA., Chan PS., 2007)



Na buněčné úrovni je intracelulární organelou, která je v případě chronické hyperglykemie u diabetu nejdříve poškozená vysokými koncentracemi glukózy, mitochondrie (Shin ES. et al., 2014). Vysoká koncentrace glukózy a její metabolický

obrat měl u bovinních sítnicových endoteliálních buněk za následek zvýšený membránový potenciál a vyšší koncentraci ROS v mitochondriích. Vysoký membránový potenciál a koncentrace ROS zároveň korelovaly s rozsahem buněčné smrti (Cui Y. et al., 2006).

Jak vyplývá z obrázku 5, oxidační stres má úzkou spojitost nejenom s metabolickou dysfunkcí zapříčiněnou hyperglykemií, ale také se zánětlivou reakcí a aktivací nukleárního faktoru kappaB (NF-κB). NF-κB spouští expresi pro-apoptotických proteinů v pericytech a buňkách retinálního endotelu (Shin ES. et al., 2014). Mezi prozánětlivé mediátory, které se účastní patogeneze DR, patří inducibilní NOS (iNOS). Ten je up-regulován v diabetické sítnici a hraje klíčovou roli v patogenezi vaskulárního poškození během časných fází DR (Zheng L. et al., 2007).

V diabetické sítnici byly prokázány také vysoké koncentrace endotelové NOS (eNOS), které výrazně korelovaly s leukostázou a se stupněm porušení hematoretinální bariéry (Haskins K. et al., 2003). V endotelové buňce reaguje vzniklý oxid dusnatý se superoxidovým radikálem za vzniku vysoce nestabilního a cytotoxického peroxynitritového radikálu. Touto reakcí se snižuje množství i dostupnost oxidu dusnatého pro vazodilatační efekt a další jeho příznivé účinky (Škrha J., 2010).

Kyselina močová

Kyselina močová je u člověka konečným produktem odbourávání purinů (tj. derivátů purinu: adeninových a guaninových bází, nukleosidů a nukleotidů vyskytujících se v buňkách jako součást koenzymů nebo nukleových kyselin); vzniká v reakci katalyzované enzymem xanthinoxidasou. Celkový obsah kyseliny močové v těle je přibližně 1 g. Kyselina močová pochází ze tří zdrojů: a) z nukleotidů potravy, b) z katabolismu tkáňových nukleoproteinů a c) z vlastní biosyntézy (Murray RK. et al., 2013).

Kyselina močová není však pouhou odpadní látkou, neboť má také antioxidační vlastnosti. Lidský organismus s ní účelně hospodaří; ačkoli jde o jeden z konečných produktů metabolismu, 90 % kyseliny močové se v tubulech ledvin reabsorbuje. Udává se, že kyselina močová představuje 35 - 65 % celkové antioxidační kapacity krevní plazmy (plazmatické proteiny představují 10 - 50 %, askorbát do 24 % a alfa-tokoferol

5 - 10% celkové antioxidační kapacity) a je tedy jejím nejhojnějším antioxidantem (Kvasnicová V., 2014).

Jako nejdůležitější antioxidační působení kyseliny močové se uvádí inhibice tvorby hydroxylového radikálu (HO^\cdot). Souvisí se schopností kyseliny močové vázat železo a měď za tvorby stabilních koordinačních komplexů, které nepodporují radikálové reakce. Kyselina močová se při tvorbě koordinační vazby s kovovými ionty neoxiduje a nemění svoji strukturu, vazbou iontů přechodných kovů však dochází k inhibici Fentonovy reakce (Kvasnicová V., 2014). Při této reakci vzniká z peroxidu vodíku v přítomnosti volných iontů Fe^{2+} nebo Cu^+ hydroxylový radikál (HO^\cdot). Hydroxylový radikál je velice reaktivní a ve tkáni okamžitě reaguje s okolními biomolekulami (nenasycenými mastnými kyselinami, aminokyselinami a bázemi nukleových kyselin) (Kalousová M. et al., 2006). Vazbou železa také dochází k výrazné inhibici oxidace askorbátu, probíhající za přítomnosti iontů železa a k potlačení peroxidace lipidů. Brání také reakci hemoglobinu s peroxidy, zabraňuje lýze erytrocytů vlivem peroxidačního poškození a reaguje s mnoha reaktivními formami kyslíku, které se tvoří v organismu, vycytává např. alkoxylové radikály (RO^\cdot) i kyselinu chlornou.

Volné kyslíkové radikály mohou neenzymaticky měnit kyselinu močovou na allantoin. Jeho koncentrace v krevní plazmě nebo moči může sloužit jako ukazatel zátěže organismu volnými radikály. Po reakci s hydroxylovým radikálem a s perferoxylovými radikály (komplexy železa s aktivním kyslíkem) se urát mění na radikál (urátový anionradikál, jehož nespárovaný elektron je lokalizován na pětičlenném kruhu), který může biologicky škodit (Kvasnicová V., 2014). Tento urátový radikál může být účinně vycytán kyselinou askorbovou, jejíž redukční potenciál je nižší (Murray RK et al., 2013).

Bylo prokázáno, že pacienti s DM mají vyšší plazmatickou koncentraci kyseliny močové a že hyperurikémie a hyperinsulinémie spolu souvisejí, nicméně podstata této skutečnosti dosud objasněna nebyla (Chaudhary K. et al, 2013). Vliv kyseliny močové na rozvoji diabetických komplikací dokazují především studie z nefrologie a kardiologie, u diabetické retinopatie její role dosud zkoumána nebyla. Podle závěrů epidemiologických studií podporuje zvýšená hladina kyseliny močové v séru vznik inzulinové rezistence a hypertenze, a tím se podílí na patofyziologickém mechanismu metabolického syndromu (Hayden MR., Tyagi SC., 2004, Sowers JR. et al., 2011, Sowers JR., 2013, Aroor AR. et al., 2013, Jalal DI. et al., 2013). Metaanalýza jedenácti

kohortových studií s 42,834 pacienty potvrdila, že sérová hladina kyseliny močové pozitivně koreluje se vznikem DM 2. typu (Kodama S. et al, 2009). Dále souvisí vysoké hladiny kyseliny močové s endotelovou dysfunkcí, sníženou elasticitou cévních stěn a nesprávnou aktivací renin-angiotensin-aldosteronového systému a tyto abnormální procesy poté vedou ke vzniku vaskulárních, kardiálních a renálních onemocnění (Hayden MR., Tyagi SC., 2004, Sowers JR., 2013, Aroor AR. et al., 2012, Jalal DI. et al., 2013).

Zvýšená hladina kyseliny močové se také jeví jako jedna z příčin zvýšené produkce oxidu dusnatého, nadměrného oxidačního stresu a neadekvátní imunitní a zánětlivé odpovědi (Aroor AR. et al., 2013). Podle autorů Hayden a Tyagi může docházet k posunu oxidačně-redukční rovnováhy kyseliny močové (tzv. “urate redox shuttle”) a kyselina močová, která za fyziologických podmínek působí jako antioxidant, se paradoxně stává oxidantem a podílí se na endoteliálním poškození cestou oxidačního stresu (Hayden MR., Tyagi SC., 2004).

V literatuře je pouze jedna práce, která sledovala vztah kyseliny močové a diabetické retinopatie. Podle té je možné, že kyselina močová se podílí na snížení totální antioxidační kapacity sklivce u DM, což přispívá k porušení hematoretinální bariéry a progresi PDR cestou indukce VEGF (Yokoi M. et al., 2005).

1.3.5 Renin-Angiotensin-Aldosteronový systém

Renin-Angiotensin-Aldosteronový systém (RAAS) je endokrinní systém, který reguluje krevní tlak a rovnováhu tělních tekutin. Všechny součásti systémového RAAS jsou přítomné také lokálně v mnoha tkáních (např. v ledvinách, srdci, cévách i sítnici). Lokální RAAS je řízen nezávisle na systémovém RAAS a v patogenezi DR je prokázána účast systémového i lokálního RAAS (Rahimi Z. et al., 2014). V sítnici hlodavců i člověka byly identifikovány nejenom všechny komponenty RAAS, ale také receptory pro angiotensin 1 a 2. Klinické i experimentální studie na modelech DR a u hypoxií spuštěné retinální angiogeneze prokázaly up-regulaci složek RAAS (Wilkinson-Berka JL., 2006). Nejdůležitější v patogenezi DR se jeví zvýšená koncentrace reninu, angiotensin konvertujícího enzymu (ACE), angiotensinu II a receptoru pro angiotensin I (Funatsu H. et al., 2002, Wilkinson-Berka JL., 2006, Rahimi Z. et al., 2014). Patofyziologický mechanismus, kterým RAAS přispívá ke vzniku a vývoji DR, není přesně znám. Předpokládá se, že zvýšená exprese ACE v diabetické sítnici má

nepříznivé účinky na krevní průtok sítnicí a cévní strukturu (Rahimi Z. et al., 2014). In vitro studie ale naznačují, že angiotensin II a ACE se spolupodílí na aktivaci PKC a VEGF (Otani A. et al., 1998, 2000) růstový faktor odvozený od destiček (platelet-derived growth factor; PDGF) a růstový faktor pojivové tkáně (connective tissue growth factor; CTGF), a to podporuje abnormální angiogenezi a urychluje progresi DR (Wilkinson-Berka JL., 2006, Rahimi Z. et al., 2014).

1.3.6 Růstové faktory

Dosud bylo popsáno velké množství růstových faktorů, které přispívají k vývoji diabetické retinopatie. Patří mezi ně:

- základní fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor; bFGF) (Hueber A. et al., 1996),
- růstový faktor-1 podobný insulinu (insulinlike growth factor-1; IGF-1) (Wilkinson-Berka JL. et al., 2006),
- angiopoetin 1 a 2 (Patel JJ. et al., 2005, Rangasamy S. et al., 2011),
- růstový faktor-1 odvozený od stromatu (stromal-derived growth factor-1; SDGF) (Brooks HL. Jr. et al., 2004),
- epidermální růstový faktor (epidermal growth factor, EGF) (Lev-Ran A. et al., 1990),
- transformující růstový faktor- β 2 (transforming growth factor- β 2; TGF- β 2) (Min SH. et al., 2006),
- růstový faktor odvozený od destiček (platelet-derived growth factor; PDGF) (Praidou A. et al., 2009) a
- erythropoetin (Eckardt KU., 2009).

Vascular endothelial growth factor

Nejvýznamnějším a nejlépe prozkoumaným růstovým faktorem v souvislosti s diabetickou retinopatií je VEGF (Simó R., Hernández C., 2008). VEGF je homodimerický glykoprotein, který patří do skupiny růstových faktorů a vyskytuje se ve čtyřech izoformách, z nichž každý monomer je složen ze 121, 165, 189, nebo 206 aminokyselin (Tarr JM. et al., 2013). Experimentální i klinické výzkumy ukázaly, že ze všech izoform VEGF nejčastěji se vyskytují izoformy 165 a 121. Zatímco izoforma 121 je důležitá pro fyziologickou obnovu cévního systému, na vzniku a progresi DR se podílí především izoforma 165 zodpovědná mimo jiné za patologickou

neovaskularizaci. VEGF je za fyziologických okolností v oku nezbytný pro trofiku choriokapilaris a má neuroprotektivní vliv na sítnici při retinální ischemii (Agarwal P. et al., 2014).

VEGF byl imunochemicky prokázán ve sklivci, ale i v gliálních buňkách sítnice (Müllerových buňkách) a v gliálních buňkách zrakového nervu. Sklivcové i sérové hladiny VEGF jsou zvýšené již v časných fázích diabetické retinopatie a je popsáno, že jeho koncentrace přímo koreluje se závažností očního postižení (Caldwell RB. et al., 2003). Hlavním stimulem pro zvýšenou tvorbu a aktivitu VEGF je především hypoxie (Abcouwer SF., 2013). K hypoxii sítnice u DR dochází důsledkem a) kapilární okluze, která je způsobena leukostázou a b) tzv. kapilárního dropoutu, způsobeného smrtí pericytů a buněk endotelu. Ischemie vede k hromadění hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) v buňkách sítnice, který svou vazbou na hypoxia response element (HRE) aktivuje expresi VEGF a dalších proangiogenetických faktorů jako erythropoetin a angiotensin II (Abcouwer SF., 2013). Podle autorů Wang et al. byla koncentrace VEGF and HIF-1 α ve sklivci u pacientů s PDR ve srovnání s kontrolami signifikantně vyšší (Wang X. et al., 2009). Další studie naznačují, že angiotensin II se jednak spolupodílí na aktivaci VEGF a jednak společně s ním podporuje novotvorbu patologických cév a urychluje progresi DR (Rahimi Z. et al., 2014, Tarr JM. et al., 2013).

VEGF ovlivňuje buněčné funkce svou vazbou na dva membránově vázané tyrosin kinázové receptory (Takahashi H., Shibuya M., 2005). Navázání VEGF na membránové receptory aktivuje dva možné intracelulární mechanismy: a) otevření kalciových kanálů a vnik vápenatých iontů do buněk nebo b) MAP-kinázovou signální cestu. Výsledkem obou cest je potom ztráta endoteliálních zonulae occludentes, zvýšená permeabilita sítnicových cév a porušení hemoretinální bariéry. Mimo to VEGF cestou zvýšené exprese adhezních molekul (ICAM-1) a NOS endotelovými buňkami podporuje adhezi leukocytů k buněčné membráně endotelu (Tarr JM. et al., 2013).

Pigment Epithelium Derived Factor

Na tkáňových kulturách a zvířecích modelech bylo prokázáno, že Pigment Epithelium Derivated Factor (PEDF) je doposud nejúčinnější známý inhibitor angiogeneze a endogenní protizánětlivá látka (Duh EJ. et al., 2002). Hladina PEDF je u pokročilých forem sítnicového postižení oproti nediabetikům nižší; předpokládá se tedy, že nedostatek protekčního působení PEDF může vést ke vzniku a progresi diabetické

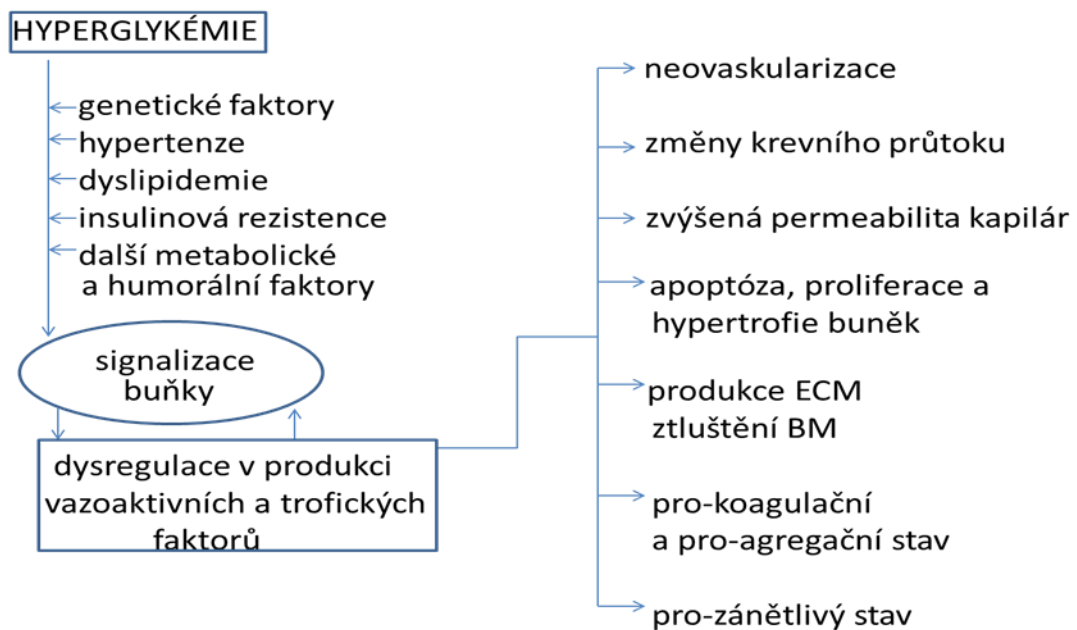
retinopatie (Ogata N. et al., 2002). Nízké hladiny PEDF souvisejí mimo jiné i se sníženou celkovou antioxidační kapacitou, jež přispívá k porušení hemoretinální bariéry a k rozvoji proliferativní formy diabetické retinopatie, jak bylo popsáno výše (Spranger J. et al., 2001, Yoshida Y. et al., 2007, Tombran-Think J, 2010). In vitro studie dokazují, že PEDF potlačuje aktivitu NADPH-oxidázy a tím přispívá k zachování redoxní rovnováhy (Amano S. et al., 2005, Yamagishi S. et al., 2006).

Závěry aktuálních studií také naznačují, že rovnováha mezi angiogenními a antiangiogenními faktory u diabetické retinopatie je porušená (Praidou A. et al., 2010), a že jejich vzájemné spolupůsobení je rozhodující pro progresi sítnicového poškození (Simó R. et al., 2006).

1.4 LOKÁLNÍ FAKTORY V PATOGENEZI DR

V posledních letech bylo shromážděno rozsáhlé množství nových poznatků týkajících se patogenetických mechanismů rozvoje DR. Zjednodušené schéma rozvoje mikrovaskulárních komplikací znázorňuje obrázek 6.

Obrázek 6: Patogeneze diabetické retinopatie (převzato a upraveno z Pelikánová T., 2007)



Zkratky: BM – bazální membrána, ECM – extracelulární matrix

Jak již bylo uvedeno, základní metabolickou odchylkou, která hraje nejdůležitější roli při vzniku DR, je hyperglykémie. Závažnost vaskulární patologie je však významně ovlivněna genetickou dispozicí jedince a je modifikována dalšími metabolickými a hemodynamickými faktory.

Mechanismy, které vedou k remodelaci tkání, nejsou specifické pouze pro diabetickou mikroangiopatii, ale obdobné procesy se uplatňují také v průběhu řady dalších degenerativních nebo autoimunitních vaskulopatií, s tím rozdílem, že při DM jsou spouštěny hyperglykemií (Pelikánová T., 2007).

Podstatou rozvoje diabetické mikroangiopatie je komplex zpočátku funkčních a později strukturálních změn, které se projeví v dysregulaci a) krevního průtoku, b) buněčného růstu (apoptóza, proliferace, hypertrofie) a c) vedou k proliferaci vaziva, zmnožení extracelulární hmoty a ztlustění bazálních membrán. Přitom změny v extracelulární hmotě nejsou pouze kvantitativní, ale zahrnují i změny kvalitativní (relativní zmnožení kolagenu typu IV, lamininu a fibronektinu; relativní pokles heparansulfátu). Důsledkem je pak rozvoj morfologicky fixované orgánové patologie (Pelikánová T. et al., 2012).

1.4.1 Poškození buněk cévní stěny a autoregulace toku krve

Pro DM je typické, že klasické mikrovaskulární komplikace postihují orgány, jejichž buněčný energetický metabolismus je vázaný na oxidaci glukózy a nemají enzymatickou výbavu, která by umožňovala využít jako zdroj energie mastné kyseliny (Pelikánová T. et al., 2012). Obecně se glukóza do buněk dostává dvěma různými mechanismy: a) na insulinu závislým transportem glukózy, který je zprostředkován glukózovými transportéry 4 (GLUT 4) a b) na insulinu nezávislým transportem. Ten je zajištěn také glukózovými transportéry (tkáňově specifického přenašeče: GLUT-1 až GLUT-7), které však jsou jinak geneticky kódovány, mají pozměněné složení aminokyselin. Důležité je, že nejsou aktivovány insulinem, ale zejména hyperglykemií a hypoxií. Pro většinu buněk orgánů, které jsou postiženy klasickými mikrovaskulárními komplikacemi, je charakteristické, že nejsou vybaveny GLUT 4. Transport glukózy do těchto buněk je zajištěn na insulin nezávislým mechanismem a závisí především na koncentračním spádu. Buňky tak mají omezenou schopnost regulovat vstup glukózy a bránit se jejímu "toxickému vlivu" při hyperglykémii (Pelikánová T. et al., 2012).

Morfologické a funkční změny se týkají nejen endotelu a cévní stěny, ale celé řady dalších buněk, ať již rezidentních, či buněk imunokompetentních, které infiltrují postižený orgán. V rámci DR jsou v retině kromě buněk cévní stěny poškozeny i neurony, glie a pigmentový epitel sítnice.

Retinální cévy postrádají sympatickou inervaci, průtok krve je lokálně regulován a přizpůsobován metabolickým potřebám. Autoregulaci umožňují svalové buňky ve stěně arteriol a pravděpodobně i pericyty kapilár. Zvýšený průtok krve sítnicí je stejně jako glomerulární hyperfiltrace první funkční změnou, která signalizuje rozvoj orgánového poškození a zároveň urychluje jeho progresi. Chronická hyperglykémie poškozuje autoregulační schopnosti sítnicových cév, které například nejsou schopny reagovat přiměřenou vazokonstrikcí na experimentální hypoxii (Fišer, I., 2007).

Cévní stěna retinální mikrovaskulatury obsahuje endotelové buňky a pericyty, které mezi sebou komunikují a jejich vzájemné interakce jsou ovlivněny vlastnostmi extracelulární matrix (ECM) (Beltramo E. et al., 2003).

Pericyty

Pericyty jsou buňky, které za normálních okolností tvoří stěnu retinálních cév, udržují jejich stabilitu, a v nich obsažený aktin odpovídá za kontraktilitu cév. Pericyty obalují stěnu sítnicových kapilár a sdílejí s endotelem bazální membránu. Za normálních okolností je poměr pericytů a endoteliálních buněk 1:1, což je vyšší než v jakémkoli jiném orgánu (0,3:1 v plicích a 0,1:1 v mozku) (Sheporo D., Morel NM., 1993). Nejdůležitější funkcí pericytů je udržování integrity hemoretinální bariéry.

Pericyty produkují řadu vazoaktivních látek, např. prostacyklin a chrání endotel před poškozením lipoperoxidy. Jejich hlavní funkcí však je inhibovat proliferaci endotelových buněk prostřednictvím TGF- β . Uplatňují se proto jako důležitý činitel, který kontroluje novotvorbu cév (Hammes HP., 2003, 2005). Funkci a rozvoj pericytů podporuje PDGF-B (platelet-derived growth factor-B). Chronickou hyperglykemií, pravděpodobně polyolovou cestou, je narušena sekrece PDGF-B a pericyty následně podléhají apoptóze (Fišer, I., 2007). Apoptóza je časnou morfologickou změnou pericytů, jejíž typickým projevem je vznik acelulárních kapilár, které jsou méně odolné vůči hydrostatickému tlaku a predisponují ke vzniku mikroaneurysmat (Shin ES. et al., 2014). Ztráta pericytů je typickým projevem DR a nebyla pozorována při vaskulopatiích sítnice jiné etiologie. Poměr pericytů a endoteliálních buněk klesá z normálních hodnot

1:1 na 0,3:1 až 0,1:1 v pokročilejších stádiích DR, a to přes to, že apoptóze podléhají i buňky endotelu (Podesta F. et al., 2000). Densita pericytů je nepřímo úměrná vaskulárním abnormalitám sítnice (Shin ES. et al., 2014).

Endotel

Endotel vytváří selektivní bariéru mezi vaskulárním lumen a sítnicí a tvoří hlavní složku hemoretinální bariéry. Transport metabolitů a živin z krve do sítnice je za normálních okolností selektivně řízen tak, aby byla zajištěná homeostáza v sítnici, nutná pro zachování zrakových funkcí. Selektivní transport do sítnice probíhá dvěma cestami: a) paracelulárně (je řízen mezibuněčnými spoji, ke kterým patří zonulae ocludentes, zonulae adherentes a gap junction) a b) transcelulárně (zprostředkovan specializovanými vesikuly). Endoteliální buňky exprimují mimo to také specifické transmembránové proteiny jako VE-catherin, claudin a occludin (Shin ES. et al., 2014).

U diabetiků jsou endotelové buňky přímo vystaveny chronickému působení vysoké koncentrace glukózy. Dochází v nich k nadměrné tvorbě ROS, a jak bylo popsáno v kapitole o oxidačnímu stresu, cestou NF- κ B vede oxidační stres k apoptóze endotelových buněk (Shin ES. et al., 2014).

Chronická hyperglykemie indukuje prozánětlivé a proadhezivní fenotypické změny endotelových buněk. Mezi časné poruchy funkce pericytů a endotelu u DR patří zvýšený transcelulární a intercelulární únik látek provázený zvýšenou expresí specifických proteinů (ICAM-1, VCAM-1) a poruchou sekrece vazoaktivních a trofických faktorů (IL-1 β , IL-8, IL-6, VEGF, TNF- α) (Popov D., 2010).

Mezi další následky chronického působení hyperglykemie na endotel patří nerovnováha koagulační a fibrinolytické aktivity. Endotel podléhající apoptóze produkuje prokoagulační mediátory (jako plasmunigen aktivátor inhibitor-1, fibrinogen a p-selektin) a zároveň je u diabetiků snížena fibrinolytická aktivita (Popov D., 2010). Následkem toho se u DR objevuje mikrotrombóza a okluze kapilár.

Hyperglykémie může u endotelových buněk spustit dva protichůdné mechanismy: v některých případech dochází k apoptóze, jindy k proliferaci. Důležitou funkci v indukcii proliferační aktivity endotelu zastává nikotinamid fosforibosyltransferasa, díky které se buňky stávají odolné k vysokým koncentracím glukózy (Popov D., 2010). U DR bylo dokázáno, že proces neovaskularizace je závislý na vzájemné interakci

buněk endotelu a pericytů, přičemž klíčová je adhezivní a migrační aktivita endotelových buněk. K pozdním projevům DR patří buněčná hypertrofie a hyperplázie endotelu a pericytů spolu se zvýšenou produkcí ECM a celkovým úbytkem pericytů. Výsledkem toho je angiogeneze a novotvorba cév v sítnici (Lorenzi M, Gerhardinger C., 2001, Hammes HP., 2003, 2005, Takamura Y. et al., 2008).

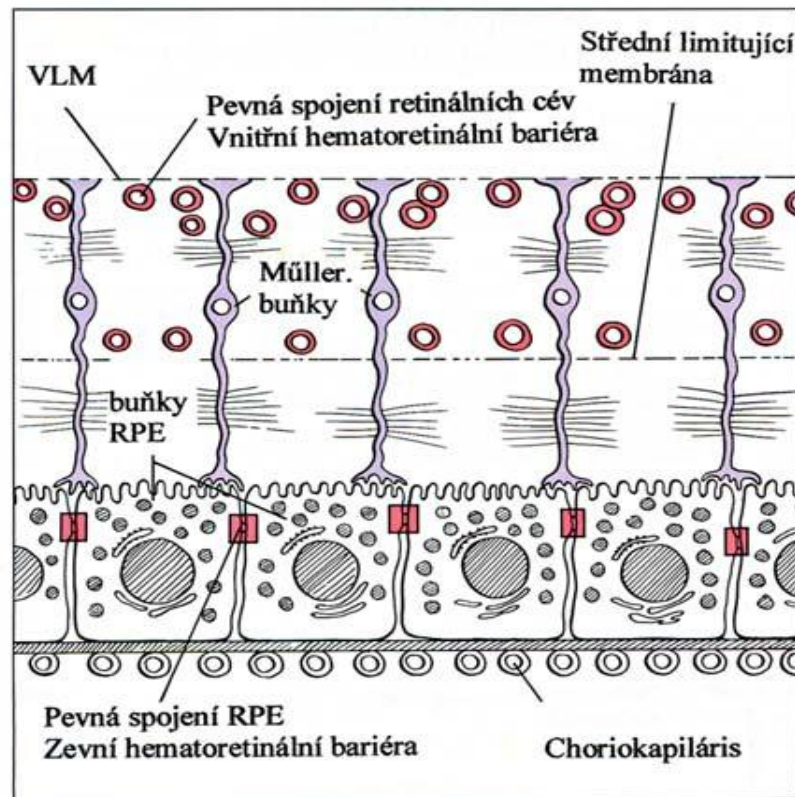
1.4.2 Ztluštění bazálních membrán

Diabetes mellitus způsobuje také ztluštění bazálních membrán především drobných cév. V bazálních membránách dochází k vakuolizaci a ukládání fibrilárního kolagenu namísto kolagenu homogenního. Tento proces není dosud biochemicky zcela objasněn, někdy je však vysvětlován sorbitolovou cestou (Fišer, I., 2007). Dalším důvodem, proč dochází ke ztluštění bazální membrány, je neenzymatická glykace kolagenu IV a ostatních typů kolagenu, lamininu a heparansulfát proteoglykanu (Sosna T. et al., 2012). Funkční poruchy plynoucí ze strukturální alterace bazální membrány jsou způsobeny změnami její permeability. Dále je narušena regulace proliferace endotelových buněk a bariéra proti pronikání na povrch sítnice, což usnadňuje vznik neovaskularizací.

1.4.3 Porucha hemoretinální bariéry

Hemoretinální bariéra (HRB) je tvořena junkčním komplexem mezi retinálním pigmentovým epitelem a endoteliálními buňkami sítnicových cév (González-Mariscal L. et al., 2003). Tento komplex selektivně zabraňuje pronikání molekul do extracelulární tkáně sítnice. HRB hraje klíčovou roli v udržení integrity struktury sítnicových cév. HRB reguluje přívod proteinů z krevního oběhu do sítnice, udržuje stabilní koncentraci specifických látek a iontů, reguluje intraretinální průnik toxinů krevního oběhu a hormonů, které mohou negativně ovlivnit funkci nervových buněk (Dusová J., 2012). Reguluje také intraretinální průnik leukocytů při vzniku zánětu. HRB je tvořena dvěma systémy - vnitřním a zevním (obrázek 7) a zajišťuje tak stabilní mikroprostředí sítnice.

Obrázek 7: Schematické znázornění vnitřní a zevní hematoretinální bariéry (zdroj: archiv oční kliniky VFN a I.LFUK)



Zkratky: RPE - retinální pigmentový epitel, VLM - vnitřní limitující membrána

Vnitřní HRB

Vnitřní HRB je tvořena endotelem sítnicových cév, pericyty a výběžky astrocytů (Hosoya K., Tachikawa M., 2009). Cévní endotel představuje jedna vrstva buněk, která vystýlá povrch intimy krevních cév. Mezi membránami endotelových buněk retinálních kapilár se nacházejí četná pevná spojení (tight junctions, zonulae occludentes), která jsou velmi stabilní a jsou podobná pevným spojením mozkových cév, které tvoří hematoencefalickou bariéru v mozku. Tato pevná spojení zabraňují přestupu makromolekul z cévního lumen do intersticia sítnice, i naopak z extracelulárního prostoru sítnice či sklivce do cévního lumen. Sítnicové cévy v makule jsou obklopeny koncovými výběžky Müllerových buněk glie, které regulují bariérové vlastnosti endotelových buněk. Buňky glie mohou uvolňovat faktory, které buď zesilují (neurotrofní faktor) nebo oslabují (TGF- β , bFGF, TNF) pevnost bariéry cévních endotelií (Dusová J., 2012). Jednou z nejdůležitějších molekul, které regulují bariérové

vlastnosti endotelových buněk je VEGF. VEGF je schopen zvýšit cévní propustnost 50 000krát silněji než histamin (Scholl S. et al., 2010). VEGF je uvolňován do sítnice, kde má odlišné funkce na zevní a vnitřní HRB. Vnitřní HRB je vystavena působení VEGF pouze za hypoxických podmínek, kdy Müllerovy buňky zvyšují sekreci VEGF. Tento VEGF odvozený z Müllerových buněk může za hypoxicko/ischemických podmínek přispívat k patologické permeabilitě vnitřní HRB.

Zevní HRB

Zevní HRB tvoří retinální pigmentový epitel (RPE), Bruchova membrána a choriokapilaris. Choroidální cévy mají četné fenestrace, jsou tedy více propustné a jejich bariérová úloha je proto jenom minimální. Bruchova membrána slouží jako bariéra volné difúze jen pro velké molekuly. Základní bariéru pro látky pocházející z cévnatky tvoří RPE, v jehož buňkách se nacházejí četné zonulae occludentes, podobně jako je tomu mezi endoteliemi retinálních kapilár. V zevní části HRB normální zdravé sítnice je VEGF produkován buňkami RPE a je uvolňován zejména jejich bazální stranou tak, aby udržoval fenestrováný a vysoce permeabilní charakter endotelií vaskulatury cévnatky (Dusová J., 2012).

Patofyziologickou podstatou vzniku diabetického makulárního edému je porušení - ať vnitřní či vnější - hemoretinální bariéry, přičemž se v intersticiálních prostorech nervové retinální tkáně hromadí plasmatické proteiny a jejich onkotickým působením následně i tekutina (González-Mariscal L. et al., 2003, Sosna T. et al., 2012). Progrese ME po zhroucení HRB je přímo závislá na rozdílu hydrostatického a osmotického tlaku. Fluorometrie sklivce prokazuje, že narušení hemoretinální bariéry u diabetiků dochází dlouho před klinickým zjištěním DR (Fišer, I., 2007).

Celý proces je spouštěn atakou např. hypoxie/ ischemie či zánětu a situace může být dále zhoršována chronickými stavy, které způsobí celkové oslabení či poškození HRB, jako je hyperglykemie, hypertenze či další vaskulární onemocnění (Dusová J., 2012). Narušení HRB je zprostředkováno zánětlivými mediátory, jimiž jsou prostaglandiny, cytokiny a VEGF. Za jejich zdroje jsou pokládány leukocyty adherující na endotel cévy, buňky mikroglie, Müllerovy buňky a RPE.

Neurony a glie

Gliální tkáň v sítnici zastupují Müllerovy buňky a astrocyty. Astrocyty obalují svými výběžky sítnicové cévy a tvoří tak součást vnitřní hematoretinální bariéry. Müllerovy buňky prostupují celou šířkou sítnice od membrana limitans interna až k retinálnímu pigmentovému epitelu (Shin ES. et al., 2014). Obalují neurony, části axonů ganglia a cévy. Jejich funkcí je udržovat iontové a metabolické mikroprostředí v sítnici a modulovat funkci neuronů. Obsahují GLUT-1 a jsou největšími spotřebiteli glukózy, kterou metabolizují na laktát. Ten je pak nejvýznamnějším energetickým substrátem pro neurony. Jako jediné buňky sítnice jsou Müllerovy buňky schopné vytvářet zásobní glykogen (Pelikánová T., 2007). Obsahují řadu iontových kanálů a transportérů a účastní se regulace krevního průtoku. Plní funkci bariéry a obsahují enzym glutamin-syntetázu, která detoxikuje glutamát. Známkou jejich poškození při diabetu je zvýšená exprese nespecifického glial fibrillary acidic proteinu (GFAP) a zvýšená aktivita transportéru pro glutamát, která je v souladu se zvýšenými hladinami toxického glutamátu, nalézány u nemocných s DM v různých kompartmentech oka (Ambati J., et al., 1997, Li Q., Puro DG., 2002). Porucha barvocitu (Terasaki H., 1996), porucha kontrastního vidění (Della Sala S. et al., 1985) a abnormality v elektroretinogramu u diabetiků bez známek vaskulárních změn na očním pozadí dokládají, že funkční poškození neuroglie může při rozvoji DR předcházet změny cévní. V neuronech retiny byla kromě apoptózy nalezena snížená exprese nNOS a GLUT-1 a zvýšená exprese endotelinu a VEGF (Lorenzi M., Gerhardinger C., 2001).

Imunokompetentní buňky, leukostáza a zánět

Rezidentní imunokompetentní buňky sítnice jsou označovány jako mikroglie a zodpovídají za udržování sítnicové homeostázy. U očí s DR byl prokázán značně větší počet mikroglií a jejich hypertrofie. Mikroglie se u diabetiků shlukovaly především v okolí sítnicových cév, dilatovaných vén, mikroaneurysmat, intraretinálních hemoragií a neovaskularizační tkáně (Zheng HY. et al., 2008). Aktivované mikroglie u DR vylučují glutamát, leukotrieny, IL-1 β , IL-6, TNF- α , VEGF a spouštějí tak další zánětlivou kaskádu sítnicové tkáně (Grigsby JG. et al., 2014).

Několik studií označilo subklinický zánět jako jeden z hlavních faktorů vedoucí ke vzniku diabetické retinopatie (van Hecke MV. et al., 2005, Klein BEK. et al., 2009, Shin ES. et al., 2014). Již časná stádia DR jsou provázena infiltrací struktur oka

aktivovanými leukocyty (leukostáza). K adhezi leukocytů k sítnicovým cévám dochází vlivem ICAM-1 a vascular cellular adhesion molecule-1, exprimovaných endoteliálními buňkami (Shin ES. et al., 2014).

Nadměrná adheze leukocytů vede k leukostáze, tvorbě mikrotrombů, následné okluzi kapilár a buněčné smrti. Leukostázou způsobený uzávěr kapilár způsobuje ischemii sítnice, která je v pozdějších stádiích DR hlavním stimulem pro angiogenezi a vznik neovaskularizací (Bandello F. et al., 2013). Aktivace neovaskularizace v sítnici diabetiků je zprostředkována HIF-1 α . HIF-1 α je transkripční faktor, který řídí expresi různých pro-angiogenních genů, jako například VEGF a angiopoetin-1 (Costa PZ., Soares R., 2013).

Adheze leukocytů na cévní stěnu je stimulem k sekreci monocytárního chemotaktického proteinu 1 (MCP 1), který napomáhá leukocytárnímu transportu přes cévní stěnu do tkání. Aktivované leukocyty a mikroglie pak v sítnici vylučují celou řadu zánětlivých mediátorů včetně IL-1 β , TNF α a VEGF a matrix metaloproteinázy (Shin ES. et al., 2014). U pacientů s DME byla prokázána vyšší hladina VEGF ve sklivci (Admis AP., Shimada DT., 2005). Zánět také stimuluje zvýšenou produkci PKC. PKC významně ovlivňuje cévní permeabilitu, krevní průtok a angiogenezi.

Přítomnost zánětlivých mediátorů a buněčná smrt v důsledku leukostázy dále zesilují lokální zánětlivou reakci (Boyer DS., 2011) a vedou k porušení hematoretinální bariéry a vzniku DME (Lutty GA. et al., 1997, Chibber R. et al., 2000, Leal EC. et al. 2007). Diabetická makulopatie je považována za stav podobný nízkému stupni zánětu (Singh A., Stewart JM., 2009). Lepší pochopení patofyziologie DME a odhalení rozhodující role zánětlivé kaskády v jeho patogenezi přispělo k zavedení kortikosteroidů do léčby tohoto onemocnění.

1.4.4 Sklivec

Sklivec vyplňuje nitrooční prostor mezi čočkou a sítnicí a působí jako pufr odolávající vnějším silám a otřesům. Sklivec obsahuje ve vodě rozpustné proteiny, glukózu, volné aminokyseliny a elektrolyty a působí jako refraktivní komponenta optického systému oka. Vzhledem k těsné anatomické blízkosti sítnice a sklivce zastává sklivec také funkci metabolickou, a hraje proto roli při vzniku DR (Nasrallah FP. et al., 1988, Sosna T. et al., 2012). Podstatná je v patogenezi skladba a uspořádání sklivce, průběh časného, pro

diabetiky typického odlučování zadní sklivcové membrány a přirozená likvifikace sklivce. Porušením hematoretinální bariéry výše popsaným mechanismem dochází u DR ke kumulaci růstových a zánětlivých faktorů ve sklivci. Vznik DME je často potencován neodloučenou zadní hyaloidní membránou i bez zjevné trakce. Je známo, že u pacientů s odloučenou zadní hyaloidní membránou se DME vyskytuje zřetelně méně často (Nasrallah FP. et al., 1988), naopak vitreoretinální trakce může vznik DME podněcovat (Sosna T. et al., 2012).

1.5 KLASIFIKACE A KLINICKÝ OBRAZ DR

Diabetická retinopatie je klasifikována podle všeobecně uznávané americké studie Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group (ETDRS), která byla provedena v letech 1980 až 1985. Principy klasifikace DR podle ETDRS představují dodnes zásadní směrnice pro monitorování sítnicového poškození a indikaci léčby laserovou koagulací. Základní klasifikace je založena na dynamice a závažnosti intraretinálních mikrovaskulárních změn a na přítomnosti neovaskularizací (Kalvodová B. et al., 2012).

Rozlišujeme tato klinická stádia a formy DR:

1. neproliferativní DR (NPDR),
2. proliferativní DR (PDR) a
3. diabetickou makulopatii (DMP).

1.5.1 Neproliferativní diabetická retinopatie

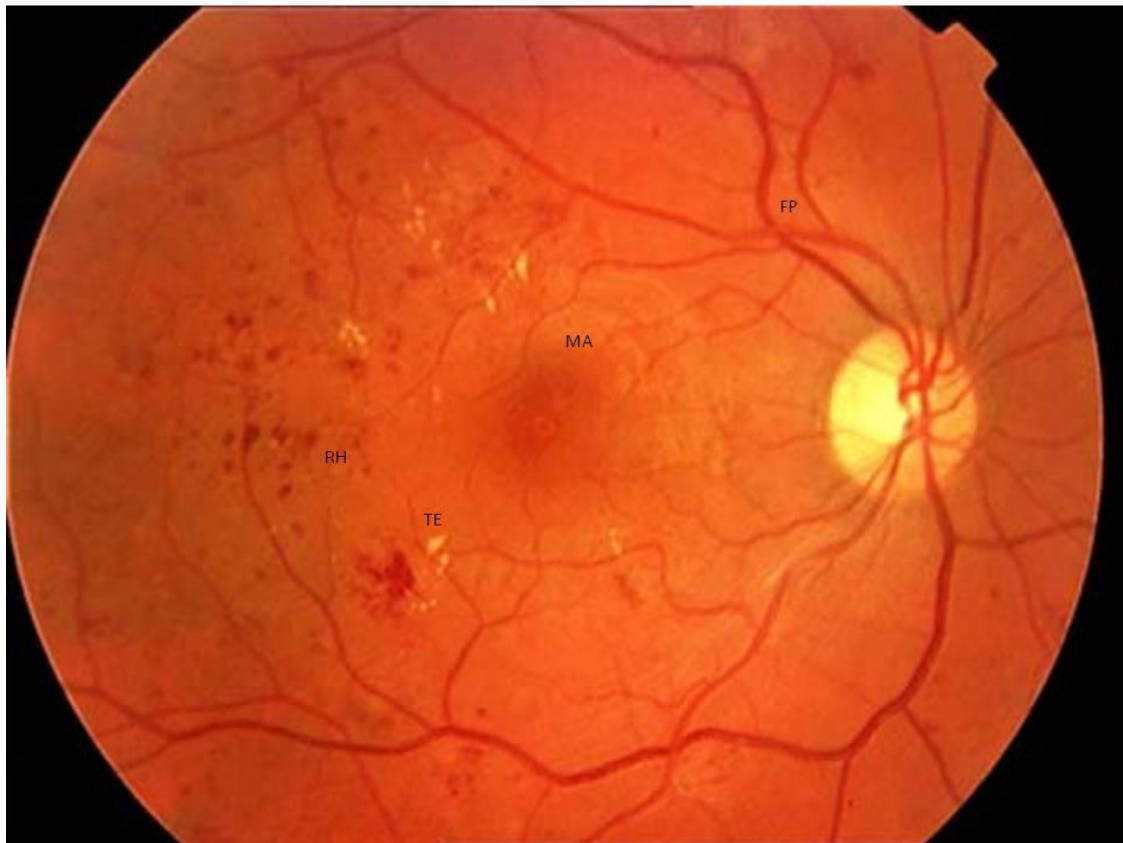
NPDR zahrnuje široké spektrum dynamiky změn a je dále klasifikována jako:

- a) počínající (4 – 0 – 0),
- b) středně pokročilá (4 – 1 – 0),
- c) pokročilá (4 – 2 – 1) a
- d) velmi pokročilá (4 – 4 – 4).

Stupeň závažnosti je dán počtem a rozsahem diabetických změn. Čísla v závorkách udávají počet sítnicových kvadrantů, ve kterých jsou u dané formy NPDR přítomné klinické znaky progresivního uzavěru kapilár: hemoragie – flebopatie (venózní abnormality) – intraretinální mikrovaskulární abnormality (IRMA) (Kalvodová B. et al., 2012).

K neproliferativnímu stádiu diabetické retinopatie patří kromě výše uvedených změn i mikroaneurysmata, vatovitá ložiska a tvrdé exsudáty. Fundoskopický obraz NPDR s typickými změnami je znázorněn na obrázku 8. Důležitým hodnotícím kritériem je také rozsah ischemií pozorovaných na fluorescenční angiografii. Ischémie střední periferie sítnice představuje vysoké riziko maligního zvratu do stádia PDR.

Obrázek 8: Fundoskopický obraz neproliferativní diabetické retinopatie



Zkratky: FP- flebopatie, MA – mikroaneurysma, RH – retinální hemoragie, TE – tvrdé exsudáty

Mikroaneurysmata

Cirkulační poruchy v sítnici se na svém počátku projevují změnami, které jsou označovány jako tzv. mikroaneurysmata. Mikroaneurysmata jsou většinou prvními viditelnými příznaky DR a jsou pro ni patognomonická. Oftalmoskopicky se jeví jako pravidelné okrouhlé červené tečky o velikosti asi 15-60 μ m, v jejichž středu lze pozorovat bod bělavého vrcholového reflexu. Mikroaneurysmata jsou patologicky dilatované výchlípky sítnicových kapilár, které se tvoří následkem ztráty pericytů. Nejčastěji se vyskytují na zadním pólu oka a temporálně od centrální fovey a nevyžadují léčení. S narůstajícím počtem mikroaneurysmat se může pojít narůstající permeabilita sítnicových kapilár vedoucí k edému sítnice (Fišer I., 2007, Kanski JJ., 2012).

Hemoragie

Hemoragie vznikají vlivem dekompenzace kapilární sítě, kdy následkem přibývajících obliterací kapilár dochází k porušení cévní stěny, nebo prosáknutím stěny mikroaneurysmat. Hlavním projevem jsou krvácející ložiska uvnitř sítnice a v jejím okolí (obrázek 8). Barva a ohraničení těchto ložisek je závislá na lokalizaci ve vrstvách sítnice. U NPDR se vyskytují hemoragie intraretinální, které bývají povrchové (tečkovité) a okrouhlé (kaňkovité, skvrnitě), nebo mohou kopírovat vrstvu nervových vláken a vytvářet tím specifický plaménkovitý tvar. Při závažnějších stupních NPDR se vyskytují četné intraretinální hemoragie i v periferní sítnici v místě kapilární nonperfúze.

Tvrdé exsudáty

Tvrdé exsudáty (obrázek 8) jsou lipidní depozita tvořena sérovými lipoproteiny, které se prosakováním z porušených těsných spojů mezi endoteliemi sítnicových kapilár či mikroaneurysmat dostávají do zevní plexiformní vrstvy sítnice (Fišer I., 2007). Klinicky se jeví jako různě velká žlutobílá ložiska. Tvrdé exsudáty bývají velmi často nalezeny především v centrální krajině většinou na hranici edematózní sítnice. Jsou-li přítomny v centru fovey, mohou nenávratně poškodit zrakovou ostrost.

Vatovitá (měkká) ložiska

Vatovitá ložiska vznikají v místech arteriolární obstrukce nebo na podkladě sníženého průtoku krve v arteriolách uvnitř vrstvy nervových vláken. Následkem nonperfúze ve vrstvě nervových vláken dochází ke zpomalení až blokadě axoplazmatického transportu a hromadění cystoidních tělísek (Valešová L., Hycl J., 2002), která obsahují mitochondrie a lipidy. Při klinickém vyšetření najdeme neostře ohraničené bělavé léze, které mohou připomínat chomáčky vaty. Dojde-li ke znovuotevření okluzí postižené kapiláry, mohou vatovitá ložiska během několika měsíců i zcela vymizet. Nejčastěji bývají nalézány v oblasti velkých cévních arkád (Kanski JJ., 2012).

Flebopatie

Venózní abnormality souvisejí s přibývajícím obliterací kapilár a zvýšeným perfúzním tlakem při hyperglykemii a ischemii sítnice. Flebopatie jsou charakteristickým doprovodným znakem DR a oftalmoskopicky mají různé podoby. Nejčastěji pozorujeme více či méně pravidelnou venózní dilataci (obrázek 8), objevují se ale i

segmentované dilatace vén. Jako korálkovité žíly jsou označovány pravidelně se střídající dilatace a zúžení žilní stěny. Tyto změny jsou způsobeny poškozením struktury cévní stěny a následkem ztráty pericytů.

Závažnější a dlouhodobá kapilární hypoperfuze a ischemie vede k výrazným změnám v průběhu cév a vzniku tzv. omega venózních kliček (ohyby a reduplikace žilních segmentů) (Kanski JJ., 2012).

Intraretinální mikrovaskulární abnormality

Intraretinální mikrovaskulární abnormality (IRMA) jsou charakterizované dilatovanými, vinutými shluky cévních spojek, objevujícími se mezi postiženými arterioly a venulami v místech nonperfúze. Není zcela zřejmé, zda jsou IRMA dilatovanými preexistujícími kapilárami, nebo zda jde o intraretinální neovaskularizace.

Odlišit tyto abnormality od klasické sítnicové neovaskularizace je možné pomocí fluorescenční angiografie.

1.5.2 Proliferativní diabetická retinopatie

Proliferativní diabetickou retinopatii charakterizují novotvořené cévy, které rostou v důsledku chronické hypoxie a ischemie částí sítnice a šíří se po vnitřním povrchu sítnice do sklivcové dutiny (obrázek 9). Neovaskularizace lze najít na povrchu sítnice (NVS), na disku zrakového nervu (NVD), ale také na duhovce (NVI) a v předním komorovém úhlu. Podle Diabetic Retinopathy Study jsou u 15 % očí s PDR přítomny pouze NVD, u 40 % očí pouze NVS a u 45 % očí NVD i NVS (Fišer I., 2007).

PDR je podle závažnosti onemocnění dále rozdělena na:

- a) počínající,
- b) vysoce rizikovou a
- c) pokročilou.

Počínající stádium PDR se projevuje objevením prvních kliček neovaskularizací a přítomností změn popsanych u NPDR.

Vysoce riziková PDR je definována přítomností NVD v rozsahu 1/4 až 1/3 plochy papily zrakového nervu a/nebo NVS velikosti nejméně 1/4 plochy papily, doprovázenými preretinálním krvácením.

U pokročilé PDR se vyskytují komplikace, jakými jsou rozsáhlé preretinální, retrovitreální a intravitreální krvácení a trakční a/nebo rhegmatogenní odchlípení sítnice včetně makuly. Konečným stádiem proliferativní diabetické retinopatie je trychtýřovité

odchlípení sítnice, doprovázené kolapsem sklivce a slepotou (Kalvodová B. et al., 2012).

Obrázek 9: Fundoskopický obraz proliferativní diabetické retinopatie



Zkratky: FP- flebotomie, MA – mikroaneurysma, NVD – neovaskularizace disku, RH – retinální hemoragie, TE – tvrdé exsudáty

Hemoragie

U PDR se kromě hemoragií intraretinálních mohou vyskytovat také hemoragie preretinální, sklivcové a subretinální.

Preretinální hemoragie vznikají v místě mezi membrana limitans interna sítnice a zadní sklivcovou membránou následkem masivního krvácení, nejčastěji z prasklé novotvořené cévy. Svým meniskovitým tvarem jsou dobře rozlišitelné.

Sklivcová hemoragie vyplňuje buď částečně, anebo úplně celý sklivcový prostor. Tento stav je označován jako hemoftalmus. Pacient to pocítí rychlým poklesem zrakové ostrosti, vyšetřující oftalmolog zamezením vizuálního vyšetření sítnice.

Subretinální hemoragie bývá u DR méně zastoupena. Jedná se o hemoragii lokalizovanou pod neuroepitelem a oftalmologovi se jeví nejčastěji jako tmavě červená nepřesně ohraničená ložiska.

Neovaskularizace

Chronický nedostatek kyslíku sítnice vede k produkci vazoproliferačních faktorů, které vyvolávají nekontrolovaný růst nových cév. Takto patologicky vzniklé cévy jsou funkčně méněcenné a bez pravidelné endoteliální stavby. Na rozdíl od IRMA vystupují neovaskularizace z povrchu sítnice a pronikají skrz membrana limitans interna. Bující novotvořené cévy jsou často doprovázeny fibroblasty, fibrocyty a gliálními buňkami, které vytvářejí vazivové pruhy s tendencí se kontrahovat. Tahem vazivové tkáně za novotvořené cévy může dojít k jejich ruptuře a preretinálnímu nebo sklivcovému krvácení, tahem za sítnici může vzniknout trhлина nebo trakční odchlípení sítnice projevující se ztrátou zraku (Fišer I., 2007).

1.5.3 Diabetická makulopatie

Diabetická makulopatie je další komplikací diabetické retinopatie, která postihuje centrální oblast sítnice. Je charakterizována vznikem edému a tvrdých exsudátů nebo ischemií v oblasti makuly, což se postupně projeví snížením zrakové ostrosti. Podkladem vzniku diabetické makulopatie je opět diabetická mikroangiopatie a zvýšená transudace poškozenou stěnou kapilár (Kalvodová B. et al., 2012, Sosna T. et al., 2012). Diabetický makulární edém (DME) dělíme podle biomikroskopického vyšetření na:

- a) fokální,
- b) difúzní a
- c) cystoidní.

Někteří autoři ještě podle angiografického obrazu dále rozlišují:

- d) ischemickou makulopatii a
- e) smíšenou makulopatii (edém a ischemie).

DME se může vyvinout v jakémkoliv stádiu diabetické retinopatie. DME vzniká následkem zhroucení HRB, což způsobí nahromadění tekutiny a sérových makromolekul v intercelulárním prostoru. DME je obvykle definován jako ztlustění sítnice v oblasti do 1 papilárního diametru (ca 1500 μ m) od centra makuly.

Fokální makulární edém

Fokální makulární edém vzniká prosakováním intravaskulární tekutiny z retinálních mikroaneurysmat a z dilatovaných kapilár do okolní sítnice. Postupně se vytváří ohraničené ložisko edému doprovázené tvrdými exsudáty.

Difuzní makulární edém

Difuzní makulární edém vzniká prosakováním celých úseků dilatovaných retinálních cév a kapilárních abnormalit do centrální krajiny sítnice. V tomto případě bývá zasažena větší plocha nežli u fokálního edému.

Cystoidní makulární edém

Cystoidní makulární edém doprovází pravidelně difuzní edém a je charakterizován prosakováním do perforovaných prostor hlubších vrstev sítnice.

Ischemická makulopatie

Ischemická makulopatie je charakterizována úbytkem až zánikem perifoveolární kapilární sítě a významným rozšířením foveolární avaskulární zóny. Ischemická makulopatie výrazně poškozuje zrakovou ostrost a je možné ji diagnostikovat pouze pomocí fluorescenční angiografie.

Klinicky signifikantní makulární edém

ETDRS definovala tzv. klinicky signifikantní makulární edém (KSME) pro zdůraznění makulárního edému, který bezprostředně ohrožuje foveu a centrální zrakovou ostrost. KSME představuje dodnes základní indikaci k zahájení léčby laserovou koagulací (Kalvodová B. et al., 2012). Definován je jako: a) ztlustění sítnice do vzdálenosti 500 µm od centra makuly, b) tvrdé exsudáty do vzdálenosti 500 µm od centra makuly, jestliže dosahují do oblasti prosáklé sítnice a c) prosáknutí sítnice větší než je plocha průměru papily zrkového nervu (PD), leží-li část tohoto prosáknutí ve vzdálenosti do 1 PD od centra makuly (Kalvodová B. et al., 2012, Sosna T. et al., 2012).

V posledních několika letech však došlo k rozšíření terapeutických možností o anti-VEGF, které se staly u některých forem DME lékem první volby. Indikací k jejich aplikaci je tzv. center involving DME, který je definovaný za pomoci optické koherenční tomografie jako ztlustění sítnice v centrálním poli o nejméně 250µm (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, 2011).

1.6 DIAGNOSTIKA

Kromě standardního vyšetření zrakové ostrosti do dálky i do blízka, patří k základním vyšetřovacím metodám v diagnostice DR biomikroskopické vyšetření. Doplnujícími metodami jsou stereoskopická fotografie, fluorescenční angiografie a optická koherenční tomografie očního pozadí. Tyto metody jsou jednoduché, bezpečné a schopné odlišit pacienta s DR/DME a bez nich. Všechna vyšetření očního pozadí jsou prováděna v arteficiální mydriáze. Pro lepší včasnou diagnostiku DR byly ve většině vyspělých zemí zavedeny screeningové programy a podle závažnosti a rozsahu diabetického poškození sítnice jsou doporučené intervaly pravidelných klinických kontrol pacientů s DM (Kalvodová B. et al., 2012).

1.6.1 Biomikroskopické vyšetření

Biomikroskopie na štěrbinové lampě se provádí s použitím kontaktních (přímá biomikroskopie) či nekontaktních čoček (nepřímá biomikroskopie). Jedná se o dostatečně citlivou metodu ke stanovení diagnózy DR, novotvořených cév na duhovce, ke zjištění přítomnosti DME a neovaskularizací na sítnici či papile zrakového nervu.

1.6.2 Stereoskopická či digitální fotografie

Jednoduchou metodou pro screening DR je fotografie očního pozadí v 7 polích podle Airlie Houe Classification (Kalvodová B. et al., 2012). Fotografie očního pozadí je zlatým standardem pro hodnocení stupně DR a je slepě hodnocena sítnicovým specialistou v tzv. Retinopathy Grading centrech bez kontaktu s pacientem. Barevná fotodokumentace základních dvou polí (centrálního a diskonasálního ve 40° záběru), by měla být provedena vždy a u všech rizikových pacientů s pokročilejšími formami DR (Kalvodová B. et al., 2012).

1.6.3 Fluorescenční angiografie

Fluorescenční angiografie patří mezi doplňující metody. Jedná se o vyšetření, při kterém je intravenózně podán 10 % fluorescein sodný do periferní žíly a následně je oční pozadí fotografováno speciálním fotografickým zařízením s filtrem; výsledné fluoroangiogramy jsou černobílé. V časně arteriální fázi je možno velice přesně identifikovat foveolární avaskulární zónu, jejíž rozšíření a nepravidelný tvar je signifikantní pro počáteční diabetickou makulopatii, typicky jsou také patrné rozšířené kapiláry. Neperfundované oblasti sítnice se zobrazují jako tmavá, tzv.

hypofluorescentní, pole. Naopak v oblasti makulárního edému, kolem mikroaneurysmat, novotvořených cév a cév se zvýšenou propustností stěny následkem porušené hemoretinální bariéry vidíme v pozdějších fázích angiogramu hyperfluorescenci, tzv. leakage. Fluorescenční angiografie není potřebná k diagnóze KSME nebo PDR, může však být indikována před laserovou koagulací, ke zjištění rozsahu kapilární nonperfúze, jemných neovaskularizací či ke zhodnocení nevysvětlitelného poklesu zrakové ostrosti.

V posledních několika letech došlo k zavedení tzv. širokoúhlé fluorescenční angiografie (ultrawide field fundus fluorescein angiography - UWFA), s jejíž pomocí je možné zobrazit periferní sítnici až do 200° pouze na jednom snímku. Širokoúhlá fluorescenční angiografie a fotografie očního pozadí je přínosem především proto, že je schopná zachytit až 3,2 krát více sítnicového povrchu v porovnání se standardním zobrazením sítnice v 7 polích (obrázek10) (Kaines A. et al., 2009). S tím souvisí také větší citlivost UWFA v zachycení neovaskularizací a oblastí nonperfúze oproti standardní angiografii.

Obrázek 10: Zobrazení sítnice pacienta s proliferativní diabetickou retinopatií pomocí širokoúhlé fluorescenční angiografie Optos s vyznačenou plochou 7 standardních polí. Ve standardním zobrazení by nebyla zachycena periferní neovaskularizace, což by vedlo ke stanovení chybné diagnózy (převzato se svolením Witmer MT., Kiss S., 2012)

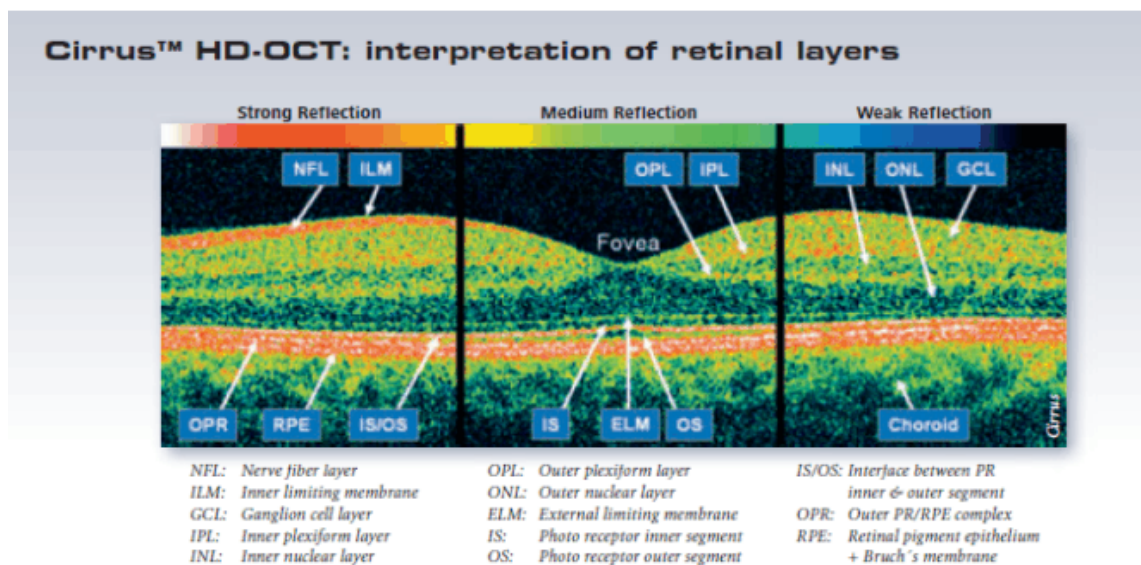


1.6.4 Optická koherenční tomografie

V části mé výzkumné práce jsem použila optickou koherenční tomografii (OCT) jako vyšetřovací metodu ke kvantifikaci a určení charakteristiky diabetického makulárního edému a z toho důvodu ji věnuji v následujících řádcích větší pozornost.

Optická koherenční tomografie je relativně nová nekontaktní a neinvazivní tomografická vyšetřovací metoda, která přináší velmi užitečné informace v diagnostice DME. První práce o OCT byly publikovány v roce 1991 a první „in vivo“ OCT snímky zobrazující sítnicové struktury byly publikovány v r. 1993 (Fercher A. et al., 1997). Do klinické praxe byla uvedena v roce 1997. Moderní OCT přístroje umožňují velice precizní zobrazení sítnice v jejím příčném průřezu ve vysokém rozlišení a kvantitativní měření tloušťky a objemu retiny. OCT využívá principu nízkokoherenční interferometrie. Zdrojem infračerveného záření vlnové délky 820 nm je superluminiscentní dioda. Přístroj se skládá ze štěrbinové lampy, zdroje světla, senzoru odraženého záření a interferometru nebo spektrometru, který měří časové rozdíly v odrazu paprsku od struktur sítnice a od referenčního zrcadla. Ve zvolené délce vyšetřovací linie se od jednotlivých, pod sebou ležících struktur sítnice odráží 512 paprsků (Dusová J., 2012). Přístroje 3. generace jsou založené na principu spektrálních domén, kdy probíhá analýza celého spektra odražených signálů najednou a má vysokou rozlišovací schopnost (obrázek 11). Vznikají obrazy průřezů sítnice s axiálním rozlišením jednotlivých struktur a vrstev 5-8 μm .

Obrázek 11: Zobrazení zdravé sítnice pomocí spectral domain OCT Cirrus (převzato od firmy Zeiss, výrobce přístroje)



OCT se od svého zavedení do oftalmologie na konci 90 let minulého století používá k hodnocení dynamiky DME a odpovědi na jeho terapii různými modalitami (laser, intravitreální injekce triamcinolonu, anti-VEGF, vitrektomie). U pacientů s DME je všeobecně akceptováno, že centrální tloušťka sítnice (CRT), je vedle nejlépe korigované zrakové ostrosti stala nejdůležitějším markerem pro posuzování efektivity léčby (DRCR.net, 2007). Studie, které by korelovaly sklivcové hladiny VEGF u DME s OCT parametry před zavedením anti-VEGF terapie prakticky neexistovaly. Až intervenčními studii bylo prokázáno, že anti-VEGF terapie vede u DME k redukci tloušťky sítnice (Massin P. et al. 2010, Mitchell P. et al, 2011) a vyšetření pomocí OCT začalo být považováno za možnou cestu, jak neinvazivně ve standardních klinických podmínkách posuzovat hladiny VEGF. Tyto empirické závěry však nejsou doloženy stanovením hladiny VEGF před a po terapii a vycházejí pouze z klinického pozorování redukce DME po anti-VEGF terapii.

Studie na pacientech s DME založené na OCT nálezech dokládají, že nejenom tloušťka sítnice, ale i její morfologie mají vliv na makulární funkci (Deak GG.et al., 2010, Reznicek L. et al., 2013). Autoři uvádějí, že DME s velkými cystami ve vnější nukleární vrstvě a přítomnost subretinální tekutiny má horší dopad na centrální zrakovou ostrost a edém hůře reaguje na terapii anti-VEGF medikamenty, než u pacientů s makulárním edémem a difúzním ztlustěním sítnice. Nicméně v literatuře je jen málo informací o tom, jak přítomnost cyst a ostatních OCT charakteristik u diabetického makulárního edému koreluje se sklivcovými hladinami VEGF a dalšími biochemickými parametry.

1.7 TERAPIE DR

Stále platí, že zásadní pro léčbu a prevenci DR je režimová a farmakologická léčba ovlivnitelných rizikových faktorů (kontrola glykémie, arteriální hypertenze a hyperlipidemie).

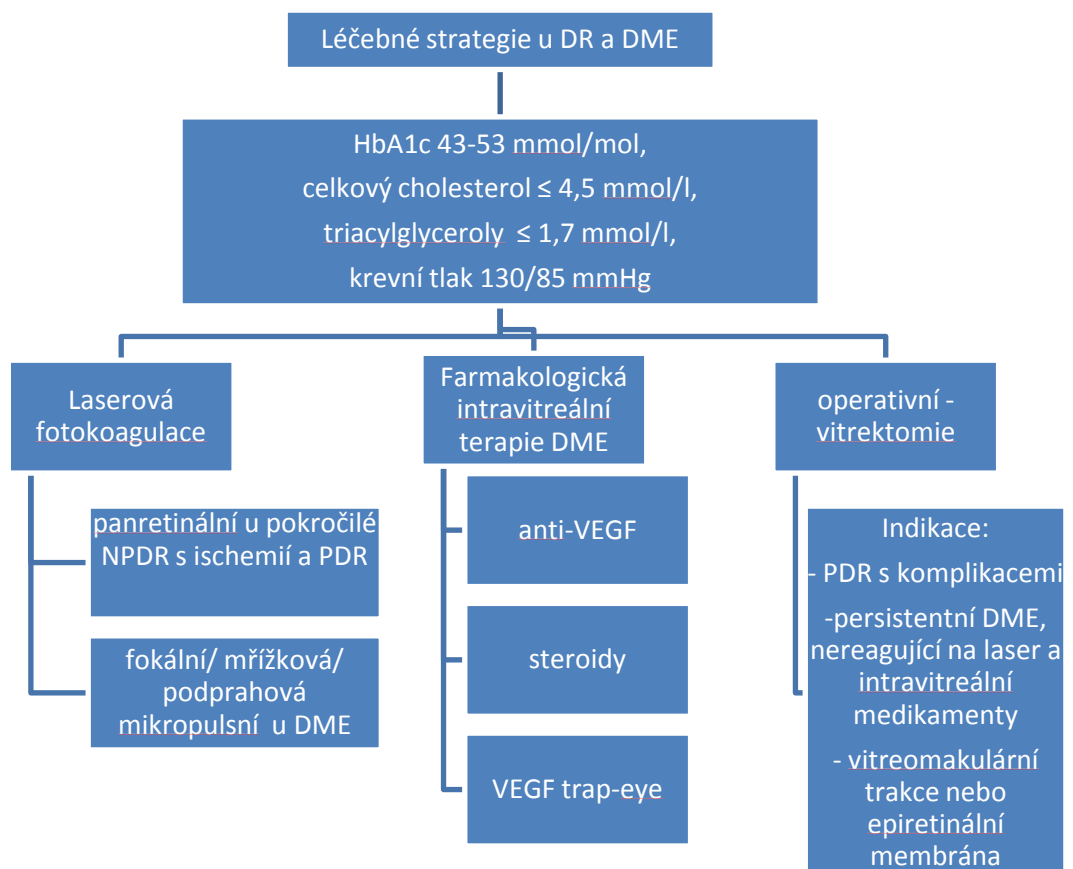
V současnosti je nejefektivnějším přístupem vedoucím ke zpomalení progresu DR metabolická kontrola, tedy optimalizace glykémie a glykovaného hemoglobinu HbA_{1c}. Za optimální hodnotu HbA_{1c}, i když velmi obtížně dosažitelnou, je považována hladina 4,5% (IFCC – International Federation of Clinical Chemistry), přičemž je vždy nutné brát v úvahu individuální rizika pacienta a eventuelní komorbidity (Kalvodová B. et al., 2012, Sosna T. et al., 2012). Důležité je zmínit, že 4,5% IFCC odpovídají 6,2% DCCT/NGSP (Diabetes Control and Complication study/ National Glycohemoglobin

Standardisation Program) tedy jednotkám použitým pro studie zmíněné v kapitole 1.1.2. Od začátku roku 2012 je zavedena nová jednotka pro HbA_{1c}, která se vyjadřuje v mmol/mol; referenční interval pro kompenzovaný diabetes je 43-53 mmol/mol (Hanas R. et al, 2010).

Důkazy o tom, že antihypertenziva by zpomalovala progresi DR, jsou nedostačující, a proto je podle autorů podávání antihypertenziv pouze k prevenci vzniku DR sporné (Do DV. et al., 2015).

Principem lokální oční terapie je redukce makulárního edému, kontrola progresu onemocnění a zlepšení či udržení zrakových funkcí. Volba specializované oftalmologické léčby je závislá na formě DR a stupni poškození sítnice. Možnosti lokální léčby DME a DR jsou schematicky shrnuty na obrázku 12.

Obrázek 12: Možnosti léčby diabetické retinopatie a diabetického makulárního edému



1.7.1 Laserová koagulace

Laserová koagulace (nebo také fotokoagulace) sítnice byla jako terapeutická možnost k léčbě DR zavedena v 80. letech minulého století na základě výsledků studie DRS a ETDRS. Od doby zavedení laserové koagulace došlo k vývoji nových laserů (např. yttrium aluminium granátový laser dopovaný neodymem: Nd-YAG) a systémů, umožňujících bezkontaktně a cíleně laserovat větší plochu sítnice a zkrátit tak dobu ošetření (např. přístroj Pascal, Navilas) (Chalam KV et al., 2012, Muqit MM. et al., 2013). Nicméně základní principy zůstaly a fotokoagulace sítnice je dodnes zlatým standardem u pokročilé a velmi pokročilé neproliferativní DR, u proliferativní DR a některých forem diabetické makulopatie. Podle rozsahu laserované oblasti rozlišujeme a) fokální, b) mřížkovou, c) kvadrantovou nebo d) panretinální fotokoagulaci.

Laserová léčba je v podstatě empirickou destruktivní metodou. Jejím principem je absorpce intenzivního světelného záření pigmentovými buňkami a přeměna na energii tepelnou, která má na tkáň trvalý efekt fotochemický, termický a vaporizační (Sosna T. et al., 2012). Účinek laserové koagulace je preventivní, již ztracenou zrakovou ostrost nemůžeme fotokoagulací zpravidla vrátit (Kalvodová B. et al., 2012).

Mezi základní mechanismy působení laseru patří:

- destrukce hypoxické tkáně, která má zabránit produkci vasoproliferačních faktorů.

Při destrukci hlubokých vrstev sítnice se snižuje metabolická aktivita a spotřeba kyslíku, což by mělo vést k vyšší koncentraci kyslíku v neošetřené sítnici. Zároveň dojde ke zrychlení průtoku ve zbývajících kapilárách.

- přímý uzávěr cév postižených angiopatií (Valešová L., Hycl J., 2002).

Panretinální a kvadrantová fotokoagulace sítnice

Panretinální fotokoagulaci je doporučena při nonperfúzi u pokročilé NPDR a u PDR. Laserovými stopami se postupně pokryje celá plocha sítnice (ca asi 800 – 2000 stop) kromě centrální oblasti. Laserová terapie je rozdělena do několika sezení.

Fokální a mřížková fotokoagulace sítnice

Indikací k laserové fotokoagulaci centrální sítnice je neischemický makulární edém. Mezi dvě základní možnosti ošetření makuly patří fokální a mřížková koagulace.

Při fokální fotokoagulaci je lépe postupovat na podkladě angiogramu. Pomocí fluorescenční angiografie jsou identifikována místa prosakování z mikroaneurysmat a ta se poté laserovou fotokoagulací cíleně ošetří. Laserová fotokoagulace se provádí pouze v rozsahu prosakování, nejblíže však 500 μm od centrální foveoly a od papily zrakového nervu (Kalvodová B. et al., 2012).

Jedná-li se o makulární edém, který je difuzní, doporučuje se pokrývat laserovými stopami celou oblast centrální krajiny s výjimkou centrální foveoly a vytvoření tzv. mřížkové laserové fotokoagulace (laserové stopy zasahují v rozsahu asi 500 – 3000 μm od makuly) při jednom sezení (Sosna T. et al., 2012).

V případě, že diabetický makulární edém stále přetrvává, a to i po několika sezeních, doporučuje se s laserovou fotokoagulací přestat. Kontrolní vyšetření fundu po laserové fotokoagulaci bývá prováděno přibližně za 4 až 12 týdnů.

1.7.2 Intravitreální aplikace léčiv

V posledních desetiletích byla v léčbě DME zavedena farmakologická alternativa k laserové koagulaci. V současné době jsou u DME injekčně podávány do sklivce anti-VEGF preparáty (Ranibizumab, Bevacizumab a Aflibercept) a výjimečně triamcinolon acetonid. Ve formě implantátu, ze kterého je léčivo postupně do sklivce uvolňováno, je aplikován intravitreálně dexamethazon.

Steroidní preparáty

Jako první k terapii DME byl od 90-tých let intravitreálně aplikován triamcinolon. ***Triamcinolon*** snižuje vaskulární permeabilitu a přispívá tak ke stabilizaci hemoretinální bariéry, má účinky antiflogistické, antiedematózní, imunosupresivní a antiproliferativní. Přesný mechanismus působení steroidů není zcela objasněn, nicméně je doloženo, že snižuje produkci derivátů kyseliny arachidonové, prostaglandinů, ICAM, TNF- α a VEGF (Agarwal P. et al., 2014). Účinek intravitreálně aplikovaného triamcinolonu přetrvává 2-6 měsíců a k nejčastějším nežádoucím účinkům patří progrese katarakty a vznik sekundárního glaukomu. Závěry Diabetic Retinopathy Clinical Research Network ukázaly, že u DME je po 2 letech fokální nebo mřížková fotokoagulace makuly efektivnější a s méně nežádoucími účinky než triamcinolon (DRCR.net, 2008). Se zavedením bezpečnějších a efektivnějších anti-VEGF preparátů se od intravitreálních aplikací triamcinolonu postupně upustilo.

Na základě poznatku, že intravitreální injekce triamcinolonu redukuje DME a zlepšuje zrakovou ostrost pouze dočasně, byly v posledních letech vyvinuty depotní sklivcové implantáty, ze kterých jsou pomalu uvolňovány steroidy do nitra oka. **Ozurdex** (Allergan) je biodegradabilní implantát, ze kterého se uvolňuje dexametason. V druhé polovině roku 2014 byl Ozurdex schválen americkou Food and Drug Administration na základě 3-leté multicentrické studie, která prokázala jeho efekt v léčbě DME (Boyer DS. et al., 2014). Pacienti léčení Ozurdexem dostali za 3 roky průměrně pouze 4-5 injekcí a došlo u nich k statisticky významnému zlepšení centrální zrakové ostrosti.

Anti-VEGF preparáty

Objevení role VEGF v patogenezi DR vedlo k zavedení protilátek proti VEGF do terapie DME. Použitím anti-VEGF protilátek se blokuje novotvorba cév a zároveň působí antiedematózně potlačením prosakování tekutiny z cév. V současné době se k anti-VEGF látkám řadí bevacizumab a ranibizumab.

Bevacizumab (Avastin, Genentech) je monoklonální protilátka proti všem izoformám VEGF-A, která se váže na všechny jeho izoformy a byl původně schválen pro léčbu rakoviny tlustého střeva. Ačkoli řada studií (např. studie DRCR.net nebo BOLT) prokázala účinnost i bezpečnost bevacizumabu v léčbě DME, stále není registrovaným lékem a oftalmology je používán v „off-label“ terapii.

Ranibizumab (Lucentis, Novartis) je fragment monoklonální protilátky proti VEGF, neutralizuje všechny aktivní izoformy VEGF-A a je určen pro intravitreální aplikaci. Na základě výsledků klinických studií RISE, RIDE, RESOLVE byl schválen k použití pro léčbu DME v roce 2011 (Dusová J., 2012, Sosna T. et al., 2012). Ranibizumab je podáván ve čtyřtýdenních intervalech do doby, kdy pacientova zraková ostrost je stabilní po tři po sobě jdoucí měsíční kontroly.

Nejnovějším intravitreálním lékem pro léčbu DME je tzv. VEGF-trap **Aflibercept** (Eylea, Bayer). Na základě multicentrických randomizovaných studií DA VINCI, VISTA-DME a VIVID-DME byl Aflibercept schválen v roce 2014 pro léčbu DME. Aflibercept je rekombinantní fúzaný protein, skládající se z části vázající VEGF-A (extracelulární doména VEGF receptoru 1 a 2), která je fúzovaná s Fc část lidského imunoglobulinu IgG1 (Korobelnik JF. et al., 2014). Doporučené dávkování Afliberceptu u pacientů s DME jsou 2 mg každých 8 týdnů po počátečním měsíčním podání pěti injekcí.

Ačkoli anti-VEGF a VEGF-trap přinesly výrazné zlepšení v léčbě DME, studie ukazují, že její terapeutický efekt je pouze dočasný a vzhledem ke komplexnosti patogeneze diabetické retinopatie i nedostatečný (Zechmeister-Koss I., Huic M., 2012, Sobaci G. et al., 2012). Dlouhodobé užívání protilátek proti VEGF by mohlo navíc způsobovat buněčnou smrt fotoreceptorů a Müllerových buněk a snižovat tak zrakovou ostrost, neboť VEGF je mimo jiné důležitým faktorem pro přežívání neuronů (Joussen AM. et al., 2002).

1.7.3 Vitrektomie

Sklivec pro účely mé výzkumné práce byl odebrán v rámci pars plana vitrektomie, proto se jí budu v následujícím textu věnovat trochu podrobněji, ačkoli její využití k léčbě komplikací DR není tak časté jako výše zmíněných terapeutických postupů.

Pars plana vitrektomie je mikrochirurgický zákrok, při němž se tzv. vitrektomem odstraní z oka sklivec a je ošetřena sítnice. Indikací k operaci je zpravidla neresorbující se krvácení do sklivce a trakční odchlípení sítnice, kombinované trakční a regmatogenní odchlípení sítnice, floridní PDR nereagující na laserovou koagulaci. Dále se vitrektomie s peelingem membrana limitans interna může použít u diabetického makulárního edému, který nereaguje na léčbu laserovou koagulací nebo intravitreální injekce, a u kterého je přítomna vitreoretinální trakce či epiretinální membrána. Podstatou pars plana vitrektomie jsou tři sklerotomie - vstupy v oblasti pars plana corporis ciliaris - kterými chirurg může vstoupit do oka, aniž by způsobil poškození sítnice. První vstup slouží pro infúzi, kterou je do oka přiváděna tekutina v průběhu operace a udržován tlak v oku. Druhý vstup je pro světlovod, kterým si chirurg svítí na operovanou oblast. A třetí sklerotomie je pro mikrochirurgické nástroje, nejčastěji vitrektom, jímž je sklivec nasáván, gilotinovým pohybem nože na špičce nástroje rozřezán a vzniklé fragmenty jsou odsávány z oka ven. K tomu, aby po operaci nedošlo k odchlípení sítnice, je nutné, aby byl sklivec nahrazen vhodnou látkou. Mezi nejčastěji používané tamponující látky patří silikonový olej, expanzivní plyn např. hexafluorosulfid - SF₆ či fyziologický roztok. Během pars plana vitrektomie je možné postiženou sítnici laserově ošetřovat.

Několik studií potvrdilo, že vitrektomie efektivně ovlivňuje diabetický makulární edém následujícími způsoby: a) zmírnění ischemického stavu neperfundovaných částí sítnice a zabránění sekrece makromolekul přispívajících ke vzniku DME, b) zlepšení zásobení sítnicového povrchu kyslíkem, jeho lepší absorpce, c) lepší rozpustnost kyslíku a

ostatních živin ve sklivcovém prostoru a jejich transport k ischemickým částem sítnice (Das Evcimen N., King GL., 2007).

Sklivec odebraný od pacientů při terapeutické vitrektomii se používá pro klinický výzkum vitreoretinálního rozhraní in vivo a umožňuje nepřímé sledování patologických procesů probíhajících na sítnici (García-Ramírez M. et al., 2007). S pomocí proteomové analýzy a imunoesejí sklivce se v posledních dvou dekáдах na světových pracovištích podařilo identifikovat faktory podílející se na patogenezi diabetické retinopatie, jako např. PEDF, ApoA-1, ApoA-4, Trip-11, a vitamin D vázající protein (Ouchi M. et al., 2005) a nebo beta krystalin S, clusterin, hemopexin a prealbumin (Hernández C. et al., 2013). Pro rutinní diagnostiku stupně a rozsahu postižení sítnice u diabetu se však dosud používají méně invazivní vyšetřovací metody fluorescenční angiografie a k diagnostice DME optická koherenční tomografie (OCT).

2 HYPOTÉZA, CÍLE PRÁCE

2.1 HYPOTÉZA

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

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

2.2 CÍLE PRÁCE

Na základě hypotézy byly stanoveny čtyři dílčí cíle:

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

3 METODIKA

3.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ

Nábor pacientů do studie probíhal v den příjmu pacienta k plánované sítnicové operaci (vitrektomii) pro patologii zadního očního segmentu. V první části studie probíhaly vitrektomie na Oční klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Vzorky pro druhou část práce byly odebírány na Oční klinice Fakultní nemocnice v Olomouci stejným způsobem a metodikou, jak je uvedeno níže. Obě studie byly schváleny etickou komisí VFN a 1.LFUK v Praze a Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

V obou případech byly vzorky biochemicky zpracovány v laboratořích Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. Lékařské fakulty University Karlovy.

Všichni pacienti, kteří byli zařazeni do obou studií, byli ve stabilním klinickém stavu bez klinických a laboratorních známek akutního zánětu a podepsali informovaný souhlas.

Diagnóza diabetes mellitus byla stanovena na podkladě WHO kritérií, doba trvání diabetu byla definována jako doba od zjištění diagnózy do odběru vzorků sklivce. Všichni pacienti podstoupili standardní oftalmologické vyšetření zahrnující stanovení nejlépe korigované zrakové ostrosti, vyšetření na šěrbinové lampě a nepřímou oftalmoskopii. U některých pacientů byla navíc provedena optická koherenční tomografie a fluorescenční angiografie. Při zařazení do studie byl dokumentován celkový zdravotní stav (zejména léčená arteriální hypertenze, hyperurikémie a dyslipidemie) a dlouhodobě užívaná medikace.

Diabetická retinopatie byla hodnocena podle Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Indikace k vitrektomii byly následující: a) difúzní nebo cystoidní diabetický makulární edém, b) preoperační centrální zraková ostrost více než 0,3 log mar a c) nedostatečná nebo žádná odpověď na předchozí léčbu fotokoagulací nebo intravitreálními injekcemi. Z účasti na studii byli vyloučeni pacienti: a) s intraokulárním krvácením, b) po předchozí vitreoretinální operaci, c) po jiné oční operaci nebo laserové fotokoagulaci sítnice před méně než 3 měsíci, d) s anamnézou intraokulárního zánětu, e) po sítnicovém cévním uzávěru či jiných retinálních patologiích vedoucích k sítnicové neovaskularizaci a makulárnímu edému, f) s idiopatickou makulární dírou či epiretinální membránou léčící se zároveň pro diabetes

mellitus, g) po intravitreální léčbě anti-VEGF nebo steroidy (např. triamcisonolon, dexamethason, bevacizumab, ranibizumab, aflibercept) před méně než 6 měsíci.

Do první studie bylo zahrnuto 81 pacientů s DME s průměrnou dobou trvání diabetes mellitus $15,6 \pm 9,0$ let. Sledovaný soubor pacientů byl rozdělen podle stupně diabetické retinopatie (DR) na: 24 pacientů s proliferativní DR (PDR) a 57 s neproliferativní DR (NPDR). Kontrolní skupinu tvořili pacienti bez diabetes mellitus s jinou sítnicovou patologií - idiopatickou makulární dírou ($n = 40$) nebo epiretinální membránou ($n = 8$). Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1: *Klinická a laboratorní charakteristika diabetických pacientů a kontrol bez diabetes mellitus*

parametr	DM (n=81)	kontroly (n=48)	
počet pacientů (muži/ženy)	44 / 37	8 / 40	***
věk (roky)	62,7±10,5	68,6 ±7,0	**
kyselina močová (mmol/l)	7,3±3,2	6,1±3,5	ns
HbA_{1c} (mmol/mol)	69±18	NV	ns
glukóza na lačno (mmol/l)	8,9±3,6	5,0±0,8	***
albumin (g/l)	41,1±3,7	43,3±2,5	***
kreatinin (μmol/l)	91,8±32,3	79,6±30,4	*
CRP (mg/l)	2,3±4,6	0,9±1,4	*
celkový cholesterol (mmol/l)	5,1±1,0 (n=76)	5,3±0,9	ns
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,4±1,0 (n=76)	3,2±0,9	ns
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,1±0,2 (n=76)	1,4±0,3	***
triglyceroly (mmol/l)	1,9±0,9 (n=76)	1,6±0,6	*
dyslipidemie	57 (70,4%)	24 (50,0%)	ns
hypertense	63 (77,8%)	36 (75,0%)	ns

Data jsou uvedena jako průměr ± standardní odchylka.

p<0.05, **p<0.01, *p<0.001 DM versus kontrolní skupina pacientů*

Zkratky: DM – diabetes mellitus, NV – nebylo vyšetřeno, HbA_{1c} – glykovaný hemoglobin, LDL – low density lipoprotein, HDL– high density lipoprotein, CRP – C-reaktivní protein, ns – nesignifikantní

Tabulka 2: Klinická a laboratorní charakteristika séra pacientů s neproliferativní a proliferativní diabetickou retinopatií

Parametr	NPDR (n=57)	PDR (n=24)	p
počet pacientů (muži/ženy)	28 / 29	16 / 8	ns
věk (let)	65,3±8,6	57,7±11,0	*
urea (mmol/l)	7,4±4,6	7,2±2,2	ns
HbA _{1c} (mmol/mol)	67 ±18	77 ±14	*
glukóza na lačno (mmol/l)	9,0 ±3,4	8,9 ±4,2	ns
albumin (g/l)	41,4±3,7	40,6±3,1	ns
kreatinin (μmol/l)	87,3±23,9	100,5±47,9	*
CRP (mg/l)	2,4±4,3	2,2±4,1	ns
celkový cholesterol (mmol/l)	5,1±1,0 (n=54)	5,2±0,9 (n=22)	ns
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,3±0,9 (n=56)	3,5±1,0 (n=20)	ns
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,0±0,2 (n=54)	1,1±0,2 (n=22)	ns
triglyceroly (mmol/l)	1,9±0,9 (n=55)	2,1±0,6 (n=21)	ns
dyslipidemie	34 (59,6%)	23 (95,8%)	**
hypertenze	43 (75,4%)	20 (83,3%)	ns
typ DM (DM 1/DM 2)	3 / 54	7 / 17	*
průměrné trvání diabetu (roky)	14,6±8,6	16,9±9,0	ns
terapie – insulin	26 (45,6%)	14 (58,3%)	ns
– PAD	19 (33,3%)	5 (20,8%)	ns
– insulin + PAD	12 (21,0%)	5 (20,8%)	ns

Data jsou uvedena jako průměr ± standardní odchylka.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ PDR versus NPDR pacienti

zkratky: DM – diabetes mellitus, NPDR – neproliferativní diabetická retinopatie, PDR – proliferativní diabetická retinopatie, PAD – perorální antidiabetika, ns – nesignifikantní

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

Tabulka 3: *Klinická a laboratorní charakteristika pacientů druhé výzkumné části.*

Parametr	DME (n=16)	kontroly (n=13)	p
počet pacientů (muži/ženy)	4 / 12	1 / 12	ns
věk (roků)	71 (61 – 77)	71 (66 – 74)	ns
visus (logMAR)	1,0 (0,6 – 1,0)	0,5 (0,5 – 0,6)	**
chronické onemocnění ledvin	1 (6,2%)	0 (0,0%)	ns
dyslipidemie	8 (50,0%)	4 (30,8%)	ns
hypertenze	14 (87,5%)	10 (76,9%)	ns
HbA_{1c} (mmol/mol)	51,5 (43,0 – 63,3)	NA	NA
sérový albumin (g/l)	42,7 (41,1 – 44,6)	44,4 (39,6 – 45,2)	ns
CRP (mg/l)	1,6 (1,0 – 3,7)	2,0 (0,8 – 3,6)	ns

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

*** $p < 0.01$ DME versus kontrolní pacienti*

zkratky: CRP – C-reaktivní protein, DME – diabetický makulární edém, HbA_{1c} – glykovaný hemoglobin, logMAR – logaritmus minimálního úhlu rozlišení (logarithm of the minimal angle of resolution), NA – nestanoveno, ns – nesignifikantní

Chronické onemocnění ledvin bylo definováno jako strukturální poškození ledvin nebo porucha funkce vyjádřená glomerulární filtrací $< 1,0 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$ po ≥ 3 měsíce

3.2 OPTICKÁ KOHERENČNÍ TOMOGRAFIE

Pacienti z druhé studie byli den před operací vyšetřeni OCT spectral-domain přístrojem (CIRRUS HD-OCT, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Německo) jako tzv. „macular cube acquisition“ podle doporučení výrobce. Data získaná v režimu „macular cube 512 x 128 scan“ sestávají ze 128 rastrových skenů s 512 A-skeny a snímají centrální oblast makuly o ploše 6 x 6 mm. U každého pacienta jsme sledovali následující tři parametry vypočtené pomocí Cirrus HD-OCT softwaru:

1. centrální tloušťka sítnice (central retinal thickness - CRT),
2. objem makulární oblasti (cube volume - CV) a
3. průměrná tloušťka sítnice v makule (cube average thickness - CAT)

a kontrolovali jsme přesnost měření. CRT je definována jako průměrná vzdálenost vnitřní limitující membrány od retinálního pigmentového epitelu v cirkulární zóně o průměru 1 mm se středem ve fovee. CV je objem vypočítán ze stejné plochy jako CAT, tedy centrálního kruhu o průměru 1 mm. CAT je vypočítána jako průměrná tloušťka sítnice v kruhu o průměru 6 mm s centrem ve fovee.

Na základě předchozích publikací, které zohledňovaly morfologické změny u DME, byl centrální řez procházející foveou ještě dále hodnocen nezávislým vyšetřujícím podle přítomnosti/absence intraretinálních cyst a serózního odchlípení sítnice (SRD).

3.3 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

V rámci studie byla odebrána pacientovi v den sítnicové operace na lačno žilní krev z kubitální žíly. Krevní vzorky ve zkumavce bez antikoagulantu byly ihned po odběru centrifugovány 10 minut při 1450 g a získané sérum následně rozpipetováno do sterilních zkumavek. Vzorky plné krve i séra byly potom uskladněny při -20°C. Krátce po odběru krve provedl vitreoretinální chirurg odběr vzorku neředěného sklivce (cca 0,3ml). Sklivec se získával pomocí vitrektomu v úvodu standardní terapeutické pars plana vitrektomie před otevřením infuzního portu a byl, stejně jako sérum, uchován ve zkumavkách při -20°C. Po odběru byly vzorky krve a sklivce uchovány nejdříve v odběrovém centru Oční kliniky, poté v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LFUK a VFN v Praze při -80°C po dobu potřebnou k biochemickému zpracování materiálu.

3.4 LABORATORNÍ STANOVENÍ

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

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

Sklivcové a sérové hladiny VEGF byly stanoveny imunochemicky pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Pro naši studii byl použit standardní kit pro lidský VEGF o 80 jamkách potažených monoklonální protilátkou (R and D Systems, Minneapolis, MN, USA) a byl dodržen doporučený postup výrobce. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách pg/ml; limity kvantifikace byly min = 31,2 pg/ml a max = 1000 pg/ml. Metoda je založena na principu kvantitativní sendvičové techniky. Souprava obsahuje destičku s navázanou monoklonální protilátkou specifickou pro VEGF. Standardy a vzorek jsou rozpipetovány do jamek mikrotitrační destičky a přítomný VEGF se váže na protilátku navázanou na destičce. Po odstranění nenavázaného materiálu se stanoví množství navázaného VEGF pomocí přidané, s enzymem konjugované, další protilátky. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na barevný produkt. Změna zabarvení měřená při 450 nm je přímo úměrná množství VEGF v testovaném roztoku.

Pracovní postup:

Roztoky:

- promývací roztok: 20 ml promývacího roztoku ve 500 ml redestilované vody
- substrátový roztok: roztoky A + B v poměru 1:1, 200 μl /jamka
- konjugát (enzymaticky označená protilátka)
- zastavovací roztok
- nulový standard: 500 μl roztoku RD5K
- připravíme sérii standardů s koncentracemi 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml v objemu 500 μl .

Do každé z jamek mikrotitrační destičky jsme nejprve napipetovali 100 μl ředícího roztoku RD1W. Poté jsme přidali standardy pro kalibrační křivku nebo vzorky sklivce a séra po 100 μl do každé jamky a nakonec byla destička zakryta fólií. Vzorky jsme na mikrotitrační destičce nechali reagovat 2 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci jsme odsáli obsah každé jamky a pomocí promývacího roztoku třikrát promyli nenavázanou monoklonální protilátku. Poté jsme přidali 200 μl konjugátu, destičku jsme opět

přikryli a inkubovali další 2 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci jsme odsáli, destičku opět třikrát promyli a do každé jamky přidali 200 μ l substrátového roztoku. Při pokojové teplotě jsme reakční směs inkubovali 25 minut a reakce byla ukončena přidáním 50 μ l zastavovacího roztoku do každé jamky. Pomocí spektrofotometru byla do 30 minut stanovena absorbance při vlnové délce 450 nm a nastavena korekce vlnové délky na 540 nm.

Glykovaný hemoglobin HbA_{1c} byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, přičemž kalibrace byla nastavena dle referenční metody IFCC.

Jak již bylo uvedeno, do roku 2012 se pro HbA_{1c} používala jednotka %, která byla na začátku roku 2012 nahrazena novou jednotkou vyjádřenou v mmol/mol. Převod jednotek je 1% = 10 mmol/mol.

Koncentrace glukózy byla stanovena enzymaticky (glukózaoxidáza) s fotometrickou detekcí. Enzymatickou metodou s fotometrií byl stanoven také celkový cholesterol (cholesteroidáza) a triglyceroly (glycerol-3-fosfát oxidáza). HDL cholesterol byl stanoven homogenní enzymatickou kolorimetrickou reakcí a LDL výpočtem z hodnot celkového a HDL cholesterolu a triglycerolů dle Friedwalda.

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

3.5 STATISTICKÁ ANALÝZA

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

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

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

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

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

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

4 VÝSLEDKY VLASTNÍ PRÁCE

4.1 STUDIE STANOVENÍ KYSELINY MOČOVÉ A GLUKÓZY

Koncentrace kyseliny močové ve sklivci byla u diabetiků signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny pacientů. Také sérová hladina kyseliny močové v séru diabetiků byla vyšší než u nediabetiků, jak je znázorněno v tabulce 4.

Tabulka 4: Koncentrace glukózy a kyseliny močové u diabetiků a nediabetických kontrol

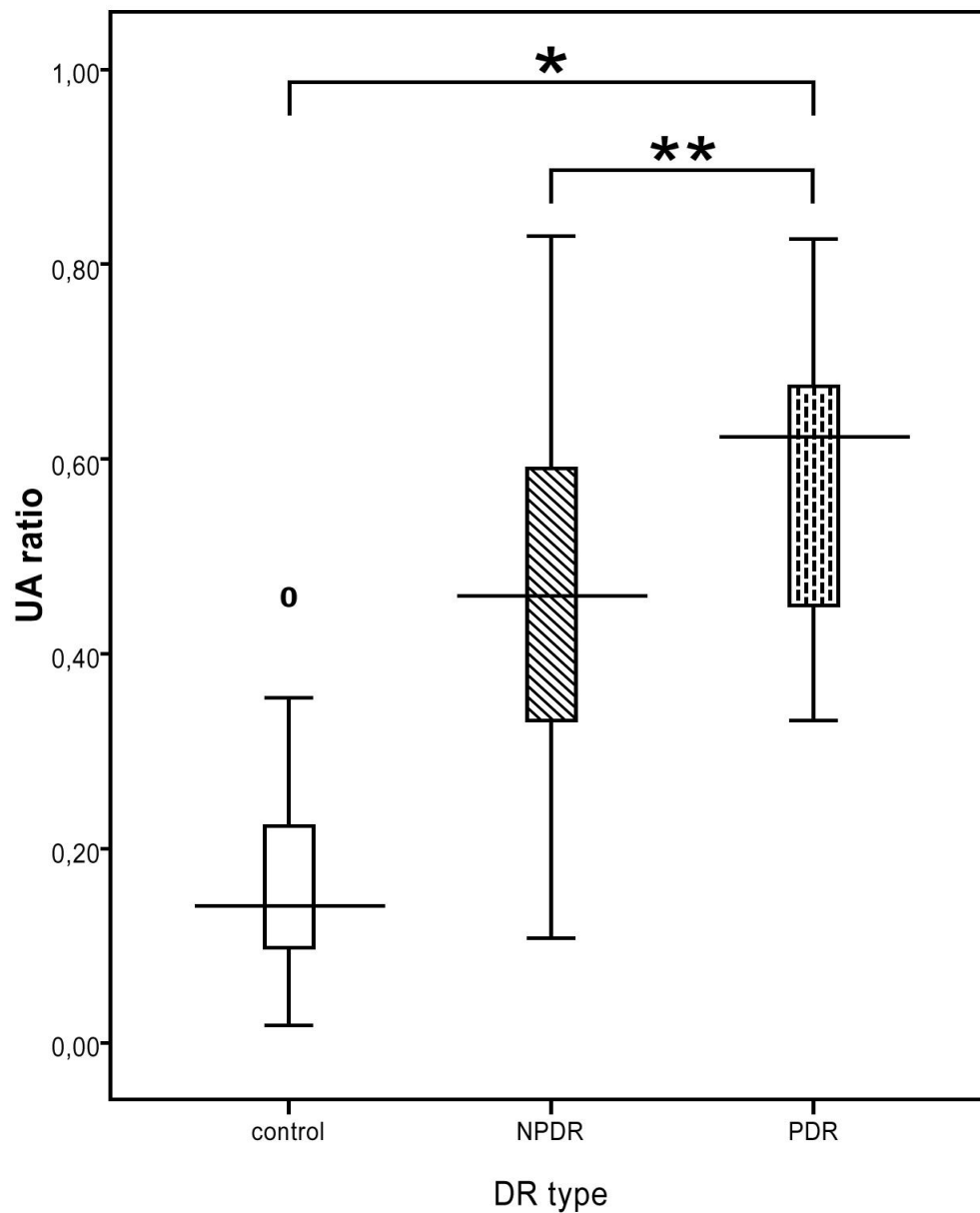
Parametr		DM (n=81)	kontroly (n=48)	p
kyselina močová	sklivec ($\mu\text{mol/l}$)	169,6 \pm 70,6	52,0 \pm 35,9	***
	sérum ($\mu\text{mol/l}$)	344,6 \pm 72,8	314,5 \pm 88,1	*
	absolutní poměr	0,494 \pm 0,18	0,163 \pm 0,10	***
glukóza na lačno	sklivec (mmol/l)	5,6 \pm 2,7	1,2 \pm 0,8	***
	sérum (mmol/l)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

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

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

Průměr absolutního poměru kyseliny močové mezi sklivcem a sérem u diabetiků se signifikantně lišil od kontrol. Kromě toho, korelovala sklivcová hladina kyseliny močové signifikantně ($p=0,022$) s typem diabetické retinopatie; kyselina močová byla vyšší u PDR ($194 \pm 56 \mu\text{mol/l}$) ve srovnání s NPDR ($159 \pm 74 \mu\text{mol/l}$). Také průměrný absolutní poměr kyseliny močové byl u PDR vyšší než u NPDR ($p=0,006$), jak je znázorněno na obrázku 13.

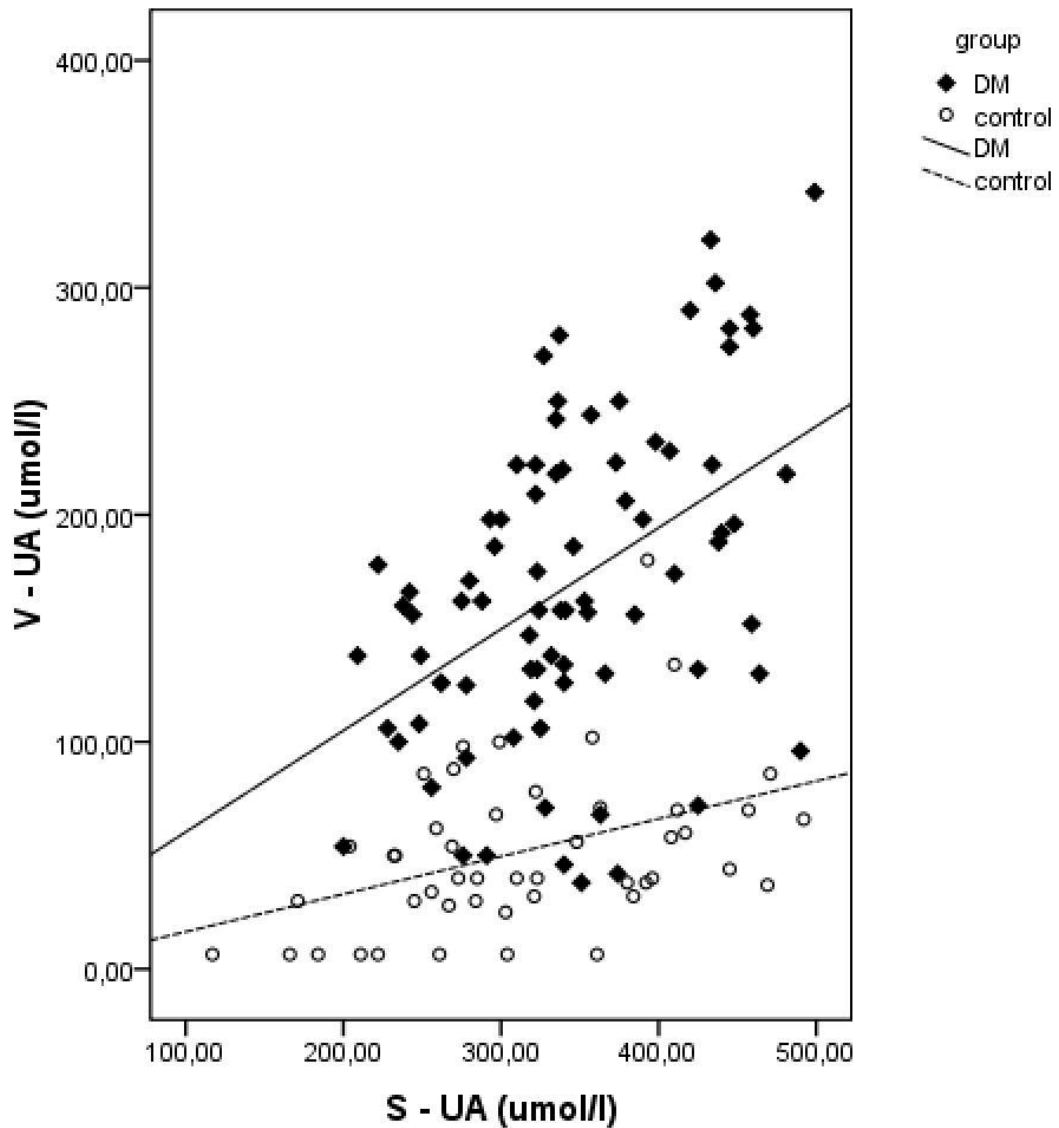
Obrázek 13: Průměrný absolutní poměr kyseliny močové u kontrol, NPDR a PDR



Zkratky: UA ratio – poměr sklivcové a sérové koncentrace kyseliny močové, * $p < 0,01$ kontroly versus diabetici, ** $p < 0,001$ PDR versus NPDR pacienti

Obrázek 14 ukazuje, že stejné zvýšení koncentrace kyseliny močové v séru vede k většímu nárůstu její intravitreální koncentrace u diabetických pacientů (0,281 krát; CI = (0,039; 0,522)) než u kontrol (0,166 krát; CI = (-0,011; 0,343)); $p=0,023$.

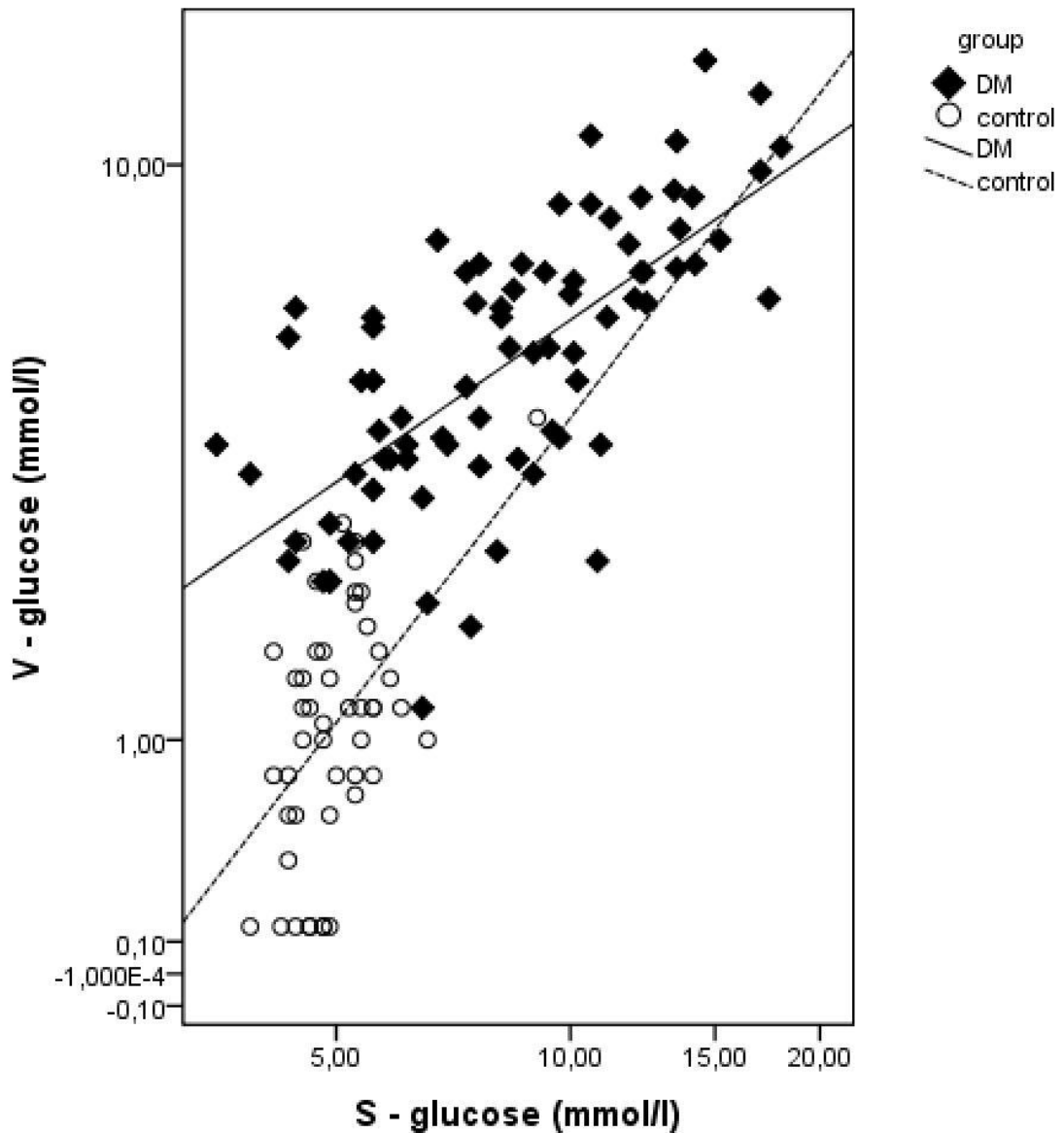
Obrázek 14: Závislost sklivcové a sérové koncentrace kyseliny močové u kontrol versus u diabetiků



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

Data pro glukózu měla asymetrické rozložení, a proto byla převedena do logaritmické stupnice. Koncentrace glukózy ve sklivci byly signifikantně vyšší u diabetických pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů. Také byl nalezen signifikantní rozdíl v lačné glykemii mezi oběma skupinami, jak shrnuje tabulka 4 a obrázek 15.

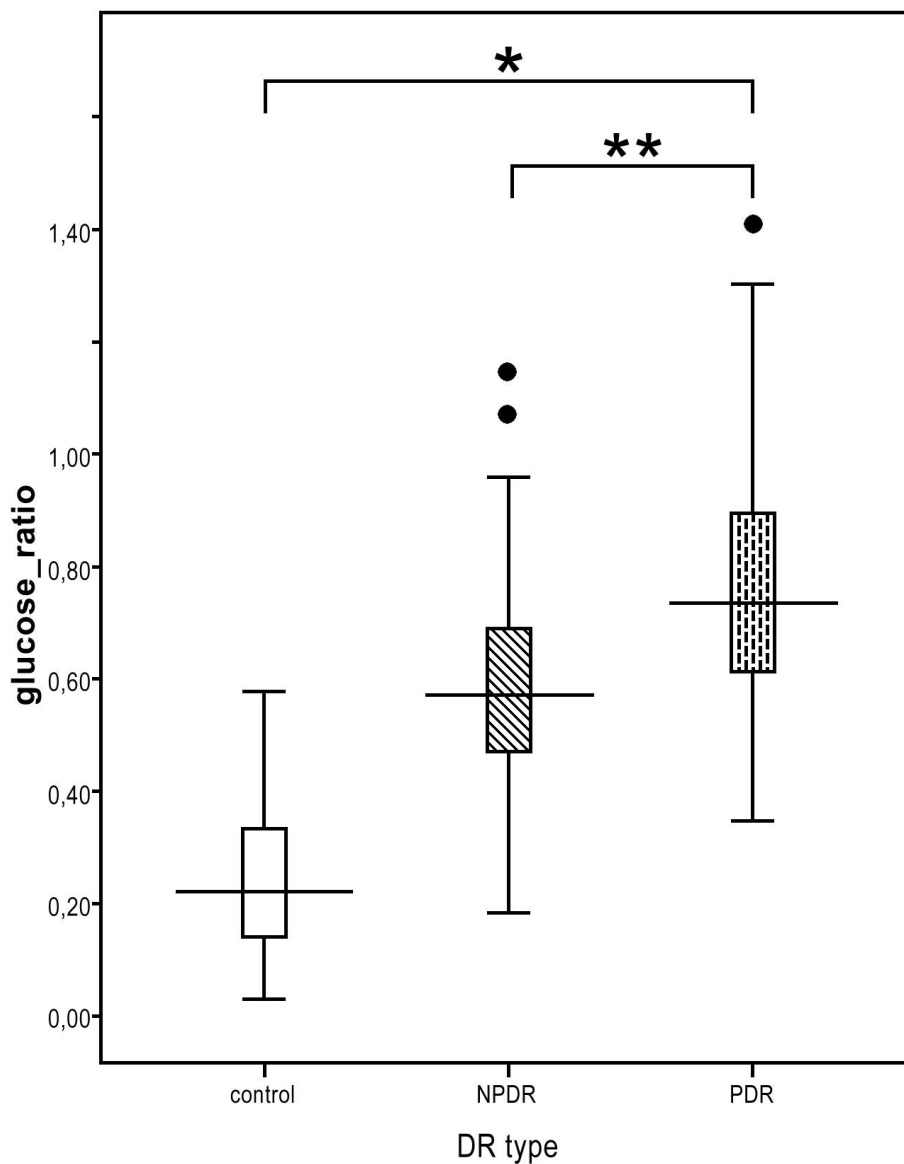
Obrázek 15: *Vztah sklivcové a sérové koncentrace glukózy u pacientů s diabetem a u kontrol*



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

Jak bylo uvedeno, průměrný absolutní poměr glukózy u diabetiků byl signifikantně vyšší než u nediabetických kontrol (tabulka 4, obrázek 14). Pacienti s PDR ($6,3 \pm 2,9$ mmol/l) měli vyšší průměrnou hladinu glukózy ve sklivci než pacienti s NPDR ($5,3 \pm 2,5$ mmol/l), ale tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní ($p = 0,233$). Nicméně průměrný absolutní poměr glukózy u PDR byl signifikantně vyšší než u NPDR a u kontrol (obrázek 16).

Obrázek 16: Průměrný absolutní poměr glukózy u kontrol, NPDR a PDR



Zkratky: *glucose ratio* – poměr sklivcové a sérové koncentrace glukózy, * $p < 0,01$ kontroly versus diabetici, ** $p < 0,001$ PDR versus NPDR pacienti

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

Hodnoty HbA_{1c} byly stanoveny pouze v krvi diabetiků, proto jsme také jenom u této skupiny hodnotili korelaci glykovaného hemoglobinu s biochemickými změnami sklivce. Průměrná hladina HbA_{1c} u NPDR byla $6,7 \pm 1,8\%$, což bylo méně (hraniční signifikance $p=0,05$) ve srovnání s PDR ($7,5 \pm 1,5\%$). Nicméně, nebyla dokázána statisticky signifikantní korelace HbA_{1c} s intravitreálními koncentracemi kyseliny močové a glukózy.

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

4.2 VZTAH KYSELINY MOČOVÉ A VEGF

Biochemická analýza séra a sklivce

Prokázali jsme, že biochemické složení sklivce diabetiků se statisticky signifikantně liší od kontrolní skupiny. Ze stanovovaných biochemických parametrů byla koncentrace VEGF, kyseliny močové a celkové bílkoviny ve sklivci diabetiků signifikantně vyšší než u kontrol, jak je znázorněno v tabulce 5 a obrázcích 17 - 19. Také sklivcová koncentrace albuminu byla u diabetiků rovněž vyšší, ale rozdíl mezi skupinami však nebyl signifikantní. Ve všech nediabetických kontrolních vzorcích sklivce byla koncentrace VEGF pod detekčním limitem 31.2 pg/ml.

Tabulka 5: *Laboratorní analýza sklivce u DME a nediabetických kontrol*

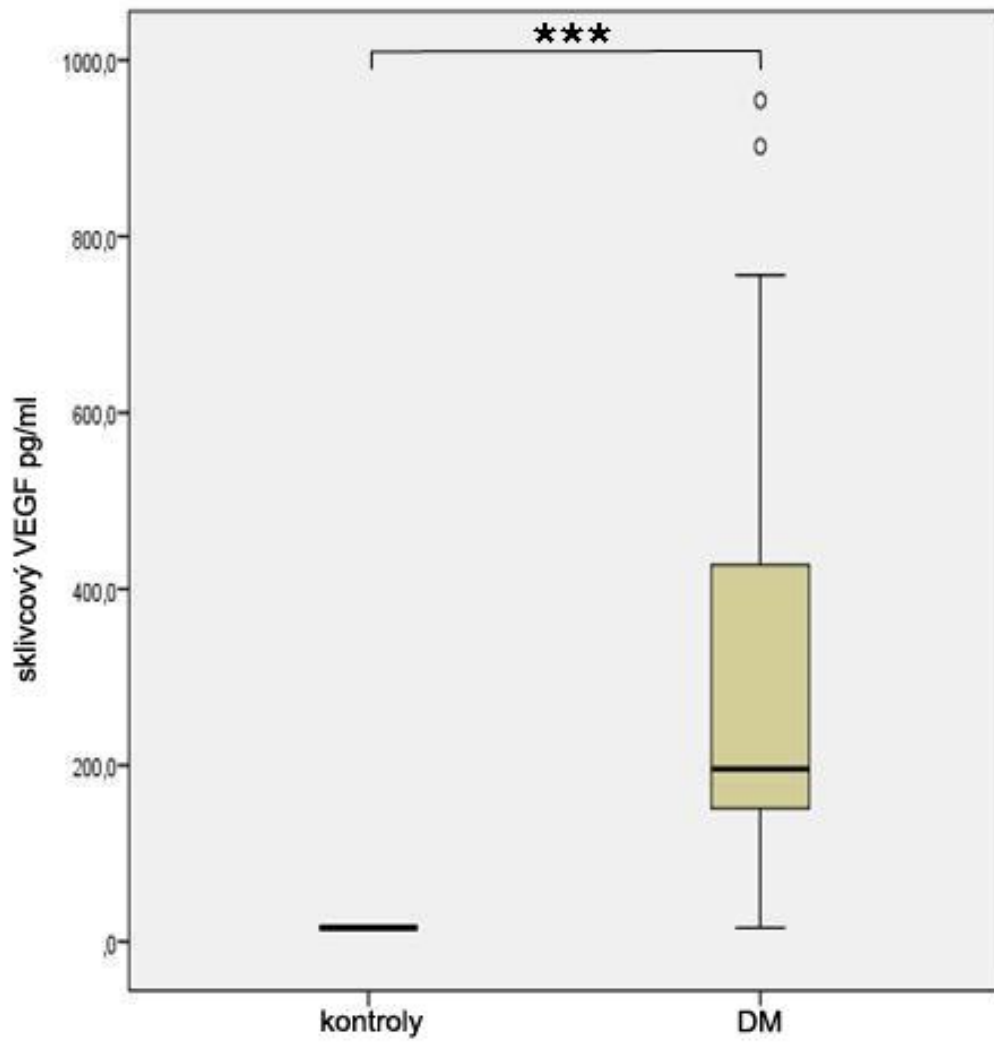
Parametr	DME (n=16)	kontroly (n=13)	p
VEGF (pg/ml)	192.7 (140.9 – 523.5)	< LOD	***
kys. močová (μmol/l)	156.0 (86.0 – 209.0)	70.0 (48.5 – 138.0)	*
albumin (mg/l)	1050 (618 – 1780)	550 (295 – 1495)	ns
celková bílkovina (g/l)	6.3 (4.9 – 9.1)	3.6 (3.1 – 4.2)	***

Data jsou uvedena jako medián a mezikvartilový interval IQR

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

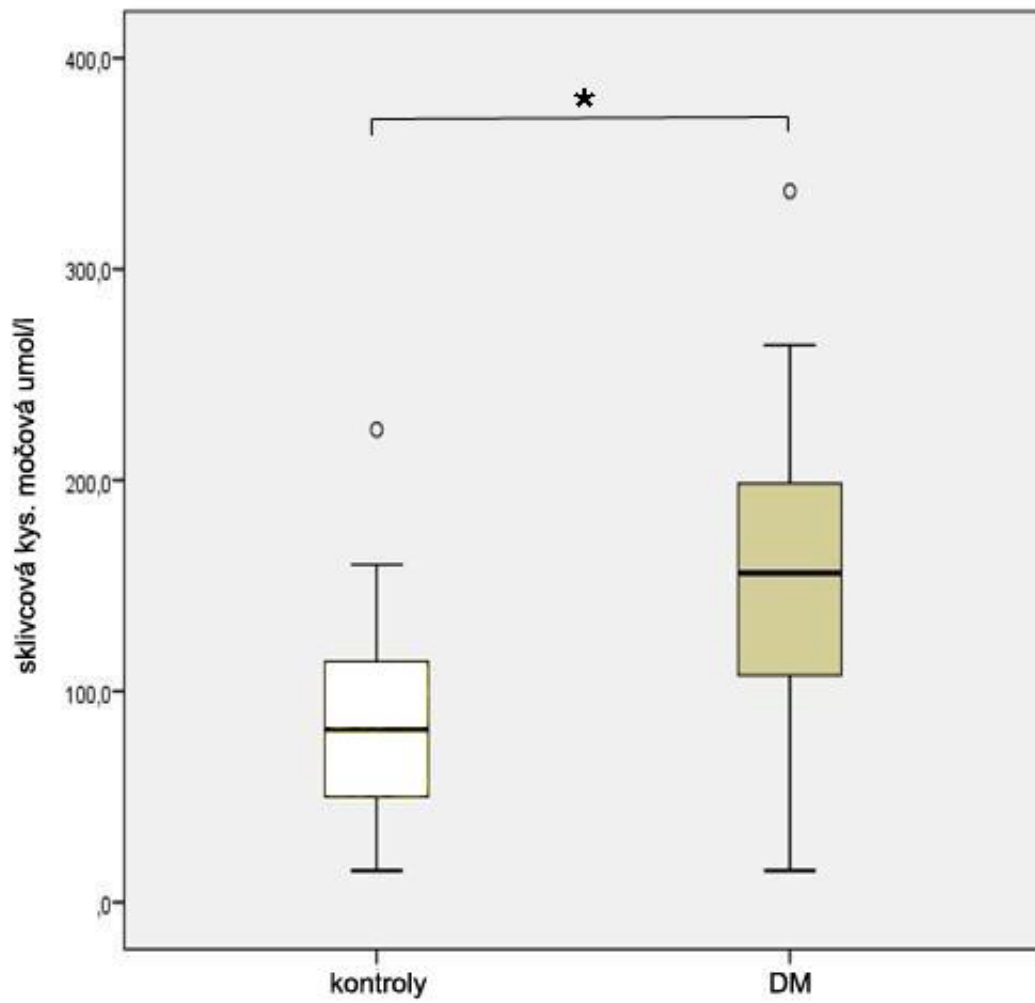
zkratky: ns= nesignifikantní, LOD - limit detekce (31.2 pg/ml)

Obrázek 17: Sklivcová koncentrace VEGF u DME a kontrolní skupiny



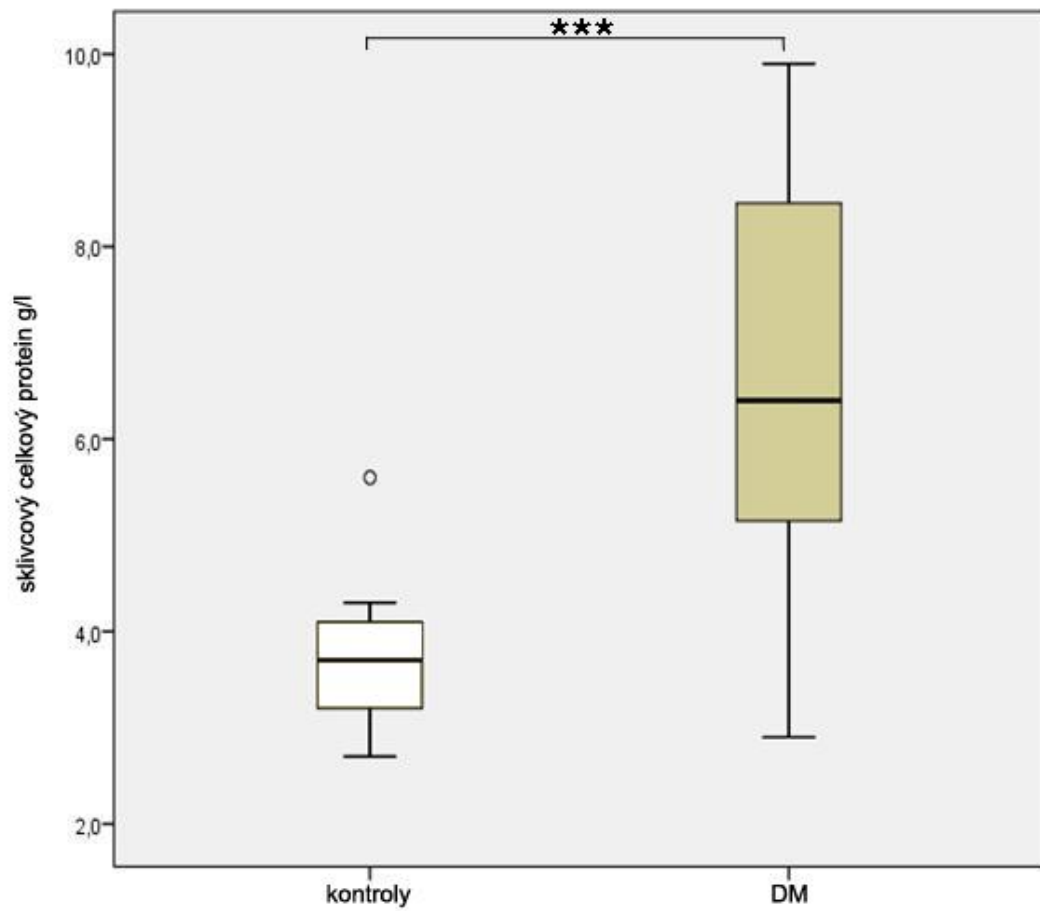
*** $p < 0.001$ DME versus kontrolní pacienti

Obrázek 18: Sklivcová koncentrace kyseliny močové u DME a kontrolní skupiny



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

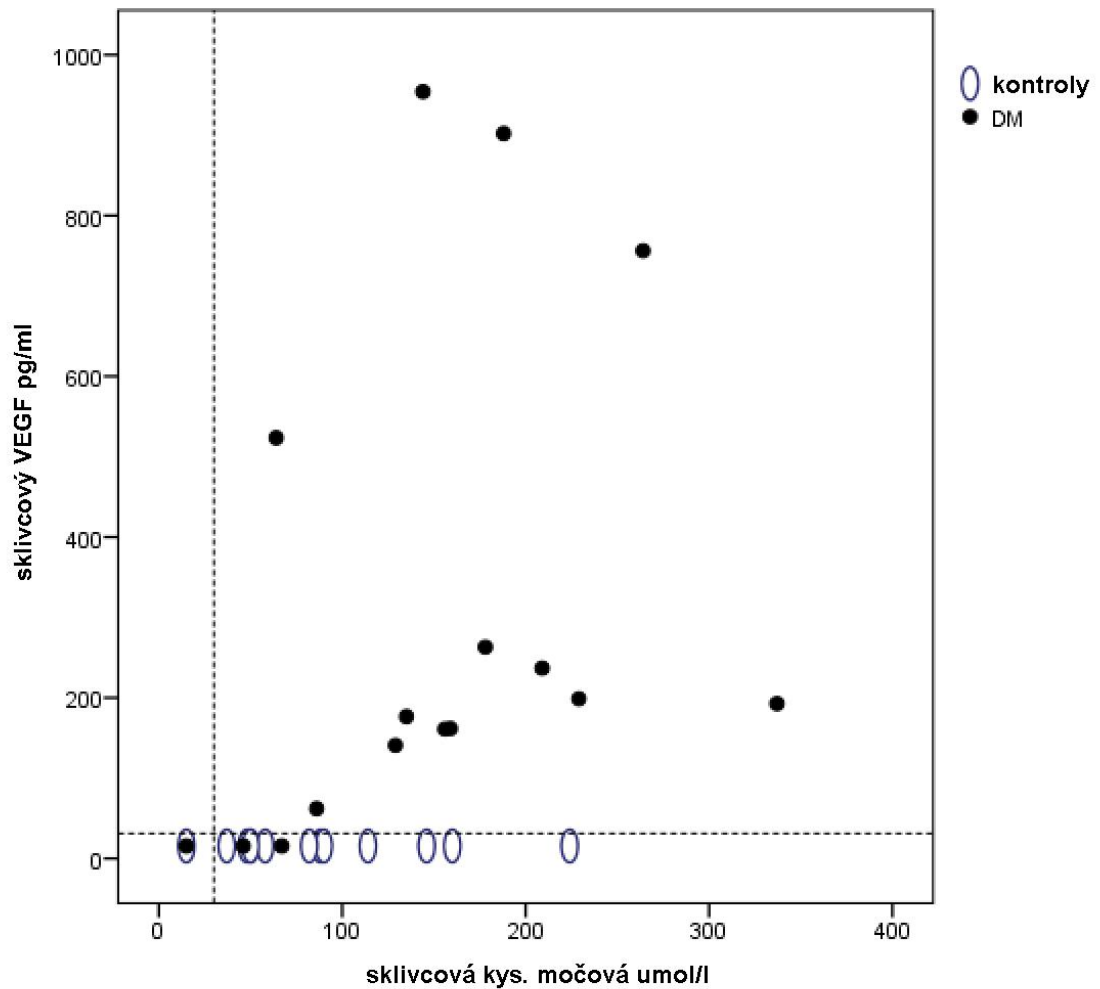
Obrázek 19: Sklivcová koncentrace celkové bílkoviny u DME a kontrolní skupiny



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

Ve skupině pacientů s DME byla dále popsána signifikantní korelace mezi sklivcovou koncentrací kyseliny močové a sklivcovým VEGF ($\rho = 0.559$, $p = 0.03$). Obrázek 20 znázorňuje vztah koncentrace kyseliny močové ve sklivci u diabetiků a kontrol.

Obrázek 20: Vztah sklivcové koncentrace kyseliny močové a VEGF u DME a kontrol



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

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

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

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

4.3 OCT PARAMETRY

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

Hodnota CRT u diabetiků korelovala signifikantně s CAT ($\rho= 0.589$, $p= 0.016$). Dále CRT u pacientů s DM korelovala signifikantně také s CV ($\rho= 0.581$, $p= 0.018$). Nicméně nejsilnější korelace ve skupině diabetiků se ukázala mezi CAT a CV ($\rho= 0.999$, $p< 0.001$). Přítomnost subretinální tekutiny byla pospána u šesti diabetických očí, ale její přítomnost nekorelovala s žádným z ostatních OCT parametrů (CRT, CAT, CV). Ze všech sledovaných OCT parametrů se pouze v diabetické skupině ukázala statisticky signifikantní korelace CV se sklivcovou koncentrací VEGF ($\rho= 0.515$, $p= 0.041$). (obrázek 21). Hodnoty CRT, CAT, CV a SRD u pacientů s DME a u kontrol nekorelovaly ani se sklivcovou koncentrací kyseliny močové, ani s albuminem a celkovou bílkovinou ve sklivci.

Tabulka 6: OCT parametry pacientů s DME a kontrolní skupiny

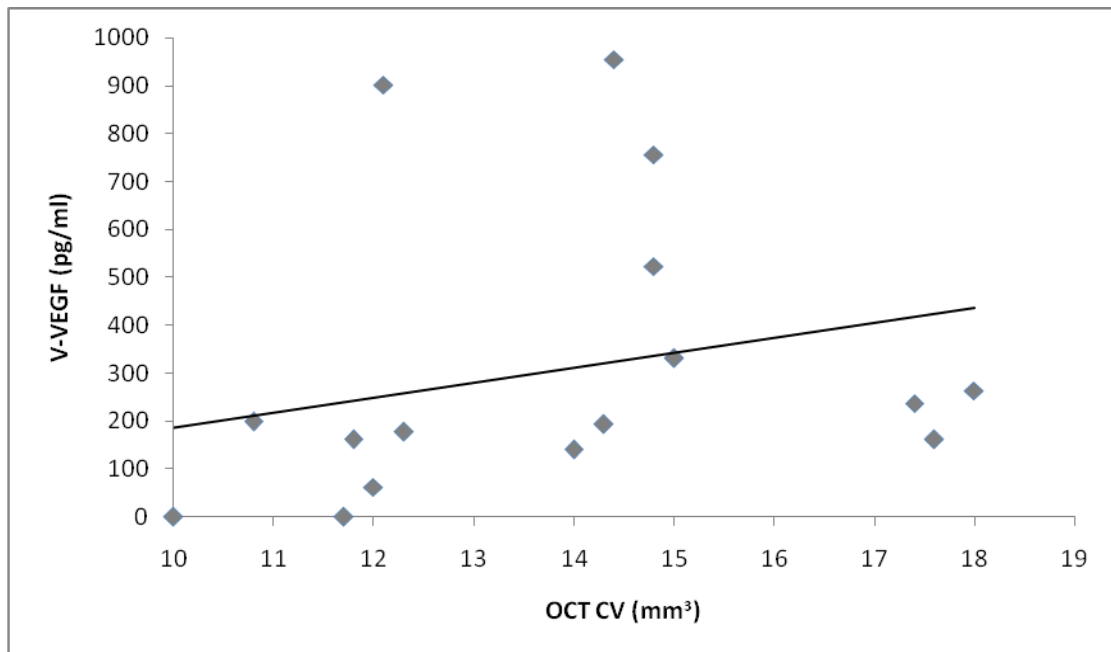
Parametr	DME (n=16)	kontroly (n=13)	p
CRT (μm)	479,0 (421,5 – 661,3)	498,0 (374,5 – 540,5)	ns
CAT (μml)	392,0 (329,8 – 414,3)	332,0 (316,0 – 346,5)	ns
CV (mm³)	14,2 (11,9 – 15,0)	12,0 (11,4 – 12,5)	ns
SRD	6 (37,5%)	0 (0%)	*

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

* $p < 0.05$ DME versus kontrolní pacienti

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

Obrázek 21: Grafická závislost koncentrace VEGF ve sklivci a CV hodnoty OCT u pacientů s DME



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

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

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

5 DISKUSE

V první části výzkumné práce jsem porovnávala sérové a sklivcové hladiny glukózy a kyseliny močové a korelovala výsledky se stupněm DR. Došla jsem k závěru, že intravitreální hladiny kyseliny močové a glukózy jsou signifikantně vyšší u pacientů s diabetem než u kontrolní skupiny. Dále jsem zjistila, že nejdůležitější determinantou zvyšující se koncentrace kyseliny močové a glukózy ve sklivci je stupeň diabetické retinopatie. Absolutní poměr obou molekul byl signifikantně vyšší u PDR ve srovnání s NPDR.

Druhá část byla zaměřena na porovnání morfologie centrální makulární oblasti vyšetřené OCT se sklivcovými a sérovými hodnotami VEGF, kyseliny močové, celkové bílkoviny a albuminu. Ve sklivci diabetiků jsme stanovili signifikantně vyšší koncentrace VEGF, kyseliny močové a celkového proteinu v porovnání s kontrolami. Naše závěry dále ukazují, že u pacientů s diabetickým makulárním edémem a NPDR koreluje intravitreální koncentrace kyseliny močové signifikantně s intravitreální koncentrací VEGF. Toto, společně se závěry první výzkumné části, podporuje naši hypotézu, že kyselina močová by mohla být jedním z faktorů podílejících se na patogenezi DR. Kromě toho jsme zjistili, že údaje o objemu makulární oblasti sítnice (CV) měřené pomocí Cirrus-HD-OCT u diabetiků signifikantně korelují s koncentrací VEGF ve sklivci.

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

Obě naše studie popisují koncentrace několika molekul ve sklivci a v séru u různých stupňů DR. Při hodnocení závěrů bychom měli zvážit především to, že zvýšená koncentrace určité biochemické látky ve sklivci nemusí být pouze přímým následkem její zvýšené difúze hemoretinální bariérou. Je nutné předpokládat také lokální

produkci, tak jak to bylo studiemí prokázáno například u VEGF (Pe'er J. et al., 1996, Abcouwer SF., 2013).

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

Hemoretinální bariéra je u DR a DME porušena. Její narušení je zprostředkováno zánětlivými mediátory, jakými jsou prostaglandiny, cytokiny a VEGF (Antcliff RJ, Marshall J., 1999, Antonetti DA. et al., 1999, Quam T. et al., 2001, Shin ES. et al, 2014). Pomocí sklivcové fluorometrie bylo prokázáno, že u pacientů s DR a DME je pasivní průnik molekul fluoresceinu přes HRB oproti kontrolám vyšší o faktor 12 (Sander B. et al., 2001). V případě kyseliny močové v první části naší studie to bylo o faktor 1,69. Pokud by se kyselina močová do sklivce u DR dostávala zvýšeným pasivním průnikem, mohlo by se jednat pouze o pasivní ukazatel rizika DR.

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

lokální produkce buňkami sítnice. S jistotou by bylo nutno tento předpoklad ale doložit dalšími studii, například se značenou kyselinou močovou.

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

V obou mých výzkumných částech byla průměrná koncentrace kyseliny močové v séru diabetiků signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny pacientů. V předchozích studiích byla sérová koncentrace kyseliny močové u DM popsána jako nižší (Ioachimescu AG. et al., 2007), stejná (Huang EJ. et al., 2006, Ioachimescu AG. et al., 2007) nebo vyšší (Ioachimescu AG. et al., 2007) v porovnání s nediabetickými kontrolami. Nicméně, při současné hladině HbA_{1c} pod 9%, byla hladina kyseliny močové signifikantně vyšší u DM (Ioachimescu AG. et al., 2007), stejně jako v našem případě.

Závěry první části výzkumu také ukazují, že pokročilé stupně DR korelovaly se zvýšenou hladinou glukózy ve sklivci. Ačkoli není mnoho studií, které by měřily hladinu glukózy ve sklivci, existuje nespočet studií, které dokazují, že vysoká hladina glukózy v séru je hlavním faktorem zapojeným do retinálních vaskulárních změn při progresi DR (např. Sheetz MJ., King GL., 2002, Ciulla TA. et al., 2003). Předpokládáme tedy, že mechanismus účinku glukózy přítomné ve sklivci bude v mnohém podobný těm, které jsou popsány při hyperglykémii, a že i glukóza přítomná ve sklivci se účastní na lokálních změnách sítnice při vzniku a progresi DR. Teorie, kterými hyperglykemie mění buněčné funkce a stimuluje expresi signálních molekul v patogenezi DR jsou následující: a) akcentace polyolové cesty, b) produkce

pokročilých produktů glykace neenzymatickou glykací proteinů, c) indukce oxidačního stresu, d) aktivace proteinkinasy C (Gardner TW. et al., 2002, Sheetz MJ., King GL., 2002, Ciulla TA. et al., 2003, Kowluru RA., Chan PS., 2007). Všemi těmito cestami může glukóza u DR přispívat k endoteliální dysfunkci a vést k následnému zvýšení permeability hematoretinální bariéry.

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

Pacienti s DM často trpí přidruženou arteriální hypertenzí, která koreluje s délkou trvání diabetu a vyššími hladinami HbA_{1c} (Aiello LP. et al., 2001). Epidemiologické studie jako WESDR (Klein R. et al., 1989), UKPDS (1998) nebo EURODIAB (Porta M. et al., 2001) nasvědčují, že systémová arteriální hypertenze urychluje progresi DR u DM 2. typu (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998) i 1. typu (Klein R. et al., 1989, Porta M. et al., 2001). V první části našeho výzkumu jsme zaznamenali přidruženou hypertenzi u 77.5% diabetiků a 75.0% kontrol. Vysoká prevalence hypertenze u kontrolní skupiny pacientů by mohla vysvětlovat to, že jsme nenašli signifikantní korelaci mezi změnami ve sklivci a přítomností hypertenze. V druhé části výzkumu byla hypertenze zastoupená dokonce u 88,2% pacientů a ani v tomto případě jsme nezaznamenali korelaci s biochemickými či OCT změnami.

Studie posledních let ukazují, že zvýšené hladiny VEGF v oku diabetiků způsobují konformační změny mezibuněčných „tight junctions“ endoteliálních buněk retinálních cév. Tímto mechanismem je VEGF zodpovědný za zvýšení cévní permeability a porušení hematoretinální bariéry u očí s DME (Antonetti DA. et al., 1999, Quam T. et al., 2001, Caldwell RB. et al., 2003, Abcouwer SF., 2013). Sklivcové hladiny VEGF korelují signifikantně se stupněm závažnosti DR (Quam T. et al., 2001, Zhang X. et al., 2014, Rahimi Z. et al., 2014). Někteří autoři pozorovali také signifikantní korelaci mezi

ztluštěním sítnice ve fovee měřenou na OCT a koncentracemi VEGF ve sklivci (Funatsu H. et al., 2006, Shimada H. et al., 2009) a komorové vodě (Javanmard SH. et al, 2012). Spojitost mezi sklivcovými koncentracemi VEGF a morfologií DME popsali Sonoda et al.; nenašli signifikantní korelaci mezi VEGF a cystoidním versus difúzním DME (Sonoda S. et al., 2014).

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

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

Studie, které by korelovaly sklivcové hladiny VEGF u DME s OCT parametry před zavedením anti-VEGF terapie prakticky neexistovaly. Až intervenčními studiemi bylo prokázáno, že anti-VEGF terapie vede u DME k redukci tloušťky sítnice (Massin P. et al. 2010, Mitchell P. et al, 2011) a vyšetření pomocí OCT začalo být považováno za možnou cestu, jak neinvazivně ve standardních klinických podmínkách posuzovat hladiny VEGF. Tyto empirické závěry však nejsou doloženy stanovováním hladiny VEGF před a po terapii a vycházejí pouze z klinického pozorování redukce DME po

anti-VEGF terapii. Například autoři Nguyen et al. publikovali práci, která hodnotí efekt anti-VEGF terapie za pomoci centrální tloušťky sítnice na OCT, i objemu makulární oblasti sítnice - CV (Nguyen QD. et al., 2006).

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

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

Význam druhé části studie je především v tom, že bylo použito současné stanovení intravitreálních biochemických parametrů a sítnicové morfologie pomocí OCT. Relativně malý počet vzorků (29 pacientů) zahrnutých do druhé části výzkumu mohl ovlivnit sílu statistických analýz. Malý počet pacientů byl následkem především ubývajícího počtu indikovaných vitrektomií pro DME, a tím ztíženou možností sběru sklivce od pacientů NPDR a DME. Ač se naše vitrektomie může zdát v době anti-VEGF preparátů jako “overtreatment”, jedná se stále o efektivní metodu, která vede ke stabilizaci sítnicové situace u DME s dlouho trvajícím účinkem (Kumagai K. et al., 2009).

Druhou studii jsme zaměřili na analýzu čtyř analytů (VEGF, kyselinu močovou, celkovou bílkovinu a albumin). Je možné, že vliv na morfologické změny na OCT u cystoidního DME mají i další molekuly. Při interpretování výsledků jsem se snažila nezapomenout na to, že naše zjištění představují korelaci hladin VEGF ve sklivci objemem makulární oblasti sítnice - CV, ale nedokazují přesný patogenetický mechanismus vzniku DME. Patogeneze DME je komplexní a dosud ne zcela objasněná. V budoucnu se chceme věnovat studiu sRAGE a jeho ligand, a dále studiu parametrů

oxidačního stresu a zánětu, které jsou spojovány s poruchou funkce endotelu a rozvojem mikro- a makrovaskulárních komplikací diabetu. Spojitost většiny z nich s diabetickou retinopatií však zatím popsána nebyla.

6 ZÁVĚR

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

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

1. Cílem mé práce bylo v rámci prospektivní studie stanovit sérové a sklivcové hladiny glukózy a kyseliny močové u pacientů s různým stupněm diabetické retinopatie a u nediabetických kontrol.

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

2. Dalším cílem bylo definovat případnou závislost koncentrací glukózy a kyseliny močové ve sklivci a séru na míře poškození sítnice a popsat dosud neprozkoumaný vztah kyseliny močové k diabetické retinopatii.

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

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

3. Dalším dílčím cílem bylo určit vzájemný vztah koncentrací kyseliny močové a VEGF ve sklivci a séru u diabetického makulárního edému.

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

4. Posledním cílem práce bylo hodnotit morfologické změny sítnice pacientů s makulárním edémem a pokročilou neproliferativní diabetickou retinopatií pomocí OCT a určit jejich závislost na sérových a sklivcových hladinách kyseliny močové a VEGF.

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

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

Poděkování

Děkuji školiteli prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc., MBA za vynikající odborné vedení v průběhu mého postgraduálního studia a při vypracování disertační práce. Konzultantce prof. MUDr. Martě Kalousové, PhD děkuji za cenné rady, odborné připomínky a podporu po celou dobu mého studia. Oba mi dodali odvahu začít ještě jednou a jsou pro mne velkým příkladem.

Dále děkuji doc. MUDr. Bohdaně Kalvodové, CSc., přednostce oční kliniky VFN a 1.LFUK v Praze a MUDr. Oldřichu Chrapkovi, PhD zástupci přednosta pro výuku oftalmologie oční kliniky LF UP a FN v Olomouci za sběr materiálu a cenné rady v oblasti chirurgické léčby diabetické retinopatie. Za technickou spolupráci dále děkuji statistikovi Mgr. Aleši Kuběnovi a laboratorním pracovnícím Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1.LFUK v Praze.

Rodině děkuji za trpělivost a podporu především v posledním roce studia.

První studie byla podpořena výzkumným záměrem MSMT 0021620807, druhá studie výzkumným záměrem DRO VFN64165, Prvok P25/LF1/2 and SVV 260032-2015, za tuto finanční podporu děkuji.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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

Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP et al. A Systematic Meta-Analysis of Genetic Association Studies for Diabetic Retinopathy. *Diabetes.* 2009, 58: 2137–2147.

Admis AP, Shimada DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina.* 2005, 25: 111–118.

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

Agardh CD, Agardh E, Torffvit O. The association between retinopathy, nephropathy, cardiovascular disease and long-term metabolic control in type 1 diabetes mellitus: a 5 year follow-up study of 442 adult patients in routine care. *Diabetes Res Clin Pract.* 1997, 35: 113-121.

Aiello LP, Bursell SE, Clermont A et al. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective β -isoform-selective inhibitor. *Diabetes.* 1997, 46: 1473–1480.

Aiello LP, Cahill MT, Wong JS. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2001, 132: 760-776.

Aiello LP, Clermont A, Arora V et al. Inhibition of PKC β by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2006, 47: 86–92.

Amano S, Yamagishi S, Inagaki Y et al. Pigment epithelium derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvasc Res.* 2005, 69: 45-55.

Ambati J, Chalam KV, Chawala DK et al. Elevated Gamma-aminobutylic acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1997, 115: 161-166.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. 2015, 38/ Supplement 1: S61-S65.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2014, 37/ Supplement: S81-S90.

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

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

Aroor AR, Mandavia CH, Sowers JR. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. *Heart Fail Clin.* 2012, 8: 609–617.

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

Bandello F, Lattanzio R, Zucchianti I et al. Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. *Acta Diabetiol.* 2013, 35: 556-564.

Barnett PA, Gonzalez RG, Chylack LT et al. The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes.* 1986, 35: 426-432.

Bhagat N, Grigorian R, Tutela A et al. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Surv Ophthalmol.* 2009, 54: 1-32.

Beltramo E, Buttiglieri S, Pomero F et al. A study of capillary pericyte viability on extracellular matrix produced by endothelial cells in high glucose. *Diabetologia*. 2003, 46: 409-415.

Boyer DS. The pathophysiology of macular edema. *Supplement to Retina Today*, 2011, 9: 4-11.

Boyer DS, Yoon YH, Belfort R et al. (Ozurdex MEAD Study Group) Three-Year, Randomized, Sham-Controlled Trial of Dexamethasone Intravitreal Implant in Patients with Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology*. 2014. 21: 1904-1914.

Brooks HL Jr., Caballero S, Newell CK et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone. *Archives of Ophthalmology*. 2004, 122: 1801–1807.

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

Chakrabarti S, Sima AAF, Nakajima T. Aldose reductase in the BB rat: isolation, immunological identification and localization in the retina and peripheral nerve. *Diabetologia*. 1987, 30: 244–251.

Chalam KV, Murthy RK, Brar V et al. Evaluation of a Novel, Non Contact, Automated Focal Laser with Integrated (NAVILAS) Fluorescein Angiography for Diabetic Macular Edema. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2012, 19: 158-162.

Chang YC, Wu WC. Dyslipidemia and diabetic retinopathy. *Rev Diabet Stud*. 2013, 10: 121-132.

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

Cheung AKH, Fung MKL, Lo ACY et al. Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes*. 2005, 54: 3119–3125.

Chew EY, Klein ML, Ferris FL 3rd et al Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol*. 1996, 114: 1079-1084.

Chew EY. Diabetic retinopathy and lipid abnormalities. *Curr Opin Ophthalmol* 1997, 8: 59-62.

Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD et al. ACCORD Eye Study group. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010, 363: 233-244.

Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S et al. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews*. 2007, 3: 3–14.

Chibber R, Ben-Mahmud BM, Coppini D et al. Activity of the glycosylating enzyme, core 2 GlcNAc (β 1,6) transferase, is higher in polymorphonuclear leukocytes from diabetic patients compared with age-matched control subjects: relevance to capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2000, 49: 1724–1730.

Chowdhury TA, Hopkins D, Dodson PM et al. The role of serum lipids in exudative diabetic maculopathy: is there a place for lipid lowering therapy?. *Eye*. 2002, 16: 689–693.

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

Clarke M, Dodson PM. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007, 21: 573–586.

Coscas G, Cunha-Vaz J, Loewenstein A et al. Macular edema: a practical approach. *Developments in Ophthalmology*. 2010, 47, S. Karger AG, Basel, Switzerland. ISBN 978-3-8055-9434-9.

Costa PZ, Soares R. Neovascularisation in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sci.* 2013, 92: 1037-1045.

Cui Y, Xu X, Bi H et al. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: The role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res.* 2006, 83: 807-816.

Cusick M, Chew EY, Ferris F et al. Effects of aldose reductase inhibitors and galactose withdrawal on fluorescein angiographic lesions in galactose-fed dogs. *Archives of Ophthalmology.* 2003, 121: 1745–1751.

Dagher Z, Park YS, Asnaghi V et al. Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2004, 53: 2404–2411.

Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res.* 2007, 55: 498–510.

Davis MD, Fisher MR, Gangnon RE et al. Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report 18. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998, 39: 233-252.

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

Della Sala S, Bertoni G, Somazzi L et al. Impaired contrast sensitivity in diabetic patients with and without retinopathy: a new technique for rapid assessment. *Br J Ophthalmol.* 1985, 69: 136 -142.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993, 329: 977-986.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. *Ophthalmology.* 1995, 102: 647-661.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Early worsening of diabetic retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Arch Ophthalmol*. 1998, 116: 874-886.

Diabetes Control and Complications Trial/ Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med*. 2000, 342: 381-389.

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

Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. (DRCR.net.) randomized trial comparing intravitreal triamcinolone acetonide and focal/grid photocoagulation for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2008, 115: 1447-9.

Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Rationale for the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network Treatment Protocol for Center-involved Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology*. 2011, 118: e5–e14.

Do DV, Wang X, Vedula SS et al. Blood pressure control for diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015, 31(1): CD006127. doi: 10.1002/14651858

Duh EJ, Yang HS, Suzuma I et al. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002, 43: 821-829.

Dusová J. Nové přístupy v léčbě makulárních edémů sítnice (Intravitreální aplikace triamcinolonu acetonidu). Hradec Králové, 2010. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Lékařská fakulta v Hradci Králové. Obor oční lékařství.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs – an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. *Ophthalmology*. 1991, 98: 786-806.

Early Treatment Diabetic retinopathy Study research group. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic retinopathy Study report number 1. Arch. Ophthalmol. 1985, 103: 1796-1806.

Eckardt KU. Erythropoietin and microvascular diabetic complications. Nephrology Dialysis Transplantation. 2009, 24: 388–390.

Estacio RO, McFarling E, Biggerstaff S et al. Overt albuminuria predicts diabetic retinopathy in Hispanics with NIDDM. Am J Kidney Dis. 1998, 31: 947-953.

Fercher A, Hitzenberger CK, Drexler W et al. In vivo Optical Coherence Tomography. Am J Ophthalmol. 1993, 116: 113-114.

Ferris FL. Early photocoagulation in patients with either type 1 or type 2 diabetes. Trans Am Ophthalmol Soc. 1996, 94: 505-537.

Ferris FL, Chew EY, Hoogwerf BJ. Serum lipids and diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Diabetes Care. 1996, 19: 1291-1293.

Fišer I. Diabetická retinopatie. In: Kuchynka P. a kol. Oční lékařství. Praha: Grada Publishing, 2007, 293-308.

Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y et al. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. British Journal of Ophthalmology. 2002, 86: 311–315.

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

Gabbay KH. The sorbitol Pathway and the complications of diabetes. The new England Journal of Medicine.1973, 288: 831-836.

Gabbay KH. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. Annual Review of Medicine. 1975, 26: 512-536.

García-Ramírez M, Canals F, Hernández C et al. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2007, 50: 1249-1303.

González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P et al. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003, 81: 1-44.

Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE et al. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy. *Journal of Ophthalmology*. 2014, 705783. doi: 10.1155/2014/705783

Grossin N, Wautier MP, Meas T et al. Severity of diabetic microvascular complications is associated with a low soluble RAGE level. *Diabetes Metab*. 2008, 34: 392-395.

Haaslacher C, Bostedt-Kiesel A, Kempe HP et al. Effect of metabolic factors and blood pressure on kidney function in proteinuric type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1993, 36: 1051-1056.

Hammes HP, Martin S, Federlin K et al. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991, 88: 11555–11558.

Hammes HP. Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J Diabetes Complications*. 2003, 17: 61-79.

Hammes HP. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm Metab Res*. 2005, 37: 39-43.

Hanas R, John G. On behalf of the International HbA_{1c} Consensus Statement on the Worldwide Standardisation of the Hemoglobin A1C. *Ann Clin Biochem* 2010, 47: 290-291.

Harris MI. Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care*. 1993, 16: 642–652.

Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW et al. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2005, 23: 234–240.

Haskins K, Bradley B, Powers K et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. *Anal of the New York Academy of Sciences*. 2003, 1005: 43-46.

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

Hernández C, García-Ramírez M, Colomé N et al. Identification of new pathogenic candidates for diabetic macular edema using fluorescence-based difference gel electrophoresis analysis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013, 29: 499-506.

Hohman TC, Nishimura C, Robison WG. Aldose reductase and polyol in cultured pericytes of human retinal capillaries. *Experimental Eye research*. 1989, 48: 55-60.

Hosoya K, Tachikawa M. Inner blood-retinal barrier transporters: Role of retinal drug delivery. *Prog Retin Eye Res*. 2009, 26: 2055-2065.

Hueber A, Wiedemann P, Esser P et al. Basic fibroblast growth factor mRNA, bFGF peptide and FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative disorders (PVR and PDR) *International Ophthalmology*. 1996, 20: 345–350.

Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension*. 1992, 20: 253-263.

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

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

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

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

Joussen AM, Poulaki V, Qin W et al. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *American Journal of Pathology*. 2002, 160: 501–509.

Joy SV, Scates AC, Bearely S et al. Ruboxistaurin, a protein kinase C β inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *Annals of Pharmacotherapy*. 2005, 39: 1693–1699.

Kaines A, Oliver S, Reddy S et al. Ultrawide angle angiography for the detection and management of diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin*. 2009, 49: 53-59.

Kaji Y, Usui T, Ishida S et al. Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007, 48: 858-865.

Kalousová M et al. *Patobiochemie ve schématech*. 1. vydání. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1522-8.

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

Kanski JJ, *Klinische Ophthalmologie Lehrbuch und Atlas*. 7. vydání. München: Elsevier Urban and Fischer, 2012. 581-599.

Karoli R, Fatima J, Shukla V et al. Predictors of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes who have normoalbuminuria. *Ann Med Health Sci Res*. 2013, 3: 536-540.

Kato N, Yashima S, Suzuki T et al. Long-term treatment with fidarestat suppresses the development of diabetic retinopathy in STZ-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2003, 17: 374–379.

Keech AC, Mitchell P, Summanen PA et al. (FIELD study investigators). Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007, 370 :1687-97.

Kinoshita JH. A thirty year journey in the polyol pathway. *Experimental Eye Research*. 1990, 50: 567-573.

Klein BE, Moss SE, Klein R, Surawicz TS. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, XIII: relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology*. 1991, 98: 1261-1265.

Klein BEK, Knudtson MD, Tsai MY et al. The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Archives of Ophthalmology*. 2009, 127: 1175–1182.

Klein R, Klein BE, Moss SE et al. Blood pressure and hypertension in diabetes. *Am J Epidemiol*. 1985, 112: 75-89.

Klein R et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IX The incidence of macular edema. *Ophthalmology* 1989, 96: 1501-1510.

Klein R, Moss SE, Klein BE. Is gross proteinuria a risk factor for the incidence of proliferative diabetic retinopathy? *Ophthalmology*. 1993, 100: 1140-1146.

Klein R, Klein BE, Moss SE et al. Ten-year incidence of gross proteinuria in people with diabetes. *Diabetes*. 1995, 44: 916-923.

Klein R, Klein BE, Lee KE et al. The incidence of hypertension in insulin-dependent diabetes. *Arch Intern Med*. 1996, 156: 662-667.

Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, XVII: the 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 1998, 105: 1801-1815.

Knels L, Worm M, Wendel M et al. Effects of advanced glycation end products-inductor glyoxal and hydrogen peroxide as oxidative stress factors on rat retinal organ cultures and neuroprotection by UK-14,304. *J Neurochem.* 2008, 106: 1876–1887.

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

Korobelnik JF, Do DV, Schmidt-Erfurth U et al. Intravitreal Aflibrecept for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2014, 121: 2247–2254.

Kotlarsky P, Bolotin A, Dorman K et al. Link between retinopathy and nephropathy caused by complications of diabetes mellitus type 2. *Int Ophthalmol* 2014 [Epub ahead of print] PMID: 25391917.

Kowluru RA. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetologica.* 2001,38: 179–185.

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

Koyta D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998, 47: 859–866.

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

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

Kumagai K, Furukawa M, Ogino N et al. Long-term follow-up of vitrectomy for diffuse nontractional diabetic macular edema. *Retina* 2009. 29: 464-472.

Kuo JZ, Wong TY, Rottler JI. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy. *JAMA Ophthalmol.* 2014, 132: 96-107.

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

Lasségue B, Clempus RE. Vascular NPD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *American Journal of Physiology*. 2003, 285: R277-R297.

Leal EC, Manivannan A, Hosoya K et al. Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007, 48: 5257–5265.

Lee SE, Ma W, Rattigan EM et al. Ultrastructural features of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic swine. *Ultrastructural Pathology*. 2010, 34: 35–41.

Leiter LA. The prevention of diabetic microvascular complications of diabetes: Is there a role for lipid lowering?. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005, 68: 3-14.

Lev-Ran A, Hwang DL, Miller JD et al. Excretion of epidermal growth factor (EGF) in diabetes. *Clinica Chimica Acta*. 1990, 192: 201–206.

Li W, Chan WS, Khatami M et al. Noncompetetive inhibition of myo-inositol transport in cultured bovine retinal capillary pericytes by glucose and reversal by sorbinil. *Biochimica et biophysica Acta*. 1986, 857: 198-208.

Li Q, Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Mueller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002, 43: 3109–3116.

Lightman S, Rechthand E, Terubayashi H et al. Permeability changes in blood-retinal barrier of galactosemic rats are prevented by aldose reductase inhibitors. *Diabetes*. 1987, 36: 1271–1275.

Lorenzi M, Gerhadinger C. Early celular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia*. 2001, 44: 791-804.

Lutty GA, Cao J, McLeod DS. Relationship of polymorphonuclear leukocytes to capillary dropout in the human diabetic choroid. *American Journal of Pathology*. 1997, 151: 707–714.

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

Mathiesen ER, Ronn B, Storm B et al. The natural course of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes: a 10 year prospective study. *Diabet Med*. 1995, 12: 482-287.

Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003, 4: 225–236.

Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ et al. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Archives of Ophthalmology*. 2004, 122-11: 1631-1640.

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

Melberg NS, Grand MG, Rup D. The impact of acute lymphatic leukemia on diabetic retinopathy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1995, 17: 81-84.

Meyer-Rüsenberg B, Pavlidis M, Stupp T et al. Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007, 245: 1009-1018.

Miljanovic B, Glynn RJ, Nathan DM et al. A prospective study of serum lipids and risk of diabetic macular edema in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53: 2883-2892.

Min SH, Lee TI, Chung YS et al. Transforming growth factor- α levels in human aqueous humor of glaucomatous, diabetic and uveitic eyes. *Korean Journal of Ophthalmology*. 2006, 20: 162–165.

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

Muqit MM, Marcellino GR, Henson DB et al. Optos-guided pattern scan laser (Pascal)-targeted retinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2013, 91: 251-258.

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

Nasrallah FP, Jahkh AE, Voncoppenrolle F et al. The role of the vitreous in diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 1988, 95: 1335-1339.

Ng DP. Human Genetics of Diabetic Retinopathy: Current Perspectives. *Journal of Ophthalmology.* 2010, doi 10.1155/2010/172593.

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

Oates PJ, Mylari BL. Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 1999, 8: 2095–2119.

Obrosova IG, Minchenko AG, Vasupuram R et al. Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes.* 2003, 52: 864–871.

Obšil T, Pavlíček Z. Glykace proteinů a fosfolipidů, Maillardova reakce in vivo. *Chem listy.* 1997, 91: 558-569.

Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T et al. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *American Journal of Ophthalmology.* 2002, 134: 348-353.

Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y et al. Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *FASEB J.* 2002, 16: 1928–1930.

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

Otani A, Takagi H, Suzuma K et al. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circulation Research*. 1998, 82: 619–628.

Otani A, Takagi H, Oh H et al. Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2000, 41: 1192–1199.

Ouchi M, West K, Crabb JW et al. Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema. *Exp Eye Res*. 2005, 81: 176-182.

Park CY, Park SE, Bae JC et al. Prevalence of and risk factors for diabetic retinopathy in Koreans with type II diabetes: baseline characteristics of Seoul Metropolitan City-Diabetes Prevention Program (SMC-DPP) participants. *Br J Ophthalmol*. 2012; 96: 151–155.

Patel JI, Hykin PG, Gregor ZJ et al. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*. 2005, 89: 480–483.

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

Pelikánová T, Šimková R, Tesař V et al. Effect of acute hyperglycaemia on selected plasma and urinary cytokine antagonists in Type 1 diabetes mellitus, *Diabetologia* 2003. 46: 470-474.

Pelikánová T, Patogeneze diabetické retinopatie. *Vnitřní lékařství*. 2007, 53: 498-505.

Pelikánová T, Bartoš V a kol. *Praktická diabetologie*. 5. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, 2012. ISBN: 978-80-7345-244.

Peppas M, Uribarri J, Vlassara H, Glucose Advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clinical Diabetes*. 2003, 21: 186–187.

Podesta F, Romeo G, Liu WH et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 2000, 156: 1025-1032.

Popov D. Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *International Journal of Diabetes Mellitus.* 2010, 2: 189–195.

Porta, M, Sjølie AK, Chaturvedi N et al. EURODIAB Prospective Complications Study Group. Risk factors for progression to proliferative diabetic retinopathy in the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia.* 2001, 44: 2203-2209.

Praidou A, Klangas I, Papakonstantinou E et al. Vitreous and serum levels of platelet-derived growth factor and their correlation in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Current Eye Research.* 2009, 34: 152–161.

Praidou A, Androudi S, Brazitikos P et al. Angiogenic growth factors and their inhibitors in diabetic retinopathy. *Current Diabetes Review.* 2010, 6: 304-312.

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

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

Raman R, Gupta A, Kolothungan V et al. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in subjects with suboptimal glycemic, blood pressure and lipid control. Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetic Study (SN-DREAMS, Report 33). *Curr Eye Res.* 2012, 37: 513-23.

Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J et al. A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2011, 52: 3784–3791.

- Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D et al. Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern Med.* 1998, 158: 998-1004.
- Reznicek L, Csherhati S, Seidensticker F et al. Functional and morphological changes in diabetic macular edema over the course of anti-vascular endothelial growth factor treatment. *Acta Ophthalmol.* 2013, 91: 529-536.
- Roy S, Lorenzi M. Early biosynthetic changes in the diabetic-like retinopathy of galactose-fed rats. *Diabetologia.* 1996, 39: 735–738.
- Sander B, Larsen M, Moldow B et al. Diabetic macular edema: passive and active transport of fluorescein through the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001, 42: 433-8.
- Scholl S, Kirchhof J, Augustin AJ. Pathophysiology of macular edema. *Ophthalmologica.* 2010, 224: 8-15.
- Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycaemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA.* 2002, 228: 2579-2588.
- Sheporo D, Morel NM. Pericyte Physiology. *FASEB J.* 1993, 7: 1031-1038.
- Shimada H, Akaza E, Yuzawa M, Kawashima M. Concentration gradient of vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009, 50: 2953-2955.
- Shin ES, Sorenson CM, Sheibani N. Diabetes and retinal Vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res.* 2014, 9: 362-373.
- Shorb SR. Anemia and diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1985, 100: 434-436.
- Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M et al: Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews* 2006, 2: 71-98.
- Simó R, Hernández C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: Hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia.* 2008, 51: 1574–1580.

Simonson DC. Etiology and prevalence of hypertension in diabetic patients. *Diabetes Care* 1988, 11-10: 812-827.

Singh A, Stewart JM. Pathophysiology of diabetic macular edema. *Int Ophthalmol Clin.* 2009, 49: 1-11.

Sobaci G, Ozge G, Erdurman C et al. Comparison of grid laser, intravitreal triamcinolone, and intravitreal bevacizumab in the treatment of diffuse diabetic macular edema. *Ophthalmologica.* 2012, 227: 95-99.

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

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

Sosna T, Švancarová R, Netuková M. Diabetická retinopatie – rizikové faktory, prevence a terapie. *Čes. a slov. Oftal.* 2010, 66: 195-203.

Sosna T et al. Oční komplikace diabetu. In: *Praktická diabetologie. 5. aktualizované vydání.* Praha: Maxdorf, 2012. ISBN: 978-80-7345-244.

Sosna T, Švancarová R, Netuková M et al. Současný pohled na diabetický makulární edém. *Česká a slovenská oftalmologie.* 2012, 68: 91-97.

Sowers JR, Whaley-Connell A, Hayden MR. The Role of Overweight and Obesity in the Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Med.* 2011, 1: 5-12.

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

Spranger J, Osterhoff M, Reimann M et al. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes.* 2001, 50: 2641-2645.

Suzuma I, Hata Y, Rook SL et al. Cyclic stretch and hypertension induce retinal VEGF-R2 (KDR) expression: Potential mechanisms for exacerbation of diabetic retinopathy by hypertension. *Diabetes*. 2001, 50: 444-454.

Szwergold BS, Kappler F, Brown TR. Identification of fructose 3-Phosphate in the lens of diabetic rats. *Science*. 1990, 247: 451-454.

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

Štípek S et al. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1.vyd. Praha: Grada, 2000. 320s. ISBN 80-7169-704-4.

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*. 2005, 109: 227-241.

Takamura Y, Tomomatsu T, Kubo E et al. Role of the polyol pathway in high glucose-induced apoptosis of retinal pericytes and proliferation of endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008, 49: 3216-3223.

Tarr JM et al. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2013, doi:10.1155/2013/343560.

Terasaki H, Hirose H, Miyake Y. S-cone pathway sensitivity in diabetes measured with threshold versus intensity curves on flashed backgrounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996, 37: 680-684.

Thomas M, Tsalamandris C, MacIsaac R et al. Anemia in diabetes: an emerging complication of microvascular disease. *Curr Diabetes Rev*. 2005, 1: 107-26.

Tombran-Think J. PEDF in angiogenic eye diseases. *Curr Mol Med*. 2010, 10: 267-78.

UZIS. Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, č. 2, Praha 3.2.2015.

UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998, 352: 837-853.

UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ*. 1998, 317: 703-713.

UK Prospective Diabetes Study Group. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2. diabetes (UKPDS 39). *BMJ*. 1998, 317: 713-720.

Valešová L, Hycl J. Diabetická retinopatie. 1. vydání. Praha: Triton, 2002. ISBN80-7254-230-3.

van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn study. *Diabetologia*. 2005, 48: 1300–1306.

Wang AL, Yu AC, He QH et al. AGEs mediated expression and secretion of TNF alpha in rat retinal microglia. *Exp Eye Res*. 2007, 84: 905–913.

Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006, 27: 317–323.

Wang X, Wang G, Wang Y. Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1a in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2009, 148: 883–889.

White NH, Cleary PA, Dahms W et al. Beneficial effects of intensive therapy of diabetes during adolescence: Outcomes after the conclusion of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *The Journal of Pediatrics*. 2001, 139–6: 8004-8012.

Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2006, 38: 752–765.

Wilkinson-Berka JL, Wraight C, Werther G. The role of growth hormone, insulin-like growth factor and somatostatin in diabetic retinopathy. *Current Medicinal Chemistry*. 2006, 13: 3307–3317.

Witmer MT, Kiss S. The Clinical Utility of Ultra-Wide-Field Imaging A look at four widely available methods of imaging the peripheral retina that are making photography more clinically practical. *Review of Ophthalmology*. 2012, (http://www.reviewofophthalmology.com/content/d/retinal_insider/c/32799/).

Yamagishi S, Nakamura K, Matusi T et al. Pigment epithelium derived factor inhibits advanced glycation end product-induced retinal vascular hyperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem*. 2006, 281: 20213-20.

Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*. 2012, 35: 556-564.

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

Yonekura H et al. Roles of advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J. Pharmacol Sci*. 2005, 97: 305-311.

Yoshida Y, Yamagishi S, Matusi T et al. Positive correlation of pigment epithelium-derived factor and total antioxidant capacity in aqueous humour of patients with uveitis and proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2007, 91: 1133–1134.

Zander E, Heinke P, Herfurth S et al. Relations between diabetic retinopathy and cardiovascular neuropathy: a cross-sectional study in IDDM and NIDDM patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1997, 105: 319-326.

Zechmeister-Koss I, Huic M. Vascular endothelial growth factor inhibitors (anti-VEGF) in the management of diabetic macular oedema: a systematic review. *Br J Ophthalmol*. 2012, 96: 167-178.

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

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

Zheng HY, Green WR, Tso MO. Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2008, 126: 227-232.

Zheng L, Du Y, Miller C et al. Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologie*. 2007, 50: 1987-1996.

Zhu CH, Zhang SS, Kong Y et al. Effects of intensive control of blood glucose and blood pressure on microvascular complications in patients with type II diabetes mellitus. *Int J Ophthalmol*. 2013, 6: 141-145.

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

Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reports*. 2011, 11: 244–252.