

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

Doktorský studijní program

**Vnitřní nemoci**

## **Reoferéza**

-

klinický význam reologických, technických a dalších hemaferetických ukazatelů  
účinnosti, nežádoucí účinky a ekonomika

## **Rheohemapheresis**

-

Clinical Importance of Rheological, Technical and Further Hemapheretic  
Indicators of Effectivity, Side-effects and Economy

**MUDr. Miriam Lánská**

Školitel: prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.

Hradec Králové, 2018

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení**

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

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

Hradec Králové 2018

podpis autora:.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Milanovi Bláhovi, CSc., vynikajícímu odborníkovi, zakladateli aferetických metod v České republice, za zasvěcení do problematiky aferéz, za cenné rady i za podporu během celého postgraduálního studia.

Dále bych chtěla poděkovat doc. MUDr. Pavlu Žákovi, Ph.D. za podporu výzkumných aktivit na našem pracovišti a za pomoc při přípravě disertační práce.

Za cenné rady při zpracování literatury a při úpravě textu děkuji Mgr. Rohrové a Mgr. Pavlové. Moje poděkování patří Ing. Kvasničkovvi za pomoc se statistickým zpracováním dat.

V neposlední řadě děkuji i své rodině za podporu a trpělivost.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b>	<b>11</b>
1.1	HISTORICKÉ POZNÁMKY	11
1.2	ZÁKLADNÍ PRINCIPY REOLOGIE	12
1.2.1	<i>Vývoj reologie</i>	13
1.2.2	<i>Fyzikální zákony - uplatnění v reologii</i>	13
1.2.3	<i>Další principy průtoku krve orgány</i>	15
1.2.4	<i>Význam viskozity pro průtok kapalin</i>	17
1.2.5	<i>Měření viskozity</i>	18
1.2.6	<i>Klíčové faktory krevního průtoku</i>	19
<b>2</b>	<b>KLINICKÉ MOŽNOSTI HEMOREOTERAPIE</b>	<b>21</b>
2.1	HEMODILUCE	21
2.2	INFUZNÍ TERAPIE	22
2.3	HEMAFERETICKÉ (AFERETICKÉ) PROCEDURY	22
2.3.1	<i>Rozvoj metodik aferézy</i>	23
2.3.2	<i>Přehled metodik extrakorporální hemoreoterapie</i>	23
<b>3</b>	<b>REOFERÉZA</b>	<b>26</b>
3.1	NÁZVOSLOVÍ	26
3.2	PRINCIP REOFERÉZY	26
3.3	INDIKACE K REOFERÉZE	27
3.3.1	<i>Období rozvoje léčebných metod</i>	27
3.3.2	<i>Výsledky medicíny založené na důkazech – racionální reoterapie</i>	28
3.4	VĚKEM PODMÍNĚNÁ MAKULÁRNÍ DEGENERACE SÍTNICE	31
3.4.1	<i>Charakteristika onemocnění VPMD</i>	31
3.4.2	<i>Léčebné možnosti u VPMD</i>	32
3.4.3	<i>Výsledky léčby VPMD pomocí reoferézy</i>	33
3.5	NÁHLÁ IDIOPATICKÁ ZTRÁTA SLUCHU	35
3.5.1	<i>Charakteristika onemocnění SISHL</i>	35
3.5.2	<i>Léčebné možnosti SISHL</i>	36
3.5.3	<i>Výsledky léčby SISHL pomocí reoferézy</i>	37
3.6	LÉČEBNÉ SCHÉMA REOFERÉZY	38
3.6.1	<i>Léčebné schéma reoferézy při léčbě VPMD</i>	39

3.6.2	<i>Léčebné schéma reoferézy při léčbě SISHL</i>	40
3.7	NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY REOFERÉZY	40
<b>4</b>	<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b>	<b>43</b>
4.1	PRIMÁRNÍ CÍLE A ZAMĚŘENÍ VÝZKUMU	43
4.1.1	<i>Vlastní modifikace metodiky reoferézy a její optimalizace</i>	43
4.1.2	<i>Efektivita procedur - ukazatele účinnosti reoferézy</i>	43
4.1.3	<i>Predikce úspěšnosti terapie</i>	43
4.1.4	<i>Bezpečnost reoferézy</i>	43
4.1.5	<i>Ekonomická stránka provozu</i>	44
4.2	SEKUNDÁRNÍ CÍLE	44
4.2.1	<i>Klinická účinnost reoferéz</i>	44
4.3	PRACOVNÍ HYPOTÉZY	44
<b>5</b>	<b>SOUBOR NEMOCNÝCH, METODY, STATISTICKÁ ANALÝZA</b>	<b>45</b>
5.1	SOUBOR NEMOCNÝCH	45
5.1.1	<i>Soubor nemocných s VPMD</i>	46
5.1.2	<i>Soubor nemocných se SISHL</i>	48
5.2	PROCEDURA REOFERÉZY	50
5.2.1	<i>Vlastní modifikace procedury</i>	50
5.2.2	<i>Klinické sledování během reoferézy, nežádoucí účinky</i>	54
5.3	LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ	54
5.3.1	<i>Schéma laboratorních kontrol</i>	55
5.3.2	<i>Základní laboratorní parametry</i>	55
5.3.3	<i>Reologicky účinné parametry</i>	56
5.4	SPECIALIZOVANÁ VYŠETŘENÍ	56
5.4.1	<i>Oftalmologická vyšetření</i>	56
5.4.2	<i>Otorinolaryngologická vyšetření</i>	57
5.4.3	<i>Léčba metodou MicroWick</i>	58
5.4.4	<i>Speciální vyšetření</i>	58
5.5	STATISTICKÁ HODNOCENÍ	59
<b>6</b>	<b>VLASTNÍ VÝSLEDKY</b>	<b>59</b>
6.1	SOUBOR NEMOCNÝCH S VPMD	60
6.1.1	<i>Procedura reoferézy – VPMD</i>	60

6.1.2	<i>Hodnocení výskytu nežádoucích reakcí - VPMD</i> .....	61
6.1.3	<i>Klinická účinnost léčby VPMD</i> .....	62
6.1.4	<i>Změny laboratorních ukazatelů u nemocných s VPMD</i> .....	72
6.1.5	<i>Predikce úspěšnosti při léčbě VPMD</i> .....	79
6.2	SOUBOR NEMOCNÝCH SE SISHL .....	84
6.2.1	<i>Procedura reoferézy – SISHL</i> .....	84
6.2.2	<i>Hodnocení výskytu nežádoucích reakcí - SISHL</i> .....	85
6.2.3	<i>Klinická účinnost léčby SISHL</i> .....	88
6.2.4	<i>Změny laboratorních ukazatelů u nemocných se SISHL</i> .....	91
6.2.5	<i>Predikce úspěšnosti při léčbě SISHL</i> .....	97
6.3	EKONOMICKÁ PROBLEMATIKA LÉČBY REOFERÉZOU .....	99
<b>7</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>100</b>
7.1	POZNÁMKA K VÝVOJI PROBLEMATIKY VE SVĚTĚ A U NÁS .....	101
7.2	HODNOCENÍ LÉČBY VPMD REOFERÉZOU .....	103
7.2.1	<i>Možnosti predikce úspěšné léčby VPMD</i> .....	106
7.2.2	<i>Kritické připomínky k léčbě VPMD reoferézou</i> .....	107
7.2.3	<i>Souhrn k léčbě VPMD reoferézou</i> .....	111
7.3	HODNOCENÍ LÉČBY SISHL REOFERÉZOU .....	111
7.3.1	<i>Možnosti predikce úspěšné léčby SISHL</i> .....	113
7.3.2	<i>Kritické připomínky k léčbě SISHL reoferézou</i> .....	113
7.3.3	<i>Souhrn k léčbě SISHL</i> .....	114
7.4	NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY LÉČBY REOFERÉZOU – ZHODNOCENÍ .....	114
7.5	ZHODNOCENÍ EKONOMICKÉ PROBLEMATIKY LÉČBY .....	115
<b>8</b>	<b>DALŠÍ SMĚR VÝZKUMU</b> .....	<b>116</b>
8.1	AKTUÁLNÍ PROBLÉMY U VPMD .....	116
8.1.1	<i>Účinek reoferézy u VPMD v čase</i> .....	117
8.1.2	<i>Význam změn aktivity komplementu u VPMD</i> .....	117
8.1.3	<i>PCSK9 při léčbě VPMD reoferézou</i> .....	118
8.2	AKTUÁLNÍ PROBLÉMY SISHL .....	119
8.2.1	<i>Náhlá jednostranná vestibulopatie</i> .....	120
<b>9</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>122</b>
9.1	VLASTNÍ MODIFIKACE METODIKY REOFERÉZY A JEJÍ OPTIMALIZACE .....	122

9.2	EFEKTIVITA PROCEDUR - UKAZATELE ÚČINNOSTI REOFERÉZY.....	122
9.3	PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI TERAPIE.....	123
9.4	BEZPEČNOST REOFERÉZY .....	123
9.5	EKONOMICKÁ STRÁNKA PROVOZU .....	123
9.6	KLINICKÁ ÚČINNOST REOFERÉZ .....	123
9.7	DALŠÍ MĚR VÝZKUMU .....	123
9.8	HODNOCENÍ PRACOVNÍCH HYPOTÉZ .....	124
<b>10</b>	<b>PODPORA PRÁCE - PODĚKOVÁNÍ .....</b>	<b>124</b>
<b>11</b>	<b>PŘÍLOHA 1 .....</b>	<b>125</b>
<b>12</b>	<b>SEZNAM ILUSTRACÍ.....</b>	<b>126</b>
12.1	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	126
12.2	SEZNAM SCHÉMAT.....	126
12.3	SEZNAM TABULEK.....	126
12.4	SEZNAM GRAFŮ .....	127
<b>13</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>128</b>



## POUŽITÉ ZKRATKY

<b>a.</b>	Arterie
<b>ACD-A</b>	Antikoagulační roztok (Anticoagulant citrate dextrose A)
<b>ACE</b>	Angiotension - konvertující enzym
<b>ADP</b>	Adenosindifosfát
<b>APTT</b>	Aktivovanýparciální tromboplastinový čas
<b>ASFA</b>	American Society for Apheresis
<b>AUVP</b>	Náhlá jednostranná vestibulopatie (aute unilateral vestibulopathy)
<b>BCVA</b>	Best corrected visual aquity – nejlépe korigovaná zraková ostrost
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>CFH</b>	Složka H systému komplementu
<b>CTCAE</b>	Common Termlogy Criteria for Adverse Events; mezinárodní terminologická kritéria pro nežádoucí příhody (CTCAE v. 4.03/2009)
<b>CNV</b>	Choroidální neovaskularizace
<b>DLI</b>	Infuze dárcovských lymfocytů
<b>DPED</b>	Drúzové odchlípení pigmentového epitelu
<b>EE</b>	Extrakorporální eliminace
<b>ERG</b>	Elektroretinografie
<b>ETDRS</b>	Early TreatmentDiabeticRetinopathy Study Group
<b>FN</b>	Fakultní nemocnice
<b>F 1/1</b>	Fyziologický roztok
<b>GAUK</b>	Grantová agentura Univerzity Karlovy
<b>H.E.L.P.</b>	Heparin InducedExtracorporeal LDL Precipitation - heparinem indukovaná extrakorporální eliminace cholesterolu
<b>HDL</b>	High density cholesterol
<b>hsCRP</b>	Hypersenzitivní C-reaktivní protein
<b>HK</b>	Hradec Králové
<b>IGA MZ ČR</b>	Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví České Republiky
<b>IgG</b>	Imunoglobulin třídy G
<b>IgM</b>	Imunoglobuliny třídy M
<b>IL-10</b>	Interleukin 10
<b>IQR</b>	Interkvartilové rozpětí (25.-75. percentil)
<b>ISFA</b>	International Society for Apheresis
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein

<b>LF UK</b>	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
<b>NO</b>	Oxid dusnatý
<b>MCP-1</b>	Monocytární chemotaktický protein
<b>mfERG</b>	Multifokální elektroretinografie
<b>[NONVIDI]</b>	Citováno dle jiného autora
<b>NKZO</b>	Nejlépe korigovaná zraková ostrost
<b>OL</b>	Oko levé
<b>OP</b>	Oko pravé
<b>OCT</b>	Optická kohorentní tomografie
<b>ORL</b>	Otorinolaryngologie
<b>PT</b>	Protrombinový čas
<b>PCSK-9</b>	Proprotein konvertáza subtilisin/kexin 9
<b>RPE</b>	Retinální pigmentový epitel
<b>sAPO-FAS</b>	Solubilní marker apoptotické aktivity
<b>SD</b>	Směrodatná odchylka průměru
<b>SISHL</b>	Náhlá idiopatgická ztráta sluchu (Sudden idiopathic sensorineural hearing loss)
<b>TPV</b>	Celkový objem plazmy nemocného (total plasma volume)
<b>USA</b>	Spojené státy americké
<b>v.</b>	Véna
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein
<b>VPMD</b>	Věkem podmíněná makulární degenerace
<b>vWF</b>	von Willerandův faktor
<b>WAA</b>	World apheresis association
<b>ZULP</b>	Zvlášť účtovaný léčivý přípravek

# 1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

## 1.1 HISTORICKÉ POZNÁMKY

Před zjištěním buněčné struktury živých organismů medicínské teorie vycházely zpravidla z konceptu existence a důležitosti správného průtoku tělesných tekutin (latinsky humor). Východiskem pro tuto teorii byla řecká filozofie. Za zakladatele humorální teorie je považován Hippokratés (460 př. n. l.- 377 př. n. l.). Podle této teorie lidské tělo obsahuje čtyři tekutiny – šťávy, které jsou v rovnováze (řecky syncrasia) - sanquis (krev), cholé (žlutá žluč), melancholé (černá žluč) a flegma (hlen). Nerovnováha (řecky dyscrasia) těchto tekutin vedla podle humorální teorie ke vzniku nemocí a léčba byla založena na opětovném ustanovení rovnováhy. K diagnostice nemocí používali starověcí lékaři vzhled krve. Melancholé byla nejspodnější část sražené krve, cholé bylo oddělující se sérum, sanquis reprezentovaly erytrocyty. Flegma byla vrchní část melancholé, tloušťka této vrstvy určovala závažnost onemocnění. (Poznámka: v době, kdy se u nás ještě vyšetřovala sedimentace bez přístrojové metody (do 80. let minulého století), tj. ve svislé trubičce metodou dle Wintrobeho, mohla laborantka odečíst ze šedožluté vrstvy nad erytrocyty v sedimentační trubičce poměrně přesně počet leukocytů a bezpečně hlásila nově zachycenou leukémii. 1 mm stupnice v trubičce odpovídal asi  $10 \times 10^6$ /ml leukocytů). Dnes víme, že flegma je ve skutečnosti „buffy coat“ zahrnující leukocyty, trombocyty a polymerizovaný fibrinogen (Baskurt and Meiselman 2003).

Standardní procedurou, jak ovlivnit rovnováhu mezi tekutinami, byla flebotomie – mystikou opředené pouštění žilou. Lékaři si všimli, že složení krve se v některých situacích mění, např. při zánětu, a že flebotomie dokáže znovu nastolit potřebný krevní průtok. Je pozoruhodné, že tato pozorování byla provedena ještě před objevem krevní cirkulace Williamem Harveyem (1578-1657) (Schultz 2002). Z nedostatku znalostí ovšem bylo pouštění žilou pro některé nemocné osudným zákrokem – podle Waldenströma (Waldenstrom 1980) takto například pravděpodobně zemřel po zákroku francouzský král Ludvík XIII. (citováno dle: Blaha et al. 1984). Newton (1642-1727) nejspíše jako první popsal reologické vlastnosti tekutin a představil termín viskozita (Borberg et al. 2001a).

Boerhaave (1668-1738) jako první doložil, že i v medicíně se uplatňují zákony fyziky, jeho mikroskopické pozorování vedlo k lepšímu pochopení krevního proudění (Hull 1997). V polovině 19. století Poiseuille (1797-1869) významně přispěl k pochopení fyziologie a mechaniky tekutin pozorováním průtoku tekutin skleněnou kapilárou, Poiseuilleův zákon pro tubulární proudění je dosud uznávaný a využíván (Borberg et al. 2001a).

Na konci 19. století se začala rozvíjet buněčná teorie. To mělo význam i z hlediska hemaferézy, a to popíráním významu funkčních změn, tedy např. hemodiluce jako léčebné metody. Průkopníkem buněčné teorie byl Rudolf Virchow (1821-1902), který zavedl nový koncept nauky o nemoci založený na strukturálních a funkčních změnách buněk, což sledoval mikroskopicky na vzorcích fixovaných tkání (Hull 1997). Vliv Virchowovy buněčné patologie byl na rozvoj moderní medicíny 20. století enormní, téměř každá nemoc byla vysvětlována mikroskopickými změnami buněk. I když byla velice pozitivně hodnocena lékařskou komunitou, tehdy platná buněčná teorie selhávala v pochopení dynamických změn v živém organismu. I přes tento statický pohled na původ nemocí se dostala buněčná teorie v první polovině 20. století do popředí zájmu a současně zájem o humorální teorie opadl, dokonce nejstarší léčebná metoda s prokázaným účinkem u mnoha nemocných - hemodiluce - byla eliminována z lékařské praxe (Baskurt and Meiselman 2003).

Teprve Robin Fahraeus (1888-1968), skandinávský patolog, se začal věnovat vlastnostem krevního průtoku (reologii) a vysvětlil humorální teorii o významu dynamických změn živých organismů na podkladě tehdy moderních vědeckých poznatků. Roku 1931 publikoval svou slavnou práci (Fahraeus 1931), jejíž závěry později vešly ve známost jako tzv. Fahraeus-Lindqvistův efekt (v cévách o průměru 0,3 cm a méně dochází k vytváření vrstvy podél stěn, kde relativní viskozita klesá s průměrem cévy) (Toksvang and Berg 2013). Proslavil se i objevem další metody – krevní sedimentace, když si všiml vyšší sedimentace krve u těhotné, což publikoval v roce 1928. Prvenství patří ale Polákovi dr. E. Biernackimu (publikoval svou práci r. 1897) – vše podrobněji popsali Grzybowski a Sak (Grzybowski and Sak 2011). Výsledky práce R. Fahraeuse se však rozšířily v pozdějších letech 20. století a test, který popsal a Westergren doplnil o techniku sedimentace v trubici (Matteson and Crowson 2011), zůstává rutinní laboratorní metodou dodnes - sedimentace krve, FW – Fahraeus-Westergrenův test.

V posledních dekádách se studium dynamických změn krevního průtoku reologických vlastností krve stalo předmětem zájmu, vzniklo nové odvětví nazývané reologie krve (blood rheology) (Bláha et al. 2008b; Toksvang and Berg 2013).

## 1.2 ZÁKLADNÍ PRINCIPY REOLOGIE

Reologie je vědní obor zabývající se studiem vnitřní reakce látek (pevných i tekutých) na působení vnějších sil, jejich deformovatelností (definováno jako „relativní přemístění materiálních bodů uvnitř těla“) a průtokovými vlastnostmi (Baskurt and Meiselman 2003; Copley 1973).

### 1.2.1 VÝVOJ REOLOGIE

Název reologie zavedli v roce 1920 M. Reiner, který se zabýval mechanikou, a E.C.Bingham, který se specializoval na koloidní chemii (Copley et al. 1942). Název odvodili z výroku Herakleita „Panta Rhei“, což lze přeložit jako „vše plyne, všechno je v pohybu“.

Termín „viskozita krve“ použil poprvé Burton-Opitz (Burton-Opitz 1900) již v roce 1900 (citováno dle: Borberg et al. 2001a).

Termín „hemorheologie“ (reologie krve – blood rheology) zavedl v roce 1948 Copley (Copley 1949), který používal také termíny jako „vessel-blood organ“ (citováno dle: Borberg and Tauchert 2006). Z lékařské reologie se postupně stal vědní obor studující krevní fluiditu a aplikující výsledky tohoto výzkumu do klinické praxe u patologických poruch, hlavně v oblasti mikrocirkulace (Bláha et al. 2008a). Reologické mechanismy a souvislosti byly popsány Hakenem v roce 1969 a našly široké uplatnění v mnoha vědních odvětvích (ve fyzice, biologii, počítačové technice, sociologii, ekonomii i teorii věd), v roce 1990 je Schmid-Schönbein (Schmid-Schönbein 1990) aplikoval na pohyb krve v mikrocirkulaci. (citováno dle: Borberg et al. 2001a).

### 1.2.2 FYZIKÁLNÍ ZÁKONY - UPLATNĚNÍ V REOLOGII

V krevní reologii a tkáňové perfuzi se uplatňují zejména tyto zákony: Newtonovy zákony, Hagen-Poiseuilleův zákon, Kirchhoffův zákon, Ohmův zákon, Bernoulliho rovnice, Fahreus-Lindquistův efekt, Starlingův zákon (Bláha et al. 2008b).

Newtonův zákon viskozity stanovuje chování newtonských tekutin co do vazkosti. Viskozita je vlastnost pohybujících se součástí tekutiny vznikající kolizí jednotlivých sousedních součástí tekutiny při jejich pohybu o nestejně rychlosti. Jde o vztah mezi třecím či tečným napětím (shearing stress) a rychlostí deformace tekutin; podle Newtonova zákona jdeo přímou úměrnost mezi třecím napětím (měřeno jako síla na plochu =  $N/m^2$ ) a dynamickou viskozitou. Na výsledku se dále podílí přímo úměrně rychlost průtoku a nepřímo úměrně vzdálenost jednotlivých vrstev tekutiny (viz vzorec v tabulce 1) (Nečas 2006).

Hagen-Poiseuilleův zákon vysvětluje zákonitosti laminárního průtoku. Objemový (prů)tok (tj. objem tekutiny, který proteče za jednotku času) viskózní tekutiny při laminárním proudění trubici kruhového průřezu je přímo úměrný tlakovému spádu ( $\Delta_p/\Delta_l$  – viz tabulka 1) a čtvrté mocnině poloměru trubice a je nepřímo úměrný dynamické viskozitě  $\eta$  (Badeer 2001).

Kirchhoffův zákon určuje pravidla pro větvení toku. Proud se rozdělí na jednotlivé větve v obráceném poměru k odporu v průtoku. Rezistence (odpor) závisí přímo na viskozitě, délce cévy a nepřímo na čtvrté mocnině poloměru (Kittnar et al. 2011).

Ohmův zákon klasicky známý jako vztah mezi elektrickým napětím, proudem a odporem, je adaptabilní pro průtok trubicí a má vztah k reologii (Borberg and Tauchert 2006). Určuje, že mohutnost průtoku je přímo úměrná tlakovému spádu a nepřímo úměrná odporu působícímu proti průtoku.

Bernoulliho rovnice vyjadřuje zákon o zachování mechanické energie. Bernoulli prokázal, že při proudění kapaliny trubicí je objemový průtok všude stejný, tj. v užším místě je menší tlak a větší rychlost a naopak (Badeer 2001). Tlak proudící kapaliny tedy klesá rostoucí rychlostí. Může vzniknout stav podobný kapalinové (vodní) vývěvě – pokud tekutina proudí dostatečnou rychlostí, tlak se v tom místě podle Poiseuilleova zákona natolik zmenší, že dojde k odsávání; jev se nazývá také hydrodynamický paradox (Badeer 2001). Jeho obdoba je známá v klinice – při stenóze aorty může dojít k období tohoto efektu, pokud jde o tlak v koronárním ústí, a vznikne synkopa.

Fahraeus a Lindquist prokázali, že v tenké kapiláře při průtoku tekutiny klesá hematokrit s klesajícím průměrem kapiláry, což se jeví nejvíce při průměru kapiláry 0,5 mm – tento průměr odpovídá arteriolám. Dále zjistili, že hematokrit v kapiláře je menší nežli v rezervoáru (rezervoár by mohl být porovnáván k větším cévám). Vyjádřeno matematicky: relativní hematokrit v trubici je definován jako poměr hematokritu v trubici a v zásobním rezervoáru (viz tabulka 1). Vše je vysvětlitelné tím, že třecí síly na stěně arteriol působí zpomalení toku a dále hromadění erytrocytů axiálně, kde je menší odpor a rychlejší tok. Tyto reologické zákonitosti mají praktické klinické dopady – je tím umožněn dostatečný průtok arteriolami. Odhaduje se, že tlak je poloviční, nežli by byl nutný ke stejnému průtoku bez existence Fahraeus-Lindqvistova efektu (Toksvang and Berg 2013).

Starlingův zákon o pohybu tělních tekutin přes kapilární stěnu vyjadřuje závislost mezi gradientem hydrostatického tlaku a gradientem onkotickým. Jde o rovnováhu mezi hydrostatickým tlakem v kapilárách a v intersticiu a onkotickým tlakem tamtéž. Čím vyšší je tlak v kapiláře a menší je osmotický tlak, tím více tekutiny proniká přes stěnu kapilár do okolí a naopak (Nečas 2006).

TABULKA 1: FYZIKÁLNÍ ZÁKONY VÝZNAMNÉ PRO LÉKAŘSKOU REOLOGII

Poř.	Název zákona	Matematická formule	Legenda
1	Newtonův zákon viskozity	$\tau = \mu \, dc / dy$	$\tau$ = smykové napětí (shearing stress, $N/m^2$ ) $\mu$ = dynamická viskozita ( $N/m^2$ ) $dc$ = jednotka rychlosti průtoku (m/s) $dy$ = jednotka vzdálenosti mezi vrstvami (m)
2	Hagen-Poiseuilleův zákon		$Q_v$ = průtok = objem tekutiny proteklý za jednotku času (l/min) $\tau$ = průměr trubice (m) $\eta$ = dynamická viskozita ( $N/m^2$ ) $\Delta_p$ = tlak (Pa) $\Delta_l$ = délka trubice (m)
3	Kirchhoffův zákon o větvení toku	$Q_v = \Delta_p / R$	$Q_v$ = průtok (l/min) $\Delta_p$ = tlak (Pa) $R$ = rezistence ( proud se rozdělí na jednotlivé větve v obráceném poměru k odporu v průtoku)
4	Ohmův zákon	$I = E/R$ ( $V = \Delta_p / R$ )	$I$ = proud (objem), $V$ = mohutnost průtoku $E$ = napětí (tlakový spád) $\Delta_p$ = tlakový spád $R$ = odpor (cévní rezistence) $R$ = odpor proti průtoku
5	Bernoulliova rovnice	$E_k + E_p = \text{konst.}$	$E_k$ = energie kinetická $E_p$ = energie tlaková
6	Fahraeus-Lindqvistův efekt	$Hr = k \frac{Ht \text{ v trubici}}{Ht \text{ v reservoáru}}$	$H_r$ = hematokrit relativní $Ht$ = hematokrit $k$ = konstanta
7	Starlingův zákon	$J_v = K_f ([P_c - P_i] - \sigma [\Pi_c - \Pi_i])$	$J_v$ = výsledný pohyb tekutin $K_f$ = filtrační koeficient $P_c$ = hydrostatický tlak v kapiláře $P_i$ = osmotický tlak v kapiláře $\sigma$ = koeficient reflexe $\Pi_c$ = onkotický tlak v kapiláře $\Pi_i$ = onkotický tlak v intersticiu

Legenda: Poř.= pořadí; popis viz text.

### 1.2.3 DALŠÍ PRINCIPY PRŮTOKU KRVE ORGÁNY

Průtok krve je determinován silou srdečního stahu a periferní rezistencí, důležitá je také elasticita velkých tepen a viskozita krve. Krev protéká vždy po tlakovém spádu. V perfuzi orgánů hraje klíčovou roli průtok krve za minutu, který je určen tepovou frekvencí a silou srdečního svalu, ale také periferním odporem daným především změnami průsvitu cév.

Na tonus svaloviny cév působí podněty místní, nervové i humorální; významný je také vliv vazomotorického centra umístěného v prodloužené míše (Kittnar et al. 2011; Nečas 2006).

**Lze sumarizovat**, že optimální průtok krve ovlivňují tyto faktory (Ganong 2005):

a) Tlak, přesněji tlakový gradient mezi dvěma body trubice (tepny). Se stoupajícím tlakovým rozdílem stoupá rychlost krevního proudu.

b) Rychlost krevního proudu, která je nepřímo úměrná průřezu tepny v místě měření. Průměrná rychlost je největší v aortě, nejmenší v systému kapilár, jejichž celkový průřez je 1000krát větší než v aortě.

c) Charakter proudu. Za optimálních podmínek je proud laminární. Krevní elementy postupují souběžně, ale různou rychlostí, která je minimální při stěnách tepny, maximální ve středu trubice. Při určité rychlosti se mění v proud turbulentní. Tento vztah vyjadřuje Reynoldsovo číslo, čím vyšší číslo je, tím je vyšší tendence k turbulenci. (Poznámka: Pokud je Reynoldsovo číslo menší nežli 200, je průtok krve cévou laminární, pak začínají turbulence, a pokud je větší nežli 1000, je vždy průtok turbulentní). Reynoldsovo číslo je úměrné průměru cévy, rychlosti proudění a hustotě tekutiny ( $v$   $\text{kg/m}^3$ ), neúměrné k dynamické viskozitě, podle vzorce:  $Re = r \cdot v \cdot \rho / \eta$  (kde  $Re$  = Reynoldsovo číslo,  $r$  = poloměr cévy v m,  $v$  = rychlost proudění v m/s,  $\rho$  = specifická hmotnost krve v  $\text{kg/m}^3$  a  $\eta$  = viskozita v kg/m.s) (Badeer 2001).

d) Průsvit tepny: průtok se mění přímo úměrně se čtvrtou mocninou průměru (odpor se mění nepřímo úměrně) - uplatnění Hagen-Poiseuilleova zákona. Proto i malé změny průsvitu tepny mají vliv na krevní průtok.

e) Pružnost stěny cévy – zde se uplatňuje elasticita stěny cév. Podle Laplaceova zákona je napětí ve stěně cévy úměrné tlaku uvnitř cévy, poloměru cévy a nepřímo úměrné tloušťce stěny.

f) Kvalita povrchu tepny, která hraje roli zejména v patologických procesech. Zde hraje důležitou roli smykové (tečné) napětí (shear stress), které vyjadřuje tření mezi jednotlivými vrstvami proudící tekutiny (krve), ale také tření mezi tekutinou a stěnou trubice. Je nepochybné, že hladká stěna tepny je pro hodnotu smykového napětí optimální.

g) Reologické vlastnosti krve: do značné míry ovlivňují krevní proudění, a to zejména v tepnách menšího průsvitu (Baskurt and Meiselman 2003; Ganong 2005).



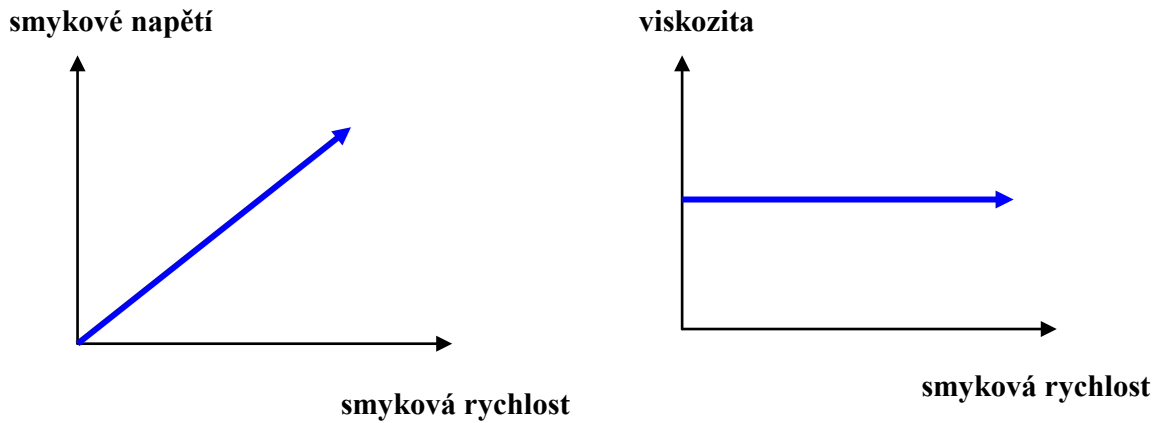
#### 1.2.4 VÝZNAM VISKOZITY PRO PRŮTOK KAPALIN

Viskozita je definována jako odpor kapaliny kladený síle, která se jí snaží rozpohybovat (Kittnar et al. 2011). Dynamická (absolutní) viskozita je tangenciální síla (v Newtonech) na jednotku plochy (v  $\text{m}^2$ ), kterou je nutno vynaložit, aby se vrstva kapaliny pohnula oproti druhé o jednotku rychlosti (v  $\text{m/s}$ ). Kinematická viskozita je poměr dynamické viskozity a hustoty kapaliny (v  $\text{kg/m}^3$ ).

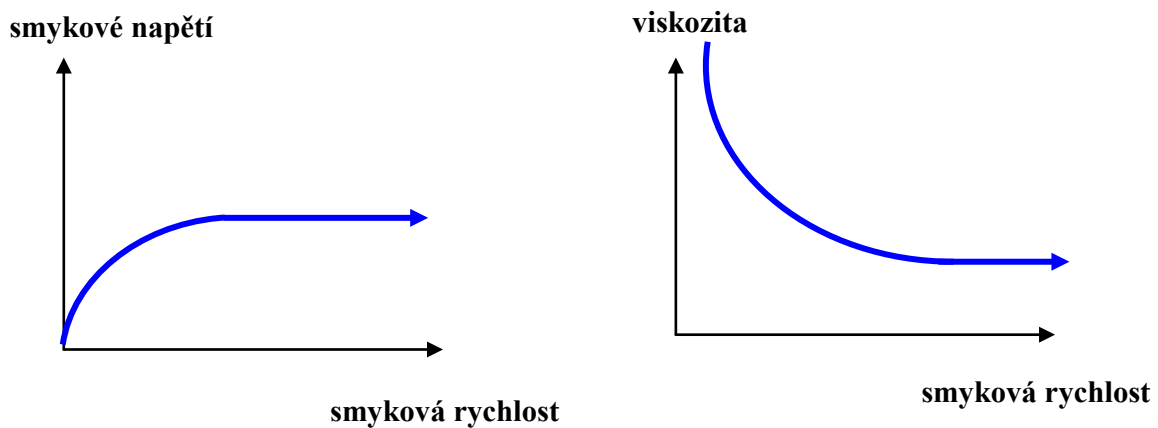
Při pohybu tekutiny trubicí vzniká smykové napětí. V ideální kapalině neexistuje smykové napětí. Pro skutečnou kapalinu to platí pouze v případě, že se kapalina nepohybuje. Pokud kapalina proudí, jsou její molekuly v relativním pohybu, dvě sousední vrstvy mají rozdílnou rychlost, na jejich rozhraní se tvoří tření, které vede ke vzniku smykového stresu (napětí). Příčinou tohoto jevu je viskozita kapaliny. Při laminárním proudění jsou jednotlivé proudnice rovnoběžné, nedochází k promíchání vrstev. Smykové napětí je v tomto případě přímo úměrné dynamické viskozitě a gradientu rychlosti (Newtonův zákon viskozity). Kapaliny, kde platí tyto zákonitosti, se nazývají *newtonské kapaliny*. U těchto kapalin je viskozita nezávislá na změnách smykové rychlosti nebo smykovém stresu. Kapaliny, u kterých neplatí výše popsané pravidlo, nazýváme *ne-newtonské*, zde viskozita není konstantní, ale je závislá na velikosti smykového stresu nebo smykové rychlosti (Baskurt and Meiselman 2003). Viskozita ne-newtonské kapaliny se může zvyšovat nebo snižovat v závislosti na nárůstu smykové rychlosti. Krev je považována za ne-newtonskou kapalinu, z fyzikálního pohledu se jedná o emulzi krevních buněk a plazmy (Borberg and Tauchert 2006). Základní charakteristiky tekutin jsou znázorněny v grafu 1.

GRAF 1: VZTAHY MEZI SILOVÝMI KOMPONENTAMI V NEWTONSKÝCH A NE-NEWTONSKÝCH TEKUTINÁCH. (ÚPRAVENO DLE: BASKURT AND MEISELMAN 2003).

a) newtonské tekutiny



b) ne-newtonské tekutiny



Legenda: popis – viz text.

### 1.2.5 MĚŘENÍ VIZKOZITY

Správné měření viskozity má zásadní význam, je jedním z rozhodujících faktorů při léčbě reoferézou. Příznivé ovlivnění viskozity je významným ukazatelem poměrů v mikrocirkulaci, jak bylo ukázáno i výše.

V posledních desetiletích došlo k technickému pokroku, který umožnil přesné měření viskozity jak látek se stálou viskozitou, tak i s viskozitou proměnnou (tzv. ne-newtonovských kapalin). Původní kapilární viskozimetry byly založeny na principu měření rychlosti průtoku měřené kapaliny trubicí a následném výpočtu viskozity dle Hagen-Poiseuilleovy rovnice.

*Tělískové viskozimetry* jsou založeny na měření průchodu tělesa (např. kuličky) kapilárou naplněnou měřenou kapalinou a využívají Stokesova zákona (rychlost sedimentace částice je nepřímo úměrná viskozitě kapaliny i průměru částice). Na odlišném principu jsou založeny *rotační viskozimetry*. Jestliže otáčíme nějakým tělesem v tekutině, klade tekutina proti otáčení odpor. Ze známé geometrie otáčeného tělesa a kladeného odporu lze vypočítat viskozitu dané kapaliny. Rotujícím tělesem může být plochá destička oproti další stojící (párové destičky), rotující válec v nádobě, anebo naopak nádoba rotuje apod. Moderní viskozimetry využívají *piezoelektrického jevu* u krystalů a hodí se i k měření za vysokých teplot nebo tlaků.

Jako jednotka dynamické viskozity se používá nejčastěji jeden mPa.s, což je viskozita vody při teplotě 20 °C. Jako jednotka kinematické viskozity se používá cS (centi-Stokes) – měřeno v mm<sup>2</sup>/sec. Kinematická viskozita vody při 20 °C je 1.

### 1.2.6 KLÍČOVÉ FAKTORY KREVNÍHO PRŮTOKU

Perfuze orgánů je závislá na krevním průtoku, jehož hlavními determinantami jsou (Otto 2010):

- stav cév,
- reologické charakteristiky krve.

U mladých jedinců s normoelastickou stěnou cév jsou funkce cév rozhodujícím faktorem pro krevní průtok a orgánovou perfuzi. Se stoupajícím věkem klesá elasticita cév, tím relativně roste vliv reologických podmínek na výslednou perfuzi. Reologie krve hraje ve velkých artériích a prekapilárních arteriolách pouze relativně méně významnou roli, její význam výrazně stoupá v síti kapilár v mikrocirkulaci a v postkapilárních cévách (Borberg et al. 2001b).

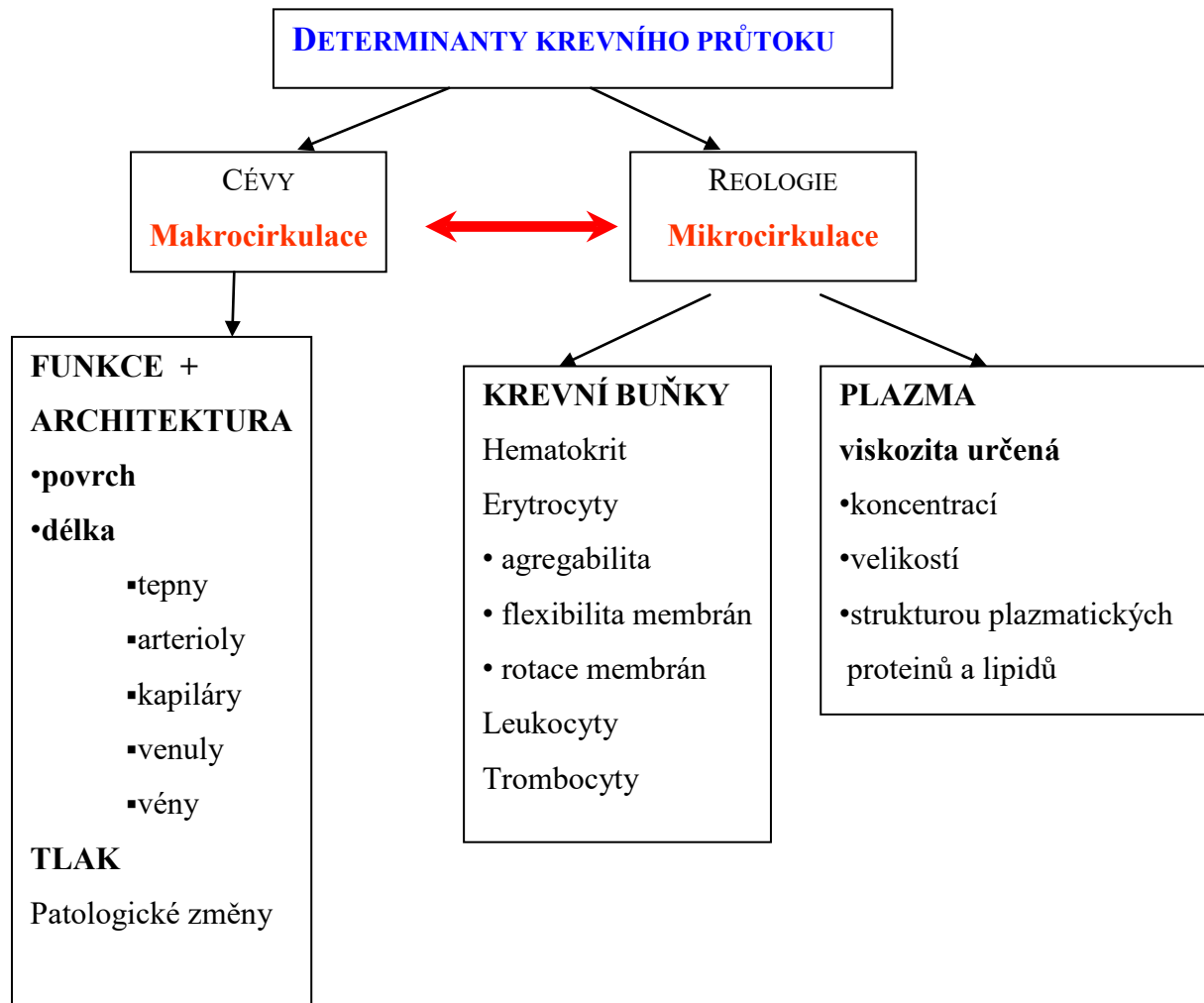
Hlavní proměnné cévního systému regulující orgánovou perfuzi jsou kontrakční funkce cév, architektura cévní stěny, struktura a funkce endotelu, krevní tlak a patologické změny ve stěně cév (Badeer 2001; Nečas 2006).

Reologie krve úzce souvisí s viskozitou plné krve, která je charakterizována krevními buňkami a plazmou (Borberg and Tauchert 2006).

Na základě literárních znalostí jsou hlavní faktory rozhodující o krevním průtoku sestaveny do schématu 1.

Uplatnění reologických faktorů v patologii chorob i význam reologických vlastností krve jsou v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu (Blaha et al. 2015a; Blythe et al. 2015; Cahn et al. 2015; Causin et al. 2015; Goyal et al. 2015; Lemonne et al. 2015).

SCHÉMA 1: DETERMINANTY KREVNIHO PRŮTOKU



Legenda: popis viz text.

### 1.2.6.1 Krevní buňky a jejich vliv na reologii krve

Viskozitu krve může ovlivnit zvýšený počet erytrocytů, výrazně zvýšený počet leukocytů, eventuálně trombocytů. Strukturální změny erytrocytů – vedoucí k změnám agregace, flexibility, schopnosti rotace membrán - patří také ke klíčovým reologickým faktorům (Borberg and Tauchert 2006; Cahn et al. 2015; Causin et al. 2015).

### 1.2.6.2 Plazma

Plazma je newtonská kapalina, jejímiž hlavními komponentami jsou proteiny. Jejich velikost, struktura a teplota determinují fluiditu (reciproční hodnota viskozity), viskozitu, a tím reologické vlastnosti krve. Viskozita plazmy je závislá na jejím obsahu – zejména na vysokomolekulárních proteinech, např. lipoproteinech. Předpokládá se, že interakce molekul hraje důležitou roli v reologii krve: proteiny adherující k endotelu kapilár a jejich interakce s erytrocyty mohou ovlivnit kvalitu i kvantitu kapilárního průtoku (Reinhart et al. 1993). VLDL cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, IgM,  $\alpha_2$ -makroglobulin a fibrinogen jsou proteiny s pravděpodobně největším vlivem na viskozitu plazmy (Klingel et al. 2000). Naopak, albumin, který se vyskytuje v plazmě ve vysokých koncentracích, má na viskozitu krve ve srovnání s fibrinogenem pouze limitovaný efekt. Kryoglobuliny zvyšují viskozitu krve zejména při nízkých teplotách (Gorevic 2012).

### 1.2.6.3 Mikrocirkulace

Reologie krve je úzce spjata s mikrocirkulací (mikrocirkulačním prostředím), a to nejenom z pohledu fyziologických i patofyziologických procesů, ale i léčebných možností. Při analýze mikrocirkulace musíme brát v úvahu hemodynamické parametry jako je krevní průtok a tlakový gradient (viz výše), ale také funkční úlohu celé kapilární sítě jako „mikrocirkulačního níché“ nebo podle Copleye - „vessel-blood organ“ (Copley 1949). Funkční úloha mikrocirkulace znamená zejména: výměnu kyslíku, oxidu uhličitého, živin a metabolitů přes kapilární stěnu do okolních tkání a obráceně. K významným změnám v mikrocirkulaci může docházet na podkladě změn kteréhokoliv výše uvedeného parametru (Ostergaard et al. 2015).

## 2 KLINICKÉ MOŽNOSTI HEMOREOTERAPIE

Na podkladě výše uvedených patofyziologických skutečností z oblasti lékařské reologie vyplynulo jejich praktické využití k léčbě. K ovlivnění reologických vlastností krve lze použít 3 hlavní léčebné modalities: hemodiluci, infuzní terapii a aferetické metody (Otto 2010).

### 2.1 HEMODILUCE

Hemodiluce je definována jako zředění krve zvýšením objemu tekutiny v cévách s následným poklesem hematokritu; vzniká v důsledku zadržetí většího množství vody v těle, např. v těhotenství nebo při velkém zvětšení sleziny (Dormandy et al. 1981). Léčebně lze

hemodiluci využít – provádí se odběrem plné krve s cílem snížení hematokritu na léčebně optimální hodnoty (40-42 %) (Borberg et al. 2001b), a tím k ovlivnění reologických podmínek. Metoda je však limitovaná zejména nebezpečím rychlého poklesu hematokritu pod bezpečnou hranici. Při rychlém poklesu hematokritu může dojít k ischemickým projevům. V literatuře lze najít několik studií využívajících tuto terapii v léčbě okluze centrální retinální žíly (Glacet-Bernard et al. 2001; Wiek et al. 1990; Wolf et al. 1994), výsledky léčby jsou ale kontroverzní. Hemodiluce vedla k poklesu některých laboratorních, pro reologii významných parametrů, ale nevedla většinou k ovlivnění viskozity plazmy. V některých studiích vedla ke zlepšení zrakové ostrosti nemocných (Placet-Bernard et al. 2001). Podle metaanalýz nevedla hemodiluce k dlouhodobému efektu (Donati et al. 2009), léčebné protokoly byly velice nejednotné a výsledky nebyly potvrzeny multicentrickou studií (Mohamed et al. 2007).

Hemodiluci lze dosáhnout i erythrocytaferézou, kdy jsou na separátorech krevních tělísek selektivně odstraněny pouze erytrocyty. Tato metoda je rychlejší a lépe tolerována než předchozí techniky, což bylo potvrzeno i na našem pracovišti (Paráková et al. 2001; Rehacek et al. 2012). V roce 2011 byly publikovány výsledky multicentrické randomizované kontrolované studie u okluze centrální retinální žíly. Diluce se jevila efektivní u nemocných v časných fázích onemocnění, dále u nemocných bez závažnějších kardiovaskulárních onemocnění (Glacet-Bernard et al. 2011). Limitující pro tuto metodu je vstupní hodnota hematokritu, která by měla být nad 42 % (Borberg et al. 2001b). Efekt hemodiluce je krátkodobý, laboratorní změny již nejsou detekovatelné za 24 hod. od procedury (Fuchs et al. 1990; Widder et al. 1996). U okluze arteria centralis retinae je efekt ještě menší, výsledek hemodiluce nebyl lepší nežli léčba placebem (Schrag et al. 2015).

## 2.2 INFUZNÍ TERAPIE

Efekt infuzní terapie je pouze přechodný, několik hodin trvajících. Infuzní terapie je podobně jako hemodiluce limitovaná u nemocných s onemocněním srdce, plic nebo ledvin (Otto 2010). Tato metoda nenašla významné uplatnění v reoterapii. Zkušenosti našeho pracoviště jsou souhlasné (Blaha et al. 2002).

## 2.3 HEMAFERETICKÉ (AFERETICKÉ) PROCEDURY

Hemaferéza byla definována jako selektivní odběr součástí krve (Blaha 2003; Bláha et al. 2008b). Je to metoda extrakorporální separace krve a jejích součástí pomocí filtrů nebo separátorů krevních tělísek s cílem účinně odstranit buňky, plazmu nebo plazmatické patogeneticky nevhodné komponenty. Pomocí hemaferézy se také získává plazma nebo

krevní buňky k léčebným účelům - např. kmenové buňky krvetvorby k transplantaci (Gasova et al. 2010; Gasova et al. 2005; Lysak et al. 2011; Lysak et al. 2005), mononukleární buňky k fotoferéze (Gasova et al. 2007; Perotti and Sniecinski 2015), k přípravě DLI, vakcín (Chang and Huang 2015), trombocytárních koncentrátů anebo plazmy k výrobě řady léčebných produktů (Kaplan 2013).

### **2.3.1 ROZVOJ METODIK AFERÉZY**

K rozvoji přístrojů k extrakorporální hemaferéze - krevních separátorů došlo v šedesátých letech minulého století, kdy pokrok techniky umožnil separaci krevních elementů od plazmy v klinicky účinných množstvích. První separátory byly vyvinuty k separaci granulocytů v National Cancer Institute dr. E. Freireichem (Freireich et al. 1965). V sedmdesátých letech minulého století přineslo další zdokonalení přístrojů účinnější separaci plazmy, a to přispělo k rozvoji plazmaferetických procedur a výměna plazmy (plasma exchange) se ukázala účinnou pro řadu onemocnění (Blaha et al. 1984; Solomon et al. 1978).

Plazmaferéza je nespecifická metoda, která vede k odstranění celé plazmy, a tím faktorů patogeneticky nepříznivých, ale i substancí potřebných; snaha vedla k rozvoji dalších, dokonalejších metod. Posun v technologii znamenal zejména objev sekundární diferenční separace plazmy, což přispělo k rozvoji specifických, semiselektivních nebo selektivních metod, jako je adsorpce, filtrace nebo precipitace (Borberg and Tauchert 2006; Schuff-Werner et al. 1989; Widder et al. 1996).

Hlavní ideou těchto separačních technik byla více či méně specifická eliminace patologických substancí, reologické aspekty nebyly zprvu diskutovány. Agishi první demonstroval vliv diferenční separace plazmy na průtok periferní cirkulací (Agishi et al. 1980; Mineshima et al. 1984), Schuff-Werner využil metodu precipitace v rámci hemoreoterapie (Schuff-Werner et al. 1989).

Současné separátory krevních tělísek k oddělení plazmy využívají jako základní princip filtraci nebo centrifugaci. Centrifugační separátory pracují na principu odlišné specifické hmotnosti jednotlivých složek krve. Při centrifugaci se soustředí erytrocyty při obvodu rotujícího centrifugačního prstence, směrem ke středu se nacházejí leukocyty, trombocyty a v centru pak plazma. Jednotlivé vrstvy lze odsávat. Přístroje pracují buď intermitentním, nebo kontinuálním způsobem. Na rozdíl od filtrace se mohou centrifugační separátory využít k odběru jednotlivých buněčných elementů (Blaha 2003).

### **2.3.2 PŘEHLED METODIK EXTRAKORPORÁLNÍ HEMOREOTERAPIE**

Jak již bylo zmíněno, viskozita krve je jedním z určujících faktorů krevního průtoku mikrocirkulací, proto byla vyvíjena snaha najít způsob ovlivnění viskozity výhodným posměněním složení plazmy. Na tomto principu je založena výměnná plazmaferéza u hyperviskózního syndromu, který vzniká např. při výrazném zmožení paraproteinu zejména u Waldenströmovymakroglobulinémie nebo mnohočetného myelomu. Ovlivnění reologie (snížení viskozity), tj. reologická terapie, byla jako hlavní cíl použita poprvé právě při léčbě syndromu hyperviskozity (Widder et al. 1996). V tomto případě jde sice o plazmaferézu, která je nespecifická, ale je záchrannou metodou léčby při hyperviskózní krizi dodnes. Obdobným způsobem se využívá leukocytaferéza, a to při výrazné leukocytóze u akutní nebo chronické leukémie, a ovlivnění reologie je jedním z důležitých cílů i zde.

**Lze shrnout,** že v současné době lze k léčebnému ovlivnění reologie využít tyto metody extrakorporální hemoreoterapie:

a) **Výměnná plazmaferéza** (plasma exchange) – je historicky první aferetická metoda, která se využívala v reoterapii (viz výše), ale vzhledem k tomu, že není selektivní, dále vzhledem k nutnosti substituce odebrané plazmy albuminem nebo dárcovskou plazmou (což nese riziko infekčních a alergických příhod), což je i ekonomicky náročné, se nyní preferují dokonalejší technologie (Baskurt and Meiselman 2003; Borberg and Tauchert 2006).

b) **Cílená („selektivní“) adsorpce** – je založena na vychytávání látek (molekul) selektivně se snahou cíleně odstranit pokud možno jen patogeneticky účinnou substanci. Při tom je zpravidla prokazatelný i benefit v oblasti reologických poměrů. Tak byl odzkoušen např. tryptofan polyvinylalkoholový adsorbér, pracující na principu hydrofóbní interakční chromatografie (k zachycení protilátek ve třídě IgG u makulopatie) (Widder et al. 1998). K odstranění fibrinogenu byl použit filtr s pentapeptidem, jenž váže specificky fibrinogen, čímž dojde ke snížení viskozity, a jde tedy o reoterapii (Ullrich et al. 2004). K odstranění LDL-cholesterolu se při familiální hypercholesterolémii používají adsorbéry, které příznivě ovlivní i reologické poměry (Borberg et al. 2001b; Lánská et al. 2014; Widder et al. 1999).

c) **Heparinem indukovaná precipitace LDL cholesterolu** (Heparin Induced Extracorporeal LDL Precipitation- H.E.L.P.) byla původně vyvinuta pro eliminaci cholesterolu. Principem je elektrostatická interakce mezi heparinem a apolipoproteinem B100 při sníženém pH. Precipitát je následně odstraněn filtrací (Borberg et al. 2001b). Shuff-Werner et al. prokázali vliv této metody na hemoreologii – dochází k precipitaci fibrinogenu a jeho poklesu 43-61 %. Nedochozí ale k signifikantním změnám celkové



bílkoviny,

$\alpha_2$ -makroglobulinu ani IgM (Schuff-Werner et al. 2012; Schuff-Werner et al. 1989).

d) **Dvojitá (kaskádová) filtrace** je kombinací primární a sekundární separace plazmy s použitím dvou rozdílných filtrů (Agishi et al. 1980; Solomon et al. 1978). Při této technice plazma získaná filtrací prvním (primárním) filtrem prochází sekundárním filtrem, který eliminuje podle velikosti pórů předem definované spektrum molekul; obvykle jde o odstranění vysokomolekulárních proteinů. Z této metodiky vycházela i metodika Borbergaz Deutsche Hämapheresis Zentrum (DHZ) v Kolíně nad Rýnem, kde ale byla primární separace nahrazena separací centrifugační. Ve 2. kroku plazma procházela filtrem (Brunner et al. 2000). Výhodou centrifugace použité v prvním kroku je podle autorů vyšší separační účinnost plazmy, menší aktivace komplementu, minimalizace rizika hemolýzy (Borberg et al. 2001b). Další výhody kaskádové filtrace jsou založené na efektivním odstranění vysokomolekulárních látek, okamžitým účinku i relativně dlouhotrvajícím efektem, jak zdokumentovala stejná skupina později pomocí laboratorních měření (Widder et al. 1996). Z modifikace metodiky autorů z DHZ jsme vycházeli i na našem pracovišti, viz dále.

Bylo zjištěno, že čím specifitější je aferetická procedura, tím více klesá reologická efektivita (Klingel et al. 2000). Viz tabulka 2.

TABULKA 2: MOŽNOSTI HEMOREOTERAPIE (MODIFIKOVÁNO PODLE: KLINGEL, ET AL. 2000)

	Reologická efektivita			Specifita	
	PE	Reoferéza	HELP	DSA, DALI	Specifická IA
$\alpha$ 2-makroglobulin	+	+			
Fibrinogen	+	+	+		+ <sub>nebo</sub>
LDL cholesterol	+	+	+	+	+ <sub>nebo</sub>
IgM	+	+			+

(+ > 60% snížení)

Legenda: PE = plazmaferéza; H.E.L.P. = heparinem indukovaná precipitace LDL cholesterolu; DSA = dextransulfátová adsorpce; DALI = Direct Adsorption of Low-Density Lipoprotein; IA = imunoadsorpce; IgM = imunoglobulin M.

### 3 REOFERÉZA

V literatuře často nacházíme několik odlišných názvů pro jednotlivé aferetické metody.

#### 3.1 NÁZVOSLOVÍ

Membránová diferenční filtrace je synonymem pro dvojitou, nebo-li kaskádovou filtraci plazmy čili filtrační plazmaferézu. Plazma prochází dvěma filtry. Prof. Borberg zavedl pojem „rheohemapheresis“ pro svoji metodu kombinace centrifugace a následné filtrace plazmy přes filtr (Borberg et al. 2001b). Plazma je primárně získávána ne filtrem, ale centrifugací separátorem krevních tělísek. Teprve pak dochází k jejímu průchodu cílovým filtrem. Z tohoto hlediska je správné používat nadále pojem kaskádová metoda, ale nejde již o dvojí filtraci. Na našem pracovišti používáme Borbergovu metodu, pro naši modifikaci kaskádové filtrace používáme pojem reoferéza nebo reohemaferéza (Lánská et al. 2014).

#### 3.2 PRINCIP REOFERÉZY

Reoferéza je modifikace membránové diferenční filtrace plazmy, kdy se používá speciální sekundární plazmatický filtr s relativně malými otvory nazývaný někdy reofiltr, který z protékající plazmy eliminuje exaktně definované spektrum proteinů s vysokou

molekulární hmotností (nad 150 000 Daltonů). Jedná se zejména o: fibrinogen,  $\alpha_2$ -makroglobulin, imunoglobulin M, LDL cholesterol, von Willebrandův faktor, trombomodulin, fibronektin (Klingel et al. 2003a). Eliminace těchto proteinů vede ke snížení krevní i plazmatické viskozity, dále ke zlepšení agregability a flexibility erytrocytů (Berrouschot et al. 1998; Brunner et al. 1995). Výsledkem snížení krevní i plazmatické viskozity je zlepšení krevního průtoku mikrocirkulací a léčebně příznivé ovlivnění některých poruch v mikrocirkulaci (Blaha et al. 2015a). Dochází k příznivým změnám cytokinů a adhezních molekul, dále ke zvýšené produkci NO endotelem a ke zlepšení deformability erytrocytů (Borberg and Tauchert 2006).

### 3.3 INDIKACE K REOFERÉZE

Rozsah využití reoferézy se postupně měnil, prošel historickým vývojem od původního entuziasmu až k dnešnímu upřesnění.

#### 3.3.1 OBDOBÍ ROZVOJE LÉČEBNÝCH METOD

Za období počátečního klinického využití a ověřování hemaferetických metod k reologické léčbě se považuje doba kolem roku 1980, protože teprve potom byly k dispozici potřebné moderní reologické metodiky a dokonalé separátory i vhodné filtry (Valbonesi et al. 2005).

Jakmile byly objeveny základní zákonitosti lékařské reologie a objevila se i technická možnost reologické vlastnosti krve změnit (tj. byla u lidí ověřena možnost provádět hemodiluce nebo další metodiky reoterapie – viz výše), vznikla logicky myšlenka využít optimalizace reologických poměrů k léčbě několika chorob, a to především (kardio)vaskulárních. Jde již o poměrně vzdálenou minulost a je obtížné počátky zjistit, některé práce byly pravděpodobně jen předneseny na vědeckých fórech nebo šlo o iniciální výzkumné sondy a i dostupné literární prameny se poněkud různí (Malkin and Isayev 2012). Jsou autoři, kteří soudí, že již egyptský vědec Amenehmet (přibližně 1600 let před Kristem.) využívající vlastností tekutin a viskozity má být považován za prvního „reologa“ (Blair 1949, citováno podle: Doraiswamy 2002).

Základ faktických snah směřujících do praxe však položila až činnost pracovníků Společnosti pro reologii (The Society for Rheology), dokládána pracemi v jejich časopise *Journal of Rheology* – založeno r. 1929 (Doraiswamy 2002). Jak již bylo zmíněno, jako reoterapie byla prvně využita výměna plazmy, později (od 80. let) další metody reoterapie. Jako mechanismus vysvětlující příznivý účinek reoterapie při tkáňové ischémii se udávala

endotelem ovlivňovaná vazodilatace na podkladě lokálního zvýšení produkce NO a bradykininu (Murashima et al. 1998), dále snížení produkce VEGF (vascular endothelial growth factor) a IGF-I (insulin-like growth factor-I), což průkazně přetrvávalo až 3 měsíce (Kobayashi et al. 2003). Autoři prokázali i příznivý efekt snížení hladiny fibrinogenu, některých koagulačních faktorů (vWf), destiček i dalších substancí obsažených v eliminované makromolekulární frakci (Yeh and Chiu 2001).

### 3.3.2 VÝSLEDKY MEDICÍNY ZALOŽENÉ NA DŮKAZECH – RACIONÁLNÍ REOTERAPIE

Vlna počáteční entuziastické snahy o uplatnění teoretických poznatků vědy v medicínské reologické praxi byla postupně upřesňována. Výsledky snah o uplatnění reoterapie u některých, zejména cévních chorob, které se podle prvních zpráv jevíly efektivní, ale později často nebyly potvrzeny, lze shrnout následujícím způsobem (Valbonesi et al. 2005):

- Reoterapie se jevila vhodnou u trombotických akutních mozkových příhod. I když některé práce prokazovaly zlepšení u akutních mozkových příhod po reoterapii (Hasegawa et al. 2003), randomizované studie provedené později to neprokázaly (Berrouschot et al. 1999).
- Některé pilotní práce ukazovaly efekt reoferézy u Bürgerovy choroby, patrně především pro odstranění cirkulujících protilátek (Valbonesi et al. 2005).
- Několik pokusů o reoterapii bylo učiněno u těžkých forem Kawasakiho syndromu (nekrotizující vaskulitída s nebezpečím vzniku fatálních aneuryzmat koronárních artérií) (Valbonesi et al. 2005).
- Pro předpokládaný efekt byla reoterapie použita u Churg-Strausova syndromu (allergicgranulomatosis) (Clutterbuck et al. 1990) a u Schönlein-Henochovy purpury (Camerone et al. 1982; Levinsky and Barratt 1979).
- Byly publikovány nadějně výsledky u Wegenerovygranulomatózy (Le Thi Huong et al. 1988), ale později nebyly potvrzeny (Cole et al. 1992; Thysell et al. 1982).
- Reoferetické procedury byly prověřovány u symptomatické kryoglobulinémie (Valbonesi et al. 1986).
- Kolektiv pracovníků DeutscheHämapheresisZentrum měl dobré zkušenosti s léčbou reoferézou u syndromu uveální efúze a trombózy venacentralisretinae (Borberg and Tauchert 2006).
- V posledních letech byly publikovány práce o využití reoferézy v dalších indikacích (sklerodermie, rezistentní kalcifylaxe) (Bouderlique et al. 2018; Lutze et al. 2017).

Lepší výsledky léčby reoferézou byly docíleny u choroby periferních tepen, zejména u aterosklerotických uzávěrů, i když i zde nejsou detaily dořešeny. Nemocní s pokročilou chorobou periferních tepen jsou ohroženi kritickou ischemií končetiny, projevující se klidovou bolestí, ischemickými defekty nebo gangrénou (podle klasifikace dle Fontaina stadium III, IV). Nemocní s diabetes mellitus mají riziko vzniku této závažné komplikace až čtyřnásobné (Weiss 2009). Léčba reoferézou může ovlivněním krevní reologie zlepšit poměry v mikrocirkulaci (Valbonesi et al. 2005).

Klingel et al. 2002 léčili reoferézou skupinu 8 diabetiků s nehojícími se vředy na dolních končetinách při syndromu diabetické nohy. Nemocným podali sérii 7 reoferéz v období 11 týdnů (první dvě reoferézy v jednom týdnu a dalších 5 ve čtrnáctidenních intervalech). U 4 nemocných (Wagnerovo stadium II) došlo k zlepšení – urychlilo se hojení, zlepšila se tenze arteriálního kyslíku a Wagnerovo stadium. U dvou nemocných se jen zlepšilo napětí kyslíku, což ale dovolilo provést menší amputaci. U dalších dvou nemocných (ve Wagnerově stadiu IV a V) nedošlo ke zlepšení. Autoři uzavírají, že reoferéza může být vhodnou doplňkovou terapií, udržet životnost končetiny, oddálit amputaci nebo redukovat její rozsah (Klingel et al. 2003b).

Stejní autoři provedli také další studii: Klingel et al. 2005 v pilotní studii léčili 12 nemocných s kritickou periferní cévní chorobou v klinickém stadiu III dle Fontaina (9 nemocných) a IV (3 nemocní). Protokol zahrnoval 10 reoferéz v průběhu 17 týdnů. U 7 nemocných se zvětšila tenze  $O_2$  o  $\geq 10$  mmHg. Třetina nemocných se posunula z klinického stadia III na IIA dle Fontaina a ustala zcela klidová bolest. Klaudikační interval se prodloužil. U nemocných ve stadiu IV neměla reoferéza efekt. Autoři uzavírali, že reoferéza ve správné indikaci může oddálit amputaci nebo snížit její rozsah. (Klingel et al. 2005).

Rietzsch et al., 2008 léčili pomocí H.E.L.P. aferézy 17 diabetických nemocných se septickými lézemi s vysokým rizikem amputace, kteří nebyli vhodní k revaskularizaci. Nekrózy se významně zmenšily u 16 nemocných, nízká amputace (prstů, v nártu) proběhla u 12 nemocných, u 3 nemocných byla nutná vysoká amputace. I když v této studii nebyla kontrolní skupina, autoři považují H.E.L.P. aferézu za jednu z možných alternativních metod léčby s potenciálem změnit poměr mezi vysokou a nízkou amputací (Rietzsch et al. 2008).

Podrobnou a velmi kritickou analýzu publikovaných dat věnovaných nemoci periferních tepen provedli roku 2011 Weiss et al.. Pokládají za prokázané, že lipidaferéza (včetně kaskádové filtrace plazmy) je indikována tam, kde přes aplikaci jiné moderní léčby

progredujeaterosklerotické cévní postižení v důsledku těžké hypercholesterolémie. Dosavadní studie(kazuistiky nebo výsledky se sériemi nemocných) se autorům jeví sice jako velmi nadějně, ale ne dostatečně průkazné. Než však bude tato náročná léčba obecně doporučena k použití u choroby periferních tepen, je třeba přesných randomizovaných studií, nestačí jen série nemocných nebo kazuistik, které navíc dle Weisse et al. 2011, nejsou plně navzájem srovnatelné, anebo při vší pečlivosti mají i jisté nedostatky. Podle těchto autorů není zatím také dost průkazů o větší účinnosti lipidaferézy oproti komplexní terapii moderními léky (statiny, ezetimib), a nejsou vyjasněny další detaily. K definitivnímu zhodnocení efektivity reoferézy v léčbě tohoto onemocnění bude nezbytné provedení randomizovaných, kontrolovaných studií s dostatečným počtem nemocných(Weiss 2012).

Podle literárních dat (podle počtu publikací věnovaných reoferéze, počtu studií i celkového počtu nemocných) jsou největší zkušenosti s použitím reoferézy u věkem podmíněné makulární degenerace sítnice a náhlé idiopatické ztráty sluchu, kde jsou k dispozici randomizované studie.

Popisy případů – studietypu „case series“ nebo „case reports“ byly publikovány v minulé dekádě i u dalších chorob – u ischemických poruch cévního zásobení na dolních končetinách, onemocnění koronárních tepen, či postižení mozkových tepen (Borberg 2006; Schwartz et al. 2013).

Americká společnost pro aferézy (ASFA – American Society for Apheresis) jednou za 3 roky na základě systematické revize všech dostupných aktuálních informací a důkazů vydává doporučení (guidelines) pro použití aferéz u jednotlivých chorob(Schwartz et al. 2016; Schwartz et al. 2013). Nemoci jsou rozděleny do 4 kategorií (I – všeobecně uznávaná terapie, většinou v první linii terapie, II – uznávaná léčba 2. linie, III – optimální úloha aferézy není určena, rozhodnutí nutno individualizovat, IV – aferéza je neefektivní, není doporučována). Dále je pro každou nemoc určena síla důkazu pro provedení aferézy (1A-2C) dle standardně užívaného GRADE systému (Grading of Recommendation Assessment, Development and Evaluation)(Guyatt et al. 2008; Jaeschke et al. 2008). Podle aktuálních doporučení z roku 2016 (Schwartz et al. 2016) je reoferéza indikována u věkem podmíněné makulární degenerace sítnice - kategorie I, síla důkazů 1B a náhlé idiopatické ztráty sluchu - kategorie III, síla důkazů 2A.

V naší zemi, stejně jako ve většině evropských zemí, respektují aferetická pracoviště výše uvedená doporučení ASFA. Podle těchto doporučení i s přihlédnutím k zaměření pracoviště byl vytvářen soubor nemocných vlastního výzkumu.

### 3.4 VĚKEM PODMÍNĚNÁ MAKULÁRNÍ DEGENERACE SÍTNICE

Věkem podmíněná makulární degenerace sítnice (VPMD) je degenerativní onemocnění sítnice způsobující progresivní změny zrakové ostrosti (vízu) nemocných a je nejčastější příčinou praktické slepoty lidí nad 60 let v industrializovaných zemích. S nárůstem populace i věkového průměru se incidence tohoto onemocnění zvyšuje. Přes všechny nové poznatky v diagnostice a léčbě zůstává VPMD nevyлéčitelným onemocněním. K závažným ztrátám zrakové ostrosti dochází přibližně u 10-15 % nemocných (Buschini et al. 2015).

#### 3.4.1 CHARAKTERISTIKA ONEMOCNĚNÍ VPMD

Jedná se o komplexní multifaktoriální onemocnění. Na etiologii se podílí individuální genetické abnormality, environmentální faktory i metabolické změny (Buschini et al. 2015). Je podmíněna poruchou metabolismu v sítnici, při progresi vede k tvorbě uloženin (drúz), drúzovému odchlípení retinálního pigmentového epitelu, neovaskularizaci a regionální atrofii určitých vrstev sítnice, jako je retinální pigmentový epitel a junkce zevních a vnitřních segmentů fotoreceptorů, později i neuronů.

Rozlišujeme suchou a vlhkou formu onemocnění. Vlhká forma je způsobena chorioidální neovaskularizací, exsudativní hemoragií a jizvením. Ztráta zrakové ostrosti je způsobená právě neovaskularizací (v 75%). Suchá forma je charakterizována tvorbou drúz (viz níže). Progrese choroby je obvykle pomalá, ale neodvratná pokračujícími změnami sítnice a s progresivním horšením zrakové ostrosti. Podle jedné z největších epidemiologických studií o VPMD je pětiletá incidence v populaci 0,9 %. V 90 % nastupuje jako suchá forma, u níž nalézáme praktickou slepotu v 10 %. V 10 % vzniká vlhká forma, která má ovšem za následek v 90 % praktickou slepotu. S časem však dochází k progresi suché formy, která u části nemocných postupně přechází do vlhké formy (Zarbin 2004).

Nejdůležitějším rizikovým faktorem je věk. Prevalence v padesáti letech je téměř nulová, v sedmdesáti letech stoupá na 2 % a v osmdesáti letech na 6 % (Zarbin 2004). Druhým závažným rizikovým faktorem je kouření, zejména pro suchou formu VPMD, nejspíše v důsledku chronické redukce krevního a tkáňového parciálního tlaku kyslíku a tendencí k ischemickému poškození. Dalším faktorem souvisejícím s incidencí a progresí VPMD je oxidační stres (Penfold et al. 2001).

Typickým znakem VPMD je tvorba drúz. Jsou složeny z debris akumulované mezi retinálním pigmentovým epitelem (RPE) a Bruchovou membránou. RPE se účastní transportu kyslíku a živin z cévnatky a také odstraňování metabolitů. Bruchova membrána je vnitřní vrstvou chorioidey, představuje bariéru mezi krví a retinou. Věkem dochází ke ztenčování

této membrány a možným dysfunkcím transportních mechanismů. Rozlišujeme měkké a tvrdé drúzy. Tvrdé drúzy jsou menší, s ohraničeným okrajem, typicky se vyskytují suché formy VPMD. Měkké drúzy jsou větší, s nejasným okrajem, představují hlavní rizikový faktor progresu VPMD do pokročilejších stádií (Buschini et al. 2015; Klein et al. 2002). Vznik drúz nejspíše vede k porušení Bruchovy membrány, umožňující prorůstání chorioideových cév. Tyto cévy jsou fragilní, může dojít k vzniku hemoragií do prostoru mezi fotoreceptory sítnice, čímž dojde k jejich zničení. Výsledkem neovaskularizace je zánik fotoreceptorů a následná ztráta zrakové ostrosti (Penfold et al. 2001).

Nemocní, kteří mají pouze drúzy buď na jednom oku, nebo i na obou očích, nemají většinou výrazné zhoršení zrakové ostrosti, ale jsou ve zvýšeném riziku progresu do pozdních forem VPMD. Nemocní s bilaterálními měkkými drúzami mají 12,4 % riziko rozvoje vlhké formy VPMD za 10 let (Lanchoney et al. 1998). Nemocní s exsudativní VPMD na jednom oku a měkkými drúzami na druhém oku představují největší rizikovou skupinu pro vznik praktické slepoty (Sarraf et al. 1999).

Původ i příčiny progresu drúz nejsou dosud zcela jasné, existuje několik hypotéz. Na jejich vzniku se nejspíše podílí retinální pigmentový epitel a cévy chorioidey. K akumulaci debris přispívá dysfunkce RPE a porucha fagocytózy fotoreceptorů zevních segmentů RPE a alterace permeability chorioidei (Haimovici et al. 2001; Malek et al. 2003; Penfold et al. 2001).

V posledních letech se do popředí zájmu dostává tzv. zánětlivá teorie vzniku VPMD - aktivací imunitního systému. Metabolické produkty debris aktivují komplementový systém se signifikantním zvýšením oxidačního stresu (Langford-Smith et al. 2014; Leung and Landa 2013; Troutbeck et al. 2012). Drúzy obsahují několik komponent: proteiny (hlavní histokompatibilní komplex II,  $\beta$ -amyloid, apolipoproteiny A a E, cytokiny, fibronectin), fosfolipidy, lipofuscin a proteiny akutní fáze (Buschini et al. 2015). RPE produkuje důležitý regulační protein - komplementový faktor H (CFH), což je hlavní inhibitor komplementové kaskády, která chrání komplement před excesivní aktivací. Výzkumy prokázaly, že polymorfismus genů na chromozomu 1 kódujících CFH je asociován s rizikem vzniku VPMD (Sivaprasad and Chong 2006; Wang et al. 2013).

### **3.4.2 LÉČEBNÉ MOŽNOSTI U VPMD**

Přes všechny snahy neexistuje v současnosti uspokojivá léčba VPMD. Léčebné modalitty zahrnují změnu životního stylu (zákaz kouření, fyzickou aktivitu, omega-3 mastné kyseliny), antioxidanty (vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karotén, zinek a měď). Podle studie AREDS



2 zmiňovaná kombinace antioxidantů měla částečný efekt na redukci rizika progresu VPMD - v léčené skupině došlo po 5 letech k progresi u 20 %, v placebo skupině o 28 % (Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group 2013).

Jiné možnosti terapie jsou zatím předmětem výzkumu - inhibitory komplementu, prostaglandiny, protilátky proti  $\beta$ -amyloidu, neuroprotektivní léky a řada dalších (Leung and Landa 2013).

Další léčebnou modalitou v případě suché formy AVMD je reoferéza, kterou jsme na našem pracovišti rozvíjeli a výsledky jsou předloženy níže.

### 3.4.3 VÝSLEDKY LÉČBY VPMD POMOCÍ REOFERÉZY

Kontrolovanou studii nemocných s VPMD představil již r. 1997 Widder et al. (Widder et al. 1997) u 20 nemocných (36 očí) (Citováno dle: Otto 2010). Nemocní byli randomizováni do 2 větví: 10 nemocných (18 očí) bylo léčeno kaskádovou filtrací 10 nemocných (18 očí) pouze sledováno. Efekt léčby byl sledován podle změny zrakové ostrosti měřené pomocí ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group) optotypů. Nemocní v léčené skupině absolvovali celkem 10 procedur během 21 týdnů. Po první proceduře došlo ke zlepšení zrakové ostrosti o 0,8 řádku a o 1,1 řádku po ukončení léčby, zatímco kontrolní skupina vykazovala zhoršení o 0,6 řádku. Studie prokázala, že extrakorporální terapie je bezpečná a účinná.

Skupina v Kolíně nad Rýnem provedla pilotní studii a publikovala v roce 2000 výsledky léčby u 40 nemocných, z nichž 20 bylo léčeno celkem 10 aferézami v průběhu 21 týdnů (2 sezení týdně s opakováním po 5 týdnech), kontrolní skupina 20 nemocných nebyla léčena (MAC I trial). Po ukončení léčby byl prokázán signifikantní rozdíl mezi zrakovou ostrostí obou skupin, signifikantní změny byly nalezeny také při vyšetření standardním elektoretinogramem. (Brunner et al. 2000). Práci kolínských autorů potvrdili i Fell et al., 2002, když publikovali obdobné zlepšení zrakové ostrosti při léčbě suché formy VPMD s měkkými drůzami u skupiny 10 nemocných (Fell et al. 2002).

Další pilotní studie (fáze II/III) proběhla v Utahu ve třech ramenech: 10 nemocných bylo léčeno reoferézou (celkem 10 výkonů v průběhu 16 týdnů) proti skupině 10 nemocných léčených placebem (slepou procedurou) a neléčené skupině 10 nemocných (Swartz and Rabetoy 1999).

O dva roky později skupina z Kolína nad Rýnem prokázala dlouhodobý efekt reoferézy (Otto 2010; Widder et al. 2002). Sledovali dlouhodobě 20 nemocných se suchou formou VPMD a prokázali dlouhodobý efekt této terapie. U 15 z 20 nemocných prokázali

přetrvávání zlepšené zrakové ostrosti i po 4 letech sledování. Dále byl prokázán také signifikantní rozdíl v laboratorních parametrech (viskozita krve, plazmy, agregace erytrocytů).

V roce 2009 byly publikovány výsledky prospektivní randomizované kontrolované studie ART. Analyzováno bylo 43 očí u 43 nemocných - 22 bylo léčených aferézou, 21 nemocných tvořilo kontrolní skupinu. Protokol obsahoval 10 procedur v průběhu 17 týdnů. Rozdíl mezi skupinou léčenou reoferézou a kontrolní skupinou nemocných byl signifikantní ( $p = 0,01$ ). Po 7,5 měsících v léčené skupině došlo ke zhoršení zrakové ostrosti (NKZO) u žádného nemocného, ke zlepšení o 1 řádek došlo u 31,8 %, o 2 řádky u 9 %. V kontrolní skupině došlo ke zhoršení o 1 řádek u 24 %, o 2 u 19%, a o 3 řádky u 9,5 % nemocných. Autoři pokládali reoferézu za účinnou a bezpečnou léčbu u nemocných se suchou formou VPMD, kteří jsou ve vysokém riziku progresu choroby (Koss et al. 2009).

Studie MIRA-1, která probíhala v USA, byla prospektivní, multicentrická, placebem kontrolovaná studie fáze III, která zkoumala efekt 8 aferéz v průběhu 10 týdnů u nemocných s pokročilou suchou formou VPMD. Předběžná analýza u 43 nemocných prokázala zlepšení zrakové ostrosti o více než 2 řádky u 28 % nemocných ve srovnání s 18,2 % v kontrolní skupině (Pulido 2002). Bohužel finální analýza u 198 nemocných po ročním sledování nezjistila signifikantní rozdíl mezi léčebnými skupinami. Prokázala ale značné deviace od protokolu, později proto bylo vyřazeno 37 % nemocných, kteří nesplňovali vstupní kritéria, a tím nebyl dosažen FDA (Food and Drug Administration) požadovaný počet nemocných. Podle konečné analýzy zbývajících nemocných došlo ke zlepšení vize minimálně o 1 řádek u 47 % proti 18 % v kontrolní skupině a ke zhoršení zrakové ostrosti o 3 řádky u 5,3 % proti 28,6 %. Efekt zůstal stabilní po dobu 12 měsíců. (Koss et al. 2009; Pulido et al. 2006; Schwartz et al. 2013).

Na základě těchto výsledků i naše pracoviště zahájilo léčbu reoferézou u nemocných s VPMD i dalšími poruchami mikrocirkulace. První výsledky publikoval Bláha a spol. v roce 2008 (Bláha et al. 2008c), v roce 2009 publikovala Rencová et al. první výsledky prospektivní randomizované studie u 16 nemocných se suchou formou VPMD (Rencova et al. 2009). V roce 2013 byly Studničkou et al. publikovány výsledky dlouhodobého sledování 19 nemocných s minimálním sledováním 3,5 roku, které prokázaly pozitivní efekt reoferézy (Studnicka et al. 2013).

Vzhledem k narůstajícímu počtu nemocných léčených reoferézou i center provádějících tuto terapii byl v Německu založen registr Rheo-Net, jehož cílem bylo zkoumat bezpečnost, toleranci a efektivitu reoferéz. Bylo zhodnoceno celkem 7722 reoferéz u 1110

nemocných, z toho 833 nemocných bylo léčeno pro VPMD, 198 s náhlou ztrátou sluchu a 79 pacientů s jinými diagnózami (diabetická noha, okluze retinálních cév, periferní tepenné uzávěry), věkový průměr nemocných byl 72 let. Byla také analyzována efektivita terapie u VPMD, hodnoceno celkem 428 očí u 279 nemocných, v kontrolní skupině bylo 85 očí u 55 neléčených nemocných. Po ukončení léčby reoferézou se zlepšilo anebo zůstalo stejných 83 % očí. Ke zlepšení zrakové ostrosti došlo u 42 % léčených nemocných, v neléčené skupině to bylo 26 %, ke zhoršení došlo u 17 % léčených a u 40 % neléčených nemocných. Rozdíly byly statisticky signifikantní (Klingel et al. 2010).

### 3.5 NÁHLÁ IDIOPATICKÁ ZTRÁTA SLUCHU

Náhlá idiopatická ztráta sluchu (sudden idiopathic sensorineural hearing loss (SISHL)) je častým příznakem, který se může objevit až u 1/5 populace (Davis 1989). Nedoslýchavost postihuje v Evropě až 30 % mužů a 20% žen starších 60 let (Roth et al. 2011); v USA trpí nedoslýchavostí přes 60 % lidí starších 70 let (Lin et al. 2012). Převážně se jedná o oboustrannou senzorieurální nedoslýchavost.

Nejčastější příčinou nedoslýchavosti je presbyakuzie (tzv. stařecká nedoslýchavost), která je asociovaná s genetickou predispozicí, expozicí hluku i s věkem spojenými patologickými změnami.

#### 3.5.1 CHARAKTERISTIKA ONEMOCNĚNÍ SISHL

Náhlá ztráta sluchu byla poprvé popsána De Kleynem v roce 1944 (de Kleyn 1944; citováno dle: Schreiber et al. 2010). Nejčastěji je definována jako ztráta sluchu nejméně o 30 dB ve 3 sousedících frekvencích v tónové prahové audiometrii, která vznikla za méně než 72 hodin (Stew et al. 2012). Incidence se pohybuje kolem 5-30 případů na 100 000 obyvatelza rok, průměrný věk při vzniku je 50-60 let a není zde preference pohlaví (Schreiber et al. 2010). Vzniká náhle, během minut až hodin, ale byly popsány stavy, kdy náhlá ztráta sluchu byla následována dalším progresivním zhoršením během týdnů až měsíců. V převážné většině se jedná o unilaterální postižení, oboustranné postižení bývá v méně než 5 % (Oh et al. 2007). Podle procenta ztrát rozlišujeme mírné, střední, těžké až velmi těžké postižení. Může postihnout nízké, vysoké nebo všechny frekvence. Současně se v 80 % může vyskytovat tinitus, ve 30 % vertigo jako příznak periferní vestibulární dysfunkce. 80 % nemocných popisuje pocit zalehnutí nebo ucpání ucha (Sakata and Kato 2006).

Náhlá ztráta sluchu může představovat izolovaný problém, nebo příznaky jiného, např. systémového onemocnění. Specifickou příčinu náhlé ztráty sluchu se podaří zjistit asi v 10 %

případů, pro zbývající případy se používá termín idiopatická ztráta sluchu (Chrobok 2018; Loughran 2000; Penido et al. 2009). Často je příčina ztráty obtížně rozpoznatelná, zejména v případě nemocí vnitřního ucha, demyelinizačních nebo autoimunních onemocnění, nádorů. Proto u všech nemocných s náhlou ztrátou sluchu je nutné pátrat po primárním, zejména systémovém onemocnění (Schreiber et al. 2010).

Přesná patogeneze náhlé ztráty sluchu nebyla dosud identifikována, i když bylo popsáno několik možných patofyziologických mechanismů. Možnou příčinou je *virová infekce* - virus neštovic(Fukuda et al. 2001), varicella-zoster virus(Wackym 1997), herpes virus, cytomegalovirus, virus chřipky(Wilson et al. 1983) a Epstein-Barové virus(Gross et al. 2007). Ani negativní sérologické, epidemiologické nebo histopatologické vyšetření nemusí vylučovat virovou etiologii (Merchant et al. 2008).

Další možnou příčinou ztráty sluchu je *cévní etiologie*. Vnitřní ucho je zásobováno terminálními arteriemi a labyrinti, proto poruchy v krevním průtoku nemohou být kompenzovány kolaterálním oběhem. Arteriální okluze jako příčina náhlé ztráty sluchu byla popsána již v roce 1949 Rasmussenem(citováno dle: Schreiber et al. 2010). V příčinné souvislosti s náhlou ztrátou sluchu byly zkoumány možné mechanismy zahrnující aterosklerózu, hypotenzi, vasospasmus, pro tyto teorie ale zatím chybí jasný důkaz (Ciorba et al. 2015; Chrobok 2018; Merchant et al. 2005). Tolerance vnitřního ucha k ischemii je ale malá, již po 30 minutách obleněného průtoku může dojít k poškození buněk. Negativní vliv na napětí kyslíku, a tím i kochleární funkci může mít i hyperviskozita(Bianchin et al. 2010; Loughran 2000). Její snížení reoferézou by proto mohlo být léčebně účinné.

Názory na souvislost s obvykle uváděnými kardiovaskulárními riziky – hypercholesterolémií, hypertenzí, diabetem, kouřením, trombofilií, jsou rozporuplné (Capaccio et al. 2005; Ciorba et al. 2015). Metaanalýza, která řešila vliv sérových lipidů na náhlou ztrátu sluchu, nepotvrdila vzájemnou souvislost (Chang et al. 2015).

V souvislosti s náhlou ztrátou sluchu mohou být i jiné nemoci nebo patologické stavy. (Přehled viz v: Blaha et al. 2015b; Dršata et al. 2014).

Prognóza je v případě idiopatické náhlé ztráty sluchu nejistá. Ke spontánní úpravě sluchu ad integrum dochází asi u 40-60 % nemocných. Zdá se, že pokud nedojde ke zlepšení sluchu do 14 dnů, je šance na úpravu sluchu malá (Moon et al. 2009).

### 3.5.2 LÉČEBNÉ MOŽNOSTI SISHL

Léčebné možnosti SISHL jsou omezené. Nejčastěji užívaným lékem jsou kortikosteroidy, ovšem dosud chybí jednoznačné důkazy pro úspěch této léčby. Steroidy mají několik druhů účinku na vnitřní ucho, ale dosud není jasné, zda by mohla být pro příznivý vliv na náhlou ztrátu sluchu významnější imunoprese, změny v mikrocirkulaci, mineralokortikoidní efekt nebo snížení endolymfatického tlaku (Lawrence and Thevasagayam 2015; Nakache et al. 2015; Wei et al. 2013). Další léčebnou modalitou je lokální aplikace kortikoidů do vnitřního ucha s výhodou sníženého rizika systémového účinku kortikoidů (Lawrence and Thevasagayam 2015; Nakache et al. 2015). K léčbě náhlé idiopatické ztráty sluchu bylo použito i několik imunopresivních preparátů (methotrexát, cyklofosfamid) nebo antivirotik, výsledky jsou nejednoznačné (Broughton et al. 2004). Další léčebnou možností je hemoreotapie. Zpočátku to byla zejména data o hemodiluci a infuzní terapii (Probst et al. 1992), v posledních 15 letech se objevují klinické studie o využití reoferézy.

### **3.5.3 VÝSLEDKY LÉČBY SISHL POMOCÍ REOFERÉZY**

Jednou z prvních studií využívajících aferézu v léčbě náhlé ztráty sluchu byla práce Suckfülla, publikovaná v roce 2002 (Suckfull 2002). Hodnoceno bylo 111 nemocných, kteří podstoupili jednu aferézu pomocí systému H.E.L.P. - s odstraněním cholesterolu i fibrinogenu. V kontrolní skupině bylo 67 nemocných léčených konzervativně (kortikoidy + hydroxyetylškrob + pentoxifylin). Nemocní byli kontrolováni za 48 hodin a 6 týdnů po aferéze. Remise bylo dosaženo v 84 % v aferetické skupině, v kontrolní v 78 %. Signifikantně lepší výsledek byl v aferetické skupině u nemocných s vysokou hladinou fibrinogenu a LDL cholesterolu (Suckfull 2002).

V roce 2004 publikovala Heidrun Ullrich et al. prospektivní nekontrolovanou studii. Autoři se pokusili léčebně ovlivnit náhlou ztrátu sluchu u skupiny 36 nemocných pomocí kaskádové filtrace, kde speciální sekundární filtr zachycoval fibrinogen. Plazmafiltraci použili u nemocných, kteří se nezlepšili spontánně (20 nemocných), a zaznamenali zlepšení sluchu. Signifikantní zlepšení nastávalo již po první plazmafiltraci a nebylo třeba další u 60 % nemocných léčených plazmafiltrací, u 20 % dalších došlo k úplné úpravě sluchu za 4 týdny. Po půl roce sledování zlepšení přetrvávalo. Snížení viskozity a zlepšení kochleárního průtoku pokládali za klíč k úspěchu (Ullrich 2004).

Italská prospektivní, randomizovaná kontrolovaná studie využívala precipitační metodu H.E.L.P. k léčbě náhlé ztráty sluchu. Porovnávali skupinu 72 nemocných léčených H.E.L.P.-aferézou a následnou 10denní standardní léčbou (dexamethason + glycerol) s kontrolní skupinou 60 nemocných se standardní léčbou. 24 hodin po ukončení léčby došlo

k úpravě sluchu u 75 % nemocných s aferézou a 41,7 % u kontrolní skupiny, za 10 dnů od léčby 76,4 % vs. 45 %. Signifikantně lepší výsledky aferézy byly u nemocných s hyperfibrinogenémií (Bianchin et al. 2010).

V roce 2009 byly publikovány výsledky německé prospektivní, multicentrické, randomizované kontrolované studie, kdy autoři porovnávali skupinu léčenou reoferézou (95 nemocných, 2 výkony během 3 dnů) s kontrolní skupinou (99 nemocných), léčenou podle německých guidelines 10 dnů kortikoidy nebo intravenózní hemodilucí (infuze hydroxyethylškrobu). Léčba byla hodnocena za 10 a 42 dní po ukončení léčby. Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi skupinami, reoferéza vedla k rychlejší úpravě sluchu. Reologické parametry (fibrinogen, cholesterol,  $\alpha_2$ -makroglobulin) vykazovaly po reoferéze signifikantní pokles. U nemocných s vyšší viskozitou a vyšší normální hladinou celkové bílkoviny došlo k výraznějšímu zlepšení sluchu po aferéze, úprava sluchu 10 dnů po léčbě byla stále vyšší, ale již nesignifikantní. Při hodnocení kvality života byla signifikantně lépe hodnocena reoferéza (Mosges et al. 2009). Podle hodnocení autorů by reoferéza mohla být léčbou 2. linie při selhání léčby kortikoidy (Klingel et al. 2009; Mosges et al. 2009). Tuto domněnku potvrdila retrospektivní studie u 25 nemocných s náhlou ztrátou sluchu, nereagujících na kortikoidní infuzní terapii. Po 2 reoferézách došlo u 68 % k promptnímu zlepšení sluchu – u 40 % k úplné remisi, u 28 % k částečné, s průměrem zlepšení o 20 dB (Uygun-Kiehne et al. 2010).

Současný stav znalostí léčby náhlé idiopatické ztráty sluchu lze shrnout jako neuzavřený. Metodika provádění aferézy není jednotná a soubory léčených nemocných nejsou plně srovnatelné a dosud nejsou dostatečně velké k definitivním závěrům.

Většina aferetických center se řídí směrnicemi Americké společnosti pro hemaferézu (ASFA), jak již bylo zmíněno výše. SISHL byla poprvé, na základě výsledků několika studií, zařazena jako vhodná indikace k léčbě reoferézou v roce 2013 (Schwartz et al. 2013) – předchozí vydání v letech 2010 a dříve tuto indikaci nezahrnovala. V posledních doporučeních ASFA z r. 2016 (Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis) (Schwartz et al. 2016) je SISHL nadále zařazeno do kategorie III (indikace po individuálním zvážení) a není metodou první volby.

### 3.6 LÉČEBNÉ SCHÉMA REOFERÉZY

Počet výkonů (procedur) jedné léčebné série a intervaly mezi jednotlivými výkony vycházejí z produkční a eliminační kinetiky vysokomolekulárních látek v plazmě a buněčných komponent (zejména erytrocytů). Reologicky významné parametry, jako je viskozita plazmy,

se vrací na úvodní hladiny během 24-48 hodin, někdy až během 7 dnů. Agregace erytrocytů se vrací do normálu až během 2-3 týdnů. Do 48 hod po proceduře dochází k rychlému (20-40 %) vzestupu biochemických parametrů, nejspíše refluxemz extravaskulárního do intravaskulárního prostoru. Syntéza většiny odstraněných látek se vrací do původních hodnot za 10-21 dní (Borberg and Tauchert 2006). Faktorem obecně velmi užitečným pro reoferézy je fibrinogen a jeho pokles po účinné proceduře, jehož poločas je relativně dlouhý - 72 hodin, ale jeho nadměrný pokles po reoferéze může být omezujícím faktorem pro provádění intenzivních a častých procedur.

### 3.6.1 LÉČEBNÉ SCHÉMA REOFERÉZY PŘI LÉČBĚ VPMD

Používané léčebné protokoly jsou odlišné pro jednotlivé choroby. Německá pracoviště v Kolíně n. Rýnem, která mají nejvíce zkušeností s VPMD, doporučují provádět celkem 8-10 procedur, cílový objem plazmy pro jednotlivou proceduru by měl být 100 % objemu plazmy nemocného. Doporučují dvě odlišná schémata léčby, která se zdají být stejně efektivní:

- 1. schéma: 2 reoferézy za týden, a to v 1., 6., 11., 16. a 21. týdnu, tj. celkem 10 procedur v 21 týdnech (Brunner et al. 2000).
- 2. schéma: 1. týden 2 reoferézy, pak 1 aferéza v dvoutýdenních intervalech, celkem 10 aferéz v průběhu 17 týdnů (Koss 2009).

Ve studii MIRA-1 prováděli autoři celkem 8 procedur v 10 týdnech, týdně 2 aferézy s odstupem 2 dnů, následovala 14denní pauza a další série aferéz (Pulido 2002). Podobné schéma používali i ve studii Utah (Swartz and Rabetoy 1999), kde bylo prováděno celkem 10 procedur ve 13 týdnech. Podle analýzy již výše zmíněného Rheo-Net registru bylo ve studiích prováděno převážně 8-10 reoferéz v průběhu 10-17 týdnů (Klingel 2010). Schémata léčby použitá v jednotlivých studiích jsou přehledně znázorněna v tabulce 3. Podle doporučení ASFA je vhodné provádět 8-10 procedur v průběhu 8-21 týdnů (Schwartz et al. 2016).

TABULKA 3: PŘEHLED MOŽNÝCH LÉČEBNÝCH SCHÉMAT REOFERÉZY PŘI VPMD

	TÝDNY																				
<i>STUDIE</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<i>Brunner</i>	••					••					••					••					••
<i>Koss</i>	••		•		•		•		•		•		•		•		•				
<i>Utah</i>	••			••			••			••			••								
<i>Mira-I</i>	••			••			••			••											

Legenda: • = reoferéza, citace ke studiím jsou uvedeny v textu výše.

### 3.6.2 LÉČEBNÉ SCHÉMA REOFERÉZY PŘI LÉČBĚ SISHL

Pro léčbu náhlé ztráty sluchu jsou používány protokoly léčby jiné než u VPMD. Suckfüll et al. Bianchin použili pouze jednu aferézu (Suckfull 2002, Bianchin 2010). Mösges et al. použili 2 aferézy s odstupem 2-3 dnů mezi jednotlivými procedurami (Mosges et al. 2009). Podle doporučení ASFA je vhodné reoferézu provádět 1-2krát (Schwartz et al. 2016).

### 3.7 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY REOFERÉZY

Nežádoucí účinky reoferézy jsou většinou identické s nežádoucími účinky jiných aferetických metod, tyto komplikace jsou díky bohatým celosvětovým zkušenostem s hemodialýzou, výměnnou plazmaferézou nebo imunoabsorpčními dobře znám zdokumentované (Klingel et al. 2003a; Stegmayr et al. 2017; Stegmayr et al. 2013). Jejich výskyt se pohybuje kolem 4-8 %, procento výskytu se liší mezi jednotlivými procedurami. Riziko vzniku bývá mírně větší při prvním výkonu (Blaha et al. 2007; Blaha et al. 2009; Norda and Stegmayr 2003).

Separátory používané v současné době jsou technicky velmi dokonalé, množství krve extrakorporálně cirkulující bývá u dospělých nemocných zanedbatelné (Blaha et al. 2007; Winters 2008). Nesetkáváme se dnes ani s hemolýzou, popisovanou u metod získávajících plazmu filtrací. Bývala až ve 20 % případů, nevedla však k signifikantním krevním ztrátám následnému poklesu hodnot hemoglobinu (Fok et al. 1996; citováno dle: Yeh et al. 2004). U centrifugačních metod se s hemolýzou nesetkáváme (Yeh et al. 2004), s tím souhlasí



i naše zkušenost. Technické poruchy separátorů a sekundárních zařízení jsou dnes výjimečné, pohybují se kolem 2%, k přerušení terapie vedou pouze v 0,38% výkonů(Klingel et al. 2010; Winters 2008).

Další skupinu tvoří komplikace spojené se žilním vstupem, jedná se většinou o špatný stav periferních žil, a tím obtížný periferní přístup, prováděný opakovanými vpichy, následují pak problémy s průtokem (nelze dosáhnout žádaného přítoku, anebo kolísá, je nutno činit krátké přestávky - čímž se rozkolísají technické parametry přístrojů), vzniká kolaps cév. Komplikací jsou také podkožní hematomy nebo krvácení po vpiších. Procento komplikací se zvyšuje pochopitelně při nutnosti zavedení centrálního žilního katétru(Shemin et al. 2007; Winters 2008).

Relativně častým příznakem, se kterým se u aferéz můžeme setkat, jsou příznaky hypokalcémie, které souvisejí s podáváním antikoagulačního roztoku ACD-A. Většinou jsou mírné - parestzie v prstech, periorální parestzie, upravitelné perorálním nebo parenterálním podáním preparátů s kalciumem. Jedná se o očekávanou reakci na podávaný roztok ACD-A, proto v mnoha publikacích nebývá započtena do uváděných nežádoucích reakcí(Winters 2008). U reoferézy se vzhledem ke kombinované antikoagulaci používá menší množství roztoku ACD-A, proto i tyto příznaky jsou méně časté.

Dále se můžeme setkat s neurovegetativními příznaky jako je hypotenze, bradykardie, tachykardie, nauzea, zvracení, zcela výjimečně se objevují alergické reakce, třesavka, teplota, zimnice (Richter et al. 1997; Winters 2008).

Nežádoucí reakce při reoferéze byly pečlivě dokumentovány i v rámci RheoNet registru, zmiňovaném výše (Klingel et al 2010). Bylo hodnoceno 7722 procedur u 1110 nemocných. Reoferézy byly velice dobře tolerované, nežádoucí účinky byly hlášeny v 5,67 % výkonů, z toho pouze 2,19% vyžadovalo intervenci, přerušení procedury bylo nutné pouze u 0,48 % výkonů. Nejčastěji hlášenou komplikací byla krátkodobá hypotenze (2,46 %), která se ve 30 % objevila během prvního výkonu. 28,8% sledovaných nemocných bylo starších 80 let, ale ani v této věkové skupině nebyl zaznamenán vyšší výskyt nežádoucích účinků.

Také v registru WAA (WorldApheresisAssociation), který vznikl v roce 2003, jsou nežádoucí účinky sledovány a hodnoceny. Registr WAA ve své zprávě z r. 2013 udává výskyt vedlejších reakcí v 6,7 %, z toho je 2,7 % mírných, 3,8 % je středně těžkých (moderate) a 0,2 % těžkých (Stegmayr et al. 2013). U reoferéz bylo pozorováno 9,1 % nežádoucích reakcí, většinou byly mírné, nebyly zaznamenány závažné komplikace(Stegmayr et al. 2008).

Specifickou komplikací, se kterou se setkáváme u výkonů se sekundárním zpracováním (filtrací) plazmy, je bradykininová reakce. Vyskytuje se u nemocných, kteří užívají ACE-inhibitory. Projevuje se zarudnutím, hypotenzí, bradykardií a dušností (bradykinin působí také bronchokonstrikci). Na negativně nabitých površích filtrů nebo kolon dochází k aktivaci kininového systému a následné tvorbě bradykininu. Za normálních okolností je bradykinin rychle inaktivován kinázami ACE (angiotensin-konvertující-enzym), I a II (což jsou dva typy peptidáz), ale u nemocných užívajících ACE-inhibitory je ACE blokován, dochází k hromadění bradykininu a vzniku příznaků popsaných výše. Proto byu nemocných podstupujících sekundární filtraci plazmy měl být ACE-inhibitor vysazen alespoň 24 hodin před výkonem(Kojima et al. 2001; Kojima et al. 1999; Winters 2012).

*Lze shrnout*, že většina komplikací u aferéz včetně reoferéz je mírná, dobře terapeuticky ovlivnitelná, nevyžaduje předčasné ukončení terapie. Pro minimalizaci nežádoucích účinků je ale potřebný vyškolený personál, který dokáže předvídat nebo časně diagnostikovat případné komplikace, neméně důležité je pečlivé sledování nemocného během celého výkonu.

## 4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Původním úkolem disertační práce bylo sledovat soubor nemocných s poruchami mikrocirkulace léčených reoferézou o počtu více než 100 nemocných, kde mělo být provedeno více než 500 reoferetických procedur. Pro disertační práci byl zvolen soubor nemocných s VPMD a SISHL.

### 4.1 PRIMÁRNÍ CÍLE A ZAMĚŘENÍ VÝZKUMU

#### 4.1.1 VLASTNÍ MODIFIKACE METODIKY REOFERÉZY A JEJÍ OPTIMALIZACE

Použít vlastní modifikaci metodiky reoferézy, vypracovanou při předchozím výzkumu léčby familiární hypercholesterolemie reoferézou a ověřit a optimalizovat ji při léčbě VPMD a SISHL (optimální žilní přístupy, antikoagulace, potřebný objem promyté plazmy, intenzita a frekvence procedur).

#### 4.1.2 EFEKTIVITA PROCEDUR - UKAZATELE ÚČINNOSTI REOFERÉZY

- Analyzovat změny vybraného panelu biochemických, hematologických ukazatelů během série procedur.
- K základnímu průkazu efektivity použité reoferetické metodiky analyzovat míru změn úplné palety reologicky efektivních činitelů dle Klingela et al. (Klingel et al. 2003).
- Analyzovat po reoferéze změny vybraných bioindikátorů, které mohou ovlivnit aktivitu endotelu, apoptózu nebo ovlivnit bezpečnost léčby (selektiny, endoglin, sApoFAS, MCP1, IL-10, CD 40L, hsCRP).

#### 4.1.3 PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI TERAPIE

Z panelu sledovaných parametrů se pokusit se vytypovat *ukazatele okamžité účinnosti* procedury k umožnění predikce úspěšnosti. K tomu srovnat výsledky nemocných úspěšně a neúspěšně léčených.

#### 4.1.4 BEZPEČNOST REOFERÉZY

Pečlivě monitorovat výskyt nežádoucích reakcí. Získat registrační kód WAA (World Apheresis Association), podle formuláře registru provádět pravidelnou registraci provedených výkonů v centru, což umožní získat zpětné informace a také umožní spoluúčast na mezinárodních publikacích. Porovnat bezpečnost procedur ve vlastním centru a srovnat s mezinárodním registrem.

#### **4.1.5 EKONOMICKÁ STRÁNKA PROVOZU**

Vyhodnotit ekonomickou náročnost a proveditelnost léčby VPMD v našich podmínkách.

### **4.2 SEKUNDÁRNÍ CÍLE**

#### **4.2.1 KLINICKÁ ÚČINNOST REOFERÉZ**

Vyhodnotit klinickou účinnost léčby reoferézou u suché formy VPMD - změny zrakové ostrosti, morfologické změny, vývoj měkkých drúz a funkční stav sítnice. U nemocných se SISHL léčených reoferézou sledovat změny sluchu pomocí audiometrie..

### **4.3 PRACOVNÍ HYPOTÉZY**

Pro vybraný soubor nemocných léčených reoferézou jsme vypracovali tyto hypotézy:

- 1) Léčba reoferézou u nemocných s VPMD zlepší nebo stabilizuje příznaky suché formy VPMD.
- 2) Léčba reoferézou u nemocných se SISHL nereagujících na standardní léčbu kortikoidy vede ke zlepšení sluchu
- 3) Léčba reoferézou je bezpečná a dobře tolerována, výskyt komplikací není vyšší než u jiných aferetických metod.

## 5 SOUBOR NEMOCNÝCH, METODY, STATISTICKÁ ANALÝZA

Reoferézu používáme na našem oddělení od roku 2003. Prvními nemocnými léčenými metodou reoferézy byli nemocní s familiární hypercholesterolémií, kteří nebyli indikováni k léčbě klasickou imunoabsorpční metodou LDL-aferézy dle Borberga (Borberg 1997). V dalším kroku to pak byli nemocní s orbitální endokrinopatií, léčení v rámci výzkumného projektu „Léčba závažné orbitopatie hemoreoferézou, význam vybraných patogenních činitelů“ (Řešeno: 2007-2009. Číslo projektu: IGAMZ ČR NR/9181-3). Úkol byl vyhodnocen ve skupině A.

Procedury byly podle výsledků výzkumu u nemocných s familiární hypercholesterolémií a orbitální endokrinopatií postupně modifikovány (množství promyté plazmy, antikoagulace) a standardizovány. Standardizované procedury u homogenních souborů nemocných (s kontrolními soubory) se provádějí od r. 2006 u věkem podmíněné makulární degenerace a náhlé idiopatické ztráty sluchu, obojí v rámci výzkumných projektů IGA MZ ČR nebo AZV, či vnitřního výzkumu FN Hradec Králové. U uvedených úkolů se autorka této práce aktivně účastnila jako spoluřešitel a v plánu těchto úkolů byla zahrnuta disertační práce postgraduálního studenta (autorky). Pro disertační práci byli vybráni nemocní s VPMD a SISHL.

### 5.1 SOUBOR NEMOCNÝCH

V této práci je hodnoceno celkem 112 nemocných léčených reoferézou, z toho bylo 71 nemocných s VPMD a 41 nemocných s náhlou ztrátou sluchu, léčených během 10 let (2006-2016). Soubor nemocných s VPMD zahrnuje 41 žen a 30 mužů, kteří jsou ve věku průměrně  $67,0 \pm 6,9$  let. Hodnocený soubor nemocných se SISHL má 14 žen a 27 mužů s věkovým průměrem  $55,5 \pm 13,5$  let.

Kontrolní skupinu tvoří 44 nemocných s VPMD průměrného věku  $79 \pm 7,5$  roku a 54 nemocných se SISHL průměrného věku  $51,3 \pm 16,2$  roku. Základní údaje o nemocných sledovaného souboru jsou shrnuty v tabulce 4.

TABULKA 4: DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE O NEMOCNÝCH

Vyšetřování nemocní	Počet nemocných celkem	Muži	Ženy	Věk (průměr)	Věk (medián)	SD	Rozsah (let)
<i>Nemocní s VPMD léčeni reoferézou</i>	71	30	41	67,0	67	6,9	51-85
<i>Kontrolní nemocní s VPMD</i>	44	39	5	79,0	80	7,5	61-92
<i>Nemocní se SISHL léčeni reoferézou</i>	41	27	14	55,5	58	13,5	21-79
<i>Kontrolní nemocní se SISHL</i>	54	29	25	51,3	53	16,2	18-77

Legenda: popis viz text; SD = směrodatná odchylka průměru.

### 5.1.1 SOUBOR NEMOCNÝCH S VPMD

Soubor 71 nemocných tvořili nemocní, u kterých jsme prováděli reoferézu v rámci několika výzkumných projektů:

- Rheoferéza jako metoda systémové léčby věkem podmíněné makulární degenerace. Trvání projektu: 2006-2008. IGA MZ ČR, č. NR/9118-3. Hodnocení: A.
- Vliv systémové léčby reoferézou na funkční stav sítnice u věkem podmíněné makulární degenerace. Doba trvání: 2008-2011. IGA MZ ČR č. NS/9738-4, u FN č. 9014. Hodnocení: A, navržen na cenu ministra zdravotnictví.
- Dynamika a význam změn komplementového systému po reoferéze u věkem podmíněné makulární degenerace. Doba řešení: 2013. Výzkumný úkol MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906), evidenční číslo FN HK: 8166.
- Optimalizace léčby suché formy věkem podmíněné makulární degenerace reoferézou. Výzkumný úkol IGA MZ ČR, číslo: NT 14037-3/2013, u FN: 9045. Doba řešení: 2013-2015. Hodnocení: A.
- Proprotein kináza subtilisin kexin 9 (PCSK9) – diagnostický, terapeutický a prognostický potenciál při léčbě věkem podmíněné makulární degenerace reoferézou. MZ ČR RVO (FNHK, 00179906). FN č. 8134. Řešeno 2016, vnitřní úkol FN. Poznámka: účelem tohoto ročního grantu bylo jen doplnění a analýza některých laboratorních hodnot, se zaměřením k podání dalšího grantu.

- Dynamika komplementu jako ukazatel efektivity terapie věkem podmíněné makulární degenerace reoferézou. MZ ČR RVO (FNHK, 00179906). FN č. 8177. Řešeno 2016. Poznámka:rovněž tento roční grant sloužil jen k doplnění a analýze některých dalších laboratorních hodnot, jako výzkumná sonda k podání dalšího grantu.

K reoferéze byli indikováni nemocní s VPMD ve stádiu měkkých drúz stupně 1 až 3 dle studie EURYEYE (Augood et al. 2004). Indikaci k reoferéze prováděli lékaři Oční kliniky FN Hradec Králové.

Kontrolní skupina nemocných byla rekrutována s úmyslem randomizace 1:1 na oční klinice z nemocných léčených ve výše uvedených výzkumných projektech; tito byli sledováni a léčeni zcela stejně s výjimkou reoferézy. Nemocní však většinou žádali zařazení do skupiny s reoferézou, kde očekávali lepší efekt, proto je skupina kontrol méně početná. Ve skupině kontrol zůstávali také více nemocní s vyšším věkem - pro přidružené choroby znemožňující reoferézu. Celkem bylo do kontrolní skupiny zařazeno 44 nemocných.

Vzhledem k tomu, že u nemocných s VPMD může být postiženo jedno oko nebo obě oči, byl hodnocen u nemocných léčených reoferézou a kontrol i počet postižených očí.

Celkem u 71 nemocných léčených reoferézou bylo VPMD postiženo 97 očí (26 nemocných s postižením obou očí, 24 nemocných s postižením pravého oka a 21 nemocných s postižením oka levého). V kontrolní skupině jsme sledovali 54 očí (17 nemocných s postižením pravého oka, 17 nemocných s postižením levého oka a 10 nemocných s postižením obou očí). (Viz tabulka 5). Vstupní BMI byl u nemocných průměrně 26,53 (rozsah 18-40), medián 26.

Doba sledování nemocných s VPMD byla 6-132 měsíců, s mediánem sledování 48 měsíců, z toho 43 nemocných bylo sledováno více než 5 let.

Všichni nemocní, kteří dokončili léčbu reoferézou podle stanoveného schématu a doba sledování byla delší než 2 roky, byli rozděleni na 2 skupiny: 1. skupinu tvořili nemocní klinicky úspěšně léčení a 2. skupinu klinicky neúspěšní. Za úspěšné byli považováni nemocní, u kterých došlo ke stabilizaci onemocnění nebo zlepšení nálezu (zraková ostrost, zhodnocení morfologického a funkčního očního nálezu). Nejdůležitějším kritériem, zejména z hlediska nemocného, je zraková ostrost: jako stabilizace bylo hodnoceno, pokud byla v daném termínu zraková ostrost  $\pm 10$  písmen od původní hodnoty (tzn. změna o maximálně 2 řádky ETDRS optotypových tabulí). Jako zlepšení bylo hodnoceno zlepšení zrakové ostrosti o 11 a více písmen a zhoršení při poklesu o 11 a více písmen. Efekt terapie byl hodnocen zkušeným oftalmologem. Výsledky nemocných úspěšně léčených byly srovnány s výsledky nemocných

neúspěšně léčených ve snaze určit biomarkery významné pro predikci úspěšnosti; hodnoceny byly zejména reologicky významné faktory.

TABULKA 5: DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE U NEMOCNÝCH S VPMD

<b>Parametry</b>	<b>Kontrolní skupina (N = 44)</b>	<b>Reoferéza (N = 71)</b>
<b><i>Věk (medián)</i></b>	79,0	67,0
<b><i>Pohlaví muži/ženy</i></b>	4/40	30/41
<b><i>Počet postižených očí</i></b>	54	97
<b><i>Postižení pravého oka</i></b>	17	24
<b><i>Postižení levého oka</i></b>	17	21
<b><i>Postižení obou očí</i></b>	10	26

Legenda: popis viz text; N = počet nemocných

### 5.1.2 SOUBOR NEMOCNÝCH SE SISHL

Od začátku provádění reoferéz bylo ve FN Hradec Králové léčeno reoferézou pro SISHL 41 nemocných. Z toho 8 nemocných bylo léčeno od r. 2008 jako výzkumná sonda, nebyla prováděna úplná paleta zejména klinických vyšetření (detailní analýza nemohla být provedena, ale tito nemocní mohli být zařazeni do hodnocení laboratorních vyšetření). Další 4 roky (2012-2015) bylo reoferézou léčeno 33 nemocných již v řádném výzkumném protokolu - grant IGA MZ ČR NT/13475-4/2012, a jejich údaje mohly být detailně hodnoceny v této práci. (Od roku 2016 se pak již naše výzkumná skupina zaměřila na jinou, novou léčebnou indikaci - léčbu náhlé ztráty rovnováhy reoferézou.)

Soubor 33 nemocných léčených reoferézou na ORL klinice FN Hradec Králové v rámci jednotného protokolu vznikl takto: v letech 2012 – 2015 bylo na ORL kliniku odesláno 157 nemocných s podezřením na SISHL. Z nich u 110 nemocných byla diagnóza potvrzena, následně podepsali informovaný souhlas a vstoupili do studie. Jeden byl vyřazen ze studie před zahájením léčby pro spontánní remisi. Dva odmítli další léčbu z osobních důvodů před ukončením terapie kortikoidem. Jeden z větve MicroWick přerušil studii rovněž z osobních důvodů. Zbýlých 106 nemocných zahájilo léčbu podle protokolu. Byli sledováni 12 měsíců a soubor mohl být statisticky hodnocen. Všichni nemocní dostávali primárně po stanovení diagnózy SISHL standardně léčbu kortikosteroidy (250 mg Solumedrolu v infuzi denně po dobu 3 dnů). Pokud došlo po iniciální terapii kortikosteroidy k parciální nebo celkové remisi, tito nemocní již další léčbu nevyžadovali a byli zařazeni do



standardní větvě (označujeme je v dalším „S“ – standardní větev), tvořili následně kontrolní soubor. Zbylí nemocní, nereagující na léčbu první linie, pak byli randomizováni k záchranné terapii buď reoferézou, nebo metodou Microwick.

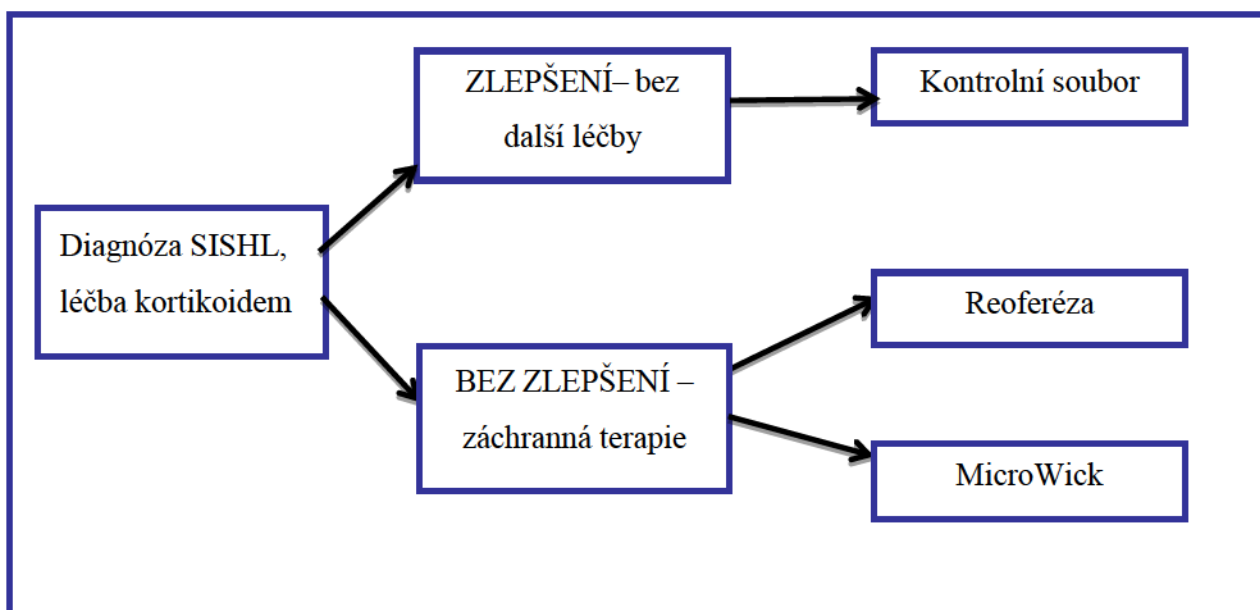
Terapie metodou MicroWick byla provedena jako paralelní otevřená prospektivní studie v rámci záchranné (sekundární) terapie – ke srovnání výsledků léčby reoferézou s léčbou „MicroWick“ (intratympanální aplikace 7,5 mg Solumedrolu). Design studie je uveden na obrázku 1. Nemocní byli do jednotlivých skupin zařazeni takto:

- Skupina S byla léčena pouze standardní léčbou 1. linie (kortikoterapie);
- Skupina R podstoupila standardní léčbu a záchrannou terapii pomocí reoferézy;
- Skupina M podstoupila standardní léčbu a záchrannou terapii pomocí systému MicroWick.

Efekt iniciální standardní terapie byl pozitivní u 54 nemocných, zbylých 52 nemocných bylo zařazeno do záchranné terapie, z těchto nemocných volilo reoferézu 33 nemocných a 19 MicroWick. (Základní demografické údaje jsou uvedeny v tabulce 6).

I v této skupině jsme se snažili najít biomarkery významné pro predikci úspěšnosti léčby, proto byli opět všichni nemocní, kteří dokončili léčbu reoferézou, rozděleni na nemocné klinicky úspěšně léčené a na neúspěšné. Kriteriem bylo zlepšení sluchu. Za úspěšné byli považováni nemocní se zlepšením sluchu na 50 % premorbidního sluchového prahu nebo více; za neúspěšně léčené byli považováni ostatní.

OBRÁZEK 1: DESIGN STUDIE – VÝZKUM Z LET 2012 – 2015



Legenda: popis viz text

TABULKA 6: DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE O NEMOCNÝCH SE SISHL

	Léčba steroidy	Reoferéza	MicroWick	p
	N = 54	N = 33	N = 19	
<b>Věk: průměr (medián)</b>	53 (38,7)	58 (44,7)	54 (29,6)	p=0,234
<b>Pohlaví muži/ženy</b>	29/25	21/12	7/12	p=0,175
<b>Vertigo (%)</b>	19	15	26	p=0,609
<b>Tinnitus (%)</b>	74	79	74	p=0,867
<b>Doba do zahájení léčby (dny, medián)</b>	4 (1,7)	10 (8,2)	9 (6,1)	p<0,001
<b>BMI (medián)</b>	25,7 (23,29)	26,6 (24,29)	24,1 (23,29)	p=0,653

Legenda: N = počet nemocných.

## 5.2 PROCEDURA REOFERÉZY

Reoferéza, nebo-li reohemaferéza, jak již bylo zmíněno výše, je dvojitá, neboli kaskádová metoda filtrace plazmy. Na našem pracovišti jsme použili vlastní modifikaci Borbergovy metody, kde je plazma primárně získávaná centrifugací kontinuálním separátorem krevních tělísek, následně získaná plazma prochází speciálním filtrem (Lánská et al. 2014).

### 5.2.1 VLASTNÍ MODIFIKACE PROCEDURY

Pro primární oddělení plazmy jsme používali kontinuální separátor Cobe Spectra, nověji pak také (a od r. 2017 výlučně) Spectra Optia (Terumo BCT, Lakewood, Colorado, USA). Pro Cobe Spectra jsme používali program verze 6.0 a separační sety SS č.70500 a pro Spectra Optia verzi 10 a 11 a separační sety č. 10 220 od stejné firmy. Ve druhém kroku plazma prochází filtrem s definovanou velikostí pór. Používali jsme filtry Evaflux 4A (Kawasumi, Tokyo, Japonsko). Filtrační membrány mají celkový povrch 2 m<sup>2</sup>, jsou vyrobeny z kopolyméru etylénu a vinylalkoholu a uspořádány do formy kapilár s vnitřním průměrem 175 µm a průměrem pórů 0,03 µm. Kapiláry jsou uzavřené v obalu z polykarbonátové pryskyřice. Filtr je umístěn a řízen přístrojem CF 100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko). Při vzestupu tlaku v kapilárách filtru nad 250 mmHg přístroj CF-100 automaticky zpětně propláchne kapiláry fyziologickým roztokem, který se spolu s odfiltrovanými částicemi odvede do odpadního vaku. Všechny sety, filtr i odpadní vak jsou určeny k jednorázovému použití.

Po průchodu filtrem se ošetřená plazma spolu s krevními buňkami vrací zpět do oběhu nemocného druhým žilním vstupem. Výkon je kontinuální, ve stejný okamžik se krev nemocnému odebírá i vrací. Množství krve, které je aktuálně v extrakorporálním oběhu je dáno použitým separátorem, pro Cobe Spectra je to 285 ml a pro Spectra Optia jeto pro tuto proceduru 141 ml.

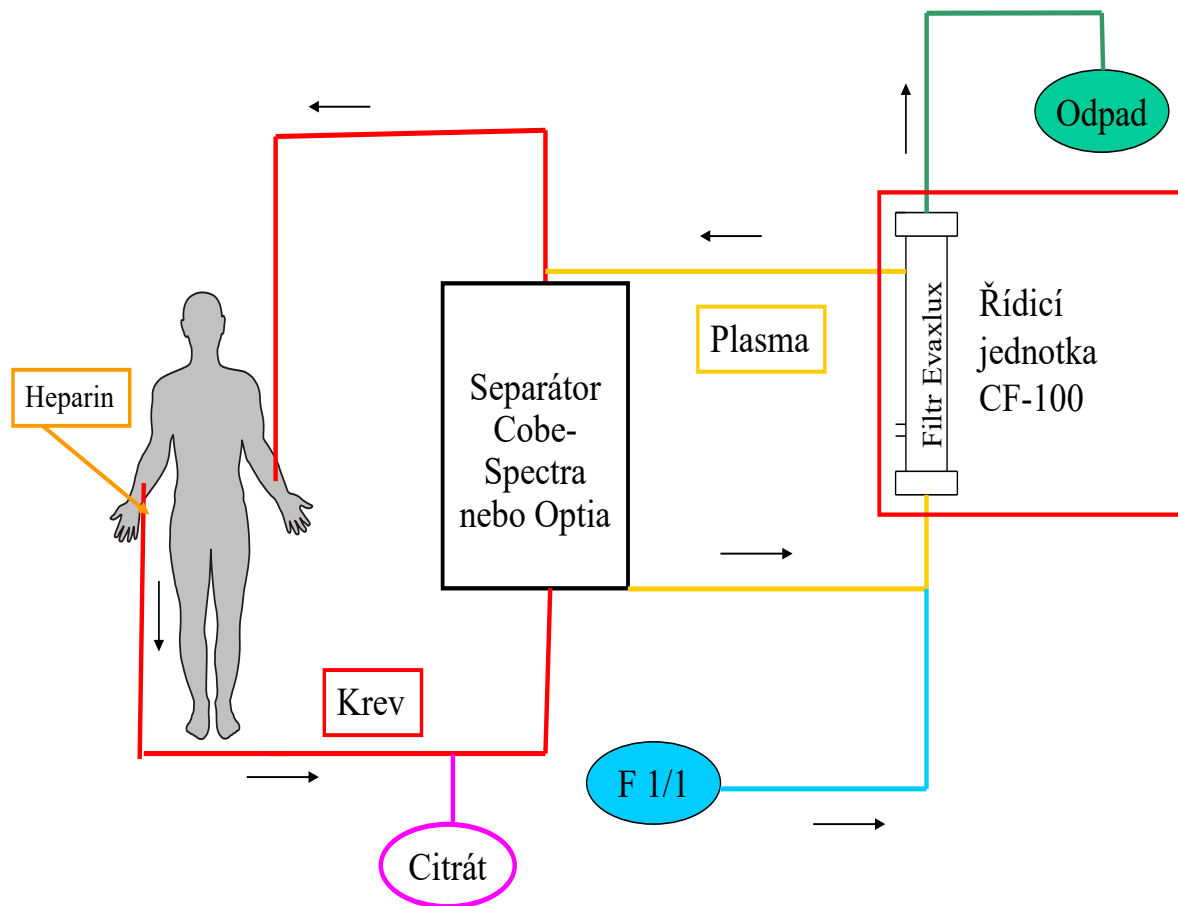
Pro výkon je nutná kontinuální antikoagulace, u reoferéz jsme použili kombinaci antikoagulačního roztoku ACD-A (Baxter, Mnichov, Německo) a úvodního jednorázového intravenózního podání nefrakcionovaného heparinu.

U nemocných s dobrým stavem periferních žil byly prováděny výkony ambulantně, přes dva periferní venózní vstupy (používají se s výhodou žíly v kubitální jamce). U nemocných s nedostatečným periferním přístupem výkon probíhá přes zavedenou dvoucestnou dialyzační kanylu v centrální žíle (většinou v. subclavia, anebo v. femoralis), výkon pak probíhá za krátké hospitalizace. Výkon trval 3-4 hodiny v závislosti na množství promyté krve a rychlosti průtoku krve, což je dáno především stavem odběrové periferní žíly. Výkon je schematicky zobrazen na schématu 2 a obrázku 2.

Pro nemocné s VPMD bylo zvoleno schéma používané ve studii MIRA-1 (Pulido, 2002); 8 procedur v 10 týdnech, týdně 2 aferézy s odstupem 2-3 dnů, následovala 14denní pauza a další série aferéz. K posílení efektu v rámci záchranné léčby je podle literárních údajů (Klingel et al. 2003a; Studnicka et al. 2013) doporučeno provádět 1-2 procedury, u našeho souboru jsme zvolili 2 procedury během 1 týdne.

Pro nemocné se SISHL jsme zvolili 3 výkony během 6-9 dnů s odstupem 2-3 dnů mezi jednotlivými procedurami.

## SCHÉMA 2: SCHÉMA REOFERÉZY



Legenda: Plazma je oddělena od krevních tělísek pomocí separátoru Cobe-Spectra nebo Optia (Terumo BCT, Lakewood, Colorado, USA) a dále čerpána do linek přístroje CF 100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko), který řídí průtok plazmy přes filtr Evaxlux (Kawasumi, Tokyo, Japonsko). Po průchodu filtrem je plazma vedena spolu s krevními elementy zpět k nemocnému.

OBRÁZEK 2: PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ PŘÍSTROJ K REOFERÉZE



Legenda: popis – viz text.

## 5.2.2 KLINICKÉ SLEDOVÁNÍ BĚHEM REOFERÉZY, NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY

Před zahájením léčby reoferézou je zhodnocen nálezn specialistů (oftalmologa, ORL specialisty), doplněna anamnéza, zejména stran případných rizik výkonu (krvácivá anamnéza, přítomnost ischemické choroby srdeční, diabetu, nekorigované hypertenze). Důležité je i pečlivé odebrání farmakologické anamnézy. Pokud nemocný užívá ACE-inhibitory, je poučen o nutnosti jejich vysazení na 24 hod. před výkonem z důvodu možné bradykininové nežádoucí reakce – viz výše. Je provedeno interní objektivní vyšetření – včetně posouzení stavu periferních žil. Nemocní jsou podrobně poučeni o výkonu a jeho možných nežádoucích reakcích a podepisují informovaný souhlas. Je jim umožněno proceduru zhlédnout in natura (při léčbě jiných nemocných) – cílem je co nejvíce odstranit neodůvodněné obavy před prvním výkonem, kdy bývá větší procento výskytu nežádoucích reakcí. Nemocný je informován o režimových opatřeních před výkonem – je vhodné vyhýbat se nadměrné fyzické aktivitě 24-48 hodin před výkonem. Pro dostatečný průtok odběrovou žílou je nutné dodržovat pitný režim (minimálně 1,5 litru tekutin denně), ráno před výkonem je nutné se nasnídat (zejména u nemocných s diabetem).

Bezprostředně před zahájením každého výkonu je provedeno aktuální upřesnění klinického stavu, změřen krevní tlak auskultační metodou a puls, je provedena kontrola léků, které nemocný užil před výkonem (zejména vysazení ACE-inhibitoru). BMI je vypočítán před zahájením první procedury podle vzorce:  $BMI = \text{váha} / \text{výška}^2$  (udáváno v jednotkách  $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

Během aferézy je nemocný neustále monitorován personálem separátorového centra. V případě závažných nežádoucích příhod těžkého stupně je zajištěna pomoc týmu jednotky intenzivní péče (přivolání alarmem kliniky a vzhledem k územní blízkosti je možná specializovaná pomoc řádově v desítkách vteřin). Po ukončení výkonu je opět změřen krevní tlak auskultační metodou a puls a je zhodnocen celkový stav nemocného.

Všechny nežádoucí účinky spojené s aferézou jsou bedlivě sledovány, zaznamenávány a následně také hodnoceny podle jednotného schématu WAA registru a odesílány elektronicky přes registrační kód do WAA registru.

## 5.3 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

Průkaz laboratorní účinnosti a hledání laboratorního korelátu klinické efektivity procedury byly mezi prvotními cíli této práce. Klasické sledování klinické účinnosti bylo sekundárním cílem – autorka se aktivně účastnila nejen při provádění reoferéz, ale i při hodnocení v závěrečných fázích výzkumu.

Podle literárních i předchozích vlastních zkušeností byl sestaven širší panel laboratorních ukazatelů s cílem sledovat, zda po reoferéze dochází ke změnám, jaká je dynamika změn - zda jde o okamžité změny po reoferéze, a nebo také dlouhodobé změny v době celého trvání léčebné série. Cílem bylo najít klinicky významné reologické nebo tzv. speciální ukazatele vhodné pro řízení léčby (co do intenzity nebo frekvence procedur) nebo ke stanovení efektu léčby a prognózy.

Vzhledem k rozdílnosti obou souborů (rozdílná diagnóza, počet i frekvence procedur, odlišné schéma laboratorních kontrol) byly obě skupiny nemocných (VPMD a SISHL) hodnoceny zvlášť. K analýzám byly od nemocných odebírány párové vzorky (předa po reoferéze).

### 5.3.1 SCHÉMA LABORATORNÍCH KONTROL

a) U nemocných s VPMD jsme prováděli laboratorní monitorování před a po výkonu, a to na začátku, uprostřed série reoferéz a na konci série s cílem zjistit, zda v průběhu 10 týdnů léčby dochází ke změně reologických poměrů v organizmu. Nemocní byli po ukončení primární série reoferéz dále klinicky sledováni v 6měsíčních intervalech specializovanými oftalmology (viz níže).

b) U nemocných se SISHL jsme prováděli odběr vzorků krve před a po prvním výkonu, následně předposledním výkonu. Další sledování bylo prováděno specializovaným otorinolaryngologem po jednom měsíci a za rok.

Provedená laboratorní vyšetření lze rozdělit do 3 skupin. 1. skupinu představují vyšetření základních laboratorních parametrů; 2. skupinu tvoří tzv. ukazatele reologické aktivity; 3. skupinu tvoří další vybraná („speciální“) vyšetření.

### 5.3.2 ZÁKLADNÍ LABORATORNÍ PARAMETRY

Níže je uveden přehled hematologických a biochemických vyšetření.

#### 5.3.2.1 Hematologická vyšetření

V hematologických parametrech bylo sledováno (metodami dle standardů FN Hradec Králové) :

- sedimentace erytrocytů,
- parametry krevního obrazu (hemoglobin, hematokrit, střední objem erytrocytů, celkový počet erytrocytů, leukocytů a trombocytů, střední objem trombocytů, destičkový hematokrit, širší distribuce histogramu destiček podle jejich objemu),
- základní koagulační parametry (APTT, PT, fibrinogen).



Pozn.: Fyziologické meze výše uvedených parametrů jsou v příloze 1.

### 5.3.2.2 Biochemická vyšetření

V biochemickém profilu ze séra jsme sledovali (metodami dle standardů FN Hradec Králové):

- glykémii, sodík, draslík, chloridy, vápník, fosfor, ureu, kreatinin, kyselinu močovou, celkový bilirubin, alaninaminotransferázu, aspartátaminotransferázu, kreatinkinázu, gamaglutamyltranspeptidázu, alkalickou fosfatázu, celkovou bílkovinu, albumin.

Pozn: fyziologické meze jsou uvedené v příloze 1.

### 5.3.3 REOLOGICKY ÚČINNÉ PARAMETRY

Jako reologicky účinné parametry jsme zvolili a vyhodnotili celé spektrum reologicky účinných vysokomolekulárních proteinů podle Klingela et al. (Klingel et al. 2003a), použité metody jsou dle standardů FN Hradec Králové:

- Viskozitu krve a plazmy. Poznámka: Naše pracoviště využívá měření dynamické viskozity na viskozimetru AMETEK Brookfield DV2TLVCJ0 (firma AMETEK, Brookfield, Midleboro, MA, USA), s vřetenem označeným CPA-40Z.
- Spektrum lipoproteinů (celkový cholesterol, LDL-cholesterol, lipoprotein(a), apolipoprotein B).
- Fibrinogen,  $\alpha_2$ -makroglobulin.
- Hladinu imunoglobulinů (IgM).

Pozn: fyziologické meze jsou uvedené v příloze 1.

## 5.4 SPECIALIZOVANÁ VYŠETŘENÍ

Klinické výsledky léčby byly dlouhodobě sledovány specializovanými oftalmology a otorinolaryngology podle níže uvedených pravidel.

### 5.4.1 OFTALMOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ

Všichni nemocní zařazení do léčeného i kontrolního souboru byli komplexně vyšetřeni na oční klinice před zahájením série reoferéz a po 4 a 8 týdnech (tj. na začátku, uprostřed a po ukončení série 8 léčebných procedur), poté každých 6 měsíců. Základní oftalmologické vyšetření vždy zahrnovalo hodnocení NKZO (nejlépe korigovaná zraková ostrost) na ETDRS optotypech, retinofotografii v arteficiální mydriáze, optickou koherentní tomografií (OCT).

OCT umožnila získat průřez všemi 10 vrstvami sítnice optickým paprskem. Pomocí ní lze určit uložení drúz, stanovit tloušťku sítnice a anatomických změn zejména v oblasti



fotoreceptorů (ve vrstvě elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů). Výsledky odpovídají histologickému řezu živé funkční tkáně.

Ke sledování vývoje měkkých drúz a k hodnocení plochy drúzového odchlípení RPE (DPED) byl nejdříve používán program Reconstruct, který však umožňoval porovnání plochy DPED pouze v arbitrárních jednotkách (Langrová et al. 2018; Rozsival et al. 2011). Postupně byl nahrazen programem Visupac (firma Zeiss, Jena, Německo) umožňujícím objektivní a přesné hodnocení plochy DPED v mm<sup>2</sup> před léčbou a na konci sledování.

Fluorescenční angiografie jako kontrastní vyšetření sítnicových cév se zobrazením možné patologie byla provedena před léčbou, po 8 týdnech a v ročních intervalech nebopři podezření na progresi onemocnění.

V indikovaných případech bylo provedeno kontrastní vyšetření vaskulatury cévnatky pomocí angiografie s indocyaninovou zelení (ICG angiografie).

Dále byla provedena elektrofyziologická vyšetření k objektivnímu zjištění funkčního stavu sítnice: a) záblesková elektoretinografie testující funkci vnější i vnitřní části sítnice (fotoreceptorů spojených s bipolárními buňkami, dále amakrinních buněk vnitřní části sítnice a dalších gliových buněk i vmezeřených neuronů); b) multifokální elektoretinografie (MfERG) specificky detekující lokalizované, drobné změny aktivity čípků a jejich bipolárních buněk centrální oblasti sítnice; c) ERG na reverzační podnět (pERG) snímající aktivitu gangliových buněk lokalizovaných ve vnitřních vrstvách sítnice (Kurtenbach et al. 2015; Rencova et al. 2015; Rozsival et al. 2011).

#### **5.4.2 OTORINOLARYNGOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ**

Diagnóza náhlé ztráty sluchu byla stanovena podle definice SISHL: ztráta sluchu minimálně o 30 dB na 3 sousedících frekvencích, vznikuvší náhle (v průběhu 72 hodin) (Stew et al. 2012).

Diagnostika SISHL se opírala o kompletní anamnézu, fyzikální vyšetření a z objektivních vyšetření o specializovaná ORL vyšetření, především o tónovou audiometrii (viz definice SISHL). Onemocnění se jeví sice klinicky jako uniformní (náhlá ztráta sluchu), ale může jít o heterogenní příčiny. Rozhodujícím vyšetřením, vylučujícím organické postižení (jinou příčinu ztráty sluchu), byla především zobrazovací vyšetření - počítačová tomografie mozku s podáním kontrastní látky (CT), resp. magnetická rezonance (MRI).

Přehled a stručná charakteristika vyšetření, provedených u všech nemocných:

- Tónová audiometrie - standardní, subjektivní metoda měření sluchového prahu; je „zlatým standardem“ pro hodnocení typu, tíže a charakteru sluchové ztráty.

- Hodnocení sluchu - bylo prováděno metodikou dle Fowlera (metodiku lze nalézt na elektronickém portálu Lékařské fakulty UK Hradec Králové, dostupné z: <http://www.eorl.cz/kniha/03-ORL-VYSETROVACI-METODY.pdf>), která zohledňuje význam ztráty sluchu v jednotlivých frekvencích důležitých pro porozumění řeči (Hybasek and Vokurka 2010).
- Slovní audiometrie - je nejčastějším typem testu tzv. řečové audiometrie. Slovní audiometrie hodnotí schopnost opakovat správně soubor slov ve standardizovaném testu.
- Impedanční audiometrie - patří mezi objektivní audiometrická vyšetření, zahrnuje vyšetření tympanometrické a vyšetření stapediálního reflexu.
- Sluchové kmenové potenciály (BERA) - vyšetření kmenových evokovaných sluchových potenciálů je test, ve kterém je zaznamenáván bioelektrický potenciál šířící se jako reakce na akustický klik sluchovým nervem a oblastmi mozku kmene (Hybasek and Vokurka 2010).

Audiometrické vyšetření (slovní, tónová, impedanční audiometrie) a vyšetření sluchových kmenových potenciálů (BERA) se provádělo standardně u všech nemocných podstupujících reoferézu před první, po druhé a třetí proceduře.

### 5.4.3 LÉČBA METODOU MICROWICK

U skupiny 19 nemocných se SISHL byla použita léčba metodou MicroWick – viz výše, kapitola 5.1.2. Soubor nemocných.

Stručný popis metody: za standardních podmínek byl na operačním sále očištěn zvukovod a bubínek poškozeného ucha a v místní anestezii 10% lidokainem provedena myringotomie v postero-inferiorním kvadrantu. Skrz bubínek byla vložena trubička Silersteinova systému MicroWick nasávkavým knotem směrem k okrouhlému okénku a pokapána roztokem dexametasonu (4mg/ml). Nemocný byl poučen, aby kapal 4x denně 2 kapky dexametasonu do zevního zvukovodu, a to po dobu jednoho měsíce.

### 5.4.4 SPECIÁLNÍ VYŠETŘENÍ

Během výzkumu byla prováděna další vybraná („speciální“) vyšetření, která by mohla upřesnit sledování chorob, bezpečnost léčby, ale také zajistit dosažení nových a unikátních poznatků. Vycházeli jsme z vlastních i literárních zkušeností (Bláha et al. 2004; Borberg and Tauchert 2006; Klingel et al. 2000). Jde o markery, které by mohly svědčit pro aktivitu zánětlivou (IL-10), markery stavu buněčné imunity (MCP-1, solubilní antigen CD40), aktivity endotelu (endoglin, adhezní molekuly, např. selektiny) nebo markery apoptózy (sAPO-1/Fas).

### **Principy vyšetření:**

Sérové hladiny hsCRP stanoveny imunonefelometricky pomocí analyzátoru IMMAGE 800 firmy Beckman (California, Ca, USA) a imunoreagencií téže firmy.

Koncentrace IL-10, sAPO-1/Fas a MCP-1 byly stanoveny pomocí komerčních ELISA kitů firmy Bender MedSystems (Wien, Austria).

Hladiny sCD40L, endoglinu (sCD105) a sP-selektinu byly změřeny za použití ELISA souprav firmy R&D Systems, Minneapolis, USA.

## **5.5 STATISTICKÁ HODNOCENÍ**

Data byla shromažďována a analyzována podle standardních pravidel vědecké práce. Kvantitativní data byla testována na normalitu, v případě normálního rozdělení byly hodnoty uvedené jako průměr a SD a pro hodnocení významnosti změny použít t-test, v ostatních případech byl uveden medián a interkvartilové rozpětí (25.-75. percentil) a použity neparametrické testy: Mann-Whitneyův a Wilcoxonův test. K testování rozdílů mezi skupinami, byl použit dvouvýběrový t-test a Mann-Whitneyův test, pro párové rozdíly před a po výkonu pak párový t-test a Wilcoxonův test. Pro porovnání kvalitativních dat jsme použili  $\chi^2$  test. Při korelační analýze byl použit Pearsonův korelační koeficient R a spočtena hodnota p. Za statisticky významnou změnu byla brána smluvní hodnota  $p < 0,05$ . K výzkumu predikce prognózy byla použita diskriminační analýza.

K výpočtům byl použit software SigmaPlot verze 13 (Systat Software, Chicago, IL, USA). Základní výpočty provedla autorka za pomoci software Systat 13. Další hodnocení provedl statistik – člen řešitelského týmu výzkumného úkolu AZV, FN č. 9010 - ing. Kvasnička. Statistická hodnocení byla konzultována s Oddělením výpočetní techniky LF UK (RNDr. Čermáková).

## **6 VLASTNÍ VÝSLEDKY**

Bylo provedeno a zhodnoceno celkem 748 reoferéz. Přehled je uveden v tabulce 7. Hodnocení bylo provedeno podle vlastního protokolu: výskyt nežádoucích reakcí u reoferéz, laboratorní ukazatele (dynamika jejich změn před a po reoferéze) a klinická účinnost terapie včetně pátrání po možných signifikantních ukazatelích účinnosti reoferéz. Vzhledem k rozdílnosti obou souborů jsme rozdělili i vlastní výsledky do dvou skupin: nemocní s VPMD a se SISHL.

TABULKA 7: PŘEHLED PROVEDENÝCH REOFERÉZ

	<b>Celkem</b>	<b>VPMD</b>	<b>SISHL</b>
<b>Počet reoferéz</b>	748	626	122
<b>Počet nemocných</b>	112	71	41

Legenda: popis viz text.

## 6.1 SOUBOR NEMOCNÝCH S VPMD

Léčba VPMD reoferézou byla těžištěm naší činnosti. U nemocných s VPMD byla provedena většina reoferetických výkonů (83,7 %).

### 6.1.1 PROCEDURA REOFERÉZY – VPMD

Ve sledovaném souboru 71 nemocných s VPMD bylo provedeno celkem 626 procedur, 551 výkonů v rámci základního plánovaného cyklu a 75 přídavných reoferéz.

U tří nemocných byla léčba předčasně ukončena po 2. výkonu. Důvodem byl nevyhovující stav žil (2 nemocné) a jednou přání nemocné. Jeden nemocný (cizinec) byl léčen reoferézou jako samoplátce mimo protokol, celkem u něj bylo provedeno 9 reoferéz. Plánovaný cyklus léčby (8 reoferéz během 10 týdnů) byl dokončen u 67 nemocných (94,4 %).

V pozdější fázi sledování bylo u 32 nemocných přidáno celkem 75 aferéz. U první pilotní skupiny 8 nemocných bylo při známkách možné progresse onemocnění (zejména pokles NKZO, nález dalších drúz, anebo drúzového odchlípení retinálního pigmentového epitelu) přidáno celkem 27 reoferéz (medián 3 výkony/nemocného, rozmezí 1-7 výkonů). Přidání aferéz v této skupině nemocných probíhalo v nepravidelných intervalech, průměrně 12,8 měsíců od ukončení primárního cyklu (rozmezí 3-27 měsíců). Předběžné výsledky léčby této pilotní skupiny nás vedly k domněnce, že by část nemocných mohla profitovat z posílení efektu léčby („booster therapy“) po 1,5-2,5 letech od základního cyklu. Do výzkumného programu byla proto zařazena přídavná terapie. Tak bylo v r. 2012-2015 u 24 nemocných přidáno celkem 48 výkonů (vždy 2 výkony v průběhu 1 týdne), průměrně 19 měsíců (rozsah 5-64 měsíců) od ukončení prvního cyklu reoferéz.

Poznámka: název přídavná, „booster therapy“ byl zvolen pro tento typ léčby autory: (Klingel et al. 2003a; Studnicka et al. 2013).

U všech nemocných byl použit periferní žilní přístup, výkony byly prováděny ambulantně. Množství ošetřené plazmy se pohybovalo v rozmezí 0,5-1,6násobku objemu

plazmy nemocného (tento údaj vypočítá počítač separátoru na základě váhy, výšky a hematokritu nemocného). Vstupní rychlost průtoku krve separátorem byla v rozmezí 35-70 ml/min, rychlost bylo nutno upravovat individuálně v závislosti na stavu periferních žil. Pro nebezpečí nežádoucích příhod (zejména bradykininové reakce) jsme v úvodu procedury začínali vždy s menší rychlostí (35-40 ml/min.) s postupným zvyšováním průtoku dle možností periferního žilního přítoku a dle tolerance pacienta s cílem 70 ml/min. Jako antikoagulaci jsme u všech nemocných použili kombinaci ACD-A a úvodního intravenozního podání heparinu v dávce 4000 j. U nemocných trvale užívajících antikoagulační terapii (LMWH, kumariny) se dávka heparinu snižovala na 2000-3000 j. Roztok ACD-A jsme používali v poměru ke krvi 1:22. Jednotlivý výkon trval průměrně 161,6 minut. Sledované parametry jednotlivých výkonů jsou v tabulce 8.

TABULKA 8: ZÁKLADNÍ PARAMETRY PROCEDUR U NEMOCNÝCH S VPMD

Parametry	Průměr	SD	Medián	IQR	Rozsah (min-max)
<b>Promytý objem plazmy (ml)</b>	3467,7	1027	3431	2666-4114	1702-7207
<b>Promytý objem/objemplazmy nemocného</b>	1,05	0,43	1	0,7-1,4	0,5-1,6
<b>Průtok krve (ml/min)</b>	-	-	-	-	35-70
<b>Množství ACD (ml)</b>	529,9	97,5	528	422-547	331-703
<b>Počet proplachů filtru</b>	0,5	0,97	0	0-1	0-4
<b>Trvání výkonu (min)</b>	161,6	35,5	156,5	138-187	94-271

Legenda: SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; min = minimální hodnota; max = maximální hodnota.

Pozn.: U průtoku krve jsou uvedené pouze minimální až maximální hodnoty, protože průtok byl průběžně adaptován – zpočátku obvykle 35 ml/min. s rychlým vzestupem až do maximální možnosti přítokové žíly, což činilo zpravidla 70 ml/min.

### 6.1.2 HODNOCENÍ VÝSKYTU NEŽÁDOUCÍCH REAKCÍ - VPMD

Z celkového množství 626 procedur u VPMD musely být pouze 2 procedury předčasně ukončeny – jedenkrát došlo k rozvoji bradykininové reakce (nemocný před výkonem užil ACE inhibitor a neinformoval o tom personál) a jedenkrát to bylo způsobeno technickou závadou na separátoru (porucha centrifugy).

Ostatní komplikace vzniklé v průběhu reoferézy, hodnocené jako mírné nebo střední („mild“ nebo „moderate“ dle CTCAE v. 4.03/2009), nevedly k předčasnému ukončení reoferézy. U 6 výkonů byly problémy s opakovanými vpichy pro horší stav periferních žil nebo hydratace, 2x došlo ke vzniku většího hematomu. Dále jsme se pozorovali krátkodobou hypotenzi s bradykardií (6x), neurovegetativní reakce jako nevolnost, slabost nebo přechodné zarudnutí v obličejí při zahájení návratu ošetřené plazmy nemocnému (10x), zvracení (2x). Všechny tyto obtíže byly přechodné, obvykle vymizely při krátkém pozastavení procedury, jen někdy bylo třeba podání malého množství krystaloidů (F 1/1 250 ml). Citrátovou toxicitu jsme zaznamenali pouze výjimečně, celkem 5x - pouze mírné brnění obličejí, konečků prstů. Nízký výskyt této komplikace je spojen s celkově menším množstvím použitého roztoku ACD-A, proto u nemocných léčených reoferézou nepoužíváme standardně profylaktické podávání kalcia; nemocné pečlivě sledujeme a při prvních příznacích podáváme intravenózně 10% Calcium gluconicum v krátké infuzi s F 1/1. K přetížení tekutinami nedošlo ani u jednoho nemocného, hrazení tekutin bylo nastaveno separátorem standardně na 110-115 %.

Souhrnně lze konstatovat, že pokud jde o nežádoucí reakce v přímé souvislosti s reoferézou, byl jejich počet 24. (Pozorovanou nutnost opakovaných vpichů při špatném stavu periferních žil – celkem 6x a 2 malé podkožní hematomy, stejně jako jednu poruchu přístroje počítáme mezi technické obtíže). Jde tedy o 3,8 % příhod ze všech provedených reoferéz u VPMD.

Poznámka: Přehled sledovaných a zjištěných nežádoucích reakcí u obou souborů ukazuje přehledně tabulka 19 (nežádoucí reakce jsou uvedeny společně se souborem SISHL, kapitola 6.2.2.).

### 6.1.3 KLINICKÁ ÚČINNOST LÉČBY VPMD

Ve vyšetřovaném souboru jsme prováděli pravidelné specializované oftalmologické sledování výše uvedených parametrů (viz kapitola 5.4.1). Z 67 nemocných s VPMD, kteří ukončili celou sérii 8 procedur, byla účinnost hodnocena u 66 nemocných, 1 nemocná nebyla pak dále sledována. U 52 nemocných (78,8 %) byla léčba hodnocena jako úspěšná, z toho bylo 20 mužů a 32 žen. U 14 nemocných (21,2 %) došlo ke zhoršení VPMD, z toho bylo 9 mužů a 5 žen.

Klinická účinnost reoferézy (NKZO, morfologické změny a funkční změny na sítnici) byla hodnocena u nemocných i v rámci úkolu MZ ČR, číslo: NT 14037-3/2013 (číslo úkolu u FN: 9045, v roce 2013-2015). V této době bylo již možné dokonalejší hodnocení - pomocí moderního typu spektrálního OCT 3 (Zeiss, Jena, Německo) s vysokou rozlišovací schopností

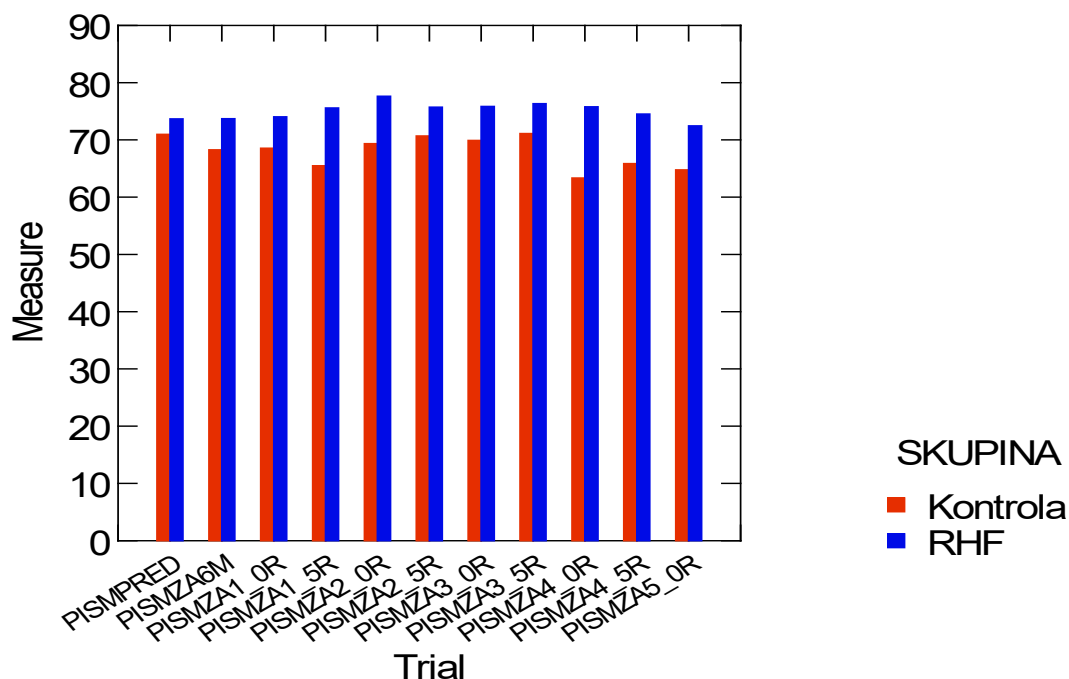
detekovat morfologické změny i v oblasti zevních a vnitřních segmentů fotoreceptorů, zejména ve vrstvě elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů. Tím bylo možno upřesnit patologické změny neuroretiny v důsledku odchlípení vrstvy pigmentového epitelu sítnice a jejich změny po reoferéze a ověřit vliv na funkční stav sítnice, což dosud v literatuře chybí. V této době také byla zavedena metoda Visupac (Zeiss, Jena, Německo), která nahradila v dřívějším výzkumu používanou metodu Reconstruct - námi publikovanou v Acta Scandinavica r. 2011 (Rencova et al. 2011). Takto bylo léčeno a podrobně klinicky vyhodnoceno celkem 65 nemocných s postižením 85 očí a kontrolních 54 očí u 44 nemocných, 1 nemocná (samoplátkyně) neměla kompletní oftalmologické sledování po léčbě.

#### **6.1.3.1 Nejlépe korigovaná zraková ostrost (NKZO)**

Ve sledované skupině nemocných léčených reoferézou jsme zjistili vstupní NKZO (průměr/medián) 73,6/80 písmen ETDRS optotypových tabulí (rozsah: 10-85 písmen), v průběhu sledování NKZO jen nevýznamně kolísala. Za 5 let sledování dosahovala průměrné/mediánové hodnoty 73,8/80 písmen (15-85 písmen) a lišila se od výchozí hodnoty také jen nevýznamně ( $p = 0,73$ ). Do 2 let sledování se NKZO nevýznamně zvyšovala, poté je nicméně patrný trend jejího poklesu (viz graf 2).

V kontrolní skupině nemocných byla průměrná/mediánová vstupní NKZO 71,2/79 písmen ETDRS optotypů (10-85 písmen). Během sledovací doby se zraková ostrost snižovala, do 4 let nevýznamně, poté již statisticky významně ( $p < 0,05$  a  $p < 0,01$ ). Za 5 let poklesla průměrná/mediánová NKZO na 64,8/74 písmen (10-85 písmen), pokles byl významný ( $p = 0,031$ ), viz graf 2. Rozdíly NKZO mezi oběma skupinami nemocných byly na začátku až do 4 let sledování jen nevýznamné. Od 4 let sledování byla NKZO kontrolní skupiny významně nižší v porovnání s nemocnými léčenými reoferézou ( $p < 0,05$  a  $p < 0,01$ ).

GRAF 2: VÝVOJ NKZO NEMOCNÝCH V ČASE - SLOUPCOVÝ GRAF



Legenda: RHF = reoferéza. Na ose x: PISM = počet přečtených písmen před výkonu, za 6 měsíců, následně v 0,5ročních intervalech. Na ose y je počet přečtených písmen dle ETDRS.

### 6.1.3.2 Morfologické změny

Při morfologickém vyšetření jsme hodnotili jako zlepšení nálezu zmenšení plochy měkkých drúz o > 25% původní plochy, bez zvratu do DPED, dále zmenšení (o > 25 % původní plochy) či úplné vymizení DPED bez vzniku následné atrofie RPE, bez přechodu do 3. stadia VPMD. Hodnocení beze změny znamená stabilizaci nálezu v rozmezí  $\pm$  25% původní plochy patologických změn (plocha drúz, DPED). Za mírné zhoršení považujeme progresi plochy měkkých drúz a zvětšení plochy DPED o >25 % původní plochy, vznik izolované atrofie RPE s postižením centrální foveoly (CF) a také vznik pigmentací v této lokalizaci. Za výrazné zhoršení VPMD považujeme vznik geografické atrofie a zvrato vlhké formy VPMD na základě rozvoje nové CNV.



Ve skupině léčených nemocných jsme hodnotili 85 očí (42x OP; 43x OL). Zlepšení nastalo u 53 očí (28x OP a 25x OL), bez významných změn zůstalo 16 očí (5x OP a 11x OL), mírné zhoršení s rozvojem atrofie nebo s rozvojem nového, plošně malého DPED jsme pozorovali u 10 očí. Významné zhoršení do 3. stadia VPMD jsme diagnostikovali u 6 očí. Z toho u 2 očí se rozvinula CNV, 1x do 5 let a 1x až po 7 letech. U 4 očí došlo k progresi do geografické atrofie, z toho 3x zasahující do centrální foveoly s poklesem zrakové ostrosti (viz tabulka 9).

V kontrolní skupině 54 očí (27x OP; 27x OL) zlepšení nastalo jen u 4 očí (2x OP a 2x OL), bez významných změn zůstaly 2 očí (1x OP a 1x OL). Zhoršení nálezu s rozvojem atrofie RPE a pigmentací jsme pozorovali u 28 očí (15x OP; 13x OL). Významné zhoršení do 3. stadia VPMD jsme diagnostikovali dokonce u 20 očí (9x OP; 11x OL). U 11 očí (5x OP; 6x OL) se rozvinula CNV. U 5 očí (4x OP; 1x OL) došlo k progresi do geografické atrofie, která ve 100 % případů dosahovala do centrální foveoly s významným poklesem zrakové ostrosti (viz tabulka 9). Rozdíl mezi skupinou léčenou reoferézou a kontrolní skupinou byl statisticky významný ve prospěch nemocných léčených reoferézou ( $p < 0,0001$ ).

TABULKA 9: VÝVOJ MORFOLOGICKÝCH ZMĚN VE SKUPINÁCH NEMOCNÝCH S VPMD

Morfologie	Reoferéza (85 očí)	Kontrolní skupina (54 očí)
<b>Zlepšení</b>	62,3 % (53/85)	7,4 % (4/54)
<b>Beze změny</b>	18,8 % (16/85)	3,7 % (2/54)
<b>Mírné zhoršení</b>	11,8 % (10/85)	51,9 % (28/54)
<b>Významné zhoršení</b>	7,1 % (6/85)	37,0 % (20/54)
<b>Vznik CNV</b>	2,4 % (2/85)	20,4 % (11/54)

Legenda: CNV = chorioidální neovaskularizace.

### 6.1.3.3 Drúzová ablace retinálního pigmentového epitelu (DPED)

Před léčbou bylo DPED přítomno u 56 očí (28x OP a 28x OL). Po zahájení léčby do 5 let sledování jsme zaznamenali zmenšení plochy DPED u 45 očí (23x OP a 22x OL). Z toho úplné vymizení DPED jsme pozorovali u 6 očí (3x OP a 3x OL), u 4 očí z nich bez projevů atrofie RPE. U 2 očí jednoho nemocného se po vymizení DPED rozvinula výrazná atrofie RPE, zřejmě po původně plošně veliké DPED doprovázené poklesem zrakové ostrosti. U 1 oka tohoto nemocného progredovalo onemocnění s rozvojem CNV po 7 letech od léčby. Jen u 3 očí se zmenšením plochy DPED

se rozvinula geografická atrofie. DPED zůstalo bez významných změn u 5 očí (2x OP a 3x OL). Zvětšení plochy DPED jsme zjistili u 6 očí, z toho u 2 očí jedné nemocné s rozvojem CNV do 1 roku po léčbě. Nově vzniklou DPED jsme zjistili u 2 očí (1x OP a 1x OL), na jednom oku z nich vznikla CNV za 3 roky po léčbě. Údaje jsou shrnuty v tabulce 10.

V kontrolní skupině bylo DPED u 20 očí (9x OP a 11x OL). Po zahájení sledování do 5 let jsme zaznamenali zmenšení plochy DPED u 10 očí (7x OP a 3x OL). Vymizení DPEDu 2 očí a zmenšení plochy DPED u 2 očí doprovázel rozvoj CNV, zmenšení plochy DPED bylo nahrazeno rozvojem geografické atrofie u 2 očí (1x OP a 1x OL). Ke zlepšení se zmenšením DPED došlo u jediného oka. DPED zůstalo bez významných změn u 2 očí (2x OL). Zvětšení plochy DPED jsme zjistili u 8 očí (2x OP, 6x OL), u jedné nemocné s rozvojem CNV do 1 roku sledování. U 10 očí v kontrolní skupině došlo k rozvoji nové DPED. Rozdíly mezi nemocnými léčenými reoferézou a kontrolní skupinou (uvedené v tabulce 10) ve zmenšení DPED jsou významné ve prospěch léčených nemocných na úrovni  $p < 0,001$ .

Průměrná velikost DPED byla na začátku sledování u nemocných léčených reoferézou  $6,78 \pm 3,79 \text{ mm}^2$ , na konci sledování se zmenšila na  $4,13 \pm 3,84 \text{ mm}^2$  ( $p < 0,001$ ). U nemocných v kontrolní skupině byla průměrná velikost DPED na začátku sledování  $4,09 \pm 3,48 \text{ mm}^2$ , na závěr sledování se zvětšila na  $6,69 \pm 4,2 \text{ mm}^2$  ( $p = 0,001$ ). Grafické porovnání změny ploch DPED mezi oběma skupinami na začátku a na konci sledování ukazuje graf 3. Porovnání velikosti DPED mezi skupinami je shrnuto v tabulce 11.

TABULKA 10: ZMĚNY DPED V ČASE VE SKUPINÁCH NEMOCNÝCH S VPMD

<b>DPED</b>	<b>Reoferéza (56 očí)</b>	<b>Kontrolní skupina (20 očí)</b>
<b>Zmenšení plochy</b>	80,4 % (45/56)	50,0 % (10/20)
<b>Beze změny</b>	8,9 % (5/56)	10,0 % (2/20)
<b>Zvětšení plochy</b>	10,7% (6/56)	40,0 % (8/20)
<b>Nově vzniklé DPED</b>	3,6% (2/56)	50,0 % (10/20)

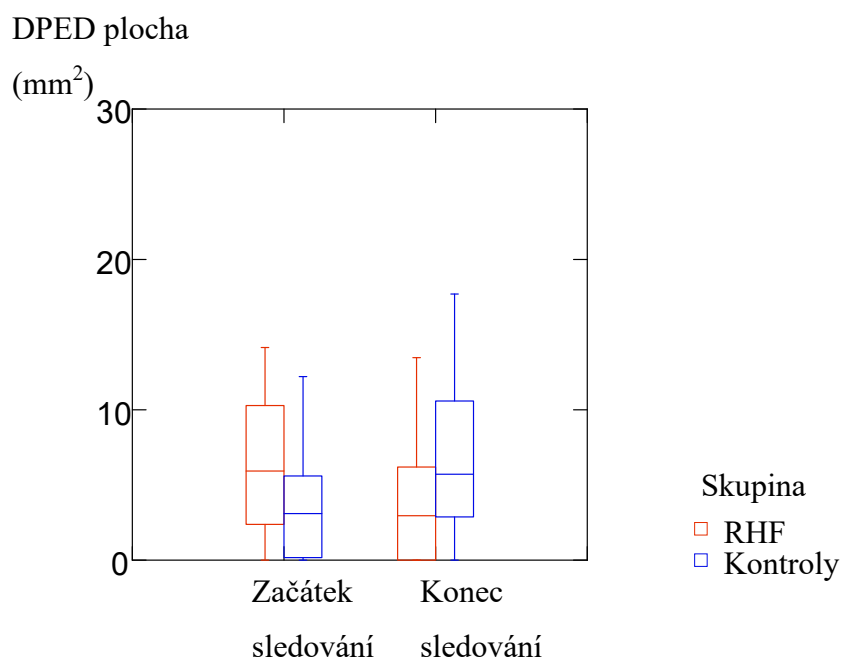
Legenda: DPED = drúzové odchlípení pigmentového epitelu.

TABULKA 11: PLOCHA DPED NA ZAČÁTKU A KONCI SLEDOVÁNÍ

DPED (mm <sup>2</sup> )	Začátek		Konec sledování		Statistická významnost
	Průměr	SD	Průměr	SD	
<b>Reoferéza</b>	6,78	3,79	4,13	3,84	p < 0,001
<b>Kontroly</b>	4,09	3,48	6,69	4,2	p < 0,001
<b>Statist. významnost</b>	p = 0,012		p = 0,015		-

Legenda: DPED = drúzové odchlípení pigmentového epitelu; SD = směrodatná odchylka průměru.

GRAF 3: ZMĚNY DPED VE SKUPINÁCH NEMOCNÝCH NA ZAČÁTKU A NA KONCI SLEDOVÁNÍ



Legenda: DPED = drúzové odchlípení pigmentového epitelu, RHF = reoferéza.

#### 6.1.3.4 Stav vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů

Poznámka: vrstva elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů byla původně nazývána „junkce zevních a vnitřních segmentů fotoreceptorů (IS/OS junkce)“.

Ukázalo se, že aktivita sítnice je stabilizována, nebo se může dokonce mírně zlepšit v případě časných pozitivních strukturálních změn (přiložení DPED a vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů bez rozvoje defektů zasahujících do foveolární oblasti) po léčbě pokročilé suché formy VPMD reoferézou. Naproti tomu u nemocných

s dlouhotrvajícími anatomickými změnami (DPED, odchlípením vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů), nebo progresí do geografické atrofie, či vlhké formy onemocnění, se aktivita sítnice snižuje.

Na začátku sledování byla u skupiny léčené reoferézou (22 očí) vrstva elipsoidů intaktní u 6 z 22 sledovaných očí (27,3 %) a u všech těchto očí zůstala intaktní i za 2,5 roku. U zbylých 16/22 očí (72,7 %) bylo DPED provázeno odchlípením vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů bez jejího defektu u 15/22 očí. Na konci sledování zůstalo 9 z těchto 15 očí (60 %) bez defektu vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů, defekty nově vznikly u 6 očí. Na konci sledování byl defekt diagnostikován celkem u 7 z 22 očí (31,8%), pouze u 4 z nich dosahoval defekt elipsoidů do foveoly a negativně ovlivnil zrakovou ostrost.

V kontrolní skupině (18 očí) na začátku sledování byla vrstva elipsoidů intaktní u 6 z 18 očí (33,3 %). U zbylých 12/18 očí (66,7 %) bylo DPED provázeno odchlípením vrstvy elipsoidů, bez defektu vrstvy elipsoidů bylo 9 očí, defekt měly 3 očí. Na konci sledování zůstala vrstva elipsoidů intaktní u 3/6 očí (50,0 %). U všech 9 očí s odchlípením vrstvy bez defektu došlo k rozvoji defektů, takže celkem defekt byl na konci sledování diagnostikován u 15/18 očí (83,3%), z nichž 12 dosahovalo do oblasti foveoly a negativně ovlivnilo zrakovou ostrost. Navíc u 6 očí původním odchlípením vrstvy se rozvinula CNV.

Rozvoj CNV často předchází ruptura odchlípené vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů později následovaná rozvojem otoku vnitřních vrstev sítnice.

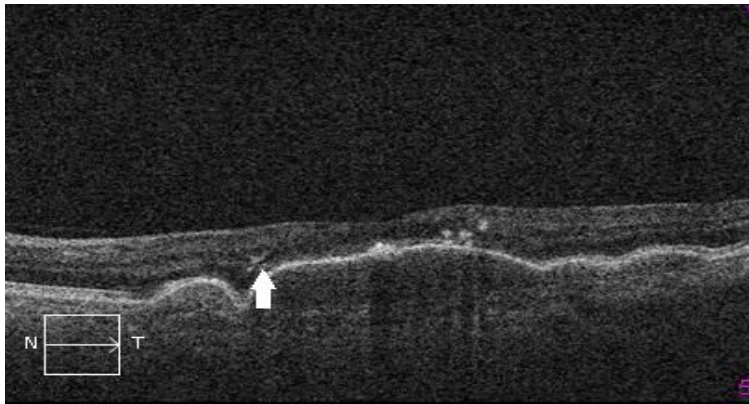
### 6.1.3.5 Elektroretinografie

Regresní analýza potvrdila jen nevýznamné kolísání amplitud foveolární aktivity u obou skupin nemocných. V parafoveolární, paramakulární i v periferních oblastech jsme u nemocných léčených reoferézou zjistili poměrně stabilní odpovědi až do 4 let pozorování, poté nastává pokles aktivity, který je převážně jen nevýznamný. Naproti tomu u kontrolní skupiny se amplitudy odpovědi snižují významně od 4 let sledování a v tomto období jsou také významně nižší v porovnání s léčenou skupinou, zatímco předtím se lišily nevýznamně. Centrální aktivita sítnice vzrostla u léčené skupiny s včasným poklesem nebo opětovným přiložením DPED. Naproti tomu u nemocných s dlouhotrvajícím nebo perzistentním DPED se aktivita sítnice a NKZO může i zhoršit.

Jako příklad k praktickému dokreslení klinické účinnosti léčby reoferézou jsou na obrázku 3 znázorněny změny některých oftalmologických vyšetření u konkrétního nemocného před zahájením léčby reoferézou a na dalším obrázku po ukončení léčby (obrázek 4).

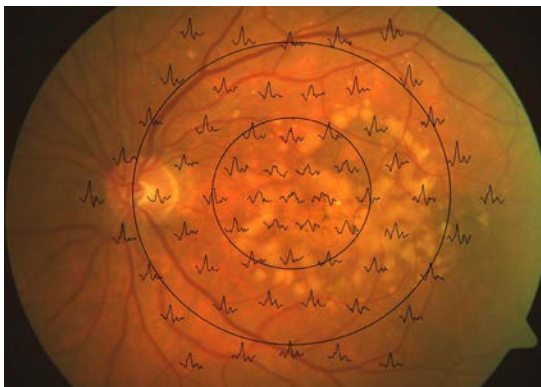
OBRÁZEK 3: OFTALMOLOGICKÝ NÁLEZ NEMOCNÉ PŘED REOFERÉZOU

A) OCT levého oka nemocné před reoferézou.



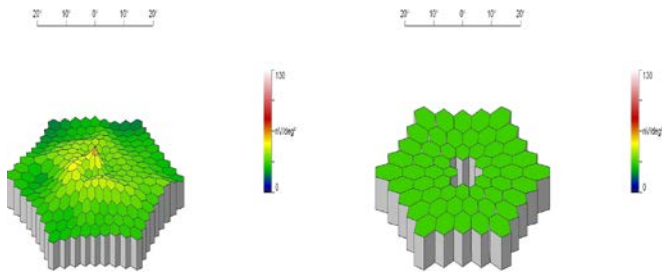
Legenda: Od rozsáhlé drúzové ablace retinálního pigmentového epitelu se začíná odchlípnout tenká vrstvička elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů (šipka).

B) Superpozice mfERG odpovědi na fundu levého oka nemocné.



Legenda: Šedesát jedna místních odpovědí multifokálního ERG superponovaných na funduskopickém obrázku levého oka s maximální odpovědí ve foveole a do periferie se snižující aktivitou.

C) Trojrozměrný obraz mfERG.



Legenda: vlevo trojrozměrný obraz elektrické aktivity sítnice levého oka nemocné; vpravo porovnání s věkovou normou (pokles aktivity foveolární a parafoveolárních odpovědí).

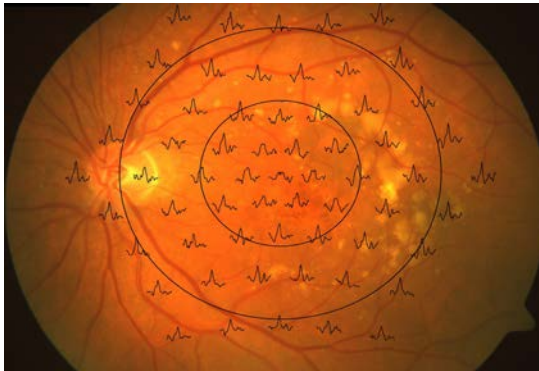
OBRÁZEK 4: : OFTALMOLOGICKÝ NÁLEZ NEMOCNÉ PO REOFERÉZE

A) OCT levého oka nemocné.



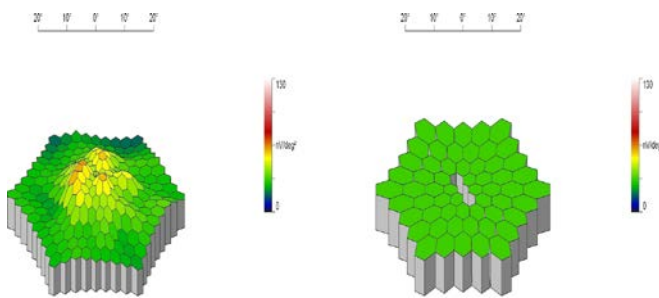
Legenda: Po reoferéze došlo k přiložení DPED i ablaci vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů, rizikového faktoru zvratu do vlhké formy VPMD. 2 drobná ložiska defektů junkce IS/OS fotoreceptorů považujeme za následek předchozí ablaci této vrstvy (šipky).

*B) Superpozice mfERG odpovědí na fundu levého oka nemocné*



Legenda: Šedesát jedna místních odpovědí multifokálního ERG superponovaných na funduskopickém obrázku levého

*C) Trojrozměrný obraz mfERG.*



Legenda: vlevo: trojrozměrný obraz elektrické aktivity sítnice levého oka, vzestup po léčbě; vpravo porovnání s věkovou normou (zvýšení parafoveolární aktivity do normálního rozmezí).

**6.1.3.6 Přídavné reoferézy (tzv. „booster“ terapie)**

Jak již bylo uvedeno, u 32 nemocných jsme přidali další reoferézy s cílem dlouhodobě udržet příznivý oftalmologický nález - v první fázi výzkumu u 8 nemocných ověření efektu (jako výzkumná sonda), následně pak již plánovitě u 24 nemocných, kteří podstoupili základní sérii reoferéz před 1,5 až 2 roky již v rámci standardního protokolu. Takto bylo možno vyhodnotit vývoj 20 očí až do 3 let, tedy 1-1,5 roku po přídavné léčbě.(U části nemocných je zatím sledování krátké, proto nemohli být hodnoceni.)



Vstupní hodnota NKZO(průměr/medián) byla 74/76,5 písmen ETDRS optotypových tabulí (38-85 písmen), do 6 měsíců se NKZO nejprve mírně zlepšovala na 77,5/81,5 písmen, po 1 roce mírně klesala a stabilizovala se na průměrné/mediánové hodnotě 74/79 písmen (36-85 písmen) ETDRS, tedy na původní úrovni.

Zlepšení morfologického nálezu ve smyslu zmenšení plochy měkkých drúz a DPED jsme pozorovali u 17 očí (85 %), bez významných změn zůstal nález 2 očí (10 %) a mírné zhoršení s rozvojem atrofie RPE jsme zjistili u 1 oka. K progresi do 3. stadia choroby nedošlo u žádného oka.

Elektroretinografie svědčí pro stabilní elektrickou aktivitu gangliových buněk, tyčinkového i čípkového systému včetně centrální oblasti sítnice.

#### **6.1.4 ZMĚNY LABORATORNÍCH UKAZATELŮ NEMOCNÝCH S VPMD**

Sledovali jsme výše uvedený panel biochemických, hematologických parametrů ukazatelů reologické účinnosti na začátku série reoferéz, uprostřed a na konci série, a to jako párové vzorky (před a po proceduře).

##### **6.1.4.1 Základní biochemické ukazatele**

Celkem jsme vyšetřili 201 párů vzorků, pouze u 3 odběrů nebyl proveden odběr všech sledovaných parametrů.

Zhodnocení výsledků ukázalo jen výkyvy bez klinické významnosti, i přesto, že byly statisticky významné. Jednalo se o diluční změny (po procedurách dojde k nevelké krevní diluci, která může způsobit pokles některých biochemických ukazatelů asi o 5-10 %). Změny parametrů jsou uvedené v tabulce 12.



TABULKA 12: ZÁKLADNÍ BIOCHEMICKÁ VYŠETŘENÍ U NEMOCNÝCH S VPMD PŘED A PO REOFERÉZE

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		P (Wilcox.test)
		Medián	IQR	Medián	IQR	
<i>Glykémie (mmol/l)</i>	201	5,50	7,8-6,6	6,00	5,5-6,9	<0,0001
<i>Natrium (mmol/l)</i>	201	140,00	139,0-142,0	142,00	140,0-143,0	<0,0001
<i>Kalium (mmol/l)</i>	201	4,00	3,8-4,2	4,20	3,8-4,1	<0,001
<i>Chlorid (mmol/l)</i>	201	104,00	102,0-106,0	106,00	104,0-108,0	0,005
<i>Kreatinin (umol/l)</i>	201	73,00	65,0-85,0	64,00	56,0-77,0	<0,0001
<i>Bilirubin (umol/l)</i>	201	8,00	6,0-10,0	7,00	5,0-8,0	<0,0001
<i>ALT (ukat/l)</i>	201	0,39	0,30-0,47	0,32	0,24-0,38	<0,0001
<i>AST (ukat/l)</i>	201	0,46	0,38-0,52	0,39	0,33-0,45	<0,0001
<i>CK (ukat/l)</i>	200	1,63	1,21-2,20	1,29	0,89-1,72	<0,0001
<i>GMT (ukat/l)</i>	201	0,32	0,23-0,46	0,21	0,15-0,28	<0,0001

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		P (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD	
<i>Calcium (mmol/l)</i>	201	2,24	0,12	2,16	0,22	<0,0001
<i>Fosfor (mmol/l)</i>	198	1,03	0,19	0,91	0,19	<0,0001
<i>Urea (mmol/l)</i>	201	5,52	1,52	5,04	1,42	<0,0001
<i>Kys.močová (umol/l)</i>	198	318,01	89,50	288,60	85,57	<0,0001
<i>Celková bílkovina (g/l)</i>	520	66,23	4,76	50,64	5,40	<0,0001
<i>Albumin (g/l)</i>	520	42,64	2,92	34,83	2,93	<0,0001

Legenda: N= počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; ALT = alaninaminotransferáza; AST = aminoaspartáttransferáza; CK = kreatinfosfokináza; GMT = gamaglutamyltransferáza.

Pozn: vyšší počet vyšetření celkové bílkoviny a albuminu je dán častější intenzitou odběrů u první poloviny nemocných (zpočátku před a po každé proceduře).

#### 6.1.4.2 Základní hematologické ukazatele

Párové vzorky na vyšetření byly odebírány dle stejného schématu jako biochemický panel (viz výše), celkem bylo odebráno 201 párových vzorků, u 4 výkonů nebyly odebrány

koagulační parametry. Byly sledovány základní hematologické ukazatele, a to především krevní obraz včetně parametrů trombocytů (viz tabulka 13). Z výsledků je vidět, že základní ukazatele krevního obrazu (hemoglobin, hematokrit, leukocyty) ani sedimentace nejsou procedurami klinicky významně ovlivněny, i když statistická významnost může být zjištěna. Opět se může podílet nevelká hemodiluce.

Došlo k určitému vzestupu počtu leukocytů, i když zcela v normálních hodnotách (z průměrných hodnot  $6,35 \times 10^9/l$  před výkonem na  $7,14 \times 10^9/l$  po výkonu,  $p < 0,0001$ ). Podobný vzestup počtu leukocytů jsme obecně pozorovali po reoferetických procedurách prováděných v jiných klinických indikacích (Blaha, et al. 2007).

Po reoferézách nedošlo ani k významnějším ztrátám erytrocytů (z průměrných hodnot hemoglobinu 134,18 g/l před výkonem na 130,11 g/l po výkonu).

Pokud jde o trombocyty – je jejich pokles z průměrné hodnoty  $230,58 \times 10^9/l$  před výkonem na  $220,91 \times 10^9/l$  po výkonu sice statisticky významný ( $p < 0,0001$ ), ale pro klinickou praxi naprosto ne.

Po reoferézách dochází k prodloužení jak protrombinového času, tak zejména APTT, které je způsobené intravenózním podáním heparinu před výkonem. Prodloužení těchto časů bylo pouze laboratorní změnou, u žádného nemocného jsme nepozorovali klinickou odezvu (krvácivé komplikace).

TABULKA 13: PARAMETRY KREVNÍHO OBRAZU - VPMD

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		p (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD	
<i>Leukocyty (x10<sup>9</sup>/l)</i>	201	6,35	1,57	7,14	1,89	<0,0001
<i>Hemoglobin (g/l)</i>	201	134,18	13,11	130,11	14,34	<0,0001
<i>Hematokrit (%)</i>	201	39,81	4,22	38,61	4,06	<0,0001
<i>MCV (fl)</i>	201	89,53	6,27	89,66	5,95	0,07
<i>Trombocyty (x10<sup>9</sup>/l)</i>	201	230,58	49,91	220,91	45,42	<0,0001
<i>MPV (fl)</i>	201	10,42	0,98	10,32	0,88	0,001

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		p (Wilcox.test)
		Medián	IQR	Medián	IQR	
<i>PCT (%)</i>	201	23,90	0,20-0,28	22,00	0,20-0,26	<0,0001
<i>PDW (fl)</i>	201	12,80	11,10-16,10	11,90	10,90-13,60	<0,0001
<i>PT (poměr)</i>	197	1,00	0,95-1,10	1,29	1,20-1,52	<0,0001
<i>APTT</i>	197	1,01	0,97-1,10	1,35	1,29-1,96	<0,0001

Legenda: N= počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; MCV = střední objem erytrocytu; PCT = destičkový hematokrit; PDW = šíře distribuce histogramu destiček podle jejich objemu; MPV =střední objem trombocyty; PT = protrombinový čas; APTT = aktivovaný parciální tromboplastinový čas.

#### 6.1.4.3 Ukazatelé reologické účinnosti -VPMD

Odběr párových vzorků byl prováděn společně s odběrem biochemických i hematologických vyšetření ve stejném časovém schématu. Celkem bylo odebráno 201 párových vzorků. U vyšetření lipoproteinu (a) došlo v roce 2014 ke změně udávaných jednotek. Vyšetření IgM a  $\alpha_2$ -makroglobulinu před a po aferéze bylo provedeno pouze u části nemocných (165, resp. 66 nemocných).

Fibrinogen bylo nutné vyšetřovat před a po každé proceduře, protože jeho aktuální vstupní hodnotou se řídilo množství zpracované plazmy, ale také odstup mezi jednotlivými procedurami. Byl ukazatelem účinnosti procedury, neboť má přímo úměrný vztah k viskozitě plazmy, proto je jeho pokles při léčbě velmi žádaný. Podle aktuální hodnoty fibrinogenu jsme u každé procedury rozhodovali o množství promyté plazmy s cílem nepřiblížit se po výkonu k hodnotám fibrinogenu pod 1 g/l. Jako ještě přípustnou minimální hladinu fibrinogenu

po proceduře jsme zvolili 0,7 g/l. Pokud by došlo k poklesu pod tuto hodnotu, byla by provedena substituce z důvodu prevence významného krvácení. U žádné procedury nedošlo k poklesu pod tuto hodnotu.

Byl zjištěn statisticky významný pokles reologicky účinných ukazatelů, což je základním předpokladem úspěšné léčby reoferézou. Po procedurách došlo ke snížení celkového cholesterolu o 55,0 %, LDL-cholesterolu o 66,5 %, apolipoproteinu B o 61,1 %,  $\alpha_2$ -makroglobulinu o 50,7 %, fibrinogenu o 61,6 %, IgM o 62,2 %. Pokles uvedených faktorů ovlivnil reologické poměry: viskozita plné krve klesla o 14,8 % a viskozita plazmy o 16,1 % (viz tabulka 14).

TABULKA 14: REOLOGICKY VÝZNAMNÉ UKAZATELE - VÝSLEDKY NEMOCNÝCH S VPMD

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		Relat. rozdíl %	Celk. pokles (%)	p (Wilcox. test)
		Medián	IQR	Medián	IQR			
<b>Chol. (mmol/l)</b>	201	4,18	3,51-4,81	1,88	1,57-2,24	-55,02	-58,84	<0,0001
<b>LDL-ch(mmol/l)</b>	201	2,27	1,72-1,89	0,76	0,55-0,99	-66,52	-72,03	<0,0001
<b>Lp(a) (g/l) *</b>	155	0,22	0,08-0,36	0,12	0,08-0,38	- 45,45	-50,00	<0,0001
<b>Lp(a) (mmol/l) *</b>	46	15,50	6,87-56,47	7,35	3,08-23,23	-52,58	-59,33	<0,0001
<b>ApoB (g/l)</b>	201	0,72	0,58-0,85	0,28	0,18-0,32	-61,11	-63,01	<0,0001
<b>Imunogl. M (g/l)</b>	165	0,45	0,32-0,67	0,17	0,11-0,23	-62,22	-68,85	<0,0001
<b>Fibrinogen (g/l)</b>	620	3,10	2,55-3,66	1,19	0,97-1,43	-61,61	-68,25	<0,0001
<b>Visk. P (mPa.s)</b>	201	2,05	1,81-2,20	1,72	1,56-1,94	-16,09	-14,49	<0,0001
<b>Visk. K (mPa.s)</b>	201	6,34	5,44-6,60	5,40	4,77-5,97	-14,82	-16,88	<0,0001

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		Relat. rozdíl %	Celk. pokles (%)	p (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD			
<b><math>\alpha_2</math>-makrogl. (g/l)</b>	66	142,81	44,39	70,36	25,20	-50,73	68,03	<0,0001

Legenda: N = počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; Relat. rozdíl = rozdíl v % mezi mediánem/průměrnou hodnotou před a po proceduře; Celk. pokles = pokles hodnoty mezi mediánem/průměrnou hodnotou před 1. procedurou a po poslední proceduře (%); Chol = celkový cholesterol; LDL-ch. = LDL cholesterol; Lp(a) = lipoprotein (a); ApoB = apolipoprotein B;  $\alpha_2$ -makrogl. =  $\alpha_2$ -makroglobulin; Imunogl.M = imunoglobulin M; Visk. P.= viskozita plazmy; Visk. K = viskozita krve; \* = od 1.7. 2014 došlo v laboratoři ke změně jednotek u lipoproteinu (a), jednotky g/l byly změněny na mmol/l.

#### 6.1.4.4 Výsledky „speciálních vyšetření“ - VPMD

Záměrem výzkumu bylo sledovat u nemocných relativně širokou škálu výzkumných parametrů (nebyly dosud při léčbě VPMD reoferézou publikovány). Jde o ukazatele označené námi jako „speciální“, které mohou upřesnit sledování choroby, ale zajistí také dosažení unikátních poznatků. Jde o markery, které by mohly svědčit pro aktivitu zánětlivou (IL-10), markery stavu buněčné imunity (MCP-1, solubilní antigen CD40), aktivity endotelu, adhezni molekuly (např. selektiny) nebo markery apoptózy (sApoFas).

Při našem předchozím výzkumu jsme vyšetřovali MCP-1 (monocyte chemotactic peptide) vzhledem k podstatnému významu makrofágů v mikrocirkulaci a zjistili jsme významný pokles u jiného souboru - u nemocných s familiární hypercholesterolémií (Blaha et al. 2004). Při tomto výzkumu byl zjištěn jeho pokles po léčbě reoferézou i u VPMD. Jak je uvedeno v literatuře (Borberg 2006), může jít o významný faktor, který svědčí pro efektivitu eliminace, a tím ovlivnění aktivity zánětlivého procesu nebo ateromatózy.

Měřením sP-selektinu a sE-selektinu lze hodnotit vliv procedur na endoteliální výstelku. U našeho souboru hladina sP-selektinu po procedurách klesala, stejně jako endoglin. Hladinu sE-selektinu jsme vyšetřovali na začátku výzkumu, ale nedošli jsme k pozitivním výsledkům; protože se hladina neměnila, v dalším průběhu nebyla sledována.

IL-10 při vyšetřování prvních nemocných vykazoval po léčbě výrazný pokles. Hladina sCD40L klesala zprvu nevýznamně, nyní po vyšetření dalších nemocných je již pokles statisticky významný. Hladina hsCRP také klesala, dále solubilní Apo-Fas po procedurách významně klesal.

Naše nálezy tedy potvrzují literární údaje, které prokazují možné pozitivní změny apoptotických ukazatelů i v jiných indikacích (Li et al. 2006; Okura et al. 2002). Pokles endoglinu byl významný, podobně jako jsme dříve popsali u nemocných při léčbě hypercholesterolemie + hyperfibrinogenemie reoferézou (Blaha et al. 2008a). Jde o marker endoteliální aktivace, která po reoferéze klesá. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 15.

TABULKA 15: VÝSLEDKY SLEDOVÁNÍ NEMOCNÝCH S VPMD - SPECIÁLNÍ UKAZATELE

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		P (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD	
<i>sApoFas (pg/ml)</i>	64	1061,0	293,9	933,5	241,3	< 0,001
<i>IL-10(pg/ml)</i>	64	59,0	25,6	53,8	23,9	< 0,001
<i>MCP-1 (pg/ml)</i>	64	275,1	78,3	265,7	23,9	< 0,001
<i>hsCRP (mg/l)</i>	64	3,6	5,9	2,7	4,3	< 0,001
<i>CD40L (pg/ml)</i>	64	5019,7	2182,2	4270,7	2202,3	< 0,001
<i>sP-selektin (ng/ml)</i>	64	150,6	54,61	133,1	55,74	0,001
<i>Endoglin (ng/ml)</i>	64	6,3	1,6	5,4	1,6	< 0,001

Legenda: N= počet vyšetření; sApoFas = solubilní marker apoptotické aktivity; IL-10 = interleukin 10; MCP-1 = monocytární chemotaktický protein; hsCRP = hypersenzitivní C reaktivní protein; sP-selektin =solubilní P-selektin.

### 6.1.5 PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI PŘI LÉČBĚ VPMD

Všichni nemocní, kteří dokončili léčbu reoferézou podle stanoveného schématu, byli rozděleni na nemocné klinicky úspěšně léčené a na neúspěšně léčené (blíže viz výše – kapitola 5.1.1). Výsledky u nemocných úspěšně léčených byly srovnány s výsledky od nemocných neúspěšně léčených ve snaze určit biomarkery významné pro predikci úspěšnosti. Hodnoceny byly:

- reologicky významné faktory (podle kapitoly 6.1.4.3),
- jako technický parametr základní důležitosti bylo hodnoceno množství promyté plazmy,
- vybrané vstupní laboratorní parametry (albumin, celkovou bílkovinu, hladinu hemoglobinu, počet leukocytů, trombocytů, kreatinin, glykémii).

Cílem byla snaha nalézt eventuální odlišnosti v obou skupinách a doporučit jejich další ověření a uplatnění v pozdější výzkumné činnosti nebo klinické praxi.

#### 6.1.5.1 Predikce podle reologicky efektivních faktorů

Zhodnotili jsme, zda nedochází k rozdílnému poklesu reologicky efektivních faktorů u nemocných úspěšně léčených oproti neúspěšným, což by mohlo být prediktivním faktorem léčebné úspěšnosti. Srovnali jsme hladiny reologicky účinných faktorů u skupiny klinicky úspěšně léčených nemocných (52 nemocných) oproti neúspěšným (14 nemocných) (viz tabulka 16). Mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ve věku ( $p = 0,317$ )

a v pohlaví ( $p = 0,317$ ). Toto zhodnocení jsme provedli opět z párových vzorků odebraných nemocným na začátku, uprostřed a na konci série reoferéz, vždy před a po reoferéze. Celkem bylo zhodnoceno 198 párových vzorků; lipoprotein (a) jsme hodnotili pouze u vyšetření provedených do 1.7.2014, kdy došlo ke změně laboratorních mezí, menší počet vzorků byl také u vyšetření imunoglobulinu M a viskozity krve a plazmy. Jako faktor s možným vlivem na úspěšnost procedury se jeví i množství ošetřené plazmy, proto jsme i tento parametr statisticky zhodnotili u všech provedených reoferéz.

Výsledky ukazují, že hladiny reologicky významných činitelů u skupiny klinicky úspěšně léčených nemocných a neúspěšných – hodnoceno před léčbou i po léčbě – se statisticky významně neliší. Z výchozí hladiny jednotlivých reologicky významných činitelů se tedy prognóza určit nedá.

Dalším zkoumaným faktorem bylo množství plazmy ošetřené během reoferézy. U úspěšně léčených bylo průměrně promyto 3466 ml plazmy, u neúspěšně léčených 3195 ml. Jde o rozdíl o 8,49 %. Přesto je to rozdíl statisticky významný ( $p < 0,001$ ). V tomto případě však pravděpodobně šlo o náhodný jev - chybu „malých čísel“, danou nejspíše rozdíly v hmotnosti nemocných. Objem promývané plazmy je určován kalkulátorem separátoru. Rozhoduje proto poměr objemu skutečně promyté plazmy a TBV (totálního objemu cirkulující plazmy), zde již rozdíl není statisticky významný.



TABULKA 16: REOLOGICKY ÚČINNÉ FAKTORY PŘED A PO REOFERÉZE U ÚSPĚŠNÉ A NEÚSPĚŠNÉ LÉČBY

Ukazatel	Neúspěšní			Úspěšní			p (M-W. test)
	N	Medián	IQR	N	Medián	IQR	
<i>Chol před (mmol/l)</i>	42	3,90	3,18-4,56	156	4,12	3,51-4,81	0,072
<i>Chol po (mmol/l)</i>	42	1,91	1,55-2,21	156	1,91	1,57-2,24	0,352
<i>LDL před (mmol/l)</i>	42	2,04	1,72-2,59	156	2,26	1,72-2,89	0,125
<i>LDL po (mmol/l)</i>	42	0,70	0,56-1,06	156	0,79	1,19-1,63	0,489
<i>Lp(a) před (g/l)</i>	31	0,14	0,07-0,44	124	0,19	0,08-0,36	0,465
<i>Lp(a) po (g/l)</i>	31	0,05	0,03-0,27	124	0,07	0,02-0,15	0,273
<i>ApoB před (g/l)</i>	42	0,68	0,55-0,83	152	0,72	0,58-0,85	0,232
<i>ApoB po (g/l)</i>	42	0,26	0,10-0,31	152	0,26	0,18-0,32	0,373
<i>IgM před (g/l)</i>	32	0,50	0,34-0,63	104	0,44	0,32-0,67	0,971
<i>IgM po (g/l)</i>	32	0,18	0,11-0,24	104	0,17	0,11-0,23	0,928
<i>Fbg před (g/l)</i>	42	3,09	2,67-3,60	156	2,82	2,55-3,60	0,200
<i>Fbg po (g/l)</i>	42	1,24	1,06-1,48	156	1,12	0,97-1,43	0,035
<i>Visk.P před (mPa.s)</i>	36	2,06	1,85-2,24	134	1,96	1,81-2,20	0,053
<i>Visk.P po (mPa.s)</i>	36	1,71	1,59-1,96	134	1,69	1,56-1,94	0,201
<i>Visk.K před (mPa.s)</i>	36	6,10	5,45-6,91	134	5,98	5,44-6,60	0,752
<i>Visk.K po (mPa.s)</i>	36	5,18	4,69-5,80	132	5,33	4,77-5,97	0,427
<i>Promytá plazma (ml)</i>	112	3103,0	2598,5-4002,5	416	3452,5	2665,5-4113,5	<0,001
<i>Poměr promyto/TPV</i>	112	1,00	0,80-1,25	416	1,20	0,80-1,30	0,719

Legenda: N = počet vyšetřených vzorků; IQR = interkvartilové rozpětí; Chol = celkový cholesterol; LDL = LDL-cholesterol; Lp(a) = lipoprotein(a); ApoB = apolipoprotein B; IgM = imunoglobulin M; Fbg = fibrinogen; Visk.P = viskozita plazmy, Visk.K = viskozita krve; TPV = objem plazmy nemocného; M-W. test = Mann-Whitneyův test.

### 6.1.5.2 Hodnocení metodou diskriminační analýzy - VPMD

Bylo provedeno další hodnocení, a to metodou diskriminační analýzy. Principem metody je výběr takové skupiny faktorů, které pomocí klasifikační funkce s co největším

úspěchem roztřídí zadaný soubor do skupin, v našem případě na léčebně úspěšné a neúspěšné. Použitý software Systat 13 umožňuje z počátečního zadaného souboru faktorů vytřídit nevýznamné, takže na konci procesu zůstane relativně optimální skupina faktorů. Programové vybavení nabízí několik způsobů třídění a podle toho dostáváme i různý konečný soubor faktorů. Do výpočtu klasifikační funkce jsou zahrnuti jenom ti nemocní, kteří mají změřeny hodnoty všech faktorů vstupujících na začátku do výpočtu.

K použití této metody je třeba předně zvolit spektrum předpokládaných účinných činitelů. Zvolili jsme celé spektrum reologicky účinných vysokomolekulárních proteinů podle Klingela et al. (Klingel et al. 2003a), tj. celkový cholesterol, LDL-cholesterol, apolipoprotein B, IgM,  $\alpha_2$ -makroglobulin, fibrinogen, dále viskozitu krve a plazmy. Jako spektrum dalších, tzv. druhořadých činitelů jsme vybrali ukazatele snadno dostupné a standardně používané: albumin, celkovou bílkovinu, hladinu hemoglobinu, počet leukocytů, trombocytů, kreatinin, glykémii. Další faktory je možno v budoucím výzkumu do hodnocení zařadit.

Do hodnocení bylo zařazeno 41 nemocných (10 neúspěšně léčených a 31 úspěšně léčených). Systém určil koeficienty dvou klasifikačních funkcí pro každý model (jednu pro úspěšné a druhou pro neúspěšné nemocné), postupně vyřadil nevhodné ukazatele. Do dalšího hodnocení postoupily pouze: glykémie, kreatinin, celkový cholesterol, LDL-cholesterol a lipoprotein (a). Tímto způsobem byli klasifikováni všichni nemocní. V závěru program provede konečné vyhodnocení a určí procentuální správnost predikce úspěšné léčby. V tomto případě byla předpověď správná u 90 % neúspěšných nemocných a u 74 % úspěšných, celkově v 78 %. Software umožňuje i další variantu - použití kvadratického modelu, výsledky jsou optimističtější. V tomto případě byla předpověď správná dokonce u 100 % neúspěšných nemocných a u 87 % úspěšných, celkově v 89 % (tímto způsobem bylo hodnoceno 56 nemocných). Výsledky závěrečného vyhodnocení programu jsou v tabulce 17.

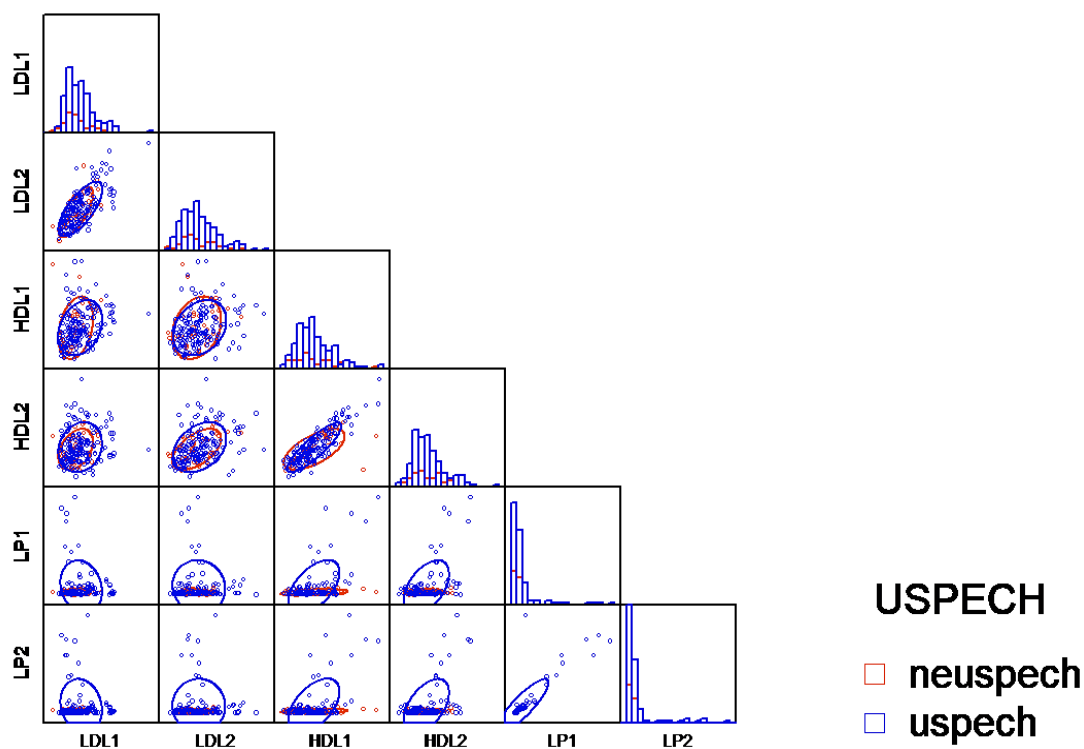
TABULKA 17: PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI LÉČBY POMOCÍ DISKRIMINAČNÍ ANALÝZY – VPMD

	Predikce odpovědi		% správné predikce	Predikce předpovědi (kvadratický model)		% správné predikce
	Neúspěch	Úspěch		Neúspěch	Úspěch	
<b>Neúspěšní nemocní</b>	9	1	90	11	0	100
<b>Úspěšní nemocní</b>	8	23	74	6	39	87
<b>Celkem</b>	17	24	78	17	39	89

Legenda: popis viz text

Zajímavé je rozložení hodnot lipoproteinu (a) a také LDL-cholesterolu. Hodnoty lipoproteinu (a) u neúspěšně léčených jsou rozloženy téměř v jedné přímce, zatímco u úspěšně léčených jsou daleko více rozptýleny. Možná i proto se v programu diskriminační analýzy jeví hladina lipoproteinu (a) a LDL-cholesterolu nejvíce vhodná k posouzení prognózy a úspěšnost predikce je lepší u neúspěšně léčených. Viz graf 4.

GRAF 4: VÝSLEDKY DISKRIMINAČNÍ ANALÝZY U VPMD



Legenda: LDL1 = LDL-cholesterol před reoferézou; LDL2 = LDL-cholesterol po reoferéze;  
HDL1= HDL-cholesterol před reoferézou; HDL2 = HDL-cholesterol po reoferéze;  
LP1 = lipoprotein (a) před reoferézou; LP2 = lipoprotein (a) po reoferéze

## 6.2 SOUBOR NEMOCNÝCH SE SISHL

Soubor nemocných se SISHL tvoří menší část této práce – u SISHL bylo provedeno 16,3 % ze všech reoferetických výkonů.

### 6.2.1 PROCEDURA REOFERÉZY – SISHL

Celkem bylo u 41 nemocných se SISHL provedeno 122 reoferéz. U 2 nemocných byla provedena jen jedna procedura, která ale musela být předčasně ukončena. Plánovaná léčba byla dokončena u 39 nemocných (95,1 %). U 36 z nich byly provedeny 3 reoferézy a u 3 nemocných v prvních letech výzkumu byla přidána 4. reoferéza s cílem navýšení léčebného efektu.

U 35 nemocných byl použit periferní žilní přístup a výkony proběhly ambulantně. U 6 nemocných byl stav periferních žil k zavedení odběrových jehel nedostatečný, proto byla použita dvoucestná kanyla zavedená do podklíčkové žíly. Množství promyté plazmy se pohybovalo v rozmezí 0,6-1,5násobku objemu plazmy nemocného. Vstupní rychlost průtoku krve separátorem byla v rozmezí 35-70 ml/min, rychlost byla řízena během každé separace stejným způsobem, jak bylo uvedeno výše u nemocných s VPMD. Antikoagulace během výkonu byla zajištěna stejným způsobem jako u nemocných s VPMD. Jednotlivý výkon trval průměrně 158,6 minut. Sledované základní parametry jednotlivých výkonů jsou uvedeny v tabulce 18.

TABULKA 18: ZÁKLADNÍ PARAMETRY PROCEDUR U NEMOCNÝCH SE SISHL

Parametry	Průměr	Medián	SD	IQR	Rozsah (min-max)
<b>Promytý objem plazmy (ml)</b>	3242,6	3022	1013,9	2500,0-3575,5	1503-7443
<b>Promytý objem/objemplazmy nemocného</b>	1,04	1	0,23	0,8-1,2	0,6-1,5
<b>Průtok krve (ml/min)</b>	-	-	-	-	35-70
<b>Množství ACD (ml)</b>	515,8	508	94,8	431-529	331-703
<b>Počet proplachů filtru</b>	0,5	0	0,23	0-1	0-3
<b>Trvání výkonu (min)</b>	158,6	153	32,7	124-178	97-254

Legenda: Legenda: SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; min = minimální hodnota; max = maximální hodnota

Pozn.: U průtoku krve jsou uvedené pouze minimální až maximální hodnoty, protože průtok byl průběžně adaptován – zpočátku obvykle 35 ml/min. s rychlým vzestupem až do maximální možnosti přítokové žíly, což činilo zpravidla 70 ml/min.

## 6.2.2 HODNOCENÍ VÝSKYTU NEŽÁDOUCÍCH REAKCÍ - SISHL

Výskyt nežádoucích reakcí byl bedlivě sledován u každé reoferézy. Z celkového množství 122 procedur byly pouze 2 procedury předčasně ukončeny - jedenkrát došlo ke kolapsovému stavu ještě před zahájením reoferézy, důvodem byla úzkostná reakce nemocného, následně jsme již po domluvě s nemocným v léčbě nepokračovali. U další nemocné byla aferéza předčasně ukončena, protože jsme dostali výsledek ze vzorku krve, odebrané při zahájení, a zjistili významnou hyperglykémii z důvodu dekompenzovaného diabetu po předchozí léčbě kortikosteroidy, tato komplikace nesouvisela s vlastní reoferézou. U 2 výkonů byly problémy se zavedením periferního přístupu s nutností opakovaných vpichů, 2x jsme pozorovali lokální kožní komplikace při zavedeném katétru (zarudnutí v okolí katétru bez celkových známek infekce). Tyto příhody se podle WAA registru počítají jako technické problémy.

Vlastní reoferéza byla komplikována 6 příhodami: 5x krátkodobá nevolnost během procedury a 1x hypotenze vyžadující podání fyziologického roztoku. Citrátovou toxicitu mírného stupně jsme pozorovali pouze u jednoho nemocného. Všechny komplikace byly hodnoceny jako mírné nebo střední (CTCAE, verze 4.03/2009). V tabulce 19 jsou uvedeny všechny sledované i skutečně zjištěné nežádoucí příhody, tj. výše uvedené 4 „technické“

příhody a 8 nežádoucích příhod, způsobených vlastním procesem reoferézy, což tvoří 6,6 % z celkového počtu provedených reoferéz (V tabulce jsou zhodnoceny obě skupiny nemocných).

Ve větvi léčby metodou MicroWick bylo pozorováno u 19 nemocných 7 příhod: 5x přetrvávala perforace bubínku 1 rok po léčbě, z toho ve 3 případech bylo třeba provést operačně okluzi (myringoplastiku). Ve dvou dalších případech došlo během sledování k progresi do hluchoty, což bylo hodnoceno jako těžká vedlejší příhoda. Celkem se vyskytly nežádoucí příhody u 36,8 % nemocných.

TABULKA 19: NEŽÁDOUCÍ REAKCE REOFERÉZY U SOUBORU NEMOCNÝCH S VPMD A SISHL

<i>Nežádoucí reakce</i>	<b>Počet reakcí VPMD</b>	<b>Počet reakcí SISHL</b>
<i>Opakované vpichy</i>	6	2
<i>Hematomy v místě vpichu</i>	2	0
<i>Hypotenze krátkodobá</i>	<b>6</b>	<b>1</b>
<i>Přechodná slabost, neurovegetativní reakce, nevolnost</i>	<b>10</b>	<b>5</b>
<i>Zarnutí v obličeji, přechodné</i>	0	0
<i>Bolesti na hrudi</i>	0	0
<i>Nadměrné zatížení tekutinou</i>	0	0
<i>Arytmie</i>	0	0
<i>Zvracení</i>	2	0
<i>Vzduchová embolie</i>	0	0
<i>Hypovolémie</i>	0	0
<i>Alergické reakce</i>	0	0
<i>Astmatické obtíže nebo záchvat</i>	0	0
<i>Bradykininová reakce</i>	<b>1</b>	0
<i>Hemolýza</i>	0	0
<i>Panická ataka</i>	0	<b>1</b>
<i>Krvácení z místa vpichu</i>	0	0
<i>Trombóza žil po výkonu</i>	0	0
<i>Flebitida v místě vpichu po výkonu</i>	0	0
<i>Lokální zánět v místě centrální kanyly</i>	0	2
<i>Celková infekce</i>	0	0
<i>Hyperglykémie</i>	0	1
<i>Technické poruchy přístrojů</i>	1	0
<i>Citrátová toxicita mírná</i>	<b>5</b>	<b>1</b>
<i>Celkem</i>	33	13
<i>V souvislosti s vlastní procedurou reoferézy: N (%)</i>	<b>24 (3,83 %)</b>	<b>8 (6,56 %)</b>

Legenda: popis viz text, N = počet nežádoucích reakcí; % = % podíl z celkového počtu reoferéz.

### 6.2.3 KLINICKÁ ÚČINNOST LÉČBY SISHL

Ve vyšetřovaném souboru jsme hodnotili účinnost terapie u všech 39 nemocných, kteří dokončili léčbu reoferézou, i následná kontrolní vyšetření. U 26 nemocných (66,7 %) došlo ke zlepšení sluchu o 50 a více %, a to u 11 žen a 15 mužů. Ostatních 13 (33,3 %) bylo neúspěšných – 11 mužů a 2 ženy.

U 8 nemocných, léčených do r. 2008 v rámci výzkumné sondy, nebyla provedena kompletní klinická vyšetření, u většiny z nich byla dlouhá doba od vzniku obtíží až k zahájení léčby reoferézou, proto nebyli zařazeni do podrobného klinického hodnocení, pouze do laboratorního hodnocení a sledování nežádoucích příhod.

U všech 157 nemocných, kteří byli zachyceni na ORL klinice HK v letech 2012-2015 s náhlou ztrátou sluchu, byla prováděna diferenciální diagnostika, což trvalo průměrně 4 dny od nástupu prvních příznaků (medián 4 dny, rozsah 1-4). Pokud do té doby nedošlo k spontánnímu zlepšení, byl jim podáván Solumedrol, jak bylo popsáno výše. Pokud léčba nebyla úspěšná, byla jim navržena sekundární záchranná léčba buď reoferézou, nebo metodou MicroWick. 33 nemocných (63,5 %) se rozhodlo pro reoferézu a 19 (36,5 %) pro MicroWick. Méně nemocných se rozhodlo pro MicroWick hlavně z důvodů obav z operační metody. Následně dostali nemocní sekundární léčbu, a to reoferézu průměrně za 10 dnů od nástupu prvních symptomů (medián 10, rozsah 8-15 dní), nebo MicroWick průměrně za 10 dnů (medián 9, rozsah 6-14 dní). Statistický rozdíl mezi dobou do zahájení záchranné terapie metodou reoferézy a metodou MicroWick nebyl zjištěn ( $p = 0,279$ ). Nemocní, kteří měli větší ztrátu sluchu, volili více reoferézu (81 %) nežli MicroWick (52 %),  $p = 0,04$ .

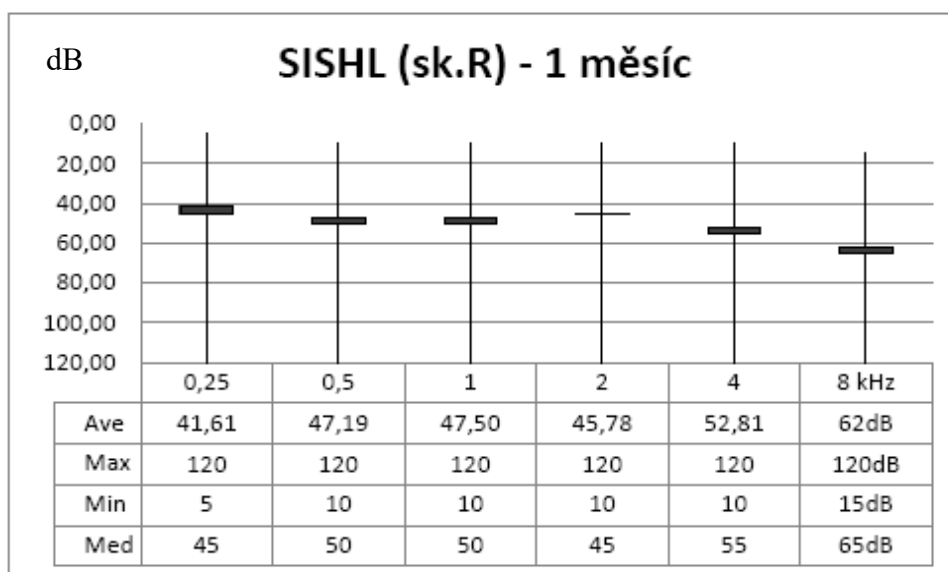
#### 6.2.3.1 Tónová audiometrie

Při zahájení léčby standardní terapií (skupina S) byly průměrné ztráty hodnocených frekvencí na postižených uších 47,22-64 dB (medián 45-65 dB). Po 1 měsíci od ukončení léčby byly průměrné ztráty sluchu 29,42-52 dB, v souboru nemocných léčených výhradně standardní terapií (skupina S) bylo tedy dosaženo signifikantního zlepšení sluchu, po 1. roce od ukončení léčby tento efekt přetrvával.

Při zahájení léčby reoferézou (skupina R) byly průměrné ztráty na postižených uších 66-81 dB (medián 70-80 dB). Po 1 měsíci od ukončení léčby reoferézou (skupina R) byly průměrné ztráty sluchu 41,61-62 dB (medián 45-65 dB), viz graf 5. Celkem tak bylo dosaženo u nemocných léčených reoferézou (skupina R) zlepšení průměrně o 18 – 25,26 dB, viz graf 6. Po 1 roce od ukončení léčby reoferézou (skupina R) byly naměřeny hodnoty sluchového prahu v průměru o max. 6 dB lepší než při kontrole 1 měsíc po ukončení léčby.

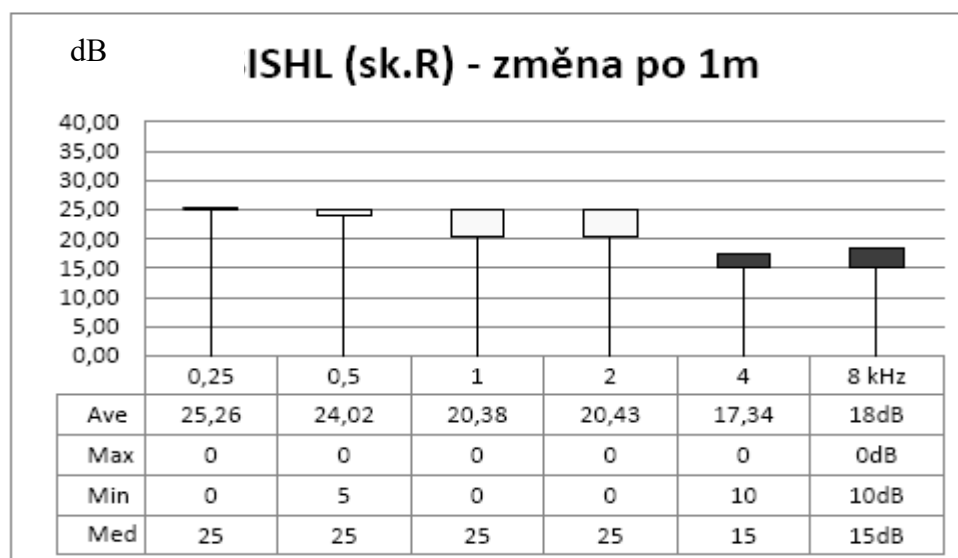


GRAF 5: ZTRÁTY SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY REOFERÉZOU



Legenda: Ave= průměr; max = maximální hodnota; min = minimální hodnota; med = medián

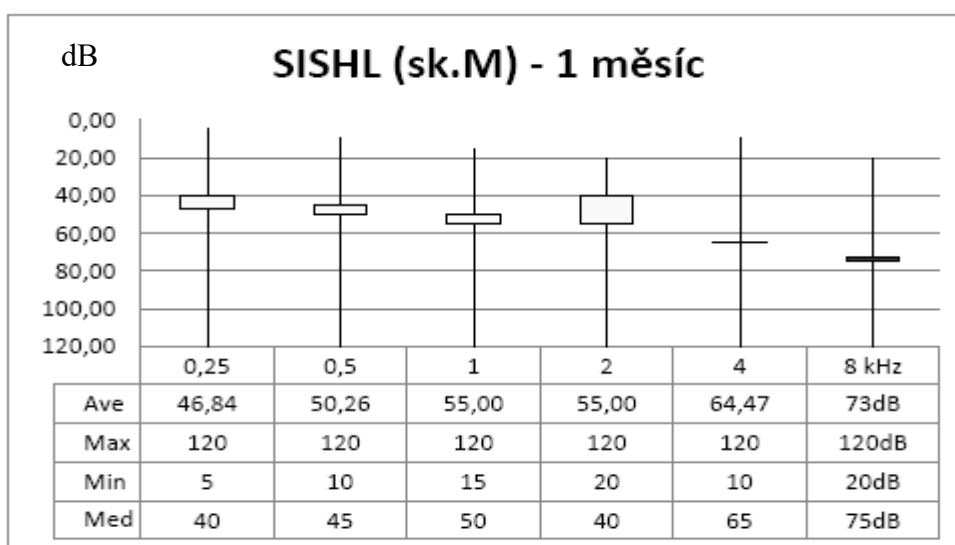
GRAF 6: ZMĚNA SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY REOFERÉZOU



Legenda: Ave= průměr; max = maximální hodnota; min = minimální hodnota; med = medián

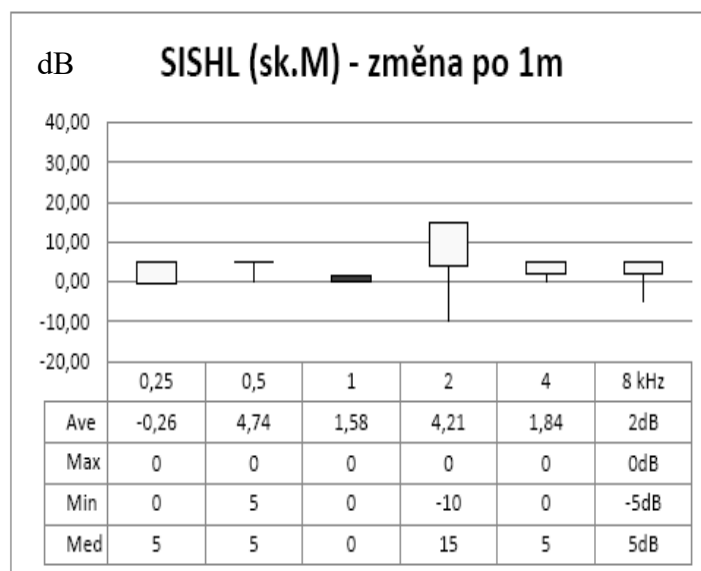
Při zahájení léčby systémem MicroWick (skupina M) byly průměrné ztráty na postižených uších 66,21-81 dB. Po 1 měsíci od ukončení léčby systémem MicroWick (skupina M) byly průměrné ztráty sluchu 47-73 dB (medián 40-75 dB), viz graf 7. V průměru dalšího zlepšení sluchu dosaženo nebylo (maximální zlepšení 4,74 dB / 0,5 kHz není signifikantní), viz graf 8.

GRAF 7: ZTRÁTY SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY SYSTÉMEM MICROWICK



Legenda: Ave= průměr; max = maximální hodnota; min = minimální hodnota; med = medián

GRAF 8: ZMĚNA SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY SYSTÉMEM MICROWICK



Legenda: Ave= průměr; max = maximální hodnota; min = minimální hodnota; med = medián

### 6.2.3.2 Slovní audiometrie

Výsledky slovní audiometrie vykazují, že u nemocných léčených standardní terapií (skupina S), reoferézou (skupina R) i systémem MicroWick se zlepšilo slovní

porozumění 1 měsíc po ukončení léčby o 12 dB (skupina S), o 11,1 dB (skupina R) a 1,3 dB (skupina M). Další zlepšení bylo pozorováno ještě 1 rok po ukončení léčby v léčených skupinách – ve skupině R došlo k celkovému zlepšení o 14,5 dB, ve skupině M o 9,5 dB, ve skupině S se již neměnilo (11 dB).

### 6.2.3.3 Zhodnocení výsledků terapie - shrnutí

Ztráta sluchu se signifikantně zlepšila během léčby Solumedrolem ( $p < 0,001$ ) a u nemocných léčených reoferézou ( $p < 0,001$ ) a zůstala nezměněna během prvního roku, jak ukazuje tabulka 20. Sluch nemocných léčených metodou MicroWick se sice poněkud zlepšil, ale statisticky nevýznamně ( $p = 0,940$ ) a nebylo pozorováno další zlepšení po dobu jednoho roku ( $p = 0,359$ ). Za 1 měsíc po zahájení sekundární terapie nebyl rozdíl v tíži poruchy sluchu u nemocných léčených metodou reoferézy a MicroWick ( $p = 0,682$ ), ačkoliv na začátku léčby byla sluchová ztráta větší ve skupině reoferézy (81 dB oproti 52 ve skupině MicroWick). U nemocných ve skupině reoferézy se tedy během 1. měsíce léčby zlepšil slucha konečná ztráta na konci roku byla jen 54 dB, kdežto ve skupině MicroWick zůstala ztráta beze změn, stejná za rok, jako byla na začátku léčby i za 1. měsíc.

Byla nalezena pozitivní korelace mezi finální hladinou sluchové ztráty a věkem ( $p=0,003$ ) a také iniciální a finální ztrátou sluchu ( $p<0,001$ ). Rovněž nemocní s vertigem měli větší finální sluchové ztráty ( $p=0,006$ ). Další faktory nevykazovaly pozitivní korelaci: BMI ( $p=0,23$ ), tinnitus ( $p=0,30$ ) a pohlaví ( $p=0,878$ ).

TABULKA 20: POROVNÁNÍ SLUCHOVÉ ZTRÁTY PODLE FOWLERA (%) BĚHEM SLEDOVÁNÍ

Skupina	Den 0 (dB)		1 měsíc (dB)		P	1 rok (dB)		P
	Medián	IQR	Medián	IQR		Medián	IQR	
<b>Standarní</b>	54	18-87	13	4-50	<0,001	11	4-29	0,224
<b>Reoferéza</b>	81	54-98	54	19-74	<0,001	53	25-78	0,963
<b>Microwick</b>	52	30-92	52	16-83	0,094	77	14-100	0,359

Legenda: popis viz text; IQR = interkvartilové rozpětí

### 6.2.4 ZMĚNY LABORATORNÍCH UKAZATELŮ U PACIENTŮ SE SISHL

Přehled změn hematologických a biochemických ukazatelů je uveden níže v textu a přehledně v tabulkách.

#### **6.2.4.1 Základní biochemické a hematologické ukazatele u nemocných se SISHL**

U nemocných léčených reoferézou jsme na začátku terapie a při jejím ukončení kontrolovali základní biochemické a hematologické parametry (viz metodika), opět jako párové vzorky. U prvních 8 nemocných léčených v prvních letech nebyly ještě vyšetřovány všechny parametry, proto jsme nakonec mohli hodnotit pouze 72 párových vzorků, u 2 nemocných některé parametry chyběly. Koagulační parametry jsme zhodnotili u 67 párových vzorků.

Zhodnocení výsledků ukázalo jen výkyvy bez klinické významnosti i přes statistickou významnost. Prodloužení APTT a protrombinového času je opět způsobeno iniciálním podáním heparinu. Naměřené hodnoty se měnily po procedurách obdobně s hodnotami souboru nemocných s VPMD. Viz tabulka 21 a 22.

TABULKA 21: ZÁKLADNÍ BIOCHEMICKÁ VYŠETŘENÍ U NEMOCNÝCH SE SISHL

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		p (Wilcox.test)
		Medián	IQR	Medián	IQR	
<i>Glykémie (mmol/l)</i>	72	6,00	5,3-7,2	5,70	5,1-6,7	0,341
<i>Kreatinin (umol/l)</i>	72	71,50	138,0-142,0	62,50	139,0-143,0	<0,0001
<i>Bilirubin (umol/l)</i>	70	8,00	6,0-10,0	6,00	5,0-9,3	<0,0001
<i>ALT (ukat/l)</i>	70	0,48	0,33-0,68	0,37	0,27-0,58	<0,0001
<i>AST (ukat/l)</i>	70	0,39	0,31-0,51	0,34	0,26-0,43	<0,0001
<i>GMT (ukat/l)</i>	70	0,46	0,30-0,78	0,29	0,21-0,47	<0,0001
<i>Celková bílkovina (g/l)</i>	70	63,20	60,2-67,5	50,55	47,9-53,2	<0,0001

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		p (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD	
<i>Natrium (mmol/l)</i>	70	139,65	3,01	141,12	3,01	<0,0001
<i>Kalium (mmol/l)</i>	70	3,89	0,31	3,92	0,34	0,185
<i>Chlorid (mmol/l)</i>	70	102,93	3,84	105,08	3,98	<0,0001
<i>Calcium (mmol/l)</i>	70	2,21	0,12	2,00	0,24	<0,0001
<i>Fosfor (mmol/l)</i>	70	1,01	0,19	0,89	0,20	<0,0001
<i>Urea (mmol/l)</i>	72	5,22	1,70	4,81	1,68	<0,0001
<i>Kys.močová (umol/l)</i>	72	314,31	87,33	287,65	84,25	<0,0001
<i>CK (ukat/l)</i>	70	1,19	0,93	0,87	0,31	<0,0001
<i>Albumin (g/l)</i>	70	41,78	4,51	34,67	5,03	<0,0001

Legenda: N= počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; ALT = alaninaminotransferáza; AST = aminoaspartáttransferáza; CK = kreatinfosfokináza; GMT = gamaglutamyltransferáza;

TABULKA 22: PARAMETRY KREVNÍHO OBRAZU – SISHL

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		p (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD	
<i>Leukocyty (x10<sup>9</sup>/l)</i>	72	8,15	3,13	9,35	3,20	<0,0001
<i>Hemoglobin (g/l)</i>	72	137,33	16,51	133,42	23,61	0,042
<i>Hematokrit (%)</i>	72	40,03	4,50	39,52	5,11	0,001
<i>MCV (fl)</i>	72	87,75	2,65	88,02	2,69	0,007
<i>Trombocyty (x10<sup>9</sup>/l)</i>	72	236,89	56,02	223,17	48,28	<0,0001
<i>MPV (fl)</i>	72	10,08	0,79	12,66	0,80	0,259
<i>PCT (%)</i>	72	23,17	5,18	22,22	4,67	<0,0001
<i>PDW (fl)</i>	72	11,90	1,89	11,70	1,83	0,004
Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		p (Wilcox. test)
		Medián	IQR	Medián	IQR	
<i>PT (poměr)</i>	67	0,96	0,93-1,94	1,26	1,13-1,34	<0,0001
<i>APTT</i>	67	1,01	0,94-1,07	1,41	1,21-1,95	<0,0001

Legenda: N= počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; MCV= střední objem erytrocytu; PCT = destičkový hematokrit; PDW = šíře distribuce histogramu destiček podle jejich objemu; MPV = střední objem trombocytu; PT = protrombinový čas; APTT = aktivovaný parciální tromboplastinový čas.

#### 6.2.4.2 Změny ukazatelů reologické účinnosti u nemocných se SISHL

Odběr párových vzorků byl prováděn společně s odběrem biochemických hematologických vyšetření ve stejném schématu a čase, pouze odběr fibrinogenu probíhal před každou procedurou a po každé proceduře z důvodu kontroly bezpečnosti procedury a také pro rozhodnutí o množství ošetřené plazmy s cílem udržet hodnoty fibrinogenu nad 1 g/l. Párové vzorky ke zhodnocení reologické účinnosti jsme získali u 36 nemocných (72 vzorků). Vyšetření IgM,  $\alpha_2$ -makroglobulinu a lipoproteinu (a) před a po reoferéze bylo provedeno pouze u části nemocných (48 vzorků).

Fibrinogen má přímo úměrný vztah k viskozitě plazmy, proto je jeho pokles při léčbě velmi žádoucí. Po procedurách klesal významně (z průměrné hodnoty 3,24 na 1,41 g/l). Po žádné proceduře nedošlo k poklesu pod stanovenou minimální hodnotu – 0,7g/l.

Po procedurách došlo průměrně ke snížení celkového cholesterolu o 52,4 %, LDL-cholesterolu o 60,8 %,  $\alpha_2$ -makroglobulinu o 49,7 %, fibrinogenu o 56,5 %, IgM o 62,5 %, LDL-cholesterolu o 60,8 %, apolipoproteinu B o 60,9 %. Pokles uvedených faktorů ovlivnil reologické poměry: viskozita plné krve klesla o 18,1 % a viskozita plazmy o 12,6 % (viz tabulka 23).

TABULKA 23: REOLOGICKY VÝZNAMNÉ UKAZATELE - VÝSLEDKY U NEMOCNÝCH SE SISHL

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		Relat. rozdíl %	Celk. pokles %	p (Wilcox test)
		Medián	IQR	Medián	IQR			
<b>Chol. (mmol/l)</b>	72	4,50	4,07-5,33	2,14	1,88-2,59	- 52,44	-64,27	<0,0001
<b>Lp(a) (g/l) *</b>	32	0,14	0,09-0,25	0,07	0,06-0,19	-50,00	-68,97	<0,0001
<b>Lp(a) (mmol/l) *</b>	16	69,30	12,47-57,64	28,10	7,55-52,35	-60,95	-67,68	<0,0001
<b>ApoB (g/l)</b>	72	0,92	0,77-1,09	0,36	0,30-0,41	- 60,87	-64,25	<0,0001
<b>Visk.K. (mPa.s)</b>	72	6,80	5,63-7,70	5,57	4,86-6,69	-18,08	-21,20	<0,0001
Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		Relat. rozdíl %	Celk. pokles %	p (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD			
<b>LDL ch. (mmol/l)</b>	72	2,68	0,94	1,05	0,46	- 60,82	-74,14	<0,0001
<b><math>\alpha_2</math>-makrog. (g/l)</b>	48	144,44	42,68	72,72	24,42	-49,65	-50,77	<0,0001
<b>Imunogl. M (g/l)</b>	48	0,64	0,29	0,29	0,24	-62,50	- 72,2	<0,0001
<b>Fibrinogen (g/l)</b>	120	3,24	1,46	1,41	0,84	-56,48	-62,74	<0,0001
<b>Visk. P.(mPa.s)</b>	72	2,15	0,30	1,88	0,25	-12,56	-18,14	<0,0001

Legenda: N = počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; Relat. rozdíl = rozdíl v % mezi mediánem/průměrnou hodnotou před a po proceduře; Celk.pokles = pokles mezi mediánem/průměrnou hodnotou před 1. procedurou a po poslední proceduře (%); Chol. = celkový cholesterol; Lp(a) = lipoprotein (a); ApoB = apolipoprotein B; Visk.K = viskozita krve; LDL ch. = LDL cholesterol;  $\alpha_2$ -makrogl. =  $\alpha_2$ -makroglobulin; Imunog.M = imunoglobulin M; Visk.P = viskozita plazmy; \* = od 1.7. 2014 došlo v laboratoři ke změně jednotek u lipoproteinu (a), jednotky g/l byly změněny na mmol/l.

### 6.2.4.3 Výsledky „speciálních vyšetření“

Během výzkumu byla prováděna, stejně jako u pacientů s VPMD, další, vybraná („speciální“) vyšetření. Principy vyšetření byly rovněž stejné jako u pacientů s VPMD (viz kapitola 6.1.4.4).

Byl zjištěn pokles faktorů významných v mikrocirkulaci: MCP-1 a solubilního CD40L, což může stejně jako hsCRP svědčit pro pokles aktivity zánětlivého procesu nebo ateromatózy (Borberg 2006; Ridker et al. 2009). Dále byl zjištěn pokles selektinových adhezních molekul (sP-selektinu) v periferní krvi. Hladinu sE-selektinu jsme vyšetřovali na začátku výzkumu, ale u SISHL jsme opět nedošli k pozitivním výsledkům; protože se hladina neměnila, v dalším nebyla sledována. IL-10 při vyšetřování prvních nemocných ve výzkumné sondě vykazoval sice u nemocných se SISHL po léčbě pokles, ale v přesněji sledovaném a větším souboru z let 2012-2015 nedosáhl statisticky významnou změnu. Solubilní APO-Fas (marker apoptotické aktivity) po procedurách významně klesal obdobně jako u souboru s VPMDa v souladu s literárními daty (Li et al. 2006; Okura et al. 2002). Významně klesal i endoglin, ukazatel zánětlivé a aterosklerotické aktivity, což naše skupina prokázala již dříve v jiné indikaci – u familiární hypercholesterolemie (Blaha et al. 2008a). Konkrétní výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 24.

TABULKA 24: VÝSLEDKY SPECIÁLNÍCH VYŠETŘENÍ U NEMOCNÝCH SE SISHL

Ukazatel	N	Před procedurou		Po proceduře		p (párový t-test)
		Průměr	SD	Průměr	SD	
<i>sApoFas (pg/ml)</i>	57	960,25	366,41	847,53	349,78	< 0,0001
<i>IL-10 (pg/ml)</i>	57	46,76	32,63	46,08	30,93	0,2150
<i>MCP-1 (pg/ml)</i>	57	244,07	95,12	203,30	74,73	< 0,0001
<i>hsCRP (mg/l)</i>	57	6,35	13,39	5,35	10,46	< 0,0001
<i>CD40L (pg/ml)</i>	57	5764,21	1813,01	4745,33	1617,52	< 0,0001
<i>sP-selektin (ng/ml)</i>	57	133,37	53,69	121,10	53,05	0,001
<i>Endoglin (ng/ml)</i>	57	4,17	1,57	3,46	1,49	< 0,0001

Legenda: N = počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru; sApoFas = solubilní marker apoptotické aktivity; IL-10 = interleukin 10; MCP-1 = monocytární chemotaktický protein; hsCRP = high sensitivity C reactive protein; sP-selektin = solubilní P-selektin



## 6.2.5 PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI PŘI LÉČBĚ SISHL

Podobně jako u nemocných s VPMD jsme i u nemocných se SISHL prokázali, že naše modifikace léčby reoferézou účinně snižuje hladinu reologicky významných činitelů (viz výše tabulka 23). Z 39 nemocných, kteří úspěšně ukončili všechny procedury, jsme získali párové vzorky vhodné k další analýze od 33 nemocných, z toho bylo klinicky úspěšných 24 nemocných se zlepšením sluchu o 50 a více %. Ostatních 9 bylo neúspěšných. Mezi oběma skupinami (nemocní léčení úspěšně a neúspěšně) nebyl statisticky významný rozdíl ve věku ( $p = 0,318$ ) a v pohlaví ( $p = 0,240$ ). U obou skupin nemocných se SISHL jsme hodnocení prováděli identickým způsobem jako u nemocných s VPMD.

### 6.2.5.1 Predikce podle reologicky efektivních faktorů

Pomocí základních statistických metod jsme provedli srovnání hladin reologicky účinných faktorů u skupiny klinicky úspěšných nemocných oproti neúspěšným. Analyzovány byly opět párové vzorky odebrané nemocným na začátku a na konci série reoferéz, vždy před a po reoferéze.

Celkem bylo zhodnoceno 66 párových vzorků, lipoprotein (a) jsme hodnotili pouze vyšetření provedených do 1.7.2014, kdy došlo ke změně laboratorních mezí, menší počet vzorků byl také u vyšetření imunoglobulinu M a viskozity krve a plazmy. Srovnali jsme také množství promyté plazmy u obou skupin nemocných. Výsledky jsou uvedené v tabulce 25.

V tabulce uvedené výsledky ukazují, že hladiny reologicky významných činitelů ani množství promyté plazmy se u skupiny úspěšných nemocných a neúspěšných statisticky významně neliší. Z výchozí hladiny reologicky významných činitelů nebo z množství ošetřené plazmy se tedy prognóza určit nedá.

..

TABULKA 25: POROVNÁNÍ HLADINY REOLOGICKY VÝZNAMNÝCH FAKTORŮ U NEMOCNÝCH SE SISHL ÚSPĚŠNĚ A NEÚSPĚŠNĚ LÉČENÝCH

Ukazatel	Neúspěšní			Úspěšní			p (2-výb. t-test)
	N	Průměr	SD	N	Průměr	SD	
<i>Chol před (mmol/l)</i>	18	4,57	0,86	48	4,81	1,04	0,208
<i>Chol po (mmol/l)</i>	18	2,13	0,56	48	2,30	0,56	0,107
<i>LDL před (mmol/l)</i>	18	2,49	0,65	48	2,75	0,97	0,345
<i>LDL po (mmol/l)</i>	18	1,02	0,42	48	1,11	0,47	0,374
<i>ApoB před (g/l)</i>	18	0,91	0,23	48	1,15	0,25	0,889
<i>ApoB po (g/l)</i>	18	0,35	0,14	48	0,38	0,14	0,568
<i>IgM před (g/l)</i>	10	0,74	0,44	36	0,80	0,52	0,225
<i>IgM po (g/l)</i>	10	0,27	0,20	36	0,35	0,29	0,225
<i>Fbg před (g/l)</i>	26	3,20	0,63	68	3,14	0,86	0,740
<i>Fbg po (g/l)</i>	26	1,31	0,40	68	1,38	0,46	0,484
<i>Visk.P před(mPa.s)</i>	18	2,15	0,25	44	2,09	0,26	0,412
<i>Visk.P po(mPa.s)</i>	18	1,80	0,24	44	1,86	0,23	0,50
<i>Visk.K před(mPa.s)</i>	18	6,82	1,39	44	6,46	1,60	0,414
<i>Visk.K po(mPa.s)</i>	18	5,91	1,18	44	5,74	1,07	0,854
<i>Promytá plazma (ml)</i>	26	3309,8	832,2	68	2972,9	1064,5	0,675
<i>Poměr promyto/TPV</i>	26	1,12	0,23	68	1,03	0,23	0,746
Ukazatel	Neúspěšní			Úspěšní			P (M-W. test)
	N	Medián	IQR	N	Medián	IQR	
<i>Lp(a) před (g/l)</i>	7	0,13	0,10-0,17	32	0,14	0,10-0,18	0,655
<i>Lp(a) po (g/l)</i>	7	0,07	0,04-0,08	32	0,06	0,03-0,08	0,313

Legenda: N = počet vyšetřených vzorků, SD = směrodatná odchylka průměru; IQR = interkvartilové rozpětí; Chol = celkový cholesterol; LDL = LDL-cholesterol; Lp(a) = lipoprotein(a); ApoB = apolipoprotein B; IgM = imunoglobulin M; Fbg = fibrinogen; Visk.P = viskozita plazmy; Visk.K = viskozita krve; TPV = objem plazmy nemocného; M-W. test = Mann-Whitneyův test.

### 6.2.5.2 Hodnocení metodou diskriminační analýzy – SISHL

Bylo provedeno další hodnocení, a to metodou diskriminační analýzy obdobně jako u nemocných VPMD – viz výše kapitola 6.1.5.2, kde je uveden i princip metody.

Předně jsme vyhodnotili pouze reologicky účinné faktory: Při hodnocení vyřadil systém hladiny IgM jako faktor nevýznamný pro predikci prognózy. Z hodnocení také byli vyřazeni nemocní, kde chyběl některý údaj z celého komplexu vyšetření (vyžaduje se přítomnost všech hodnot plánovaných do hodnocení) a hodnoceno bylo 6 neúspěšně a 16 úspěšně léčených nemocných. Systém určil klasifikační funkce, koeficienty příslušných lineárních klasifikačních funkcí použitých ke klasifikaci, opět postupně vyřadil nevhodné ukazatele. Na konci byly hodnoceny pouze:  $\alpha_2$ -makroglobulin, celkový cholesterol a viskozita plazmy. Takto byli jednotlivě klasifikováni všichni nemocní. V závěru program provedl konečné vyhodnocení a určil procentuální správnost predikce úspěšné léčby. V tomto případě byla předpověď správná u 89 % neúspěšných nemocných a u 76 % úspěšných, celkově v 80 %. Jestliže jsme použili k hodnocení nemocných se SISHL kvadratický model, byl v závěru hodnocen pouze LDL-cholesterol, viskozita krve a plazmy a výsledky byly ještě příznivější (hodnoceno celkem 30 nemocných). Výsledky predikce úspěšnosti jsou uvedené v tabulce 26.

TABULKA 26: PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI LÉČBY POMOCÍ DISKRIMINAČNÍ ANALÝZY – SISHL

	Predikce odpovědi		% správné predikce	Predikce předpovědi (kvadratický model)		% správné predikce
	Neúspěch	Úspěch		Neúspěch	Úspěch	
<i>Neúspěšní nemocní</i>	8	1	89	9	0	100
<i>Úspěšní nemocní</i>	5	16	76	3	18	86
<i>Celkem</i>	13	17	80	12	18	90

Legenda: popis viz text.

## 6.3 EKONOMICKÁ PROBLEMATIKA LÉČBY REOFERÉZOU

Reoferéza v léčbě VPMD i SISHL, je relativně novou léčebnou metodou. Ekonomické zhodnocení reoferézy náleží ke komplexnímu přístupu indikujícího lékaře. Z těchto důvodů byla ekonomická rozvaha o využití reoferézy v léčbě VPMD a SISHL jedním z cílů této práce.

V našem výzkumu bylo provedení výkonů a zajištění potřebného zdravotního materiálů hrazeno v rámci výše uvedených výzkumných záměrů nebo rozvojových projektů

FN (viz kapitola 5.1.1 a 5.1.2). Výkon reoferézy při VPMD a SISHL není v České republice hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění, i když v současné době vyvíjí pracovní skupina České oftalmologické společnosti snahu o širší uplatnění léčby reoferézou u VPMD a její hrazení z prostředků veřejného zdravotnictví.

Podle aktuálního Seznamu zdravotních výkonů Všeobecné zdravotní pojišťovny z roku 2018 lze výkon reoferézy ohodnotit jako adsorpční výkon, který se hradí jako imunoadsorpce (číslo výkonu 22371 a 22373) v bodové hodnotě 3681 bodů, a spotřební materiál lze vykázat jako ZÚLP. Ceny materiálu se liší podle výrobců a prodejců v jednotlivých zemích i v naší republice.

Podle výše uvedeného Seznamu zdravotních výkonů lze provést adsorpci fibrinu a fibrinogenu u stavů, kde dochází k závažné poruše mikrocirkulace refrakterní na standardní terapii (např. náhlá porucha sluchu, degenerace makuly s těžkou poruchou zraku).

K reoferéze používáme na našem pracovišti jako primární přístroj k oddělení plazmy separátor Cobe Spectra nebo Optia (od r. 2017 výhradně Optia) (Terumo BCT, Lakewood, Colorado, USA). Automatické plnění, zajištění průtoku a proplachování používaného reoferetického filtru (Evaflux 4A, Kawasumi, Tokyo, Japonsko) zajišťuje přístroj CF 100 firmy Infomed, Ženeva, Švýcarsko. Toto uspořádání vyžaduje soupravu spojovacích hadic pro přístroj Optia a soupravu propojovacích hadic pro přístroj CF100. Cena námi používaného materiálu je shrnuta v tabulce 27.

TABULKA 27: NÁKLADY NA SPOTŘEBNÍ ZDRAVOTNICKÝ MATERIÁL K REOFERÉZE

<b>Druh spotřebního zdravotnického materiálu</b>	<b>CENA v Kč</b>
<i>Filtr Evaflux</i>	16.180,-
<i>Set propojovacích hadic pro přístroj Optia</i>	5.142,-
<i>Set propojovacích hadic pro přístroj CF 100</i>	2.699,-
Celkem	<b>24.021,-</b>

Legenda: popis viz text.

## 7 DISKUZE

Reohemoterapie zaznamenala v posledních desetiletích významný pokrok a je v současné době důležitou léčebnou metodou i u poruch mikrocirkulace, kde dosud úspěšná léčba nebyla možná.

## 7.1 POZNÁMKA K VÝVOJI PROBLEMATIKY VE SVĚTĚ A U NÁS

Klinická implementace reoterapie nebyla ve světě ani na našem pracovišti jednoduchá. Využití reologie v lékařské praxi bylo relativně dlouho považováno jen za lákavou, ale výrazně limitovanou terapeutickou možnost. Na rozdíl od medicíny, se reologie v jiných oborech prosadila mnohem dříve. Zákonitosti reologie byly nejprve, a jsou dosud, využívány při řízení průtoku tekutin např. v naftařství, automobilovém průmyslu, stavebnictví (zpracovávání betonu, bitumenu, asfaltu), při práci s plyny nebo tekutým dusíkem, tekutým kyslíkem, ale i se sypkými hmotami (např. s talkem, pískem) atd. Pokrok lékařské reologie umožnil teprve rozvoj přístrojů k extrakorporální hemaferéze - krevních separátorů, k čemuž došlo v šedesátých letech minulého století. Tento pokrok techniky umožnil účinnou separaci krevních elementů od plazmy.

Se zpožděním pouhých deseti let začaly být tyto techniky rozvíjeny i na pracovišti II. interní kliniky v Hradci Králové (Blaha et al. 1984). Za období počátečního faktického klinického využití a ověřování hemaferetických metod v reologické léčbě se však považuje doba kolem roku 1980, protože teprve potom byly k dispozici potřebné moderní reologické metodikya dokonalé separátory i vhodné filtry (Valbonesi et al. 2005). S rozvojem moderních technologií, vedoucích k různým sekundárním separačním technikám, jako je precipitace, adsorpce a filtrace, došlo také k významnému rozšíření indikačního spektra využití reoterapie k léčbě onemocnění podmíněných reologickou poruchou v mikrocirkulaci.

Vlna počáteční entuziastické snahy o široké uplatnění teoretických poznatků vědy v medicínské reologické praxi byla postupně upřesňována. Výsledky snah o uplatnění reoterapie u některých, zejména cévních chorob, které se podle prvních zpráv jevíly efektivní, později nebyly potvrzeny (Bláha et al. 2008b; Valbonesi et al. 2005). S narůstajícím počtem zkušeností se okruh využití reologii ovlivňujících technik upřesnil a zúžil. Tak tomu bylo i na našem pracovišti – výzkum se u nás zúžil do dvou oblastí: léčba suché formy VPMD a náhlé idiopatické ztráty sluchu.

Bylo docíleno dalších poznatků a upřesnění. Widder publikoval změny hemoreologických i biochemických parametrů při použití selektivní adsorpce. Podařilo se statisticky významně snížit vysokomolekulární proteiny i lipoproteiny (o 47-50 %), ale také viskozitu plné krve a agregabilitu erytrocytů - měřeno za 24 hod. po proceduře ( $p < 0,05$ ), přičemž hodnoty leukocytů, erytrocytů, draslíku, sodíku zůstaly nezměněné (Widder et al. 1996).

Naše pracoviště se rozvíjelo s využitím zkušeností Deutsche Hemapheresis Zentrum, Kolín nad Rýnem. Šéf centra, prof. Borberg, publikoval v roce 2006 na základě zkušeností s diferenciační separační technikou významné závěry: kombinace centrifugace se sekundární filtrace (Reohemapheresis) je nejúčinnější a ekonomicky přijatelný přístup. Limitací výměnné plazmaferézy pro reoterapii je nízká specifita, relativně vysoká cena a přinejmenším teoretické riziko přenosu infekce. Heparinová precipitace, původně vyvinutá pro nemocné s familiární hypercholesterolémií, vede ke snížení hladin cholesterolu, ovšem reologický efekt není významný. Dvojitou filtraci považoval za nejdražší alternativu. Za nejpríjemnější postup označil centrifugaci s použitím přístrojů například Cobe/Gambro Spectra nebo Dideco Excel a následnou filtraci s použitím sekundárních filtrů Kuraray Evaflux 4A nebo 5A. Za nevýhody dvojité filtrace považoval sníženou separační efektivitu, zejména při nízkém průtoku krve, riziko hemolýzy a aktivace komplementu. Uzavíral, že na základě těchto poznatků vyplývá preference reohemaferézy ve srovnání s hemodilucí a infuzní terapií. Je založena na odstranění definovaného spektra vysokomolekulárních látek, okamžité efektivitě, relativně dlouhotrvajícím efektu zdokumentovaném laboratorním i reologickým měřením i klinickými výsledky (Borberg 2006; Borberg and Tauchert 2006). Poznatky těchto autorů, z kterých jsme u nás vycházeli, jsou shrnuty v tabulce 28.

Na základě příznivých poznatků o reohemaferéze i výsledků výše uvedených a dalších prací jsme se rozhodli také na našem pracovišti zavést vlastní modifikaci Borbergovy metody reohemaferézy, nazývanou buď originálním názvem „reohemaferéza“ (se svolením autorů), nebo „reoféze“. Bylo k dispozici i potřebné technické vybavení (separátor Cobe Spectra byl na našem pracovišti denně používán k různým aferézám) a brzy byly získány i první zkušenosti s technikou kombinace centrifugace a následné filtrace - filtry Evaflux jsme již od roku 2003 používali v léčbě familiární hypercholesterolémie (Blaha 2003). Na pracovišti byl prověřován význam reoferézy u diabetické nohy (Blaha et al. 2008b), ale v dalších letech se soustředil náš výzkum na léčbu VPMD a SISHL. Proto byla jako téma této disertační práce zvolena reoferéza u těchto dvou nemocí s vědomím, že lze vytvořit dostatečně velký soubor nemocných, kde by bylo možné provést klinická i statistická hodnocení.

TABULKA 28: PŘEDPOKLADY K LÉČBĚ REOFERÉZOU PODLE BORBERGA A TAUCHERTA, 2006

Metoda	Technika	Hodnocení
1. Plazmaferéza	Centrifugace Filtrace	Překonaná Nespecifická
2. Selektivní adsorpce (např. hydrofobní interakce)	Selektivní vazba relevantních součástí plazmy	Příliš drahá Omezená kapacita
3. Dvojitá filtrace (Rheo- apheresis aj. názvy)	Primární a sekundární separace 2 různými membránovými filtry	Technicky překonaná Příliš drahá
<b>4. Rheohemapheresis (reoferéza)</b>	Primární separace automat. centrifugací + sekundární separace filtrem	Progresivní plně automatická technika Cenově přijatelnější

Legenda: popis- viz text

## 7.2 HODNOCENÍ LÉČBY VPMD REOFERÉZOU

Podkladem slepoty u VPMD, která je hlavní příčinou praktické slepoty obyvatel rozvinutých zemí starších 50 let, je v 80-90% disciformní jizva sítnice, která se vyvíjí u očí s vlhkou formou VPMD (Diamant et al. 2004). Předstupněm praktické slepoty bývá suchá forma VPMD s výskytem měkkých drúz v makule. Bez léčby dochází ve stadiu měkkých drúzk rozvoji ischemie zevních vrstev sítnice na zadním pólu oka s chronickým postupným zhoršováním zraku vlivem apoptózy (geneticky naprogramované smrti buněk). Náhlý zvrát VPMD do vlhké formy během 5 let je popisován až ve 26 % (Donaldson and Pulido 2006).

Jedinou léčebnou metodou současnosti, u které práce některých autorů (včetně prací naší skupiny) prokazují, že může zabránit přechodu suché formy VPMD do devastující vlhké formy a vést ke stabilizaci nebo dokonce ke zlepšení zrakových funkcí nemocných se vzestupem zrakové ostrosti, představuje reoferéza (Rencova et al. 2013; Schwartz et al. 2016). Série léčebných pulzů vede k redukci bariéry difuze z Bruchovy membrány normalizuje metabolickou výměnu mezi pigmentovým epitelem sítnice a choriokapilaris. Zlepší výživu buněk RPE a neuroepitelu. Snížení ischemie snižuje produkci VEGF (vascular endothelial growth factor) buňkami RPE. Úprava poměrů na molekulární úrovni a aktivace funkčních rezerv sítnice může zabránit rozvoji procesu vedoucího ke ztrátě zraku. Předpokládá se i zlepšení průtoku krve cévnatkou, který je u suché formy VPMD

výrazně alterován (Nowak et al. 2005). O perfuzi cévnatky a sítnice nás informují hodnoty pulzního okulárního krevního proudu. Je prokázána nižší viskozita plazmy i celé krve a snížená agregace erytrocytů (Klingel et al. 2003a).

Léčbu VPMD reoferézou jsme zahájili r. 2006 jako první v České republice a mezi předními pracovišti světa s podporou grantu IGA MZČR NR/9118-3. Reoferézu jsme pro účely léčby pacientů s VPMD modifikovali, standardizovali a její klíčové části byly patentovány (Úřad pro ochranu průmyslového vlastnictví, patent č. 301836). Cílem bylo zdokonalení diagnostického i léčebného postupu zároveň se zvýšením léčebné efektivity a bezpečnosti a vytvoření již dostatečného souboru nemocných a kontrol, aby bylo možné hodnocení obvyklými vědeckými metodami. Jednalo se zejména o stanovení změn funkce jednotlivých typů nervových buněk a oblastí sítnice a o upřesnění významu některých imunologicky nebo reologicky významných faktorů, což jsme dosud v literatuře nenašli. Objasnění těchto údajů má nejen teoretický, ale i výrazně praktický klinický význam, protože by mohlo umožnit cílené řízení léčby tak, aby bylo docíleno maximálního efektu s minimálním zatížením nemocných i s minimálními náklady.

Bylo publikováno několik řízených studií, které prokazují účinnost reoferézy u suché formy VPMD, jak se konstatuje v posledních doporučeních Americké společnosti pro hemaferézu (ASFA) (Schwartz et al. 2016). Cesta k zařazení reoferézy do pravidelné léčby suché formy VPMD však byla komplikovaná. Po prvních úspěších, které publikovali němečtí autoři, studie UTAH a další (přehled viz v tabulce 3 výše) byla podniknuta dosud nejrozsáhlejší mezinárodní randomizovaná dvojitě zaslepená studie MIRA-1. Do studie bylo zařazeno 216 nemocných. Po původním skvělém začátku však bylo zjištěno a publikováno v předběžné (interim) publikaci, že výsledky nejsou lepší při léčbě reoferézou. Studie byla zastavena, ale byly zjištěny její organizační nedostatky. Americká FDA požadovala k definitivním závěrům upřesnění a výsledky od dalších cca 150 nemocných, což však sponzor (firma OccuLogix) nemohl ekonomicky zabezpečit. Tím studie skončila. Následně byl ovšem proveden pečlivý rozbor dosažených výsledků a bylo zjištěno, že u 37 % léčených nemocných a 27 % kontrol, zařazených do studie, neodpovídala indikační kritéria schválenému plánu. To vedlo ke zkreslení konečného výsledku. Když byli chybně zařazení nemocní a kontroly vyřazení a bylo provedeno nové hodnocení, bylo zjištěno, že reoferéza je účinnou léčbou. Požadavky FDA na schválení studie však tím splněny nebyly (Donaldson and Pulido 2006; Graham et al. 2017; Pulido et al. 2006).



Naše studie účinnost reoferézy při léčbě VPMD prokazují (Blaha et al. 2013; Rencova et al. 2013). Do roku 2013 byly publikovány kazuistiky nebo série nemocných, dvě kontrolované studie a pět randomizovaných kontrolovaných prací (Schwartz et al. 2013), které svědčí o úspěchu reoferézy u suché formy VPMD. Reoferézou samozřejmě nelze VPMD vyléčit, ale uvedené práce svědčí o možnosti zadržet její progresi, nebo dokonce zlepšit stav nemocných na dlouhou časovou periodu. V našem výzkumu jsme prokázali pozitivní změny anatomických (přítomnost měkkých drúz, DPED), funkčních (příznivé ovlivnění zrakové ostrosti, pozitivní změny na mfERG) i humorálních ukazatelů. Aktivita sítnice je stabilizována, nebo se může dokonce mírně zlepšit v případě časných pozitivních strukturálních změn - přiložení DPED a junkcevnitřních a zevních segmentů (vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů) bez rozvoje defektů zasahujících do foveolární oblasti), a to i po léčbě pokročilé suché formy VPMD reoferézou (Rencova et al. 2015). Naproti tomu u nemocných s dlouhotrvajícími anatomickými změnami DPED, odchlípením vrstvy elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů nebo progresí do geografické atrofie či vlhké formy onemocnění aktivita sítnice snižuje.

Pokud jde o náš soubor nemocných s VPMD, lze shrnout, že léčba reoferézou byla úspěšná, u 78,2 % nemocných došlo ke stabilizaci nebo zlepšení VPMD.

Vstupní průměrná/mediánová NKZO ve sledované skupině nemocných (kteří podstoupili léčbu reoferézou) v průběhu sledování jen nevýznamně kolísala. I za 5 let sledování se od výchozí nelišila významně ( $p = 0,73$ ). U kontrol se během sledovací doby zraková ostrost snižovala, po 4 letech i statisticky významně ( $p < 0,01$ ). Rozdíly NKZO mezi skupinami léčených a kontrolní byly od 4 let sledování statisticky významné ve prospěch nemocných léčených reoferézou ( $p < 0,01$ ).

U souboru námi léčených nemocných bylo také dosaženo zlepšení morfologických změn na sítnici ve statisticky významně vyšším počtu nežli u kontrol. Jak ukazuje tabulka 9 výše, bylo to v 62,3 % případů, kdežto u kontrol jen v 7,4 %.

Během procedur nedošlo ke klinicky významným změnám základních biochemických a hematologických parametrů. Po opakovaných odběrech obvykle nedochází k rozvoji anémie ani závažné trombocytopenie. Toto zjištění má klinickou důležitost, neboť některé separátory staršího typu mohly počty elementů rozkolísat, docházelo až k třetinovému poklesu trombocytů. V minulosti byly popsány významné reakce, které jsme i sami pozorovali (Blaha et al. 1980). Při použití námi zvolené antikoagulace nedošlo ani v jednom případě ke krvácivým komplikacím ani k technickým obtížím z důvodu nedostatečné antikoagulace.

Výsledky vyšetření reologicky významných faktorů dokládají, že procedury jsou reologicky velmi účinné, dochází k více než 50% poklesu reologicky efektivních parametrů, což je základním předpokladem zvýšení průtoku v mikrocirkulaci.

Ze změn uvedených tzv. speciálních faktorů, které jsou uváděny v literatuře někdy jako významné u nemocných s reologickými poruchami nebo zánětlivými či ateromatózními procesy, lze v našem případě vyvodit zatím pilotní závěry. Některé ukazatele svědčí pro pokles aktivity endotelu nebo zánětlivých změn. Kromě malých počtů vyšetřených vzorků hraje jistě roli i to, že některé změny nastávají pravděpodobně později, ne hned po ukončení procedury. Provádět u nemocných odběry opakovaně nebylo technicky možné ani etické.

V rámci grantu GAUK 373 611 (Aktivita vybraných trombocytárních a koagulačních markerů po LDL-aféřeze a rheoferéze), jehož byla autorka disertační práce hlavním řešitelem, jsme zkoumali u souboru nemocných léčených různými aferetickými metodami (včetně 16 nemocných s VPMD a 16 nemocnými se SISHL) význam aktivity trombocytů, vybraných koagulačních faktorů, ukazatelů fibrinolýzy i aktivity endotelu při extrakorporální eliminaci. Při vyšetření primární hemostázy byl zjištěn pokles agregační aktivity po ADP, neměnila se frakce nezralých trombocytů a destičkový faktor 4, po procedurách vždy klesal tkáňový faktor, trombomodulin a komplexy trombin/antitrombin, ale jednoznačně určit parametry podstatné pro určení aktivity nebylo možné (Kostal et al. 2014).

### 7.2.1 MOŽNOSTI PREDIKCE ÚSPĚŠNÉ LÉČBY VPMD

Naše pokusy o predikci úspěšnosti terapie VPMD pomocí jednotlivých faktorů významných pro reologické poměry (celkový cholesterol, LDL-cholesterol, apolipoprotein B, IgM,  $\alpha_2$ -makroglobulin, fibrinogen, dále viskozita krve a plazmy) nebyly úspěšné. Ani faktory jako celkové množství promyté plazmy v ml, ani procento promyté plazmy z celkového množství cirkulující plazmy v našem souboru nemohou být činitelem předurčujícím další prognózu.

Pomocí jednotlivých ukazatelů nebylo možno predikovat výsledek ani při použití některých dalších faktorů, které jsou považovány z hlediska reologie za druhořadé („sekundární“), ale snadno dosažitelné – vyzkoušeli jsme neúspěšně využít hladinu albuminu, celkovou bílkovinu, hladinu hemoglobinu, počet leukocytů, trombocytů, kreatinin, glykémii.

Využití dalších možností však je nadějně. Diskriminační analýza ukázala, že její výsledky dávají naději na předpověď prognózy nemocného, zejména když se využije k hodnocení nejen paleta tzv. reologicky efektivních faktorů, ale komplexně i skupina výše jmenovaných sekundárních faktorů. Některé z vyzkoušených variant diskriminační analýzy

nabízejí již zajímavé výsledky, kdy předpověď správného výsledku dosahuje požadované tři čtvrtiny případů nebo se blíží 100 %. Pro VPMD bude třeba určit, která varianta diskriminační analýzy, nabízená softwarem Systat, bude nejvíce odpovídat skutečnosti. Ukázali jsme, že výsledky jednotlivých variant se liší. To bude předmětem našeho dalšího výzkumu.

Hlavním nedostatkem našeho pátrání je ovšem dosud malá skupina nemocných. Nevýhodou je také, že v hodnoceném komplexu stovek výsledků program beze zbytku vylučuje každý nedostatek a vyřadí nemocného z celého hodnocení, ať jde o odchylku vzniklou klinikou nemocného (nedokončení výkonu), technicky, tak samozřejmě chybu v činnosti personálu. Tím se dále snižuje počet hodnocených. V našem výzkumu proto pokračujeme s cílem zvětšit sestavu nemocných.

## **7.2.2 KRITICKÉ PŘIPOMÍNKY K LÉČBĚ VPMD REOFERÉZOU**

K léčbě VPMD reoferézou byly vzneseny připomínky a existují i kritické hlasy. Především existuje námitka, že dosud nebylo podáno explicitní vysvětlení patofyziologického mechanismu, jak přesně ovlivní odnětí vysokomolekulárních bílkovin mikrocirkulaci v retinálním pigmentovém epitelu. Lze jen předpokládat, že po snížení viskozity dochází ke zvýšení průtoku v mikrocirkulaci poškozené retiny a k hojení lézí – ale jde o předpoklad nebo nepřímý důkaz, přímá měření průtoku v sítnici po reoferéze chybí. Dále jde o určitou nejistotu obklopující klinický význam zlepšení zraku, kterého bylo dosaženo. A konečně se namítá, že existují případy, kdy spontánně dochází ke stabilizaci choroby po dlouhou dobu a že existují nemocní, kde dochází spontánně k regresi drúz a jejich vymizení bez jakékoliv léčby (Finger et al. 2009).

Podle Grahama bylo do roku 2017 publikováno o aferézách u makulární degenerace 53 prací. Tito autoři detailně shrnují a popisují několik dobře řízených studií s pozitivními výsledky - zlepšení suché formy VPMD po reoferéze (Graham et al. 2017). Jedna studie byla negativní – šlo o 10 pacientů léčených reoferézou, dalších 10 v zaslepené studii a 10 neléčených (Swartz and Rabetoy 1999). Byly ale publikovány i pozitivní randomizované studie (včetně naší) shrnuté v posledním vydání směrnic pro léčbu ASFA (Schwartz et al. 2016). Přesto se Graham et al. domnívají, že situace není zralá k tvrzení, že reoferézu lze u VPMD jednoznačně doporučit a definitivně rozhodnout by měla velká řízená studie (Graham et al. 2017).

### 7.2.2.1 Antioxidační rovnováha

Setkali jsme se ještě s jednou námitkou, jejímž řešením jsme se podrobněji zabývali. Při reoferéze je odstraněno kolem 60 % intravaskulárních lipoproteinů. Změny hladin lipoproteinů by mohly nepříznivě ovlivnit stav lipoperoxidace (malonyldialdehyd, superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza) a způsobit změny antioxidantů (vitamin E) v séru a v membránách buněk. Markery lipoperoxidace jsou významné z pohledu zachování antioxidační kapacity séra a lipoproteinových frakcí – z tohoto hlediska vypovídají o šetrnosti výkonu. Měli jsme možnost vyšetřit hladiny i v jednotlivých vrstvách lipoproteinů po ultracentrifugaci (VLDL, LDL, HDL) a hladinu antioxidantů (vitamin A, E – také zde včetně zastoupení v jednotlivých vrstvách lipoproteinů). Význam vyšetření frakcí lipoproteinů spočívá v daleko přesnějším pohledu do skutečných patofyziologických poměrů u VPMD, než jen stanovení celkových hodnot v krvi. Jako model poměrů ve tkáních byl vybrán erytrocyt, a to jeho membrána, kde je metabolismus relativně čilý. Z vyšetření 23 nemocných v letech 2008-2011 jsme uzavřeli, že se u nemocných s VPMD hladiny superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy a hladina vitamínu E v erytrocytární membráně a pravděpodobně i v jiných buněčných membránách po reohemaferéze statisticky významně nemění. Tkáňové koncentrace vitamínu E proto zůstávají zachovány i přes dramatické snížení jeho tukového nosiče v krvi (Solichova et al. 2015). Ve frakcích VLDL, LDL a HDL hladina vitamínu E klesá (což je očekávaný pokles při poklesu koncentrace jejich nosičů), stejně tak byl zjištěn pokles hodnot vitamínu E a A v séru. Mnohem zásadnější význam má však poměr vitamínu E a cholesterolu v séru a v jednotlivých lipoproteinových frakcích, kde relativní obsah vitamínu E rovněž neklesal, naopak došlo ke statisticky významnému vzestupu v séru.

Intervence, které vedou k potlačení oxidace LDL cholesterolu, jsou považovány za antiaterogenní. Naše výsledky prokázaly, že léčba pomocí reohemaferézy vedla k efektivnímu snížení LDL-cholesterolémie, přitom se neměnil (neklesal) poměrný obsah vitamínu E v lipoproteinech. Předpokládáme, že popsaná změna vypovídá o relativním zvýšení obsahu vitamínu E v lipoproteinových frakcích VLDL, LDL i HDL v situaci, kdy dochází k dramatickému snížení koncentrace jejich tukového nosiče. Humánní LDL částice obsahují řadu antioxidantů, které regulují oxidaci lipidů včetně alfa-tokoferolu (biologicky nejvíce aktivní forma vitamínu E). Reoferéza může mít dle našich výsledků, vedle významného snížení aterogenního obsahu LDL částic, aditivní příznivý antiaterogenní efekt v důsledku relativního zvýšení obsahu vitamínu E v lipoproteinových frakcích. Sledování uvedeného souboru nemocných s VPMD vyloučilo možnost poškození poměrů

při lipoperoxidaci, naopak potvrdilo při sledování uvedených markerů lipoperoxidace významný a pozitivní efekt procedur. Pokud jde o reoferézu, nenašli jsme v dosavadní literatuře podobné práce a tato zjištění. Další detaily jsou v naší publikaci (Aufartova et al. 2015).

### 7.2.2.2 Endoteliální mikropartikule

Některé publikované práce namítaly, že k průkazu efektivity je třeba řešit význam endoteliálních mikropartikulí (EMP), protože VPMD je nemoc, kde pravděpodobně dochází k aktivaci a posléze k poškození endotelu (Diamant et al. 2004; Strijbos 2011). EMP jsou malé membránové fragmenty (vezikuly) o velikosti menší jak 1  $\mu\text{m}$ , které se odštěpují z endoteliálních buněk (i z krevních buněk) a na svém povrchu nesou charakteristické antigenní markery rodičovské buňky. Prováděli jsme vyšetřování EMP u nemocných léčených reoferézou ve výzkumném projektu IGA MZ ČR NS/9738-4. Výsledky měření u VPMD ukázaly, že počet EMP je jen nevýznamně vyšší oproti kontrolám. Vzhledem k nevýznamným rozdílům jsme v dalším hladinu EMP nevyšetřovali. Ve stejném výzkumném úkolu jsme vyšetřovali také cirkulující endoteliální buňky (CEC). Pro výzkum patogenetických změn mají CEC pravděpodobně značný význam, neboť odrážejí míru poškození endoteliální výstelky a ukazoval se i jejich přímý vztah k angiogenezi, což při VPMD hraje významnou roli.

Endotel je poměrně nepřístupný k přímému sledování, a proto se výzkumníci soustřeďují na různé markery endoteliální funkce. Jedním z přístupů hodnocení endoteliální funkce je měření CEC a EPC (endoteliálních progenitorových buněk) v periferní krvi. CEC se do krve uvolňují ze stěn krevních cév při patologických dějích. EPC jsou buňky obzvláště schopné maturace v buňky se vztahem k lumenu krevních cév a hrají důležitou roli v udržování endoteliální integrity (Barak et al. 2009). Zvýšený počet EPC byl prokázán u VPMD (Machalinska et al. 2011). Neovaskularizace, významný faktor ve vývoji VPMD, probíhá za účasti jednak endoteliálních buněk cévního řečiště, ale také endoteliálních progenitorů z kostní dřeně, které na základě pro-angiogenních působků přispívají k vaskularizaci. Endoteliální buňky se uvolňují do krevního oběhu, vznikají cirkulující endoteliální buňky a je tak možno je detekovat v periferní krvi. CEC v periferní krvi je možné detekovat imunocytochemicky na základě exprese specifických proteinů na jejich povrchu pomocí průtokové cytometrie, viz tabulka 28.

Problematika je u VPMD nedořešena, proto jsme chtěli přispět k objasnění vlastním výzkumem. Polští výzkumníci v poslední době zkoumali různé populace endoteliálních buněk

u nemocných s VPMD a zjistili zvýšený počet jak CEC, tak EPC (Machalinska et al. 2011). Naopak v práci Baraka, který zkoumal počet a funkci EPC u nemocných s nově diagnostikovanou VPMD, je uveden signifikantně snížený počet EPC těchto nemocných ve srovnání s kontrolami (Barak et al. 2009). Evidentně stále přetrvávají rozpory, jaké mechanismy ohledně CEC a EPC v organismu za dané situace převažují, a výsledek pozorování je zřejmě silně ovlivněn i časovými intervaly, kdy se měření provádí. My jsme zvolili párové vzorky před a ihned po ukončení léčebné procedury.

Sami jsme provedli 58 měření, a to u 20 nemocných léčených v rámci výše uvedeného grantu IGA MZ ČR 9738-4. Šlo opět o vyšetření na začátku léčby, uprostřed léčebné série a na konci, a to vždy u párových vzorků. Viz tabulka 29 a obrázek 5.

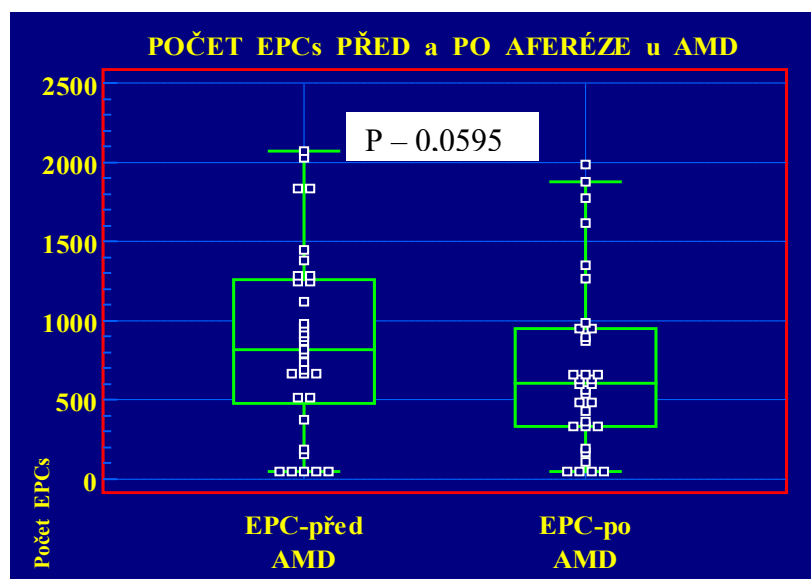
Při vyšetření po reoferéze jsme u všech typů endoteliálních buněk našli nižší počet těchto buněk než před reoferézou, ne však statisticky významně. Nejmarkantnější úbytek byl v případě progenitorových endoteliálních buněk (EPC) -  $p=0,0595$ . Je možné, že tento úbytek přispívá ke klinickému zlepšení, neboť se sníží počet buněk, které hrají významnou roli při neovaskularizačním procesu. Zjištěné údaje je nutno ověřit dalším výzkumem na větším počtu nemocných.

TABULKA 29: POČET JEDNOTLIVÝCH TYPŮ ENDOTELIÁLNÍCH BUNĚK V PERIFERII U NEMOCNÝCH S VPMD PŘED A PO VÝKONU

Parametry	Před procedurou		Po proceduře		p (párový t-test)
	Průměr	SD	Průměr	SD	
<b><i>Cirkulující endoteliální buňky CD45-/VEGFR+/34+/133- (CEC/ml)</i></b>	402	347	299	204	0,143
<b><i>Progenitorové endoteliální buňky ) CD45-/VEGFR+/34+/133+ (EPC/ml)</i></b>	864	584	693	553	0,059
<b><i>Aktivované endoteliální buňky CD45-/31+/146+/105+ (akt.EC/ml)</i></b>	588	697	433	408	0,425
<b><i>Klidové endoteliální buňky CD45-/31+/146+/105- (rest.EC/ml)</i></b>	336	550	223	274	0,393

Legenda: popis viz text.

OBRÁZEK 5: POČET EPC PŘED A PO REOFERÉZE U VPMD



Legenda: AMD = věkem podmíněná makulární degenerace sítnice; EPC = endoteliální progenitorové buňky.

### 7.2.3 SOUHRN K LÉČBĚ VPMD REOFERÉZOU

Na základě našich výsledků lze uzavřít, že reoferéza je možností, jak ovlivnit osud nemocných se suchou formou VPMD, kteří jsou v nebezpečí progresu. Je to účinná a bezpečná léčebná metoda. Tato léčebná modalita je již zakotvena i v celosvětově uznávaných doporučeních ASFA jako metoda první volby (Schwartz et al. 2016), k čemuž zřejmě přispěly i naše výsledky – naše dvě práce byly přímo citovány v těchto doporučeních jako poslední randomizované studie (Blaha et al. 2013; Rencova et al. 2013).

### 7.3 HODNOCENÍ LÉČBY SISHL REOFERÉZOU

Léčba SISHL není dosud dořešena. Standardní léčba kortikoidy nemá uspokojivé výsledky u všech nemocných. U neúspěšných nemocných jsme se proto snažili využít reoterapii. Stachler doporučuje zvážit plazmafiltraci při zvýšeném fibrinogenu a LDL-cholesterolu (Stachler et al. 2012). Filtrace plazmy (double plasma filtration) jako alternativa konvenční empirické terapie je doporučována několika výzkumnými skupinami, jak bylo uvedeno výše (Bianchin et al. 2010; Klingel et al. 2010; Mosges et al. 2009; Ullrich et al. 2004). Podle německé prospektivní, randomizované studie nebyly nalezeny významné rozdíly mezi nemocnými léčenými reoferézou a kontrolní skupinou, a reoferéza vedla k rychlejší úpravě sluchu, také při hodnocení kvality života byla významně lépe hodnocena

reofereza(Klingel et al. 2009; Mosges et al. 2009).Tito autoři, ale i výsledky další studie (Uygun-Kiehne et al. 2010)označili reoferézu za možnou záchrannou léčbou 2. linie při selhání léčby kortikoidy (Klingel et al. 2009; Mosges et al. 2009). Metodika provádění aferézy však není jednotná a soubory léčených nemocných dosud nejsou dostatečně velké k definitivním závěrům.

U nemocných, kteří nereagovali uspokojivě na standardní léčbu steroidy, jsme použili reoferézu, a bylo dosaženo příznivého efektu. U 26 nemocných (66,7 %) došlo ke zlepšení sluchu o 50 a více %: Ve skupině nemocných léčených reoferézou byli nemocní s horšími vstupními parametry tónové audiometrie nežli byli nemocní ve skupině S (léčení steroidem) - 81 dB sluchové ztráty ( $p < 0,001$ ). Je známo, že tíže sluchové ztráty je negativním prognostickým faktorem. U nemocných léčených reoferézou byla přitom zahájena léčba reoferézou v průměru později než u nemocných ve skupině S ( $p < 0,001$ ), protože reoferéza byla aplikována jako záchranná až po nesplnění očekávání od standardní terapie. To dokládá, že reoferézamá příznivý terapeutický účinek po neúspěšné konvenční terapii a pozdějším zahájení léčby. Tyto výsledky byly zjevné na našem pracovišti již z pilotní studie (Dršata et al. 2014) a jsou v soulase s příznivými výsledky léčby SISHL pomocí obdobných hemaferetických metod, které byly publikované ze zahraničních pracovišť (Bianchin et al. 2010; Canis et al. 2012).

Během procedur,obdobně jako u nemocných s VPMD, nedošlo ke klinicky významným změnám základních biochemických a hematologických parametrů, námi zvolená antikoagulace také nevedla ke komplikacím. Výsledky vyšetření reologicky významných faktorů dokládají ve shodě s výsledky u nemocných s VPMD, že procedury jsou reologicky velmi účinné.

Při pátrání po lehce zjistitelných faktorech, které by mohly ovlivňovat prognózu nebo predikovat úspěch léčby SISHL reoferézou, jsme hodnotili také velikost trombocytů. Bylo publikováno několik prací zabývajících se velikostí trombocytů a významu tohoto velmi jednoduše zjistitelného ukazatele u poruch v mikrocirkulaci. Pokud jde o reoferézu, sami jsme prokázali snížení velikosti destiček po snížení cholesterolu LDL-aferézou u familiární hypercholesterolemie(Blahá et al. 2015b). Objevily se i práce, které prokazují význam velikosti destiček u SISHL (Sagit et al. 2013; Ulu et al. 2013). Jednoduchým podkladem významu velikosti destiček je fakt, že větší trombocyty jsou obvykle více metabolicky aktivní, obsahují více protrombotického materiálu (tromboxinu A2 a B2, glykoproteinu IIb – IIIa, jeví větší agregabilitu, mají více alfa-granulí s destičkovým faktorem 4, P-selektinem



atd.) Snížení velikosti trombocytů se snížením aktivity jejich obsahu by mohlo příznivě ovlivnit průběh SISHL, pokud platí vaskulární teorie vzniku SISHL. Velmi důležitým je i fakt, že jde o rutinně dosažitelnou metodu (většina analyzátorů spočte velikost trombocytu /MPV/ zároveň s krevním obrazem) a ekonomicky nenáročnou. V roce 2015 jsme proto vyhodnotili naši sestavu nemocných léčených reoferézou pro SISHL. Významné změny velikosti destiček u SISHL před nebo po reoferéze jsme však nenalezli (Blaha et al. 2015b).

Zajímavá je i možná etiopatogenetická souvislost SISHL s hypercholesterolémií. Proto jsme u našich nemocných sledovali hladiny lipoproteinů a body mass index (BMI). Názory na souvislost SISHL s tradičními kardiovaskulárními riziky - hypercholesterolémií, hypertenzí, diabetem, kouřením, trombofilií jsou nejasné a autoři se liší v názorech. (Capaccio et al. 2005; Ciorba et al. 2015), ale metaanalýza zabývající se vlivem sérových lipidů na SISHL nepotvrdila vzájemnou souvislost, jak jsme již uvedli výše v kapitole o charakteristice SISHL (3.5.1.) (Chang et al. 2015). Ani v našem souboru nebylo potvrzeno, že by nemocní se SISHL měli vyšší hladinu cholesterolu, anebo že by BMI byla hodnota využitelná k předpovědi úspěšnosti nebo neúspěšnosti léčby SISHL reoferézou. Při hodnocení laboratorních parametrů jsme dospěli ke stejným závěrům jako u nemocných s VPMD.

### **7.3.1 MOŽNOSTI PREDIKCE ÚSPĚŠNÉ LÉČBY SISHL**

O možnosti předpovědět účinnost nebo neúčinnost léčby SISHL reoferézou platí v zásadě totéž, co bylo uvedeno výše v kapitole 7.2.1. při hodnocení této možnosti u nemocných s VPMD. Využití jednotlivých ukazatelů, považovaných za reologicky účinné, nepřineslo pozitivní výsledky. Daleko nadějnější byly možnosti diskriminační analýzy, ale i tyto výsledky jsou jen předběžné. Je třeba rozšířit sestavu a vyhodnotit různé varianty možných hodnocení, aby bylo možno vyslovit definitivní závěry.

### **7.3.2 KRITICKÉ PŘIPOMÍNKY K LÉČBĚ SISHL REOFERÉZOU**

Naše výsledky mají svá omezení. Původně byla zamýšlena studie s léčbou SISHL pomocí reoferézy jako klasická prospektivní randomizovaná studie. Z původních 110 nemocných, kteří vstoupili do studie, se nezlepšilo po standardní úvodní kortikoidní léčbě 52 a ti vyžadovali další léčbu. Optimální design randomizace by byl do tří větví (MicroWick, reoferéza a kontrolní skupina) v poměru 1 : 1 : 1. Vzhledem k jednoznačně pozitivnímu efektu reologické terapie ve výzkumné sondě však bylo neetické ponechat kontrolní skupinu zcela bez léčby. Navíc posuzováno z hlediska statistiky by se tím počet nemocných ve větvích snížil a nebylo by možné obvyklé statistické hodnocení. Nezdařilo se ani vytvořit obě větve

(reofereza a MicroWick) o srovnatelném počtu nemocných. Nemocní se většinou obávali náročnosti operační metodiky MicroWick, a proto se zařazením do této skupiny souhlasilo méně nemocných nežli do skupiny léčené reoferézou. Z výsledků je však také zřejmé, že do skupiny s reoferézou byli zařazeni nemocní se závažnější poruchou sluchu (medián sluchové ztráty 81 % oproti 52 % ve skupině MicroWick,  $p = 0,04$ ). Přesto, že nemocní s větší sluchovou ztrátou mají horší prognózu, zlepšila reoferéza signifikantně sluchové ztráty přibližně na stejnou úroveň, na které se nacházela skupina léčená metodou MicroWick. U skupiny léčené metodou MicroWick došlo jen k menšímu, nesignifikantnímu léčebnému efektu ( $p = 0,940$ , viz tabulka 20).

### 7.3.3 SOUHRN K LÉČBĚ SISHL

Lze uzavřít, že reoferéza se ukázala úspěšnou metodou záchranné terapie SISHL v případech, kdy standardní terapie kortikoidem byla neúspěšná, ke zlepšení sluchu došlo u 66,7 % nemocných. Reoferéza, ve vlastní patentované modifikaci, byla potvrzena jako bezpečná metoda pro léčbu SISHL, technicky srovnatelně proveditelná jako u jiných indikací reoferéz. Léčba reoferézou prokázala výrazně menší frekvenci i závažnost nežádoucích reakcí než srovnávací záchranná léčba systémem MicroWick. Byly získány unikátní výsledky o kinetice změn některých ukazatelů aktivity endotelu, fibrinolýzy, hemokoagulace, zánětlivých faktorů, adhezních molekul, endoglinu, IL-10, solubilních CD znaků a ukazatelů apoptózy po reoferéze, získané při této disertační práci, anebo publikované v předchozích pracích skupiny, jejíž je autorka této disertace aktivní členkou (Blaha et al. 2015a; Blaha et al. 2008a; Blaha et al. 2004).

### 7.4 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY LÉČBY REOFERÉZOU – ZHODNOCENÍ

Výskyt nežádoucích reakcí byl bedlivě sledován u každé reoferézy. Při rozboru nežádoucích reakcí za rok 2016 (hodnoceno podle posledního Protokolu pro hlášení hemaferéz ve WAA) jsme zaznamenali pouze 4,9 % komplikací – hodnoceno u všech našich terapeutických hemaferéz, ve stejné době byl průměr WAA registru 5,8 %.

Nežádoucí reakce v přímé souvislosti s reoferézou u VPMD se vyskytly 24krát. Jde tedy o 3,8 % příhod z celkem provedených reoferéz u VPMD. Při hodnocení podle CTCAE (verze 4.03/2009) se nevyskytla žádná reakce stupně 3 nebo více (těžká, životohrožující nebo smrtelná).

Nežádoucí příhody v přímé souvislosti s reoferézou se při léčbě SISHL reoferézou vyskytly celkem 8krát, tj. 6,6 % z celkově provedených reoferéz. Žádná nebyla těžká (stupeň 3 a výše dle CTCAE).

Celkem se při léčbě reoferézou u VPMD a SISHL vyskytlo při 748 procedurách 32 nežádoucích reakcí, což tvoří 4,3 %. Další podrobnosti i seznam sledovaných reakcí byly popsány výše v kapitole 6.1.2 o nežádoucích účincích při léčbě VPMD a dále v kapitole 6.2.2 o nežádoucích účincích při léčbě nemocných se SISHL.

Z našich výsledků lze uzavřít, že reoferéza je při léčbě VPMD i SISHL bezpečná metoda, která v rukou zkušeného týmu při použití moderní techniky vede jen k řídkým a nezávažným nežádoucím reakcím.

## 7.5 ZHODNOCENÍ EKONOMICKÉ PROBLEMATIKY LÉČBY

V současné době není otázka financování reoferéz dořešitelná. Z veřejného zdravotnictví je reoferéza hrazena v případě nemocných s familiární hypercholesterolémií, kteří splní kritéria pro zahájení léčby. Jde především o homozygoty, zachycené většinou již v sekundární prevenci, anebo velmi omezený počet heterozygotů v sekundární prevenci s progredující aterosklerózou, kde nebylo dosaženo cílových hodnot lipoproteinů ani při maximálně tolerovaných dávkách statinů a ezetimibu.

V poslední době se zintenzivnily snahy o vyšší dostupnost aferetických metod pro nemocné v České republice. Vznikl požadavek na ustanovení aferetických center. Vzhledem k mezioborovému rozsahu aferetických metod je nutná spolupráce dotčených odborných společností. Cílem je vytvořit přesně určené požadavky na aferetická centra – jde především o komplexní spektrum výkonů (tedy nejen o výkon imunoadsorpce, reoferézy a lipidové aferézy), ale i další metody. S tím dále souvisí i požadavky na personální a technické vybavení a zpřesnění indikačních kritérií jednotlivých výkonů. Dalším krokem by mělo být jednání s pojišťovnami o úhradě těchto nejnákladnějších aferetických výkonů. Postupně se v rámci jednotlivých odborných společností vytvářejí podklady pro vznik aferetických center. Naše centrum se k této snaze připojilo.

Z výše uvedených ekonomických kalkulací vyplývá, že nejde o levné výkony. Jestliže však zvážíme náklady, které vyplynou pro zdravotnictví z ošetřování například progresu VPMD do praktické slepoty, je vidět, že zábrana progresu VPMD je ekonomicky daleko výhodnější. Ošetřování takového nemocného je zhruba třikrát dražší nežli léčba reoferézou, což bylo vykalkulováno v Německu (Klingel et al. 2000), ale souhlasí i u nás. Ošetřování nemocného s praktickou slepotou, ale také léčba nemocného s vlhkou formou anti-VEGF

preparáty je poměrně náročná. Podle Studničky et al., kteří vykalkulovali tuto léčbu, je to ročně v podmínkách rutinní praxe v ČR v případě použití pegaptamibu 5 467,63 Euro na jednoho nemocného a v případě použití ranibizumabu je to méně – 1220,16 Euro. Těmto autorům se podařilo léčbou zlepšit zrak – hodnoceno zrakovou ostrostí na EDTRS tabulkách. Pokusili se o zajímavou kalkulaci: léčba ranibizumabem a pegaptanibem ve srovnání s fotodynamickou léčbou verteporfynelem brání ztrátě zrakové ostrosti na ETDRS o 1 řádek za 1225,98 resp. 2286,18 EURO (Studnicka et al. 2013). Další studie z jiných zemí jsou k dispozici (Earnshaw et al. 2007; Gower et al. 2010); potvrzují ekonomickou náročnost léčby VPMD anti-VEGF preparáty, i když ceny se v jednotlivých zemích poněkud liší.

Lze uzavřít, že reoferéza může zabránit přechodu ze suché do vlhké formy VPMD, a proto je výhodná i z ekonomické stránky. Je to náročná léčebná metodika, vyžaduje speciální a náročné přístroje i zkušený personál, ale v případě ohrožení progresí suché formy VPMD není dosud jiná léčba, která by byla ekonomicky výhodnější.

## 8 DALŠÍ SMĚR VÝZKUMU

Přes již upřesněné a pozitivní léčebné výsledky - shrnuté např. v doporučeních Americké společnosti pro hemaferézu z r. 2013 (Schwartz et al. 2013) a aktualizované v roce 2016 (Schwartz et al. 2016), zbývá několik problémů nedořešených jak při VPMD (Melinda et al. 2016), tak i v případě SISHL (Kostal et al. 2017).

### 8.1 AKTUÁLNÍ PROBLÉMY U VPMD

Podle našich výsledků i podle literatury je třeba v dalším výzkumu dále zkoumat a dořešit především tyto otázky:

- klinický význam zmenšení plochy DPED - vztah zmenšení plochy DPED a zrakové ostrosti nebo celkové aktivity choroby (Rencova et al. 2009),
- význam slibného účinku reoferézy na vrstvu elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů (dříve zvanou vrstvou spojů vnitřních a vnějších segmentů fotoreceptorů) – což má zásadní význam pro kvalitu vidění (Rencova et al. 2015),
- problém dlouhodobějšího vlivu reoferézy na průběh VPMD. S tím souvisí otázka optimální doby, kdy je vhodné indikovat posílení efektu („booster therapy nebo refreshment“) po základní sérii léčby reoferézou,
- není jasná ani otázka optimálního počtu a frekvence základní série reoferéz,
- otázky významu genetických změn v patogeneze a léčbě VPMD,
- význam ovlivnění složek komplementu při VPMD.

Snažili jsme se hledat odpovědi na alespoň část uvedených otázek. Dosud se podařilo zahájit výzkumné sondy ve třech oblastech díky prostředkům z vnitřních výzkumných úkolů naší FN: přesněji posoudit, jak dlouho trvá léčebný efekt reoferézy, posoudit význam aktivace systému komplementu a posoudit význam konvertázy PCSK9.

### 8.1.1 ÚČINEK REOFERÉZY U VPMD V ČASE

Léčebný efekt reoferézy trvá dlouhodobě i po skončení léčebné série 8 procedur. Tato doba je však omezená - podle Kosse et al. (Koss et al. 2009) jde asi o 1 rok, podle našich zkušeností může být toto období poněkud delší (Studnicka et al. 2013), ale pak může nastat opět progresse jak anatomického nálezu, tak i funkčních změn a pozitivní efekt léčby je ztracen. Upřesnit toto období, poskytnout nemocným individualizovaně možnost záchranné terapie (re-treatment, „booster therapy“), a tak podstatně zlepšit prognózu bude cílem *dalšího výzkumu*, který jsme navrhli na příští období. Je nutno také poznamenat, že jeto otázka významná i po stránce ekonomiky. Náklady stoupají, jak bylo již uvedeno výše, zhruba třikrát při přechodu suché formy VPMD do vlhké (Klingel et al. 2000), a tak by bylo možné zástavou progresse suché formy VPMD podstatně snížit již tak vysoké a stále rostoucí náklady na léčbu vlhké formy VPMD, a to vytvořením racionálního, komplexního systému optimální dlouhodobé péče o suchou formu VPMD. Naše výsledky svědčí pro to, že je zpravidla vhodné provést přídatnou léčbu pomocí dalších 1-2 procedur (po úvodní sérii 8 procedur) za 1,5-2 roky. Výsledky léčby našich 24 nemocných, léčených za 1-2 roky přídatnou reoferézou, ukazují významné pozitivní morfologické i funkční změny – podrobnosti jsou uvedeny výše a také v monografii: Trendy v současné oftalmologii 11, která je v tisku (Langrová et al. 2018).

### 8.1.2 VÝZNAM ZMĚN AKTIVITY KOMPLEMENTU U VPMD

Důležitou změnou v názorech na patogenezi VPMD sev posledních letech stala tzv. „zánětlivá“ teorie vzniku VPMD. Význam se přikládá změnám aktivity složek komplementového systému. V drúzách při VPMD se našly složky komplementu a postupně byly objeveny nezvratné údaje pro genetickou zátěž nemocných s VPMD. Byla nalezena souvislost několika genetických odchylek a VPMD (McHarg et al. 2015; Troutbeck et al. 2012; Wang, et al. 2013). Obecné riziko pro VPMD je polymorfismus Y402H.

Samozřejmě začaly snahy o potlačení aktivace komplementu. Jsou vyvíjeny inhibitory složek komplementu (de Amorim Garcia Filho et al. 2014), monoklonální protilátky proti faktoru B, D nebo inhibitory C5, s možností použití u VPMD s větší účinností a méně častou

aplikací (Troutbeck et al. 2012). Studie jsou zatím v I. nebo II. fázi výzkumu a zřejmě potrvá ještě několik let, nežli budou k dispozici v klinické praxi.

Výše uvedené poznatky vedly naši skupinu k výzkumu změn aktivace komplementu při léčbě reoferézou jako bioindikátorů progresu VPMD. Důležitá je také korelace změn komplementu nejen s klinickým nálezem (aktivitou choroby), ale i s dalšími bioindikátory (markery aktivity endotelu, koagulace, fibrinolýzy, metabolismus lipoproteinů) a se speciálními ukazateli (faktory aktivace apoptózy, vybranými interleukiny, adhezními molekulami). Změny složek komplementu by mohly být markerem úspěšnosti léčby, a tedy by měla existovat korelace mezi mírou poklesu aktivity složek komplementu a aktivitou choroby. Velmi cenné je, že jde o časný marker - úspěšnost léčby se dosud posuzuje klinickými ukazateli (vývoj morfologických změn na sítnici, pokles zrakové ostrosti atd.), které jsou dlouhodobé. Neumožňují proto rychlé individualizované řízení frekvence a intenzity terapie již během základní série reoferéz (8 procedur během 10 týdnů). Zjistili jsme, že klesá nejen aktivita alternativní cesty aktivace komplementu (o 1/3), ale i klasické cesty na 88%, lektinové cesty na 62% a faktoru H na 80% (Blaha et al. 2015a). Je třeba získané poznatky upřesnit na větším počtu případů, zjistit dynamiku změn složek komplementu již v průběhu základní léčby a ověřit délku periody snížení složek komplementu.

Nejen naše předběžná studie, ale i některé jiné práce svědčí pro to, že komplement, zejména alternativní a lektinová cesta, hrají důležitou roli při poruchách mikrocirkulace u VPMD (Troutbeck et al. 2012; Wang et al. 2013). Léčba cílená na systém komplementu pravděpodobně reprezentuje další nový přístup k léčbě, nebo i prevenci poruch v mikrocirkulaci, jako je VPMD a další.

### **8.1.3 PCSK9 PŘI LÉČBĚ VPMD REOFERÉZOU**

Během několika posledních let vzbudila pozornost vědeckého světa proprotein konvertáza subtilisin/kexin 9 (PCSK9), což je sekreční regulátor LDL receptoru (LDLR) na povrchu buněk, jeho funkcí je zvyšovat hladinu LDL cholesterolu. Snížení PCSK9 je aktivní a slibná možnost terapeutických snah u hypercholesterolemie.

Jedna ze současných hypotéz o příčinách vzniku a rozvoje VPMD obviňuje poruchu metabolismu lipoproteinů. Více než 20 % plazmatického PCSK9 je vázáno na LDL-cholesterol, a proto jsme předpokládali, že s poklesem LDL-cholesterolu po reoferéze dojde také k poklesu PCSK9.

Protože údaje v literatuře dosud chyběly, vyšetřili jsme hladinu PCSK9 u 19 nemocných léčených reoferézou pro VPMD, a to na začátku série 8 procedur, uprostřed a na konci léčebné série (vždy párové vzorky – před a po reoferéze). Kontrolním souborem byli dárce krve. Zjistili jsme, že hladina PCSK9 je zvýšena oproti kontrolám. Po procedurách významně klesá (přehled předběžných výsledků – viz tab 30). Koreluje s hladinou celkového cholesterolu, nekoreluje s LDL cholesterolem, HDL cholesterolem, fibrinogenem, viskozitou plazmy a krve, apolipoproteinem B, IgM a alfa-2-makroglobulinem. Hladina PCSK9 není odlišná u nemocných s úspěchem a neúspěchem léčby (hodnoceno dle zrakové ostrosti, morfologických a funkčních změn na sítnici). Tyto výsledky jsme přednesli předběžně na druhém kongresu evropské skupiny ISFA v březnu 2018 ve Vídni. Jsou podkladem k našemu dalšímu výzkumu, neboť údaje je třeba potvrdit na větším počtu nemocných.

TABULKA 30: POKLES PCSK9 U NEMOCNÝCH PO REOFERÉZE U VPMD

	<b>N</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>	<b>Medián</b>	<b>IQR</b>
<i>Výsledky vyšetření před 1. procedurou</i>	19	240	174	213	73-375
<i>Výsledky vyšetření po 1. proceduře</i>	19	102	58	93	51-159
<i>Výsledky vyšetření před 4. procedurou</i>	19	184	80	185	101-255
<i>Výsledky vyšetření po 4. proceduře</i>	19	88	30	90	57-119
<i>Výsledky vyšetření před 8. procedurou</i>	19	215	191	185	59-372
<i>Výsledky vyšetření po 8. proceduře</i>	19	96	32	97	69-119

Legenda: N = počet vyšetřených vzorků; SD = směrodatná odchylka průměru, IQR = interkvartilové rozpětí.

## 8.2 AKTUÁLNÍ PROBLÉMY SISHL

Léčba reoferézou u SISHL ukázala, že je možno docílit zlepšení i u nemocných se SISHL, kteří nebyli úspěšní při počáteční standardní terapii s použitím kortikoidů, ale výsledný stav ani potom není ve všech případech uspokojivý. Naše skupina 39 nemocných je také příliš malá, aby bylo možno vše definitivně uzavřít, problematika je komplexní a složitá. Proto v těchto směrech ve výzkumu pokračujeme s cílem rozšířit zkušenosti a ověřit výsledky na větším souboru nemocných.



## 8.2.1 NÁHLÁ JEDNOSTRANNÁ VESTIBULOPATIE

Na základě pozitivní zkušenosti s reoferézou u SISHL jsme v dalším výzkumném směru uvažovali o možném efektu reoferézy i u nemocných s náhlým poškozením vestibulární části vnitřního ucha, jehož mechanismus vzniku se zdá být analogický problematice poškození sluchového analyzátoru.

Cílem naší práce je ověření technické proveditelnosti a bezpečnosti reoferézy u náhlého periferního vestibulárního výpadku u malého počtu nemocných – jako iniciální výzkumná sonda. Zaměřili jsme se na náhlou jednostrannou vestibulopatii (Acute unilateral vestibulopathy- AUVP), pro kterou je typická náhlá rotační závrať (vertigo) s odpovídající nevolností až zvracením bez dalších sluchových, očních nebo neurologických příznaků. V klinickém obraze je typický normální otoskopický nálezn a fyziologický sluch, porucha posturální rovnováhy s pulzním tahem ve směru rotace a pomalé složky horizontálně-rotatorického nystagmu. Pozitivní head-impulse-test je potvrzením poškození ampulární části vestibulárního labyrintu na postižené straně (Strupp and Magnusson 2015). Pro vyloučení centrální mozkové příhody je zásadní zobrazovací vyšetření mozku (CT či MRI) a zhodnocení neurologem.

V posledních dvou letech (2016-2017) bylo na naší ORL klinice zachyceno 17 nemocných s náhlou AUVP, z toho 9 mužů a 8 žen ve věkovém rozmezí 39 až 79 let. Diagnóza byla stanovena na základě klinického nálezu a vyloučení centrální léze neurologickým a CT vyšetřením. Úvodní léčbou byl klid na lůžku, betahistidin (38-54mg perorálně denně, eventuálně prostá symptomatická léčba) a standardní podání kortikosteroidů (Solu-Medrol 250 mg v 60minutové infuzi po dobu minimálně 3 dnů). Dále byla nemocným nabídnuta reoferéza (2 procedury během jednoho týdne). Do skupiny léčených reoferézou tak bylo zařazeno 7 nemocných, 10 nemocných bylo léčeno standardní terapií a mohli být kontrolní skupinou.

Testování vestibulárních funkcí bylo prováděno na přístrojích videookulografie (VOG), Video-Head-Impulse-Test (VHIT) a oční + cervikální vestibulární evokované myogenní potenciály (c/oVEMPs). Tato vyšetření jsme prováděli v průběhu léčby (po odeznění akutních vestibulárních příznaků) a 1 měsíc po ukončení léčby. Reoferéza byla prováděna identicky jako u nemocných se SISHL, včetně monitorování veškerých nežádoucích příhod. (viz kapitola 7.2.2).

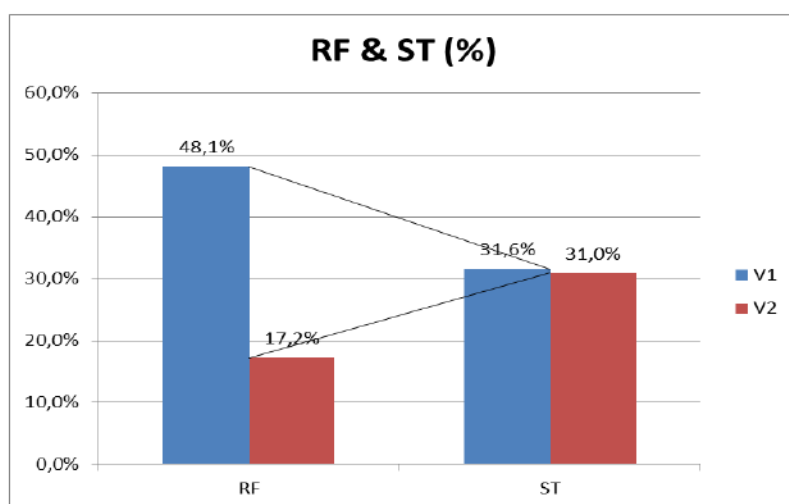
U všech 7 nemocných léčených reoferézou došlo při kontrolním vyšetření po 1 měsíci ke zlepšení rovnováhy. Při vyhodnocení topodiagnostických testů bylo u nemocných



ve skupině léčených reoferézou při zahájení léčby diagnostikováno poškození 26x, zatímco ve skupině léčených standardně 24x, což představuje 48,1 %, resp. 31,6 % ze všech testovaných sensorických oblastí. Po ukončení léčby bylo ve skupině léčených reoferézou zaznamenáno 11, resp. 17,2 % poškozených oblastí, zatímco ve skupině nemocných léčených standardně bylo zachyceno 26, resp. 31 % lézí (viz graf 9).

Lze tedy uzavřít, že naše iniciální zkušenost s léčbou AVUP je pozitivní. Jde o náš další výzkumný směr. AVUP je velmi závažným onemocněním rovnovážného ústrojí vnitřního ucha, jehož diagnostika i terapie je velmi obtížná. Reoferéza se jeví jako metoda, která je bezpečná, dobře tolerovaná, a první výsledky naznačují, že ve srovnání se standardní empirickou léčbou může nabídnout lepší výsledek z hlediska zachování vestibulární funkce.

GRAF 9: POČET POŠKOZENÝCH SENZORICKÝCH OBLASTÍ VE SKUPINĚ REOFERÉZY A STRANDARDNÍ TERAPIE



Legenda: Počet zachycených poškozených sensorických oblastí ve skupině reoferézy (RF) a standardní terapie (ST) před léčbou (V1) a po léčbě (V2) v procentech všech vyšetřených oblastí.

## 9 ZÁVĚRY

Cíle výzkumu byly beze zbytku splněny, byly získány další poznatky mimo původní záměr. Byla prezentována sestava 112 nemocných, u kterých bylo provedeno celkem 748 léčebných výkonů (reoferez). Ve srovnání s dosud publikovanými daty se jedná o jeden z největších souborů. Unikátní je také doba sledování nemocných, 43 nemocných s VPMD je sledováno více než 5 let. Souhrn výsledků je uveden níže.

### 9.1 VLASTNÍ MODIFIKACE METODIKY REOFERÉZY A JEJÍ OPTIMALIZACE

Vlastní modifikace metodiky reoferézy a její optimalizace se plně osvědčila, technické parametry procedury (žilní přístupy, antikoagulace, množství promyté plazmy, frekvence procedur) byly nastaveny a odzkoušeny. Obtíže s periferním žilním přítokem odpovídají reoferezám při jiných indikacích. Výše uvedený typ antikoagulace pomocí ACD-A a heparinu vyhovuje – nikdy jsme nezaznamenali klinicky významné poruchy nebo nebezpečné laboratorní hodnoty. Procedury jsou reologicky významně účinné při promytí jednoho objemu celkového množství cirkulující plazmy. Docílené množství promyté plazmy (průměrně 1,05 násobek objemu cirkulující plazmy u VPMD a 1,04 u SISHL) vedlo k signifikantnímu poklesu analyzovaných reologických činitelů a tím k snížení viskozity krve a plazmy jako předpoklad k pozitivnímu ovlivnění průtoku mikrocirkulací. Průměrné množství použitého roztoku ACD-A (529,9 resp. 515,8 ml na 1 proceduru) nepřesáhlo nebezpečné limity. I když průtok krve kolísal podle stavu přítokových žil v rozmezí 35 – 70 ml/min, byla průměrná doba trvání výkonu 161,6 minuty u nemocných s VPMD a 158,6 min u nemocných se SISHL, což bylo pro absolutní většinu nemocných plně vyhovující (za předpokladu pečlivé ošetrovatelské péče, zejména polohování). Počet proplachů filtru byl průměrně 0,5/proceduru, což neohrožuje jeho kvalitu. Procedura je technicky dobře proveditelná, vyžaduje však odpovídající technické vybavení a zkušený tým.

### 9.2 EFEKTIVITA PROCEDUR- UKAZATELE ÚČINNOSTI LÉČBY

Byl prokázán významný pokles reologicky účinných faktorů po procedurách (což svědčí o dobré reologické efektivitě procedur), dále pokles vybraných ukazatelů aktivace endotelu.

### 9.3 PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI TERAPIE

Byl zhodnocen význam řady ukazatelů, sledovaných při výzkumu. Nepodařilo se určit jednotlivé biomarkery významné pro predikci úspěšnosti, ale metoda diskriminační analýzy skupiny reologicky významných i dalších ukazatelů tuto možnost ukazuje.

### 9.4 BEZPEČNOST REOFERÉZY

Procedury jsou relativně velmi bezpečné. Od získání mezinárodního registračního kódu WAA (World Apheresis Association) roku 2008 jsou pravidelně registrovány aferetické výkony ve světovém centru registrací hemaferéz, autorka se podílí na publikacích registru. Nežádoucích příhod bylo pouze 4,3 % a byly jen „mild“ nebo „moderate“ dle CTCAE v. 4.03/2009. Výskyt nežádoucích příhod je lehce pod úrovní celkového počtu nežádoucích příhod ve WAA registru (5,8 %).

### 9.5 EKONOMICKÁ STRÁNKA PROVOZU

Byly konkrétně vyčísleny a zhodnoceny náklady na léčbu v našich podmínkách. Jde o ekonomicky náročnou léčbu, avšak zábrana progresi slepoty nebo hluchoty je i po ekonomické stránce podstatně výhodnější.

### 9.6 KLINICKÁ ÚČINNOST REOFERÉZ

Byla prokázána klinická účinnost léčby u suché formy VPMD u nemocných oproti kontrolám (hodnocením zrakové ostrosti, anatomických změn na sítnici i funkčních změn na mERG). Byla prokázáno, že reoferéza může zlepšit sluch oproti kontrolám u nemocných SISHL, kde standardní léčba nebyla efektivní.

### 9.7 DALŠÍ MĚR VÝZKUMU

Byl určen *další směr výzkumu* a zahájeno provádění základních výzkumných sond:

- a) ke zjištění významu přídatné terapie (tzv. booster therapy) u nemocných s VPMD ohrožených další progresí choroby,
- b) k ověření změn aktivity komplementu při léčbě reoferézou,
- c) k prověření významu změn PCSK9 u nemocných s VPMD při léčbě reoferézou,
- d) k prověření proveditelnosti a účinnosti reoferézy u AUVP (akutní unilaterální vestibulopatie).

## 9.8 HODNOCENÍ PRACOVNÍCH HYPOTÉZ

Pracovní hypotézy byly zhodnoceny takto:

**Ad 1.)** Prokázali jsme platnost hypotézy, že reoferéza zlepšuje průběh VPMD. Po léčbě reoferézou u 78,2% nemocných s VPMD dochází ke zlepšení nebo stabilizaci příznaků VPMD.

**Ad 2.)** Léčba reoferézou u nemocných se SISHL nereagujících na standardní léčbu kortikoidy vedla u 66,7 % ke zlepšení sluchu o 50 a více %.

**Ad 3.)** Prokázali jsme, že léčba reoferézou je bezpečná a dobře tolerovaná, výskyt komplikací je minimální (4,3%). Nesetkali jsme se se závažnými komplikacemi a u většiny nemocných (94,6%) bylo možné dodržet plánovanou sérii procedur.

## 10 PODPORA PRÁCE - PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR, číslo: NT 14037-3/2013 a grantu IGA MZ ČR NT/13475-4/2012.

## 11 PŘÍLOHA 1

### Fyziologické meze vybraných laboratorních parametrů.

Parametr	uváděné jednotky	Fyziologické meze
Glykemie	mmol/l	3,9-5,6
Natrium	mmol/l	136-145
Kalium	mmol/l	3,5-5,1
Chlorid	mmol/l	98-107
Calcium	mmol/l	2,2-2,55
Fosfor	mmol/l	0,81-1,45
Urea	mmol/l	2,8-8,1
Kreatinin	umol/l	59-104
Kyselina močová	umol/l	202-417
Bilirubin	umol/l	0-24
ALT	ukat/l	0,17-0,83
AST	ukat/l	0,17-0,85
CK	ukat/l	0-3,2
GMT	ukat/l	0-1
Celková bílkovina	g/l	64-83
Albumin	g/l	35-52
Celkový cholesterol	mmol/l	2,9-5
LDL cholesterol	mmol/l	1,2-3
Apolipoprotein B	g/l	0,66-1,33
Lp(a) do 1.7.2014	g/l	0-0,3
Lp(a) od 1.4.2014	nmol/l	0-75
$\alpha_2$ -makroglobulin	mg/dl.	100 -310 mg/dl.
Imunoglobulin M	g/l	0,8-4,8
Leukocyty	$10^9/l$	4-10
Hemoglobin	g/l	muži 135-175 ženy 120-160
Hematokrit	%	muži 40-50 ženy 35-47
MCV	fI	82-98
Trombocyty	$10^9/l$	150-400
MPV	fI	7,8-11
PCT	%	12-35
PDW	fI	9-17
PT	poměr	0,8-1,2
APTT	poměr	0,8-1,2
Viskozita krve	mPa.s	5-10
Viskozita plazmy	mPa.s	1,7-2,3
Fibrinogen	g/l	1,8-4,2

Pozn: podrobnosti jsou v příslušných laboratorních příručkách jednotlivých laboratoří.

## 12 SEZNAM ILUSTRACÍ

### 12.1 SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: DESIGN STUDIE – VÝZKUM Z LET 2012 – 2015 .....	49
OBRÁZEK 2: PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ PŘÍSTROJ K REOFERÉZE .....	53
OBRÁZEK 3: OFTALMOLOGICKÝ NÁLEZ NEMOCNÉ PŘED REOFERÉZOU.....	69
OBRÁZEK 4: OFTALMOLOGICKÝ NÁLEZ NEMOCNÉ PO REOFERÉZE.....	70
OBRÁZEK 5: POČET EPC PŘED A PO REOFERÉZE U VPMD .....	111

### 12.2 SEZNAM SCHÉMAT

SCHÉMA 1: DETERMINANTY KREVNÍHO PRŮTOKU .....	20
SCHÉMA 2: SCHÉMA REOFERÉZY .....	52

### 12.3 SEZNAM TABULEK

TABULKA 1: FYZIKÁLNÍ ZÁKONY VÝZNAMNÉ PRO LÉKAŘSKOU REOLOGII .....	15
TABULKA 2: MOŽNOSTI HEMOREOTERAPIE (MODIFIKOVÁNO PODLE: KLINGEL, ET AL. 2000)...	26
TABULKA 3: PŘEHLED MOŽNÝCH LÉČEBNÝCH SCHÉMAT REOFERÉZY PŘI VPMD .....	40
TABULKA 4: DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE O NEMOCNÝCH .....	46
TABULKA 5: DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE U NEMOCNÝCH S VPMD.....	48
TABULKA 6: DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE O NEMOCNÝCH SE SISHL .....	50
TABULKA 7: PŘEHLED PROVEDENÝCH REOFERÉZ.....	60
TABULKA 8: ZÁKLADNÍ PARAMETRY PROCEDUR U NEMOCNÝCH S VPMD.....	61
TABULKA 9: VÝVOJ MORFOLOGICKÝCH ZMĚN VE SKUPINÁCH NEMOCNÝCH S VPMD .....	65
TABULKA 10: ZMĚNY DPED V ČASE VE SKUPINÁCH NEMOCNÝCH S VPMD.....	66
TABULKA 11: PLOCHA DPED NA ZAČÁTKU A KONCI SLEDOVÁNÍ .....	67
TABULKA 12: ZÁKLADNÍ BIOCHEMICKÁ VYŠETŘENÍ U NEMOCNÝCH S VPMD PŘED A PO REOFERÉZE .....	73
TABULKA 13: PARAMETRY KREVNÍHO OBRAZU - VPMD .....	75
TABULKA 14: REOLOGICKY VÝZNAMNÉ UKAZATELE - VÝSLEDKY NEMOCNÝCH S VPMD.....	77
TABULKA 15: VÝSLEDKY SLEDOVÁNÍ NEMOCNÝCH S VPMD - SPECIÁLNÍ UKAZATELE.....	79
TABULKA 16: REOLOGICKY ÚČINNÉ FAKTORY PŘED A PO REOFERÉZE U ÚSPĚŠNÉ A NEÚSPĚŠNÉ LÉČBY.....	81
TABULKA 17: PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI LÉČBY POMOCÍ DISKRIMINAČNÍ ANALÝZY – VPMD .....	83
TABULKA 18: ZÁKLADNÍ PARAMETRY PROCEDUR U NEMOCNÝCH SE SISHL .....	85
TABULKA 19: NEŽÁDOUCÍ REAKCE REOFERÉZY U SOUBORU NEMOCNÝCH S VPMD A SISHL ..	87
TABULKA 20: POROVNÁNÍ SLUCHOVÉ ZTRÁTY PODLE FOWLERA (%) BĚHEM SLEDOVÁNÍ .....	91

TABULKA 21: ZÁKLADNÍ BIOCHEMICKÁ VYŠETŘENÍ U NEMOCNÝCH SE SISHL .....	93
TABULKA 22: PARAMETRY KREVNÍHO OBRAZU – SISHL.....	94
TABULKA 23: REOLOGICKY VÝZNAMNÉ UKAZATELE - VÝSLEDKY U NEMOCNÝCH SE SISHL ...	95
TABULKA 24: VÝSLEDKY SPECIÁLNÍCH VYŠETŘENÍ U NEMOCNÝCH SE SISHL .....	96
TABULKA 25: POROVNÁNÍ HLADINY REOLOGICKY VÝZNAMNÝCH FAKTORŮ U NEMOCNÝCH SE SISHL ÚSPĚŠNĚ A NEÚSPĚŠNĚ LÉČENÝCH.....	98
TABULKA 26: PREDIKCE ÚSPĚŠNOSTI LÉČBY POMOCÍ DISKRIMINAČNÍ ANALÝZY – SISHL .....	99
TABULKA 27: NÁKLADY NA SPOTŘEBNÍ ZDRAVOTNICKÝ MATERIÁL K REOFERÉZE.....	100
TABULKA 28: PŘEDPOKLADY K LÉČBĚ REOFERÉZOU PODLE BORBERGA A TAUCHERTA, 2006	103
TABULKA 29: POČET JEDNOTLIVÝCH TYPŮ ENDOTELIÁLNÍCH BUNĚK V PERIFERII U NEMOCNÝCH S VPMD PŘED A PO VÝKONU.....	110
TABULKA 30: POKLES PCSK9 U NEMOCNÝCH PO REOFERÉZE U VPMD .....	119

## 12.4 SEZNAM GRAFŮ

GRAF 1: VZTAHY MEZI SILOVÝMI KOMPONENTAMI V NEWTONSKÝCH A NE-NEWTONSKÝCH TEKUTINÁCH. (UPRAVENO DLE: BASKURT AND MEISELMAN 2003). .....	18
GRAF 2: VÝVOJ NKZO NEMOCNÝCH V ČASE - SLOUPCOVÝ GRAF .....	64
GRAF 3: ZMĚNY DPED VE SKUPINÁCH NEMOCNÝCH NA ZAČÁTKU A NA KONCI SLEDOVÁNÍ.....	67
GRAF 4: VÝSLEDKY DISKRIMINAČNÍ ANALÝZY U VPMD.....	83
GRAF 5: ZTRÁTY SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY REOFERÉZOU	89
GRAF 6: ZMĚNA SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY REOFERÉZOU .	89
GRAF 7: ZTRÁTY SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY SYSTÉMEM MICROWICK.....	90
GRAF 8: ZMĚNA SLUCHU NA POSTIŽENÝCH UŠÍCH 1 MĚSÍC PO UKONČENÍ LÉČBY SYSTÉMEM MICROWICK.....	90
GRAF 9: POČET POŠKOZENÝCH SENZORICKÝCH OBLASTÍ VE SKUPINĚ REOFERÉZY A STRANDARDNÍ TERAPIE .....	121

## 13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Seznam literatury je vytvořen za použití software Endnote. Literatura není kategorizovaná:

AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY 2 RESEARCH GROUP Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *Jama*, May 15 2013, 309(19), 2005-2015.

AGISHI, T., I. KANEKO, Y. HASUO, Y. HAYASAKA, et al. Double filtration plasmapheresis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 1980, 26, 406-411.

AUFARTOVA, J., M. BLAHA, E. KASALOVA, B. HONEGROVA, et al. Blood levels of antioxidants during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, Sep 2015, 159(3), 400-406.

AUGOOD, C., A. FLETCHER, G. BENTHAM, U. CHAKRAVARTHY, et al. Methods for a population-based study of the prevalence of and risk factors for age-related maculopathy and macular degeneration in elderly European populations: the EUREYE study. *Ophthalmic Epidemiol*, Apr 2004, 11(2), 117-129.

BADEER, H. S. Hemodynamics for medical students. *Adv Physiol Educ*, Dec 2001, 25(1-4), 44-52.

BARAK, A., J. GEORGIE, A. LOWENSTEIN, M. GOLDSTEIN, et al. Fewer Circulating Endothelial Progenitor Cells in Newly Diagnose Neovascular AMD Patients. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal* 2, 2009, p. 48-52., 2009, 2, 48-52.

BASKURT, O. K. AND H. J. MEISELMAN Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost*, Oct 2003, 29(5), 435-450.

BERROUSCHOT, J., H. BARTHEL, J. KOSTER, S. HESSE, et al. Extracorporeal rheopheresis in the treatment of acute ischemic stroke: A randomized pilot study. *Stroke*, Apr 1999, 30(4), 787-792.

BERROUSCHOT, J., H. BARTHEL, C. SCHEEL, J. KOSTER, et al. Extracorporeal membrane differential filtration--a new and safe method to optimize hemorheology in acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*, Feb 1998, 97(2), 126-130.



BIANCHIN, G., G. RUSSI, N. ROMANO AND P. FIORAVANTI Treatment with HELP-apheresis in patients suffering from sudden sensorineural hearing loss: a prospective, randomized, controlled study. *Laryngoscope*, Apr 2010, 120(4), 800-807.

BLAHA, M. Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2003, 46(1), 3-7.

BLAHA, M., C. ANDRYS, H. LANGROVA, J. STUDNICKA, et al. Changes of the complement system and rheological indicators after therapy with rheohemapheresis. *Atheroscler Suppl*, May 2015a, 18, 140-145.

BLAHA, M., M. CERMANOVA, V. BLAHA, M. BLAZEK, et al. Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia. *Ther Apher Dial*, Feb 2007, 11(1), 9-15.

BLAHA, M., M. CERMANOVA, V. BLAHA, P. JAROLIM, et al. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, Mar 2008a, 197(1), 264-270.

BLAHA, M., M. KOSTAL, J. DRŠATA, V. CHROBOK, et al. Does mean platelet volume really increase in sudden sensorial hearing loss? *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, Sep 2015b, 272(9), 2575-2578.

BLAHA, M., J. KREJSEK, V. BLAHA, J. ANDRYS, et al. Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiol Res*, 2004, 53(3), 273-278.

BLAHA, M., J. PTAK, J. CAP, V. ČEEŮVA, et al. WAA apheresis registry in the Czech Republic: two centers experience. *Transfus Apher Sci*, Aug 2009, 41(1), 27-31.

BLAHA, M., E. RENCŮVA, V. BLAHA, R. MALÝ, et al. Rheopheresis in vascular diseases. *Int J Artif Organs*, May 2008c, 31(5), 456-457.

BLAHA, M., E. RENCŮVA, H. LANGROVA, J. STUDNICKA, et al. Rheohaemapheresis in the treatment of nonvascular age-related macular degeneration. *Atheroscler Suppl*, Jan 2013, 14(1), 179-184.

BLÁHA, M., E. RENCOVÁ, R. MALÝ, J. DRŠATA, et al. Léčba hemorheoferézou (současný stav a vlastní zkušenosti). *Aktuality z nefrologie*, 2008b, 14(3), 118 - 124.

BLAHA, M., M. SKOREPOVA, V. MASIN, I. SPASOVA, et al. The role of erythrocytapheresis in secondary erythrocytosis therapy. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2002, 26(4), 273-275.

BLAHA, M., J. VANASEK, L. JEBAVY, J. MALY, et al. [Therapeutic plasmapheresis (literature review and personal experience with therapy)]. *Vnitr Lek*, Mar 1984, 30(3), 268-278.

BLAHA, M., J. VAŇÁSEK, O. ŠIROKÝ AND M. PECKA Možnosti klinického využití separátorů krevních tělísek. *Vojenské zdravotnické listy*, 1980, 49(4), 148-151.

BLYTHE, T. W., A. J. SEDERMAN, J. MITCHELL, E. H. STITT, et al. Characterising the rheology of non-Newtonian fluids using PFG-NMR and cumulant analysis. *J Magn Reson*, Jun 2015, 255, 122-131.

BORBERG, H. LDL-Apheresis and LDL-Elimination Therapies. In E. BOARD. *European School of Haematology: 2nd Seminar of Applied Technology in Haemapheresis (Proceedings)*. Paris: European Society for Haemapheresis, 1997, p. 1 - 8.

BORBERG, H. Quo vadis haemapheresis. Current developments in haemapheresis. *Transfus Apher Sci*, Feb 2006, 34(1), 51-73.

BORBERG, H., R. BRUNNER, A. GACZKOWSKI, M. MICHEL, et al. The role of rheology in hemapheresis. *Ther Apher*, Apr 2001a, 5(2), 128-133.

BORBERG, H., R. BRUNNER, M. TAUCHERT AND R. WIDDER The current state of extracorporeal haemorheotherapy: from haemodilution via cascadefiltration to rheohaemapheresis. *Transfus Apher Sci*, Feb 2001b, 24(1), 57-64.

BORBERG, H. AND M. TAUCHERT Rheohaemapheresis of ophthalmological diseases and diseases of the microcirculation. *Transfus Apher Sci*, Feb 2006, 34(1), 41-49.

BOUDERLIQUE, E., F. PROVOT AND A. LIONET Rheopheresis for Adjuvant Treatment in Resistant Calciphylaxis. *Ther Apher Dial*, Feb 11 2018.

BROUGHTON, S. S., W. E. MEYERHOFF AND S. B. COHEN Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience. *Semin Arthritis Rheum*, Oct 2004, 34(2), 544-548.

BRUNNER, R., R. A. WIDDER, P. WALTER, H. BORBERG, et al. Change in hemorrheological and biochemical parameters following membrane differential filtration. *Int J Artif Organs*, Dec 1995, 18(12), 794-798.

BRUNNER, R., R. A. WIDDER, P. WALTER, C. LUKE, et al. Influence of membrane differential filtration on the natural course of age-related macular degeneration: a randomized trial. *Retina*, 2000, 20(5), 483-491.

BURTON-OPITZ, R. Vergleich der Viscosität des normalen Blutes mit der Oxalatblutes des defibrinierten Blutes und des Blutserums bei verschiedener Temperaturen. *Arch Ges Physiol*, 1900, 82 464 - 468 (NON VIDI).

BUSCHINI, E., A. M. FEA, C. A. LAVIA, M. NASSISI, et al. Recent developments in the management of dry age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*, 2015, 9, 563-574.

CAHN, A., L. LIVSHITS, A. SRULEVICH, I. RAZ, et al. Diabetic foot disease is associated with reduced erythrocyte deformability. *Int Wound J*, May 28 2015.

CAMERONE, G., S. GARELLI, M. VALBONESI AND L. MOSCONI [Plasma exchange treatment in a patient with severe Schoenlein-Henoch purpura]. *Minerva Med*, Apr 28 1982, 73(18), 1185-1187.

CANIS, M., F. HEIGL AND M. SUCKFUELL Fibrinogen/LDL apheresis is a promising rescue therapy for sudden sensorineural hearing loss. *Clin Res Cardiol Suppl*, Jun 2012, 7, 36-40.

CAPACCIO, P., F. OTTAVIANI, V. CUCCARINI, U. AMBROSETTI, et al. Sudden hearing loss and MTHFR 677C>T/1298A>C gene polymorphisms. *Genet Med*, Mar 2005, 7(3), 206-208.

CAUSIN, P., G. GUIDOBONI, F. MALGAROLI, R. SACCO, et al. Blood flow mechanics and oxygen transport and delivery in the retinal microcirculation: multiscale mathematical modeling and numerical simulation. *Biomech Model Mechanobiol*, Aug 1 2015.

CIORBA, A., S. HATZOPOULOS, C. BIANCHINI, V. IANNINI, et al. Idiopathic sudden sensorineural hearing loss: cardiovascular risk factors do not influence hearing threshold recovery. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, Apr 2015, 35(2), 103-109.

CLUTTERBUCK, E. J., D. J. EVANS AND C. D. PUSEY Renal involvement in Churg-Strauss syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 1990, 5(3), 161-167.

COLE, E., D. CATTRAN, A. MAGIL, C. GREENWOOD, et al. A prospective randomized trial of plasma exchange as additive therapy in idiopathic crescentic glomerulonephritis. The Canadian Apheresis Study Group. *Am J Kidney Dis*, Sep 1992, 20(3), 261-269.

COPLEY, A. L. Rheological problems in biology. In *Proceedings of the International Congress on Rheology 1948*. Burgers et al., JM, editors. Amsterdam, Holland, 1949, vol. I, p. 47 (NON VIDI).

COPLEY, A. L. On biorheology. *Biorheology*, Jun 1973, 10(2), 87-105

COPLEY, A. L., L. C. KRCHMA AND M. E. WHITNEY. Humoral reology: I. Viskosity studies and anomalous flow properties of human blood system with heparin and other anticoagulants.. *J Gen Physiol*, Sep 20 1942, 26(1), 49-64.

DAVIS, A. C. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol*, Dec 1989, 18(4), 911-917.

DE AMORIM GARCIA FILHO, C. A., Z. YEHOShUA, G. GREGORI, R. P. NUNES, et al. Change in drusen volume as a novel clinical trial endpoint for the study of complement inhibition in age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, Jan-Feb 2014, 45(1), 18-31.

DE KLEYN, A. Sudden complete or partial loss of function of the octavus-sxsystem in apparently normal person. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 1944, 32, 407-429 (NON VIDI).

DIAMANT, M., M. E. TUSHUIZEN, A. STURK AND R. NIEUWLAND Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*, Jun 2004, 34(6), 392-401.

DONALDSON, M. J. AND J. S. PULIDO Treatment of nonexudative (dry) age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*, Jun 2006, 17(3), 267-274.

DONATI, G., N. MAVRAKANAS AND C. J. POURNARAS [Isovolumic hemodilution in the management of the acute phase of central retinal vein occlusion: a pilot study]. *J Fr Ophthalmol*, Dec 2009, 32(10), 750-756.

DORAISWAMY, D. The Origins of Rheology: A Short Historical Excursion. *Rheology Bulletin*, 2002, 71(1), 7-17.

DORMANDY, J. A., C. J. YATES AND G. A. BERENT Clinical relevance of blood viscosity and red cell deformability including newer therapeutic aspects. *Angiology*, Apr 1981, 32(4), 236-242.

DRŠATA, J., M. BLAHA, V. CHROBOK AND M. LÁNSKÁ Léčba percepční ztráty sluchu rheohemaferézou – první zkušenosti. *Otorinolaryngologie*, 2014, 63(3), 163-169.

EARNSHAW, S. R., Y. MORIDE AND S. ROCHON Cost-effectiveness of pegaptanib compared to photodynamic therapy with verteporfin and to standard care in the treatment of subfoveal wet age-related macular degeneration in Canada. *Clin Ther*, Sep 2007, 29(9), 2096-2106; discussion 2094-2095.

FAHRAEUS, R., LINDQVIST T The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *The American Journal of Physiology*, 1931, 96, 562-568 (NON VIDI).

FELL, A. J., K. ENGELMANN, G. RICHARD, C. FASSBENDER, et al. [Rheophoresis. A systematic approach to therapy of age-related macular degeneration (AMD)?]. *Ophthalmologie*, Oct 2002, 99(10), 780-784.

FINGER, R. P., T. U. KROHNE, P. CHARBEL ISSA, M. FLECKENSTEIN, et al. Plasmapheresis for dry age-related macular degeneration--evidence based? *Retina*, May 2009, 29(5), 569-572.

FOK, W., S. WU, N. HSIAO, T. CHEN, et al. Hemolysis in plasmapheresis. *Acta Nephrol*, 1996, 10, 16 - 21 (NON VIDI).

FREIREICH, E. J., G. JUDSON AND R. H. LEVIN Separation and collection of leukocytes. *Cancer Res*, Oct 1965, 25(9), 1516-1520 (NON VIDI).

FUCHS, M., P. HENKEL, D. BECKER-SCHEID AND J. SCHMITT [Continuous hemodilution using a low-molecular hydroxyethyl starch solution. Pilot studies in patients with acute cerebral ischemia]. *Infusionstherapie*, Aug 1990, 17(4), 205-209.

FUKUDA, S., E. CHIDA, T. KURODA, M. KASHIWAMURA, et al. An anti-mumps IgM antibody level in the serum of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx*, May 2001, 28 Suppl, S3-5.

GANONG, W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. Edition ed. Praha: Galén, 2005. 890 p. ISBN 10: 80-7262-311-7.

GASOVA, Z., Z. BHUIYAN-LUDVIKOVA, M. BOHMOVA, I. MARINOV, et al. PBPC collections: Management, techniques and risks. *Transfus Apher Sci*, Oct 2010, 43(2), 237-243.

GASOVA, Z., I. MARINOV, S. VODVARKOVA, M. BOHMOVA, et al. PBPC collection techniques: standard versus large volume leukapheresis (LVL) in donors and in patients. *Transfus Apher Sci*, Apr 2005, 32(2), 167-176.

GASOVA, Z., R. SPISEK, L. DOLEZALOVA, I. MARINOV, et al. Extracorporeal photochemotherapy (ECP) in treatment of patients with c-GVHD and CTCL. *Transfus Apher Sci*, Apr 2007, 36(2), 149-158.

GLACET-BERNARD, A., M. ATASSI, C. FARDEAU, J. P. ROMANET, et al. Hemodilution therapy using automated erythrocytapheresis in central retinal vein occlusion: results of a multicenter randomized controlled study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, Apr 2011, 249(4), 505-512.

GLACET-BERNARD, A., A. ZOURDANI, M. MILHOUB, N. MARAQUA, et al. Effect of isovolemic hemodilution in central retinal vein occlusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, Dec 2001, 239(12), 909-914.

GOREVIC, P. D. Rheumatoid factor, complement, and mixed cryoglobulinemia. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012, 439018.

GOWER, E. W., S. D. CASSARD, E. B. BASS, O. D. SCHEIN, et al. A cost-effectiveness analysis of three treatments for age-related macular degeneration. *Retina*, Feb 2010, 30(2), 212-221.

GOYAL, A., V. SHARMA, N. UPADHYAY, A. K. SINGH, et al. Development of stable flaxseed oil emulsions as a potential delivery system of omega-3 fatty acids. *J Food Sci Technol*, Jul 2015, 52(7), 4256-4265.

GRAHAM, B. C., J. S. PULIDO AND J. L. WINTERS Seeing is believing: A review of apheresis therapy in the treatment of ophthalmologic disease. *J Clin Apher*, Nov 18 2017.

GROSS, M., D. G. WOLF, J. ELIDAN AND R. ELIASHAR Enterovirus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus infection screening in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Audiol Neurotol*, 2007, 12(3), 179-182.

GRZYBOWSKI, A. AND J. J. SAK Who discovered the erythrocyte sedimentation rate? *J Rheumatol*, Jul 2011, 38(7), 1521-1522; author reply 1523.

GUYATT, G. H., A. D. OXMAN, G. E. VIST, R. KUNZ, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *Bmj*, Apr 26 2008, 336(7650), 924-926.

HAIMOVICI, R., D. L. GANTZ, S. RUMELT, T. F. FREDDO, et al. The lipid composition of drusen, Bruch's membrane, and sclera by hot stage polarizing light microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Jun 2001, 42(7), 1592-1599.

HASEGAWA, Y., M. TAGAYA, S. FUJIMOTO, K. HAYASHIDA, et al. Extracorporeal double filtration plasmapheresis in acute atherothrombotic brain infarction caused by major artery occlusive lesion. *J Clin Apher*, 2003, 18(4), 167-174.

HULL, G. The influence of Herman Boerhaave. *J R Soc Med*, Sep 1997, 90(9), 512-514.

HYBASEK, I. AND J. VOKURKA. Vyšetření sluchového ústrojí. eOtolaryngologie. Poslední aktualizace 13. 2. 2018 [cit. 2018-05-14]. 2010. Available from Internet:<<http://www.eorl.cz/kniha/03-ORL-VYSETROVACI-METODY.pdf>>.

CHANG, I. J., C. J. KANG, C. Y. YUEH, K. H. FANG, et al. The relationship between serum lipids and sudden sensorineural hearing loss: a systematic review and meta-analysis. PLoS One, 2015, 10(4), e0121025.

CHANG, Y. J. AND X. J. HUANG Improving the clinical outcome of unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, Jun 2015, 50 Suppl 2, S21-23.

CHROBOK, V. In U. DĚKANÁT. *Elektronický portál Lékařské fakulty UK Hradec Králové*. Lékařská fakulta Hradec Králové, 2018.

JAESCHKE, R., G. H. GUYATT, P. DELLINGER, H. SCHUNEMANN, et al. Use of GRADE grid to reach decisions on clinical practice guidelines when consensus is elusive. Bmj, 2008, 337, a744.

KAPLAN, A. A. Therapeutic plasma exchange: a technical and operational review. J Clin Apher, Feb 2013, 28(1), 3-10.

KITTNAR, O., K. JANDOVÁ, E. KURIŠČÁK, M. LANGMEIER, et al. *Lékařská fyziologie*. Edtion ed. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. 800 p. ISBN 978-80-247-3068-4.

KLEIN, R., B. E. KLEIN, S. C. TOMANY, S. M. MEUER, et al. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. Ophthalmology, Oct 2002, 109(10), 1767-1779.

KLINGEL, R., B. ERDTRACHT, V. GAUSS, A. PIAZOLO, et al. Rheopheresis in patients with critical limb ischemia--results of an open label prospective pilot trial. Ther Apher Dial, Dec 2005, 9(6), 473-481.

KLINGEL, R., C. FASSBENDER, T. FASSBENDER, B. ERDTRACHT, et al. Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects. Ther Apher, Oct 2000, 4(5), 348-357.



KLINGEL, R., C. FASSBENDER, T. FASSBENDER AND B. GOHLEN Clinical studies to implement Rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine. *Transfus Apher Sci*, Aug 2003a, 29(1), 71-84.

KLINGEL, R., C. FASSBENDER, A. HEIBGES, F. KOCH, et al. RheoNet registry analysis of rheopheresis for microcirculatory disorders with a focus on age-related macular degeneration. *Ther Apher Dial*, Jun 2010, 14(3), 276-286.

KLINGEL, R., A. HEIBGES, S. UYGUN-KIEHNE, C. FASSBENDER, et al. Rheopheresis for sudden sensorineural hearing loss. *Atheroscler Suppl*, Dec 29 2009, 10(5), 102-106.

KLINGEL, R., C. MUMME, T. FASSBENDER, F. HIMMELSBACH, et al. Rheopheresis in patients with ischemic diabetic foot syndrome: results of an open label prospective pilot trial. *Ther Apher Dial*, Aug 2003b, 7(4), 444-455.

KOBAYASHI, S., H. MORIYA, K. NEGISHI, K. MAESATO, et al. LDL-apheresis up-regulates VEGF and IGF-I in patients with ischemic limb. *J Clin Apher*, 2003, 18(3), 115-119.

KOJIMA, S., M. SHIDA, H. TAKANO, S. INAMI, et al. Effects of losartan on blood pressure and humoral factors in a patient who suffered from anaphylactoid reactions when treated with ACE inhibitors during LDL apheresis. *Hypertens Res*, Sep 2001, 24(5), 595-598.

KOJIMA, S., Y. YOSHITOMI, M. SAOTOME, K. TANAKA, et al. Effects of losartan on low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher*, Nov 1999, 3(4), 303-306.

KOSS, M. J., P. KURZ, T. TSOBANELIS, W. LEHMACHER, et al. Prospective, randomized, controlled clinical study evaluating the efficacy of Rheopheresis for dry age-related macular degeneration. Dry AMD treatment with Rheopheresis Trial-ART. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, Oct 2009, 247(10), 1297-1306.

KOSTAL, M., M. BLAHA, E. RENCOVA, M. LANSKA, et al. Dynamics of blood count after rheohemapheresis in age-related macular degeneration: possible association with clinical changes. *Biomed Res Int*, 2014, 2014, 858219.

KOSTAL, M., J. DRŠATA, M. BLAHA, M. LANSKA, et al. Rheopheresis in treatment of idiopathic sensorineural sudden hearing loss. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, Jun 29 2017, 46(1), 50.

KURTENBACH, A., C. KERNSTOCK, E. ZRENNER AND H. LANGROVA Electrophysiology and colour: a comparison of methods to evaluate inner retinal function. *Doc Ophthalmol*, Sep 23 2015.

LANGFORD-SMITH, A., T. D. KEENAN, S. J. CLARK, P. N. BISHOP, et al. The role of complement in age-related macular degeneration: heparan sulphate, a ZIP code for complement factor H? *J Innate Immun*, 2014, 6(4), 407-416.

LANGROVÁ, H., E. RENCOVÁ, M. BLÁHA, J. STUDNIČKA, et al. Rheoferéza v léčbě věkem podmíněné makulární degenerace. In P. ROZSÍVAL ed. *Trendy soudobé oftalmologie 11*. 2018, vol. 11.

LANCHONEY, D. M., M. G. MAGUIRE AND S. L. FINE A model of the incidence and consequences of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Comparative effects of current treatment and potential prophylaxis on visual outcomes in high-risk patients. *Arch Ophthalmol*, Aug 1998, 116(8), 1045-1052.

LÁNSKÁ, M., M. BLÁHA AND P. ŽÁK Extrakorporální eliminace cholesterolu u familiární hypercholesterolemie – srovnání dvou metod. *Transfúze a hematologie dnes.*, 2014, 20, 67 - 75.

LAWRENCE, R. AND R. THEVASAGAYAM Controversies in the management of sudden sensorineural hearing loss: an evidence-based review. *Clin Otolaryngol*, Jun 2015, 40(3), 176-182.

LE THI HUONG, D., B. WECHSLER, J. C. PIETTE, C. DE GENNES, et al. [Wegener's granulomatosis in elderly subjects. 37 cases]. *Presse Med*, Dec 17 1988, 17(45), 2379-2382.

LEMONNE, N., K. CHARLOT, X. WALTZ, S. K. BALLAS, et al. Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia. *Haematologica*, Jul 2 2015.

LEUNG, E. AND G. LANDA Update on current and future novel therapies for dry age-related macular degeneration. *Expert Rev Clin Pharmacol*, Sep 2013, 6(5), 565-579.

LEVINSKY, R. J. AND T. M. BARRATT IgA immune complexes in Henoch-Schonlein purpura. *Lancet*, Nov 24 1979, 2(8152), 1100-1103.

LI, Y., Y. H. SONG, J. MOHLER AND P. DELAFONTAINE ANG II induces apoptosis of human vascular smooth muscle via extrinsic pathway involving inhibition of Akt phosphorylation and increased FasL expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, May 2006, 290(5), H2116-2123.

LIN, R. J., R. KRALL, B. D. WESTERBERG, N. K. CHADHA, et al. Systematic review and meta-analysis of the risk factors for sudden sensorineural hearing loss in adults. *Laryngoscope*, Mar 2012, 122(3), 624-635.

LOUGHRAN, S. Management of sudden sensorineural hearing loss: a consultant survey. *J Laryngol Otol*, Nov 2000, 114(11), 837-839.

LUTZE, S., G. DAESCHLEIN, W. KONSCHAKE AND M. JUNGER Rheopheresis as a causal therapy option for systemic scleroderma (SSc). *Clin Hemorheol Microcirc*, 2017, 67(3-4), 229-240.

LYSAK, D., Z. KORISTEK, Z. GASOVA, I. SKOUMALOVA, et al. Efficacy and safety of peripheral blood stem cell collection in elderly donors; does age interfere? *J Clin Apher*, 2011, 26(1), 9-16.

LYSAK, D., V. KOZA AND P. JINDRA Factors affecting PBSC mobilization and collection in healthy donors. *Transfus Apher Sci*, Nov 2005, 33(3), 275-283.

MACHALINSKA, A., K. SAFRANOW, V. DZIEDZIEJKO, K. MOZOLEWSKA-PIOTROWSKA, et al. Different populations of circulating endothelial cells in patients with age-related macular degeneration: a novel insight into pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Jan 2011, 52(1), 93-100.

MALEK, G., C. M. LI, C. GUIDRY, N. E. MEDEIROS, et al. Apolipoprotein B in cholesterol-containing drusen and basal deposits of human eyes with age-related maculopathy. *Am J Pathol*, Feb 2003, 162(2), 413-425.

MALKIN, A. Y. AND A. I. ISAYEV *Rheology: Concepts, Methods, and Applications*. Edition ed. Scarborough, Canada: Chemtec Publishing, 2012. 473 p. ISBN 978-1-895198-49-2.

MATTESON, E. AND C. CROWSON Dr. Matteson and Ms Crowson reply. *J Rheumatol*, 2011, 38(7), 1523.

MELINDA, V., D. AGNES, N. NORBERT, S. VIKTORIA, et al. Rheopheresis in vascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2016, 64(4), 977-987.

MERCHANT, S. N., J. C. ADAMS AND J. B. NADOL, JR. Pathology and pathophysiology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol*, Mar 2005, 26(2), 151-160.

MERCHANT, S. N., M. L. DURAND AND J. C. ADAMS Sudden deafness: is it viral? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2008, 70(1), 52-60; discussion 60-52.

MCHARG, S., S. J. CLARK, A. J. DAY AND P. N. BISHOP Age-related macular degeneration and the role of the complement system. *Mol Immunol*, Sep 2015, 67(1), 43-50.

MINESHIMA, M., T. AGISHI, I. KANEKO, Y. HASUO, et al. Performance evaluation of conventional and modified double filtration plasmapheresis (DFPP). *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 1984, 30, 665-670.

MOHAMED, Q., R. L. MCINTOSH, S. M. SAW AND T. Y. WONG Interventions for central retinal vein occlusion: an evidence-based systematic review. *Ophthalmology*, Mar 2007, 114(3), 507-519, 524.

MOON, I. S., J. KIM, S. Y. LEE, H. S. CHOI, et al. How long should the sudden hearing loss patients be followed after early steroid combination therapy? *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Sep 2009, 266(9), 1391-1395.

MOSGES, R., J. KOBERLEIN, A. HEIBGES, B. ERDTRACHT, et al. Rheopheresis for idiopathic sudden hearing loss: results from a large prospective, multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Jul 2009, 266(7), 943-953.

MURASHIMA, J., Y. UEKI, Y. MATSUNAGA, M. YANO, et al. Removal of low-density lipoprotein from plasma by adsorption increases bradykinin and plasma nitric oxide levels in patients with peripheral atherosclerosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Nov 1998, 9(8), 725-732.

NAKACHE, G., L. MIGIROV, S. TROMMER, M. DRENDEL, et al. Steroid-based treatments for patients with total sudden sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol*, Apr 10 2015, 1-7.

NEČAS, E. *Obecná patologická fyziologie*. Edition ed. Praha: Karolinum, 2006. 377 p. ISBN 9788024616889.

NORDA, R. AND B. G. STEGMAYR Therapeutic apheresis in Sweden: update of epidemiology and adverse events. *Transfus Apher Sci*, Oct 2003, 29(2), 159-166.

NOWAK, I., W. GAJEWICZ, L. STEFANCZYK AND W. OMULECKI [Color Doppler imaging of the retrobulbar circulation in non-exudative and exudative age-related macular degeneration]. *Klin Oczna*, 2005, 107(1-3), 63-67.

OH, J. H., K. PARK, S. J. LEE, Y. R. SHIN, et al. Bilateral versus unilateral sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg*, Jan 2007, 136(1), 87-91.

OKURA, T., S. WATANABE, Y. JIANG, M. NAKAMURA, et al. Soluble Fas ligand and atherosclerosis in hypertensive patients. *J Hypertens*, May 2002, 20(5), 895-898.

OSTERGAARD, L., A. GRANFELDT, N. SECHER, A. TIETZE, et al. Microcirculatory dysfunction and tissue oxygenation in critical illness. *Acta Anaesthesiol Scand*, Jul 7 2015.

OTTO, J. Rheohaemapheresis. *Transfus Apher Sci*, Oct 2010, 43(2), 217-222.

PARÁKOVÁ, Z., M. BLÁHA, V. MAŠÍN, V. KOBLÍŽEK, et al. Léčba polyglobulie u plicních chorob erythrocytaferézou (výsledky za 5 let). In *Tuberkulóza, respirační isnuficience, karcinom plic, ošetřovatelství*. Praha: Galén, a.s., 2001, p. 76-79.

PENFOLD, P. L., M. C. MADIGAN, M. C. GILLIES AND J. M. PROVIS Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, May 2001, 20(3), 385-414.

PENIDO, N. O., O. L. CRUZ, A. ZANONI AND D. P. INOUE Classification and hearing evolution of patients with sudden sensorineural hearing loss. *Braz J Med Biol Res*, Aug 2009, 42(8), 712-716.

PEROTTI, C. AND I. SNIĘCINSKI A concise review on extracorporeal photochemotherapy: Where we began and where we are now and where are we going! *Transfus Apher Sci*, Jun 2015, 52(3), 360-368.

PROBST, R., K. TSCHOPP, E. LUDIN, B. KELLERHALS, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of dextran/pentoxifylline medication in acute acoustic trauma and sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol*, 1992, 112(3), 435-443.

PULIDO, J. S. Multicenter prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled study of Rheopheresis to treat nonexudative age-related macular degeneration: interim analysis. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 2002, 100, 85-106; discussion 106-107.

PULIDO, J. S., J. L. WINTERS AND D. BOYER Preliminary analysis of the final multicenter investigation of rheopheresis for age related macular degeneration (AMD) trial (MIRA-1) results. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 2006, 104, 221-231.

REHACEK, V., M. BLAHA, H. JIROUSOVA, J. CERNOHORSKA, et al. Therapeutic erythrocytapheresis in the initial treatment of hereditary hemochromatosis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2012, 55(4), 180-185.

REINHART, W. H., C. M. BOULANGER, T. F. LUSCHER, A. HAEBERLI, et al. Influence of endothelial surface on flow velocity in vitro. *Am J Physiol*, Aug 1993, 265(2 Pt 2), H523-529.

RENCOVA, E., M. BLAHA, M. BLAZEK, V. BLAHA, et al. [Influence of haemorheopheresis in the dry form of the age related macular degeneration]. *Cesk Slov Oftalmol*, Apr 2009, 65(2), 43-48.

RENCOVA, E., M. BLAHA, J. STUDNICKA, V. BLAHA, et al. Reduction in the drusenoid retinal pigment epithelium detachment area in the dry form of age-related macular degeneration 2.5 years after rheohemapheresis. *Acta Ophthalmol*, Aug 2013, 91(5), e406-408.

RENCOVA, E., M. BLAHA, J. STUDNICKA, V. BLAHA, et al. Preservation of the Photoreceptor Inner/Outer Segment Junction in Dry Age-Related Macular Degeneration Treated by Rheohemapheresis. *J Ophthalmol*, 2015, 2015, 359747.

RENCOVA, E., M. BLAHA, J. STUDNICKA, M. BLAZEK, et al. Haemorheopheresis could block the progression of the dry form of age-related macular degeneration with soft drusen to the neovascular form. *Acta Ophthalmol*, Aug 2011, 89(5), 463-471.

RIDKER, P. M., E. DANIELSON, F. A. FONSECA, J. GENEST, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet*, Apr 4 2009, 373(9670), 1175-1182.

RIETZSCH, H., I. PANZNER, T. SELISKO, U. JULIUS, et al. Heparin-induced Extracorporal LDL precipitation (H.E.L.P) in diabetic foot syndrome - preventive and regenerative potential? *Horm Metab Res*, Jul 2008, 40(7), 487-490.

RICHTER, W. O., M. G. DONNER, A. SELMAIER, E. HILLER, et al. Efficacy and safety of immunoglobulin apheresis. *Asaio j*, Jan-Feb 1997, 43(1), 53-59.

ROTH, T. N., D. HANEUBUTH AND R. PROBST Prevalence of age-related hearing loss in Europe: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Aug 2011, 268(8), 1101-1107.

ROZSÍVAL, P., D. BARÁKOVÁ, M. BLÁHA, A. FEUERMANNNOVÁ, et al. *Trendy soudobé oftalmologie 7*. Edtion ed. Praha: Galén, 2011. 225 p. ISBN 978-80-7262-691-5.

SAGIT, M., M. KAVUGUDURMAZ, S. GULER AND M. A. SOMDAS Impact of mean platelet volume on the occurrence and severity of sudden sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol*, Oct 2013, 127(10), 972-976.

SAKATA, T. AND T. KATO Feeling of ear fullness in acute sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol*, Aug 2006, 126(8), 828-833.

SARRAF, D., T. GIN, F. YU, A. BRANNON, et al. Long-term drusen study. *Retina*, 1999, 19(6), 513-519.

SHEMIN, D., D. BRIGGS AND M. GREENAN Complications of therapeutic plasma exchange: a prospective study of 1,727 procedures. *J Clin Apher*, 2007, 22(5), 270-276.

SCHMID-SCHÖNBEIN, H. Synergics of blood movement through microvascular network. Causes and consequences of nonlinear pressure flow relationship. In H. HAKEN AND M. A. eds. *Drugs and the delivery of oxygen to tissues*. Boca Rato (FI): CRC Press, 1990, p. 15-86 (NON VIDI).

SCHRAG, M., T. YOUN, J. SCHINDLER, H. KIRSHNER, et al. Intravenous Fibrinolytic Therapy in Central Retinal Artery Occlusion: A Patient-Level Meta-analysis. *JAMA Neurol*, Aug 10 2015.

SCHREIBER, B. E., C. AGRUP, D. O. HASKARD AND L. M. LUXON Sudden sensorineural hearing loss. *Lancet*, Apr 3 2010, 375(9721), 1203-1211.

SCHUFF-WERNER, P., S. FENGER AND P. KOHLSCHEIN Role of lipid apheresis in changing times. *Clin Res Cardiol Suppl*, Jun 2012, 7, 7-14.

SCHUFF-WERNER, P., E. SCHUTZ, W. C. SEYDE, T. EISENHAUER, et al. Improved haemorheology associated with a reduction in plasma fibrinogen and LDL in patients being treated by heparin-induced extracorporeal LDL precipitation (HELP). *Eur J Clin Invest*, Feb 1989, 19(1), 30-37.

SCHULTZ, S. G. William Harvey and the circulation of the blood: the birth of a scientific revolution and modern physiology. *News Physiol Sci*, Oct 2002, 17, 175-180.

SCHWARTZ, J., A. PADMANABHAN, N. AQUI, R. A. BALOGUN, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue. *J Clin Apher*, Jun 2016, 31(3), 149-162.

SCHWARTZ, J., J. L. WINTERS, A. PADMANABHAN, R. A. BALOGUN, et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based approach



from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: the sixth special issue. *J Clin Apher*, Jul 2013, 28(3), 145-284.

SIVAPRASAD, S. AND N. V. CHONG The complement system and age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*, Aug 2006, 20(8), 867-872.

SOLICHOVA, D., M. BLAHA, J. AUFARTOVA, L. K. KRCMOVA, et al. The Effect of LDL-Apheresis and Rheohaemapheresis Treatment on Vitamin E. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Apr 2015, 61(2), 105-112.

SOLOMON, B. A., F. CASTINO, M. J. LYSAGHT, C. K. COLTON, et al. Continuous flow membrane filtration of plasma from whole blood. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 1978, 24, 21-26.

STACHLER, R. J., S. S. CHANDRASEKHAR, S. M. ARCHER, R. M. ROSENFELD, et al. Clinical practice guideline: sudden hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg*, Mar 2012, 146(3 Suppl), S1-35.

STEGMAYR, B., M. MORTZELL HENRIKSSON, E. NEWMAN, V. WITT, et al. Distribution of indications and procedures within the framework of centers participating in the WAA apheresis registry. *Transfus Apher Sci*, Jan 04 2017.

STEGMAYR, B., J. PTAK, T. NILSSON, G. BERLIN, et al. Panorama of adverse events during cytapheresis. *Transfus Apher Sci*, Apr 2013, 48(2), 155-156.

STEGMAYR, B., J. PTAK, B. WIKSTROM, G. BERLIN, et al. World apheresis registry 2003-2007 data. *Transfus Apher Sci*, Dec 2008, 39(3), 247-254.

STEW, B. T., S. J. FISHPOOL AND H. WILLIAMS Sudden sensorineural hearing loss. *Br J Hosp Med (Lond)*, Feb 2012, 73(2), 86-89.

STRIJBOS, M. H. Circulating tumour cells and circulating endothelial cells as biomarkers in oncology. *Acta Clin Belg*, Sep-Oct 2011, 66(5), 332-336.

STRUPP, M. AND M. MAGNUSSON Acute Unilateral Vestibulopathy. *Neurol Clin*, Aug 2015, 33(3), 669-685, x.

STUDNICKA, J., E. RENCOVA, M. BLAHA, P. ROZSIVAL, et al. Long-term outcomes of rheohaemapheresis in the treatment of dry form of age-related macular degeneration. *J Ophthalmol*, 2013, 2013, 135798.

SUCKFULL, M. Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial. *Lancet*, Dec 7 2002, 360(9348), 1811-1817.

SWARTZ, M. AND G. RABETOY Treatment of non-exudative age-related macular degeneration using membrane differential filtration apheresis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40. (NON VIDI), S319.

THYSELL, H., P. BYGREN, U. BENGTSSON, T. LINDHOLM, et al. Immunosuppression and the additive effect of plasma exchange in treatment of rapidly progressive glomerulonephritis. *Acta Med Scand*, 1982, 212(3), 107-114.

TOKSVANG, L. N. AND R. M. BERG Using a classic paper by Robin Fahraeus and Torsten Lindqvist to teach basic hemorheology. *Adv Physiol Educ*, Jun 2013, 37(2), 129-133.

TROUTBECK, R., S. AL-QURESHI AND R. H. GUYMER Therapeutic targeting of the complement system in age-related macular degeneration: a review. *Clin Experiment Ophthalmol*, Jan-Feb 2012, 40(1), 18-26.

ULLRICH, H., T. KLEINJUNG, T. STEFFENS, P. JACOB, et al. Improved treatment of sudden hearing loss by specific fibrinogen aphaeresis. *J Clin Apher*, 2004, 19(2), 71-78.

ULU, S., M. S. ULU, A. AHSEN, F. YUCEDAG, et al. Increased levels of mean platelet volume: a possible relationship with idiopathic sudden hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Nov 2013, 270(11), 2875-2878.

UYGUN-KIEHNE, S., R. STRAUBE, A. HEIBGES, R. KLINGEL, et al. [Rheopheresis for recurrent sudden hearing loss : therapeutic options for patients refractory to infusion therapy]. *Hno*, May 2010, 58(5), 445-451.

VALBONESI, M., P. CARLIER, G. GIANNINI AND M. R. RUZZENENTI Rheotherapy for vascular disorders. *Int J Artif Organs*, Oct 2005, 28(10), 1012-1017.

VALBONESI, M., A. A. PINEDA AND J. C. BIGGS *Therapeutic hemapheresis*. Edition ed. Milano, Italy: Wichtig Editore, 1986. 714 p. ISBN 978-8885053298.

WACKYM, P. A. Molecular temporal bone pathology: II. Ramsay Hunt syndrome (herpes zoster oticus). *Laryngoscope*, Sep 1997, 107(9), 1165-1175.

WALDENSTROM, J. G. Plasmapheresis--bloodletting revived and refined. *Acta Med Scand*, 1980, 208(1-2), 1-4 (NON VIDI).

WANG, X., Y. ZHANG AND M. N. ZHANG Complement factor B polymorphism (rs641153) and susceptibility to age-related macular degeneration: evidence from published studies. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6(6), 861-867.

WEI, B. P., D. STATHOPOULOS AND S. O'LEARY Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, 7, Cd003998.

WEISS, N. Lipid apheresis and rheopheresis for treatment of peripheral arterial disease. *Atheroscler Suppl*, Dec 29 2009, 10(5), 62-69.

WEISS, N. A critical review on the use of lipid apheresis and rheopheresis for treatment of peripheral arterial disease and the diabetic foot syndrome. *Semin Dial*, Mar-Apr 2012, 25(2), 220-227.

WIDDER, R. A., R. BRUNNER AND H. BORBERG Changes of haemorheological parameters when using plasma exchange, selective adsorption and membrane differential separation. *Transfus Sci*, Dec 1996, 17(4), 505-510.

WIDDER, R. A., R. BRUNNER, H. BORBERG, R. A. FISCHER, et al. Changes of visual acuity in patients with age related macular degeneration (AMD) after elimination of high molecular weight proteins and lipids. In SCIENTIF.COMMITTEE ed. *Association for research in vision and ophthalmology 1997 annual meeting*. Fort Lauderdale, Florida, USA: Scient.Committee, 1997, vol. 38, p. 1-677 (NON VIDI).

WIDDER, R. A., R. BRUNNER, B. ENGELS, H. BORBERG, et al. Changes of hemorheological and biochemical parameters after plasma perfusion using a tryptophan-

polyvinyl alcohol adsorber leading to clinical improvement in patients suffering from maculopathy. *Blood Purif*, 1998, 16(1), 15-21.

WIDDER, R. A., R. BRUNNER, P. WALTER, C. LUKE, et al. Improvement of visual acuity in patients suffering from diabetic retinopathy after membrane differential filtration: a pilot study. *Transfus Sci*, Dec 1999, 21(3), 201-206.

WIDDER, R. A., E. FARVILI, R. G. J. REIS, C. LÜKE, et al. The treatment of age-related macular degeneration (ARMD) with extracorporeal treatment procedures: a follow-up of four years. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(2906 [abstract] (NON VIDI)).

WIEK, J., M. SCHADE, M. WIEDERHOLT, H. R. ARNTZ, et al. Haemorheological changes in patients with retinal vein occlusion after isovolaemic haemodilution. *Br J Ophthalmol*, Nov 1990, 74(11), 665-669.

WILSON, W. R., R. W. VELTRI, N. LAIRD AND P. M. SPRINKLE Viral and epidemiologic studies of idiopathic sudden hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg*, Dec 1983, 91(6), 653-658.

WINTERS, J. *Therapeutic apheresis: a physician handbook*. Edition ed.: AABB, 8101 Glenbrook Road, Bethesda, Maryland 20814-2749, 2008. 245 p. ISBN 978-1-56395-271-5.

WINTERS, J. L. Low-density lipoprotein apheresis: principles and indications. *Semin Dial*, Mar-Apr 2012, 25(2), 145-151./

WOLF, S., O. AREND, B. BERTRAM, A. REMKY, et al. Hemodilution therapy in central retinal vein occlusion. One-year results of a prospective randomized study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, Jan 1994, 232(1), 33-39.

YEH, J. H., W. H. CHEN AND H. C. CHIU Complications of double-filtration plasmapheresis. *Transfusion*, Nov 2004, 44(11), 1621-1625.

YEH, J. H. AND H. C. CHIU Coagulation abnormalities in serial double-filtration plasmapheresis. *J Clin Apher*, 2001, 16(3), 139-142.

ZARBIN, M. A. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration.  
Arch Ophthalmol, Apr 2004, 122(4), 598-614.