

**KRAŻĄCE PRZECIWCIAŁA
PRZECIWSIĄTKÓWKOWE
JAKO BIOMARKER
WYSIĘKOWEJ POSTACI
ZWYRODNIENIA PŁAMKI
ZWIĄZANEGO Z WIEKIEM**

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2010–2012
jako projekt badawczy nr N N402 588238

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski
Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej
Katedra Okulistyki

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Bożena Romanowska-Dixon

ROZPRAWY HABILITACYJNE UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI

AGNIESZKA KUBICKA-TRZĄSKA

KRAŻĄCE PRZECIWCIAŁA
PRZECIWSIATKÓWKOWE
JAKO BIOMARKER
WYSIĘKOWEJ POSTACI
ZWYRODNIENIA PLAMKI
ZWIĄZANEGO Z WIEKIEM



WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

RECENZENT WYDAWNICZY

Prof. dr hab. n. med. Dariusz Kęcik, Klinika Okulistyki Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie

PROJEKT OKŁADKI

Dorota Heliasz

REDAKTOR PROWADZĄCY

Dorota Węgierska

ADIUSTACJA JĘZYKOWO-STYLISTYCZNA

Katarzyna Jagiela

KOREKTOR

Małgorzata Szul

SKŁAD I ŁAMANIE

Hanna Wiechecka

© Copyright by Agnieszka Kubicka-Trząska & Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Wydanie I, Kraków 2012
All rights reserved

ISBN 978-83-233-3402-6



www.wuj.pl

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Redakcja: ul. Michałowskiego 9/2, 31-126 Kraków
tel. 12-631-18-81, tel./fax 12-631-18-83
Dystrybucja: tel. 12-631-01-97, tel./fax 12-631-01-98
tel. kom. 506-006-674, e-mail: sprzedaz@wuj.pl
Konto: PEKAO SA, nr 80 1240 4722 1111 0000 4856 3325

*Pani Profesor Bożenie Romanowskiej-Dixon
serdecznie dziękuję za żywe zainteresowanie postępami badań,
nieustanną mobilizację oraz wsparcie w trakcie całego okresu
przygotowywania niniejszej pracy.*

*Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikowi
pragnę podziękować za okazaną życzliwość oraz umożliwienie
przeprowadzenia badań.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I TERMINÓW UŻYTYCH W PRACY	9
1. WSTĘP.....	11
1.1. Anatomia i fizjologia plamki	11
1.2. Epidemiologia i etiologia zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem	13
1.3. Współczesne poglądy na patogenezę zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem	14
1.3.1. Pierwotna dysfunkcja komórek nabłonka barwnikowego siatkówki.....	15
1.3.2. Rola stresu oksydacyjnego.....	15
1.3.3. Udział czynników genetycznych	16
1.3.4. Udział mechanizmów naczyniowych.....	18
1.3.5. Rola zapalenia i układu immunologicznego	18
1.3.6. Rola zakażenia <i>Chlamydia pneumoniae</i>	21
1.4. Patofizjologia wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem ..	21
1.5. Objawy kliniczne i diagnostyka zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem	23
1.6. Klasyfikacja kliniczna zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem	28
1.7. Współczesne metody leczenia zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem.....	29
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY.....	33
3. MATERIAŁ I METODY	37
3.1. Charakterystyka grupy badanej oraz grupy kontrolnej.....	37
3.2. Metody badań	37
3.2.1. Wstępne badanie okulistyczne.....	37
3.2.2. Kontrolne badania okulistyczne.....	38
3.2.3. Wstępne badanie ogólne	38
3.2.4. Kryteria włączenia do badań.....	39
3.2.5. Kryteria wyłączenia z badań.....	39
3.2.6. Kryteria kontynuacji leczenia	40
3.2.7. Kryteria zawieszenia leczenia.....	40
3.2.8. Kryteria przerwania leczenia	40
3.2.9. Zastosowane leczenie	41
3.2.10. Test immunofluorescencji do oznaczania przeciwciał przeciwiątkówkowych oraz przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonka.....	43
3.2.11. Analiza statystyczna	43

4.	WYNIKI	45
4.1.	Wyniki wyjściowego badania okulistycznego	45
4.2.	Przeciwciała przeciwiśiatkówkowe w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem i w grupie kontrolnej w badaniu wyjściowym	48
4.3.	Przeciwciała przeciwiśiatkówkowe w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem a zaawansowanie zmian zwyrodnieniowych w plamce w badaniu wyjściowym	51
4.4.	Przeciwciała przeciwko komórkom śródbłónka w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem i w grupie kontrolnej w badaniu wyjściowym	53
4.5.	Wyniki kontrolnych badań okulistycznych.....	56
4.6.	Liczba wykonanych doszklistkowych iniekcji bewacizumabu (Avastin) w badanej grupie chorych w okresie ośmiomiesięcznej obserwacji	60
4.7.	Zachowanie się miana PPS _{max} w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem w okresie leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin) oraz zależność pomiędzy dynamiką zmian miana PPS _{max} a klinicznymi cechami aktywności choroby	61
4.8.	Zachowanie się przeciwciał przeciwko komórkom śródbłónka w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem w okresie obserwacji	67
5.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja	69
6.	PODSUMOWANIE	81
7.	WNIOSKI	83
8.	STRESZCZENIE	85
9.	ABSTRACT	89
10.	ANEKS	93
10.1.	Zgody Komisji Bioetycznej UJ CM na leczenie chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin).....	95
10.2.	Wzór zgody pacjenta z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) na leczenie doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin).....	98
10.3.	Wzór zgody pacjenta na pobieranie krwi i monitorowanie w surowicy poziomu przeciwciał przeciwiśiatkówkowych w okresie leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin).....	100
11.	PIŚMIENNICTWO.....	101

WYKAZ SKRÓTÓW I TERMINÓW UŻYTYCH W PRACY

AECA	(ang. <i>anti-endothelial cell antibodies</i>) – przeciwciała przeciwko komórkom śródbłónka
AMD	(ang. <i>age-related macular degeneration</i>) – zwyrodnienie plamki związane z wiekiem
ANA	(ang. <i>antinuclear antibodies</i>) – przeciwciała przeciwjądrowe
BCVA	(ang. <i>best corrected visual acuity</i>) – najlepiej skorygowana ostrość wzroku
b-r KZN	bloniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek
CAR	(ang. <i>carcinoma-associated retinopathy</i>) – retinopatia związana z rakiem
CEP	(ang. <i>carboxyethylpirol</i>) – karboksyetylpirol
CFH	(ang. <i>complement factor H</i>) – czynnik H dopełniacza
CNV	(ang. <i>choroidal neovascularization</i>) – neowaskularyzacja naczyńówkowa
CRP	(ang. <i>C-reactive protein</i>) – białko C-reaktywne
CRT	(ang. <i>central retinal thickness</i>) – centralna grubość siatkówki
DA	(ang. <i>disc area</i>) – powierzchnia tarczy nerwu wzrokowego
EKG	elektrokardiogram
FA	(ang. <i>fluorescein angiography</i>) – angiografia fluoresceinowa
FAZ	(ang. <i>foveal avascular zone</i>) – dołkowa strefa beznacyniowa
FGF	(ang. <i>fibroblast growth factor</i>) – czynnik wzrostu fibroblastów
GFAP	(ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>) – glejowe kwaśne białko włókienkowe
HIF	(ang. <i>hypoxia-inducible factor</i>) – czynnik indukowany hipoksją
HUVEC	(ang. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>) – ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej
HMECs	(ang. <i>human microvascular endothelial cells</i>) – ludzkie komórki śródbłónka mikronaczyń
ICAM-1	(ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1
ICG	(ang. <i>indocyanine green angiography</i>) – angiografia indocyjaninowa
IIF	(ang. <i>indirect immunofluorescence test</i>) – test immunofluorecencji pośredniej

iMP	(ang. <i>indocyanine green-mediated photothrombosis</i>) – fototromboza indukowana zielenią indocyjaninową
KDR	(ang. <i>kinase insert domain receptor</i>) – receptor kinazy tyrozynowej
LFA-1	(ang. <i>leukocyte function-associated antigen-1</i>) – antygen związany z aktywnością limfocytów 1
MAC	(ang. <i>membrane attack complex</i>) – kompleks atakujący błonę
MAR	(ang. <i>melanoma-associated retinopathy</i>) – retinopatia związana z czerniakiem skóry
MCP	(ang. <i>monocyte chemotactic protein</i>) – białko chemotaktyczne monocytów
MHC II	(ang. <i>major histocompatibility complex</i>) – główny układ zgodności tkankowej
MMPs	(ang. <i>matrix metalloproteinases</i>) – metaloproteinazy macierzy mitochondrialnej
OCT	(ang. <i>optical coherence tomography</i>) – optyczna koherentna tomografia
PCR	(ang. <i>polymerase chain reaction</i>) – reakcja łańcuchowa polimerazy
PCV	(ang. <i>polypoidal choroidal vasculopathy</i>) – poliploidalna naczyniówkowa waskulopatia
PDT	(ang. <i>photodynamic therapy</i>) – terapia fotodynamiczna
PED	(ang. <i>pigment epithelium detachment</i>) – odwarstwienie nabłonka barwnikowego
PEDF	(ang. <i>pigment epithelium derived factor</i>) – czynnik wywodzący się z komórek nabłonka barwnikowego
PPS	przeciwciała przeciwsiatkówkowe
RAP	(ang. <i>retinal angiomatous proliferation</i>) – proliferacja naczyniowa siatkówki
RPE	(ang. <i>retinal pigment epithelium</i>) – nabłonek barwnikowy siatkówki
SLE	(ang. <i>systemic lupus erythematosus</i>) – toczeń rumieniowaty układowy
Sn	powszechnie przyjęty skrót służący oznaczeniu ostrości wzroku z bliska pochodzący od nazwiska twórcy tablic do badania ostrości wzroku Hermanna Snellena
sPED	(ang. <i>serous pigment epithelium detachment</i>) – surowicze odwarstwienie nabłonka barwnikowego
Ta	tonometria aplanacyjna
TGF- β 1, β 2	(ang. <i>transforming growth factor β1, β2</i>) – transformujący czynnik wzrostu β 1, β 2
TNF α	(ang. <i>tumor necrosis factor α</i>) – czynnik martwicy nowotworu α
TTT	(ang. <i>transpupillary thermotherapy</i>) – przezźreniczna termoterapia
VCAM-1	(ang. <i>vascular cell adhesion protein-1</i>) – cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka 1
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

1. WSTĘP

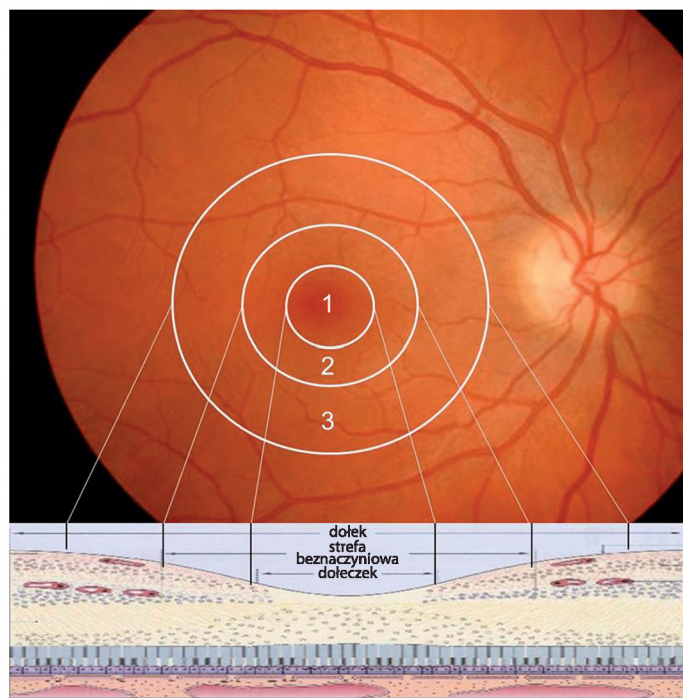
1.1. Anatomia i fizjologia plamki

Wzrok jest dominującym i najlepiej wykształconym zmysłem człowieka. Oczami człowiek odbiera aż 80% wszystkich informacji o otaczającym świecie, a najważniejszą częścią oka ludzkiego odpowiedzialną za jego precyzyjne widzenie jest plamka. Plamka (łac. *macula*) – centralna część siatkówki – to obszar dna oka mający około 5,5 mm średnicy. Po raz pierwszy opisał ją pod koniec XVIII wieku włoski okulista z Mediolanu Francesco Buzzi [1]. Przedstawił on plamkę jako obszar dna oka o żółtawym zabarwieniu z centralnym zagłębieniem, zlokalizowany skroniowo od tarczy nerwu wzrokowego. Dzisiaj wiadomo, iż żółta barwa plamki pochodzi od ksantofilu – pigmentu zawierającego karotenoidy, takie jak: luteina, zeaksantyna i mezozeaksantyna, o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, dlatego też w starej anatomicznej nomenklaturze ten obszar siatkówki nazywano „plamką żółtą” (łac. *macula lutea*) [2].

Plamka to obszar siatkówki o największej rozdzielczości widzenia. Jej prawidłowa budowa oraz funkcjonowanie decydują o najważniejszych czynnościach oka ludzkiego, jakimi są: ostrość widzenia, rozpoznawanie kształtów, widzenie barwne oraz poczucie kontrastu [3].

Anatomiczne punkty orientacyjne plamki to dołek, dołeczek, pępek oraz dołkowa strefa beznaczyniowa [4, 5]. Dołek środkowy jest centralnie położonym zagłębieniem plamki i ma średnicę około 1,5 mm. W centrum dołka znajduje się zagłębienie o średnicy około 0,35 mm. Jego centrum to małe dodatkowe zagłębienie (pępek – *umbo*), widoczne podczas oglądania dna oka jako refleks z dołeczka (ryc. 1). Wraz z wiekiem staje się on fizjologicznie coraz mniej wyraźny, aż zanika całkowicie, natomiast u osób młodych utrata tego refleksu lub jego „rozmycie” może być pierwszym objawem uszkodzenia plamki. Warto zaznaczyć, że zagłębienie centralne w dołku jest strukturą, która ewolucyjnie rozwinęła się dopiero u naczelnych. Centralny obszar dołka zajmuje strefa awaskularna, zaopatrywana wyłącznie z naczyń włosowatych naczyniówki. Jest to tzw. dołkowa strefa beznaczyniowa (*foveal avascular zone* – FAZ) o średnicy od 250 do 600 μm , która stanowi istotny punkt orientacyjny w leczeniu fotokoagulacją laserową niektórych patologii plamki [4].

Architektura plamki różni się istotnie od budowy siatkówki w obwodowych częściach dna oka. W budowie histologicznej siatkówki wyróżnia się 10 warstw: nabłonek barwnikowy (*retinal pigmental epithelium* – RPE), komórki fotoreceptorowe (czopki



Ryc. 1. Budowa plamki – obraz wziernikowy oraz przekrój histologiczny (1 – dołeczek, 2 – strefa beznacyniowa, 3 – dołek)

i pręciki), błonę graniczną zewnętrzną, warstwę jądrazą zewnętrzną, warstwę splotowatą zewnętrzną, warstwę jądrazą wewnętrzną, warstwę splotowatą wewnętrzną, warstwę komórek zwojowych, warstwę włókien nerwowych, błonę graniczną wewnętrzną, przy czym w centralnej części plamki, tj. w dołeczku, nie występują cztery warstwy wewnętrzne siatkówki [4, 5]. Mimo małej powierzchni, jaką stanowi dołeczek, ciasno upakowane czopki zapewniają „wysoką rozdzielczość” percepcyjną siatkówki. Dołeczek stanowi zatem najcieńszą warstwę siatkówki i zarazem jest miejscem występowania największego zagęszczenia czopków (140 000–300 000/mm², gdzie na 1 komórkę RPE przypada 30 czopków, przy czym w samym dołeczku 1 komórka RPE zaopatruje 1 komórkę czopkową). Czopki są tutaj wydłużone, a ich zewnętrzne segmenty są ustawione równoległe do osi widzenia i prostopadle do powierzchni nabłonka barwnikowego. W dołeczku komórki RPE są wyższe, cieńsze i zawierają więcej melanosomów niż w innych obszarach dna oka. Neurony drogi wzrokowej są w nim rozsunięte na bok, dzięki czemu jest on przezierny optycznie, a bodźce świetlne w tym miejscu najskuteczniej pobudzają fotoreceptory – czopki. Część dołeczkowa obszaru plamki należy do miejsc awaskularnych (FAZ) [4, 5]. Naczynia krwionośne zaopatrujące siatkówkę, a będące odgałęzieniami tętnicy środkowej siatkówki, w tym obszarze dna oka nie występują [6]. Do plamki, będącej miejscem o szybkim tempie przemian metabolicznych i najwyższym w organizmie wskaźniku zużycia tlenu, składniki odżywcze i tlen są dostarczane przez naczynia naczyniówki (choriokapilary), które oddzielone są od siatkówki kolage-

nowo-elastynową błoną Brucha. Zabezpiecza ona jednocześnie fotoreceptory i związane z nimi czynnościowo komórki RPE przed niepożądanym wtargnięciem choriokapilarów w ich obszar, jednocześnie umożliwiając dwukierunkowy transport substancji odżywczych i produktów przemiany materii [6].

1.2. Epidemiologia i etiologia zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (*age-related macular degeneration* – AMD) zostało po raz pierwszy opisane przez Hutchinsona i Taya ponad 100 lat temu [7]. W ostatnich latach AMD stało się poważnym problemem społecznym – jest najważniejszą przyczyną utraty widzenia centralnego u osób powyżej 50. roku życia w krajach wysoko rozwiniętych [8–10]. Częstość występowania AMD wzrasta z wiekiem; wyniki badań przeprowadzonych przez Beaver Dam Eye Study wykazały występowanie AMD u 14,4% populacji pomiędzy 55. a 64. rokiem życia, u 19,4% pomiędzy 65. a 74. rokiem życia i u 36,8% powyżej 75 roku życia [11]. Nieznacznie niższą częstość występowania AMD odnotowano w badaniu Framingham, w którym liczba przypadków AMD w grupie wiekowej 52–64 lata wynosiła 1,5%, a następnie wzrosła do 20% w populacji powyżej 75. roku życia [12]. W badaniu Netherlands Rotterdam Eye Study wykazano, iż liczba przypadków AMD wynosi 11% w populacji powyżej 85. roku życia [13]. Obecnie szacuje się, iż na świecie jest od 40 do 50 milionów ludzi chorujących na AMD; w Polsce liczba ta sięga 1,2–1,5 miliona [14]. W naszym kraju rocznie na AMD zapada ponad 100 tysięcy osób, z czego na postać wysiękową około 10–15 tysięcy [14]. Dane statystyczne pokazują wzrastającą tendencję zachorowań na AMD. W 2020 roku około 7,5 miliona osób powyżej 50. roku życia może stracić wzrok z powodu tego schorzenia [15, 16]. Wśród osób rasy białej AMD jest przyczyną około 54% wszystkich przypadków ślepoty. Z tego też powodu AMD coraz częściej określa się mianem „epidemii XXI wieku” lub „epidemii ślepoty” [14, 17, 18].

Najistotniejszymi czynnikami ryzyka rozwoju AMD są: wiek, płeć, rasa biała oraz palenie tytoniu [7–12, 18–21]. Wiek jest niepodważalnie najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju i progresji choroby, dlatego też przyjęto nazywać to schorzenie „zwyrodnieniem plamki związanym z wiekiem” (dawniej „starcze zwyrodnienie plamki”). Kobiety częściej niż mężczyźni chorują na AMD, co ma prawdopodobnie związek z ich większą średnią długością życia [18]. Wśród osób rasy białej choroba ta występuje częściej niż u osób rasy żółtej czy czarnej, które choroba ta atakuje najrzadziej. Palacze tytoniu zapadają na wysiękową postać AMD 4,5–6,6-krotnie częściej, a na postać suchą 2,5-krotnie częściej niż osoby niepalące. Uważa się, że u byłych palaczy wartości te zmniejszają się o połowę [19–21]. Istnieją także doniesienia, które dowodzą, iż zaprzestanie palenia papierosów nie zmniejsza w istotny sposób ryzyka zachorowania na AMD [21–23].

Do potencjalnych czynników ryzyka rozwoju AMD należą również: pozytywny wywiad rodzinny, wysoki poziom cholesterolu, nadciśnienie tętnicze, choroby układu sercowo-naczyniowego, cukrzyca [13, 18, 22, 24, 25]. Ostatnie doniesienia dowiodły, że rozwój AMD może poprzedzać wystąpienie groźnych incydentów naczyniowych [24].

Wykazano, że zaawansowana postać AMD 10-krotnie zwiększa ryzyko zgonu z powodu udaru mózgu oraz 5-krotnie podwyższa śmiertelność związaną z chorobą niedokrwinną serca w porównaniu z chorymi bez zmian zwyrodnieniowych w plamce [24]. U kobiet w okresie menopauzy, stosujących estrogeny, rzadziej dochodzi do rozwoju wysiękowej postaci AMD w porównaniu z nieprzyjmującymi suplementacji hormonalnej, co może sugerować ochronny wpływ estrogenów na rozwój neowaskularyzacji naczyńkowej (CNV) [25, 26]. Uważa się, iż przewlekłe narażenie na działanie promieniowania słonecznego oraz dieta uboga w przeciwutleniacze i luteinę sprzyjają rozwojowi zmian zwyrodnieniowych w plamce [27, 28].

Wśród czynników ryzyka AMD wyróżnia się także predyspozycje miejscowe, takie jak: obecność miękkich druz i zmian barwnikowych w plamce, CNV w jednym oku, nadwzroczność, niebieski kolor tęczówek [8, 10, 13, 16]. W ciągu 5 lat u 40% chorych z wysiękową postacią AMD w jednym oku dochodzi do rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce oka towarzyszącego [29]. Przedstawiono także negatywny wpływ operacji zaćmy na powstanie i progresję zmian zwyrodnieniowych w plamce. Zwiększone ryzyko wysiękowej postaci AMD po operacji zaćmy po raz pierwszy opisał w 1994 roku van der Schaft i wsp. [30]. Rozwijająca się z wiekiem zaćma działa jak filtr i zmniejsza ryzyko wystąpienia ubocznych skutków promieniowania działającego na siatkówkę, a jej usunięcie poprzez poprawę penetracji promieniowania zwiększa ryzyko rozwoju AMD [31]. Ponadto, oko z początkowym AMD może być bardziej podatne na uraz operacyjny ze względu na istnienie związanych ze zwyrodnieniem nieprawidłowości w błonie Brucha, a wystąpienie odczynu zapalnego w okresie pooperacyjnym może stanowić dodatkowy czynnik angiogenezy [32]. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, które nie potwierdziły jednak istnienia zależności pomiędzy progresją AMD a operacją zaćmy, co może być wynikiem objęcia badaniami bardziej jednorodnej grupy pacjentów, operowanych wyłącznie techniką fakoemulsyfikacji z niepowikłaną dotorebkową implantacją sztucznej soczewki wewnątrzgałkowej [33–35]. Zabieg wykonany z małego cięcia jest mniej traumatyczny i wzbudza mniejszą odpowiedź zapalną w oku niż zewnątrztorbkowe usunięcie zaćmy [34, 35].

1.3. Współczesne poglądy na patogenezę zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Patogeneza AMD obejmuje złożone interakcje czynników metabolicznych, funkcjonalnych, genetycznych, środowiskowych i pomimo prowadzonych na szeroką skalę badań klinicznych oraz doświadczalnych pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Wiadomo, że zmiany w tej chorobie zachodzą w obrębie kompleksu anatomiczno-czynnościowego, składającego się z fotoreceptorów, komórek RPE, błony Brucha i choriokapilar [16, 36]. Wzajemne oddziaływanie wszystkich tych struktur zapewnia prawidłowe funkcjonowanie siatkówki, a w szczególności jej najczulszego i najważniejszego miejsca, jakim jest plamka. Do rozwoju choroby przyczyniają się cztery powiązane z sobą procesy pojawiające się w tym kompleksie: lipofuscynogeneza, druzogeneza, lokalny proces zapalny i neowaskularyzacja [16, 17, 36, 37]. Zachodzący w fagolizosomach

komórek RPE proces enzymatycznej degradacji złuszczonego fragmentów fotoreceptorów ulega z wiekiem spowolnieniu, a „niestrawiony” materiał zostaje skumulowany w postaci złogów lipofuscyny [16, 17, 36–38]. Obok toczącego się w komórkach RPE procesu lipofuscynogenezy, pomiędzy warstwą komórek RPE a błoną Brucha odkładają się nierozpuszczalne depozyty – druzdy, które inicjują lokalny, przewlekły proces zapalny i aktywują układ immunologiczny. Mobilizacja układu immunologicznego wiąże się z napływem, kumulacją i aktywacją komórek zapalnych w rejonie podsiatkówkowym. Niektóre z tych komórek, zwłaszcza makrofagi, mogą produkować czynniki proangiogenne, w tym czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), co może prowadzić do zachwiania równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi na korzyść tych pierwszych, tworząc sytuację sprzyjającą nowotworzeniu naczyń [39–42].

1.3.1. Pierwotna dysfunkcja komórek nabłonka barwnikowego siatkówki

Najstarsza teoria rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce zakłada, iż głównym komórkowym substratem patologii AMD jest komórka RPE. W starzejącym się organizmie te nieodnawiające się podczas życia człowieka komórki stanowią przysłowiową „piętę Achillesową” narządu wzroku, gdyż jako pierwsze stają się z wiekiem mniej wydolne i pierwsze ulegają degeneracji, co z kolei prowadzi do zaburzeń czynnościowych i strukturalnych fotoreceptorów [43–45]. Komórki RPE pełnią wiele funkcji niezbędnych do życia i aktywności czopków i pręcików; m.in. fagocytują szczytowe fragmenty POS, które są nieustannie złuszczone w procesie widzenia. W pochłanianym materiale pochodzącym z POS znajdują się zmodyfikowane, utlenione formy wielu związków lipidowych i białek, które znacznie trudniej podlegają enzymatycznej inaktywacji i metabolizmowi i odkładają się w lizosomach w postaci ziaren lipofuscyny, która jest markerem starzenia się komórki [36, 37, 46]. Najgroźniejszymi z punktu widzenia etiopatogenezy AMD składnikami lipofuscyny są fosfolipidy i różnego rodzaju retinoidy, które w wyniku utleniania tworzą kompleksy o dużej cytotoxyczności. Takim związkiem jest na przykład bis-retinoid pirymidoniowy (A2E), który charakteryzuje się dużą fotoreaktywnością i cytotoxycznością, co z całą pewnością nie pozostaje bez wpływu na funkcjonowanie komórek RPE i komórek fotoreceptorowych [17, 47–49].

1.3.2. Rola stresu oksydacyjnego

Z wiekiem dochodzi do nadmiernej produkcji wolnych rodników tlenu przy jednoczesnym osłabieniu układu antyoksydacyjnego [50–52]. Biorąc pod uwagę fakt, że AMD jest schorzeniem zależnym od wieku i występuje w populacji ludzi starszych, należy rozpatrywać w jego patomechanizmie również udział stresu oksydacyjnego. Powstające w komórkach RPE reaktywne formy tlenu dają początek następnym rodnikom, co może prowadzić do dysfunkcji, a w dalszej konsekwencji do degeneracji i/lub atrofii komórek [50, 53, 54]. Siatkówka, a w szczególności jej okolica plamkowa, stanowi niezwykle dogodny miejsce do powstawania reaktywnych form tlenu. Przyczyniają się do tego następujące czynniki: intensywny metabolizm, który wymaga dużej ilości tlenu, działanie promieniowania zwłaszcza z pogranicza koloru niebieskiego i bliskiego nadfioletu, obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórek fotoreceptorowych, podatnych na działanie reaktywnych form tlenu, odkładanie się zło-

gów nie do końca „strawionego”, nierozpuszczalnego materiału w postaci lipofuscyny, przyczyniającego się do nasilania stresu oksydacyjnego oraz naturalnie występujące chromofory, czyli fotouwrażliwiacze: rodopsyna i melanina [17, 28, 29, 52, 55, 56].

1.3.3. Udział czynników genetycznych

W ostatniej dekadzie zidentyfikowano wiele genów, których mutacje mogą być odpowiedzialne za rozwój AMD [16, 43, 44, 57–60]. Ocena korelacji polimorfizmu tych genów z występowaniem AMD wskazała na istnienie takiej zależności, przy czym jednoczesne występowanie kilku mutacji zwiększa ten wskaźnik, jednak nie na tyle, aby wysunąć tezę, że u osoby genetycznie predysponowanej rozwinie się choroba [57, 59]. W związku z powyższym oprócz predyspozycji genetycznej muszą współuczestniczyć dodatkowe czynniki przyczyniające się do rozwoju AMD. Uważa się, że geny w sposób niezależny od siebie bądź też wzajemnie na siebie oddziałując, są odpowiedzialne za pojawienie się podatności organizmu na czynniki środowiskowe. Mnogość czynników genetycznych i środowiskowych oraz liczne, skomplikowane interakcje zachodzące między nimi odpowiadają za znaczną heterogenność obrazu klinicznego i procesów patologicznych w przebiegu AMD [43, 44, 59, 61]. Zidentyfikowano i dokonano analizy kilkudziesięciu genów, których polimorfizm w różny sposób może przyczynić się do rozwoju AMD. Wśród nich najsilniejszy związek z AMD wykazały geny kodujące białka układu dopełniacza, takie jak: gen kodujący czynnik H (*complement factor H* – CFH), geny kodujące białka dopełniacza – czynnik B i C2 oraz gen kodujący konwertazę C3 [62–65]. W tej grupie gen kodujący CFH wydaje się najważniejszy z punktu widzenia patogenezy AMD. Jego polimorfizm Y402H, skutkujący nadreaktywnością drogi alternatywnej dopełniacza, prowadzi do niszczenia własnych komórek, w tym m.in. komórek RPE, występuje u około 50% chorych na AMD [62]. W badaniach epidemiologicznych udowodniono, że wystąpienie tej mutacji zwiększa ryzyko rozwoju AMD 2–4-krotnie u heterozygot oraz 3–5-krotnie u homozygot [66]. Udowodniono także, że pacjenci będący homozygotycznymi nosicielami zmutowanego genu CFH gorzej odpowiadają na leczenie bewacizumabem [67]. Najnowsze badania wykazują ponadto istotną zależność między genem *SERPING1* (*serpin peptidase inhibitor, clade G*), odpowiedzialnym za ekspresję inhibitora czynnika C1, a AMD [68].

Do innych genów, których związek z AMD wydaje się przekonujący, należą: *ARMS2* (*age-related maculopathy susceptibility-2*), *HTRA1* (*high temperature required factor A-1*), *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), *ACE* (*angiotensin converting enzyme*), *ApoE* (*apolipoprotein E*), *SOD2* (*superoxide dismutase 2*), *PON* (*paraoxonase*), *ABCA4* (*ATP-binding cassette subfamily A, member 4*) oraz *CX3CR1* (*chemokine CX3C*), przy czym te dwa ostatnie mają głównie związek nie z wysiękową, lecz z suchą postacią AMD. Istnieje także wiele innych genów „oczekujących” na potwierdzenie swojego udziału w rozwoju AMD [69, 70] (tab. I).

Za udziałem czynników genetycznych w AMD przemawia fakt, iż u około 20% chorych na AMD występuje dodatni wywiad rodzinny, a w badaniach bliźniąt wykazano cechy kliniczne AMD u 100% bliźniąt monozygotycznych i u 25% bliźniąt dizygotycznych [70, 71]. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa dziedziczność AMD może sięgać nawet 75% [60, 72–74].

Tabela I

Geny o potwierdzonym związku z AMD

Nazwa genu	Lokalizacja genu	Funkcja genu	Efekt mutacji genu
CFH	1q	Koduje czynnik H układu dopełniacza	Nadmierna aktywacja drogi alternatywnej układu dopełniacza
BF/C2	6p	Koduje składowe dopełniacza: białko B i C2	Nadmierna aktywacja drogi alternatywnej układu dopełniacza
C3	19p	Koduje konwertazę C3, która prowadzi do rozszczepienia C3 na C3a i C3b. Białko C3b współtworzy konwertazę C5, katalizującą rozpad C5 na C5a i C5b, który inicjuje kaskadową reakcję tworzenia kompleksu atakującego błonę (<i>membrane attack complex</i> – MAC)	Zwiększa ryzyko wystąpienia AMD
SERPING1	11q	Koduje białko inhibitorowe czynnika C1	Nadmierna aktywacja klasycznej drogi układu dopełniacza
ARMS2 (LOC 387715)	10q	Koduje białko znajdujące się w elipsoidalnym regionie fotoreceptorów zawierającym najwięcej mitochondriów	Zwiększa ryzyko wystąpienia AMD
HTRA1	10q	Koduje białko należące do rodziny proteaz serynowych szoku cieplnego	Inicjuje proces neowaskularyzacji poprzez nasilenie degradacji komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej
VEGF	6p	Koduje czynnik wzrostu śródbłonna naczyń	Inicjuje i podtrzymuje rozwój CNV
ACE	17q	Koduje enzym konwertujący angiotensynę I do angiotensyny II, ma związek z procesem patologicznej neowaskularyzacji w przebiegu retinopatii cukrzycowej	Rola do końca niewyjaśniona; polimorfizm tego genu prawdopodobnie pełni funkcję ochronną w przebiegu AMD
ApoE	19q	Koduje białko regulujące poziom cholesterolu w surowicy, stanowi stały element druz	Obecność allela ε2 ma związek z większym ryzykiem wystąpienia AMD
PON	7q	Koduje glikoproteinę regulującą metabolizm lipidów oraz ma działanie protekcyjne wobec lipoproteiny LDL w czasie stresu oksydacyjnego	Nadreaktywność enzymu wpływa na występowanie AMD w populacji japońskiej
SOD2	6q	Koduje dysmutazę ponadtlenkową, enzym o właściwościach antyoksydacyjnych	Wzrost aktywności enzymu paradoksalnie nasila stres oksydacyjny prowadząc do rozwoju AMD
ABCA4	1p	Koduje glikoproteinę RmP, która stanowi integralną część błony zlokalizowanej wzdłuż brzeżnych partii dysków POS. Pełni w oku rolę ochronną, zapobiegając odkładaniu się lipofuscyny	Warunkuje dziedziczną autosomalnie recesywnie chorobę Stargardta, którą cechuje patologiczne gromadzenie lipofuscyny w RPE

Nazwa genu	Lokalizacja genu	Funkcja genu	Effekt mutacji genu
CX3CR1	3q	Koduje zlokalizowane na powierzchni makrofagów białko receptorowe dla chemokin, które regulują migrację komórek do różnych przedziałów uszkodzonych tkanek	Zmniejsza zdolność do chemotaksji, co prowadzi do zmniejszenia fagocytozy lipofuscyny i sprzyja tworzeniu się druz w plamce
IL-6	7p	Koduje interleukinę 6	Wysokie stężenie IL-6 wiąże się z progresją AMD
CRP	1q	Koduje białko C-reaktywne	Wysokie stężenie białka wiąże się z progresją AMD

1.3.4. Udział mechanizmów naczyniowych

W latach osiemdziesiątych XX wieku Friedman i wsp. przedstawili koncepcję, iż rozwój AMD jest wynikiem zaburzeń hemodynamicznych, których przyczyną jest wzrost sztywności naczyń naczyniówki [75] (ryc. 2). Zaobserwowali oni także wzrost oporu naczyniowego w krążeniu mózgowym u chorych na AMD. W oparciu o wyniki kolorowej ultrasonografii dopplerowskiej wykazali, iż w przypadku gdy opór w naczyniach naczyniówki jest większy niż w krążeniu mózgowym, dochodzi do zmniejszenia przepływu naczyniówkowego i wzrostu gradientu osmotycznego, który przewyższa zdolności kompensacyjne komórek RPE, co prowadzi do kumulacji produktów przemiany materii w postaci druz i/lub zaników RPE i choriokapilar. Natomiast gdy opór naczyniówkowy wzrasta w mniejszym stopniu niż opór w naczyniach ośrodkowego układu nerwowego, obserwuje się większe ciśnienie perfuzji, które prowadzi do surowiczego odwarstwienia RPE i promuje rozwój CNV (ryc. 3).

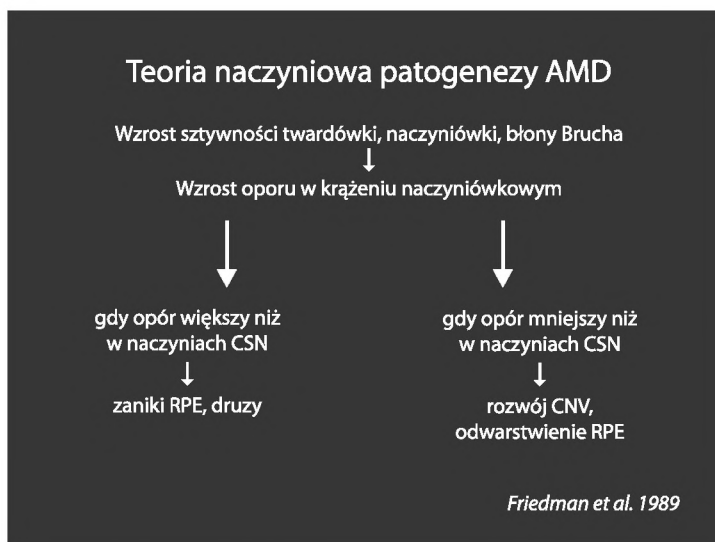
Przeprowadzone w późniejszych latach badania kliniczne potwierdziły istnienie zaburzeń hemodynamicznych w oczach chorych na AMD [76, 77]. W angiografii fluoresceinowej stwierdzono wydłużenie czasu wypełniania łożyska naczyń naczyniówki oraz naczyń tętniczych siatkówki [78–82]. Ross i wsp. w angiografii indocyjaninowej wykazali częstsze występowanie obszarów opóźnionego wypełniania naczyniówkowego działu wodnego plamki (*presumed macular watershed filling* – PMWF), który charakteryzował się wczesną hipofluorescencją odpowiadającą hipoperfuzji [83]. Obszar ten występował w 59% oczu chorych na CNV; dla porównania w grupie kontrolnej stwierdzono go tylko w 15% przypadków. Z kolei Grunwald i wsp. w badaniu dopplerowskim stwierdzili istnienie zależności pomiędzy nasileniem objawów AMD a zmniejszeniem prędkości, objętości i przepływu krwi w okolicy dołka [84].

1.3.5. Rola zapalenia i układu immunologicznego

W 2001 roku Hageman i wsp. wysunęli hipotezę o udziale zapalenia w biogenezie druz – pierwszego widocznego na dnie oka objawu AMD [85]. Odkrycie to stanowiło prawdziwy przełom i rzuciło zupełnie nowe, nieznane dotąd spojrzenie na etiopatogenezę tego schorzenia, w której decydującą rolę zaczął odgrywać układ immunologiczny.



Ryc. 2. Teoria naczyniowa patogenezy AMD



Ryc. 3. Teoria naczyniowa patogenezy AMD

Obecnie uważa się, iż kluczową i nadrzędną rolę w inicjowaniu patologicznej reakcji zapalnej w przebiegu AMD pełni układ dopełniacza, stanowiący istotny element wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [39, 86–92]. Pobudzenie układu dopełniacza, który obejmuje grupę około 30 białek, może przebiegać trzema drogami – klasyczną, lektynową

oraz alternatywną, przy czym sugeruje się, że droga alternatywna stanowi potencjalny czynnik rozwoju AMD [39, 86–90]. Wszystkie drogi aktywacji układu dopełniacza prowadzą do powstania konwertazy białka C3, które inicjuje kaskadową reakcję tworzenia kompleksu atakującego błonę komórkową (*membrane attack complex* –MAC) [45, 93]. Ostateczny efekt aktywacji układu dopełniacza to liza komórki, mobilizacja komórek zapalnych oraz wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych.

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały obecność w komórkach RPE oraz w naczyniówce myszy kompleksów zawierających składową dopełniacza C5 oraz immunoglobulinę IgG, które również znajdowano w oczach ludzi chorujących na AMD [94–97]. Badania histopatologiczne gałek ocznych chorych na AMD oraz analiza biochemiczna i histochemiczna składu druz wykazały występowanie w nich wielu elementów układu immunologicznego, takich jak: białek układu dopełniacza C3a, C5a, pełniących rolę anafilatoksyn o silnym działaniu prozapalnym, czynnika CFH, cząsteczki zgodności tkankowej MHC klasy II, MAC, immunoglobulin podklasy G. Ponadto wykazano występowanie witronektyny i apolipoproteiny E, które odgrywają ważną rolę jako mediatory odpowiedzi zapalnej [97–99]. Wśród białek budujących druzy zidentyfikowano fibronektynę, integryny, protrombinę, alfa-1-antytrypsynę, amyloid P, z których te dwa ostatnie są białkami fazy ostrej [86, 99]. Druzy zatem stanowią efekt miejscowego pobudzenia reakcji zapalnej w odpowiedzi na pojawiające się z wiekiem uszkodzenie komórek RPE [86, 95, 98, 99]. Wyniki badań doświadczalnych wykazały także kluczowe znaczenie układu dopełniacza w progresji zmian zwyrodnieniowych i w rozwoju CNV, objawu charakterystycznego dla wysiękowej postaci AMD. Aktywacja kaskady dopełniacza pobudza bowiem wydzielanie wielu czynników o właściwościach proangiogennych, tj. VEGF, bFGF i TGF- β 2 [100].

Pomimo zaangażowania w patogenezę AMD mechanizmów zapalnych z całą pewnością AMD nie jest klasyczną chorobą zapalną, jak np. zapalenie tęczówki lub naczyniówki oka. Proces zapalny, toczący się w AMD, „tli” się, mechanizmy obronne ulegają mobilizacji, lecz nie na tyle, aby skutecznie stawić czoła rodzącej się patologii na poziomie kompleksu fotoreceptory–RPE–błona Brucha–choriokapilary [39, 45]. Tego typu przewlekły stan zapalny określa się terminem parazapalenia (*para-inflammation*), które pojawia się jako odpowiedź tkanki na przewlekłe działanie czynników szkodliwych, na przykład stres oksydacyjny, lub jest inicjowane przez same zaburzenia czynnościowe komórek [101–103]. Jest to tkankowa odpowiedź adaptacyjna, mająca na celu utrzymanie tkankowej homeostazy. W przypadku jednak przewlekłego działania bodźców stresowych i nasilającej się dysfunkcji komórek przybiera ono bardziej intensywną formę i prowadzi do dalszej utraty funkcji i uszkodzenia komórek, ich degeneracji i w końcu śmierci [101].

Za udziałem zapalenia i reakcji immunologicznych w patogenezie AMD przemawiają także wyniki badań genetycznych, wspomniany już wcześniej polimorfizm genów kodujących białka CFH, CFB/C2 i C3 oraz SERPING1, promujących rozwój AMD i wskazujących na aktywację układu dopełniacza [39, 45, 64–68]. Zmiana struktury genu prowadzi do zmiany ekspresji białka, co z kolei skutkuje zaburzeniem jego struktury i funkcji, prowadząc do nadmiernej aktywacji układu immunologicznego [104, 105]. Podobnie, histopatologiczna ocena chirurgicznie usuniętych poddołkowych błon neowaskularnych wykazała w nich obecność licznych komórek zapalnych: makrofagów, komórek tucznych, limfocytów [106, 107]. Stwierdzono również, iż ekspresja VEGF,

głównej cytokiny zaangażowanej w proces angiogenezy, jest proporcjonalna do liczby komórek zapalnych obecnych w kompleksie CNV [107].

1.3.6. Rola zakażenia *Chlamydia pneumoniae*

W świetle opublikowanych w ostatnim czasie badań nie można wykluczyć przebiegu zakażenia *Chlamydia pneumoniae* jako czynnika uruchamiającego lokalne mechanizmy układu odpornościowego w postaci jego pierwszej linii obrony, tj. układu dopełniacza, co może być jedną z przyczyn rozwoju trzech chorób związanych z wiekiem: miażdżycy, choroby Alzheimera oraz AMD [108–112]. Przeciwciała przeciwko *Chlamydia pneumoniae* występują u 50–80% populacji dorosłych na świecie [113–115]. Kalayoglu i wsp. oraz Robman i wsp. wykazali, że obecność w surowicy przeciwciał przeciwko *Chlamydia pneumoniae* koreluje ze zwiększonym ryzykiem rozwoju i progresji AMD [110, 111]. Badania immunohistochemiczne oraz badanie reakcji łańcuchowej polimerazy PCR przeprowadzone u chorych na AMD potwierdziły obecność *Chlamydia pneumoniae* w 4 z 9 fragmentów usuniętych chirurgicznie podsiatkówkowych błon neowaskularnych. Dla porównania w błonach niezwiązanych z AMD w żadnym przypadku nie stwierdzono obecności tego mikroorganizmu [116]. Kilka publikacji nie wykazało jednak istnienia zależności pomiędzy zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* a rozwojem AMD [117–119]. Potwierdzenie udziału tego drobnoustroju w patogenezie AMD wymaga zatem dalszych badań.

1.4. Patofizjologia wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Nie wiadomo, dlaczego u części chorych na AMD obserwuje się rozwój wysiękowej postaci tego schorzenia, związanej z CNV. Istnieją poglądy sugerujące, że CNV jest powikłaniem suchej postaci AMD [120–122]. Oznacza to, iż aby doszło do rozwoju CNV, muszą zaistnieć odpowiednie warunki, a takie właśnie powstają w przebiegu postaci suchej AMD. Najsilniejszym znanym stymulatorem angiogenezy jest hipoksja [38, 39, 123]. W warunkach niedotlenienia w komórkach dochodzi do ekspresji czynników proangiogennych, które inicjują i podtrzymują rozwój procesu neowaskularyzacji, a więc nowotworzenia naczyń na bazie już istniejących naczyń krwionośnych [38, 42]. Neowaskularyzacja jest objawem homeostazy warunkującej utrzymanie się przy życiu niedotlenionej tkanki. Chociaż hipoksja jest głównym motorem neowaskularyzacji, to do ekspresji czynników proangiogennych dochodzi w przebiegu rozwijającego się pod jej wpływem przewlekłego zapalenia i mobilizacji komórek uczestniczących w procesie zapalnym, zdolnych do produkcji tych czynników [87–89, 121]. Uważa się, iż hipoksja i tworzące się w jej wyniku związki immunogenne obecne w ziarnach lipofuscyny, materiale druzowym oraz we krwi, indukują reakcję immunologiczną i stają się celem ataku dopełniacza, prowadząc następnie do niszczenia plamkowego obszaru obejmującego fotoreceptory, RPE, błonę Brucha i choriokapilary [36, 122]. Klinicznym skutkiem takiego „ataku” są objawy leżące u podstaw rozpoznania zanikowej postaci AMD. W przypadku gdy komórki biorące udział w tłącym się procesie zapalnym podejmą produkcję proan-

giogennych czynników lub gdy miejscowe czynniki antyangiogenne nie będą w stanie zrównoważyć lokalnej aktywności proangiogennej, dołącza się neowaskularyzacja, która stanowi podstawę rozpoznania wysiękowej postaci AMD [85–87, 90, 123, 124].

Główną rolę w procesie neowaskularyzacji w oku człowieka odgrywa komórka RPE, posiadająca zdolność produkcji czynników zarówno pro-, jak i antyangiogennych [38, 40, 41, 125–128]. W warunkach fizjologicznych zostaje utrzymana dynamiczna równowaga pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi, z których największy potencjał wykazuje VEGF oraz czynnik wywodzący się z komórek nabłonka barwnikowego (PEDF) [41]. W wyniku nasilającego się miejscowego niedotlenienia tkanek, postępującej degeneracji komórek RPE i aktywnej reakcji immunologicznej oraz przewlekłego procesu zapalnego ryzyko rozchwiania równowagi pro- i antyangiogennej wzrasta. Nie jest znany dokładny patomechanizm, który leży u podstaw patologicznej angiogenezy. Proces neowaskularyzacji może zostać zainicjowany poprzez wzrost aktywności proangiogennej, wyrażonej wzrostem produkcji VEGF albo obniżeniem aktywności antyangiogennej, związanej na przykład z obniżeniem ekspresji PEDF [38, 40, 41, 125]. Wiadome jest, że ważnym czynnikiem nasilającym angiogenezę jest niedotlenienie, które indukuje wytwarzanie czynnika indukowanego hipoksją (HIF) – silnego induktora VEGF [125, 126]. Komórki RPE produkują białko odpowiedzialne za migrację i gromadzenie się monocytów (*monocyte chemotactic protein* – MCP) oraz interleukinę 8 (IL-8). Monocyty (makrofagi) migrują od choriokapilar wzdłuż zewnętrznej warstwy błony Brucha i gromadzą się wokół miejsc naczyniowego wzrostu, uczestnicząc w tworzeniu uszkodzeń błony Brucha przez produkcję kolagenazy i elastazy [69]. Makrofagi te są również odpowiedzialne za ekspresję czynnika martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor α* – TNF α), który stymuluje produkcję przez komórki RPE wspomnianych już wcześniej MCP, IL-8, VEGF oraz integryn α -3 i α -5 [129, 130]. Te ostatnie poprzez kinazę tyrozyny przekazują sygnał do migracji komórek. Wynikiem działania czynników proangiogennych, a w szczególności VEGF, jest proliferacja komórek śródbłonka choriokapilar i patologiczna angiogeneza. Poprzez drobne uszkodzenia w elastynowo-kolagenowej błonie Brucha „pączkujące”, nowe, niepełnowartościowe naczynia krwionośne przenikają do przestrzeni pod RPE, a następnie pod neurosensoryczną siatkówkę i dochodzi do rozwoju CNV [38, 40, 41, 69, 125, 126, 130]. Te patologiczne naczynia krwionośne prowadzą do powstania krwotocznego lub surowiczego odwarstwienia nabłonka barwnikowego (*pigment epithelium detachment* – PED), krwawień i wysięków podsiatkówkowych, śródsiatkówkowych, co wywołuje zaburzenia widzenia centralnego. Chociaż wiele obserwacji wskazuje na istotny udział VEGF w tworzeniu CNV, to wyniki ostatnich badań sugerują, iż w postaci wysiękowej AMD może także dochodzić do rozwoju CNV niezależnie od VEGF. Nowotworzenie naczyń w przestrzeni podsiatkówkowej może być dodatkowo indukowane przez powstające w kompleksie komórkowym RPE–fortoreceptory addukty, zawierające białko i 2-(ω -karboksyetyl) pirol (CEP) – produkt peroksydacji kwasu dokozaheksaenowego [131–133]. Addukty białko–CEP są wysoce immunogenne i mogą indukować reakcję immunologiczną obejmującą CNV [132, 133].

Zasadniczą rolę w powiększaniu się rozmiarów CNV odgrywają produkowane przez komórki śródbłonka i makrofagi metaloproteinazy macierzy mitochondrialnej (*matrix metalloproteinases* – MMPs), które umożliwiają przenikanie CNV przez tkanki [135, 136]. Podczas aktywnej fazy angiogenezy wzrasta także działanie angiopoetyny i jej receptorów (Tie 1 i Tie 2), czynników wzrostu fibroblastów (aFGF i bFGF) wydziela-

nych przez komórki RPE i śródbłonek naczyń [136, 137]. Dochodzi także do transformacji czynnika wzrostu β (TGF- β), który odpowiada za zahamowanie rozwoju CNV [138]. Tak więc proces angiogenezy to nieustanna „walka” pomiędzy dwiema „drużynami czynników” pro- i antyangiogennych, a wygrana jednej z nich decyduje o dalszym losie CNV. Przewaga czynników proangiogennych wpływa na dalszy rozwój CNV, a czynników antyangiogennych prowadzi do osłabienia aktywności procesu zapalnego i bliznowacenia CNV.

1.5. Objawy kliniczne i diagnostyka zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Pierwsze objawy AMD są nieswoiste i często niezauważalne przez chorego, zwłaszcza gdy proces chorobowy dotyczy początkowo jednego oka. Wiele osób nie dostrzega u siebie wczesnych, niewielkich zaburzeń widzenia, szczególnie gdy patrzy obustronnie. Jest to wynikiem tłumienia przez mózg objawów pojawiających się w gorzej widzącym oku. Chory może być zatem nieświadomy istniejącego problemu, aż do momentu gdy zmiany chorobowe pojawią się w drugim oku [139–141]. Wczesnymi objawami AMD są: pogorszenie ostrości wzroku – zwykle w pierwszej kolejności pogarsza się widzenie z bliska, a następnie w dal, występowanie metamorfopsji, obniżenie poczucia kontrastu, zaburzenie widzenia barw, a w bardziej zaawansowanej postaci pojawienie się mroczków w centralnym polu widzenia [1, 69, 70, 139–141]. Chorzy często podają zmienność widzenia, nawet w ciągu dnia. Niezwykle cennym i zarazem bardzo prostym badaniem, pozwalającym na wykrycie wczesnych objawów choroby, jest test Amslera, który można samodzielnie wykonać w domu [142]. W przypadku uszkodzenia plamki pojawiają się zniekształcenia (wygięcie, falowanie linii), przymglenia i/lub brak części linii siatki (mroczki) tworzącej test. Pomimo iż u większości chorych z zaawansowaną postacią AMD nie dochodzi do całkowitej ślepoty, to jednak uszkodzenie widzenia centralnego jest istotną przyczyną ograniczającą wykonywanie codziennych czynności zależnych od narządu wzroku, takich jak: czytanie, pisanie, posługiwanie się zegarkiem, rozpoznawanie twarzy, prowadzenie samochodu. Utrata widzenia centralnego powoduje utratę niezależności pacjenta, co z kolei jest przyczyną pogorszenia jakości życia, a nawet może prowadzić u 1/3 chorych do rozwoju klinicznie jawnej depresji [143, 144].

Diagnostyka AMD opiera się na połączeniu szczegółowego badania klinicznego z obrazowymi technikami diagnostycznymi, takimi jak: angiografia fluoresceinowa (FA), angiografia indocyjaninowa (*indocyanine green angiography* – ICG) oraz optyczna koherentna tomografia (*optical coherence tomography* – OCT), których wyniki stanowią podstawowe kryterium kwalifikacji chorego do leczenia.

Badanie okulistyczne powinno obejmować: ocenę najlepiej skorygowanej ostrości wzroku (*best corrected visual acuity* – BCVA) w dal i z bliska, ocenę przedniego odcinka gałki ocznej oraz dna oka w obrazie stereoskopowym po poszerzeniu źrenicy. Wczesne wykrycie i szybkie rozpoczęcie leczenia wysiękowego AMD są kluczowe dla zatrzymania postępu choroby i utrzymania przez jak najdłuższy czas jak najlepszej ostrości wzroku. Z tego względu zaleca się, aby każda osoba po 50. roku życia miała co najmniej raz w roku badaną ostrość wzroku [145].

Typowymi objawami oftalmoskopowymi wczesnego stadium AMD są druzy i przegrupowania RPE w plamce widoczne jako ogniska hiperpigmentacji i hipopigmentacji [69, 70, 140, 141]. Druzy mogą występować jako druzy twarde, miękkie, mieszane, druzy błony podstawnej. Zanik geograficzny, obejmujący RPE, zewnętrzne warstwy siatkówki i choriokapilary, jest typowym objawem dla suchej postaci AMD; na dnie oka obserwuje się obszar hipopigmentacji o nieregularnych, ale wyraźnych granicach z widocznymi dużymi naczyniami naczyniówki. Typowymi klinicznymi objawami dla wysiękowej postaci AMD jest obecność uniesienia lub obrzęku siatkówki w plamce, występowanie surowiczego lub krwotocznego odwarstwienia RPE, wybroczyn, krwawień śródsiatkówkowych, podsiatkówkowych, wysięków twardych oraz typowego szarozielonkawego ogniska położonego pod siatkówką, charakterystycznego dla CNV (ryc. 4). Czasami masywne krwawienia podsiatkówkowe lub położone pod RPE mogą imitować zupełnie inne schorzenie plamki, co wymaga różnicowania przede wszystkim ze zmianami nowotworowymi (ryc. 5). Rzadko obserwuje się przebiecie krwawienia podsiatkówkowego do ciała szklistego, co uniemożliwia ocenę szczegółów dna oka. W końcowym stadium wysiękowej postaci AMD obserwuje się rozplem tkanki włóknistej pod siatkówką, czyli tworzenie tarczowatej blizny [69, 70, 139–141, 146, 147] (ryc. 6).

(FA) umożliwia ocenę krążenia siatkówkowego i naczyniówkowego oraz RPE. W diagnostyce chorych z wysiękową postacią AMD odgrywa ona nieocenioną rolę w określeniu rodzaju, lokalizacji i rozmiarów CNV [139]. W oparciu o wynik FA można wyróżnić trzy podstawowe formy CNV: postać klasyczną, ukrytą oraz mieszaną. W tej ostatniej w zależności od procentowego udziału formy klasycznej w całej zmianie wyodrębnia się CNV dominująco klasyczną (komponenta klasyczna stanowi więcej niż 50% powierzchni zmiany) lub minimalnie klasyczną (komponenta klasyczna stanowi mniej niż 50% powierzchni zmiany) [139, 148, 149]. Klasyczną postać CNV cechuje wczesna hiperfluorescencja o dobrze określonych granicach i przybierająca kształt „koronki”, która w fazach późnych staje się homogenna i rozlana jako wynik przecieku z patologicznych naczyń tworzących błonę [148, 149] (ryc. 7). Ukryte zmiany CNV występują w FA w dwóch postaciach: jako włóknisto-naczyniowe odwarstwienie RPE lub – rzadziej – jako późny przeciek z nieokreślonego źródła. W tych przypadkach ognisko o niejednorodnej, ziarnistej hiperfluorescencji staje się wyraźne dopiero w późniejszych fazach badania [148, 149] (ryc. 8). Na podstawie lokalizacji względem centralnej strefy beznaczyniowej dołka (*foveal avascular zone* – FAZ) CNV klasyfikuje się jako: zewnątrzdołkową (oddaloną co najmniej 200 μm od FAZ), okołodołkową (zlokalizowaną pomiędzy 199 a 1 μm od FAZ) oraz poddołkową (obejmującą strefę beznaczyniową) [139, 148, 149].

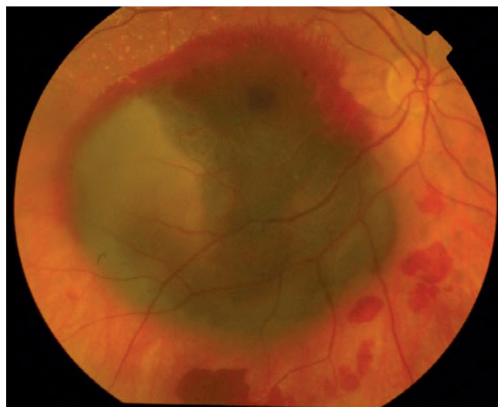
Wynik FA ma decydujące znaczenie nie tylko w rozpoznaniu, ale także w kwalifikacji chorych z wysiękową postacią AMD do różnych form terapii, a ponadto odgrywa istotną rolę w ocenie wyników zastosowanego leczenia.

W niektórych formach wysiękowej postaci AMD istnieje konieczność uzupełnienia diagnostyki obrazowej o ICGA, która ma szczególną wartość w ocenie krążenia naczyniówkowego. Jest ona przydatna w wykrywaniu ukrytych i źle ograniczonych postaci CNV, towarzyszących surowiczemu lub krwotocznemu odwarstwieniu RPE, wyjaśnia jednoznacznie charakter surowiczego odwarstwienia nabłonka barwnikowego (*serous pigment epithelium detachment* – SPED) oraz pozwala wykryć rzadkie postaci wysię-

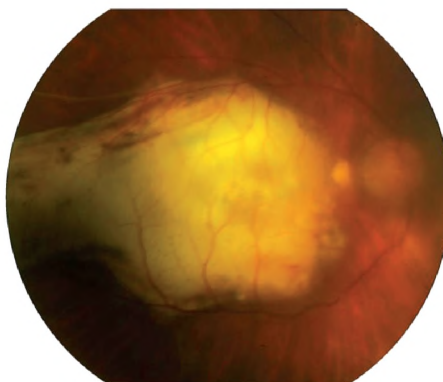
Ryc. 4. Wysiękowa postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD); szarozielonkawe ognisko neowaskularyzacji naczyńkowej – CNV (strzałka biała) otoczone wylewem krwi (strzałka żółta)

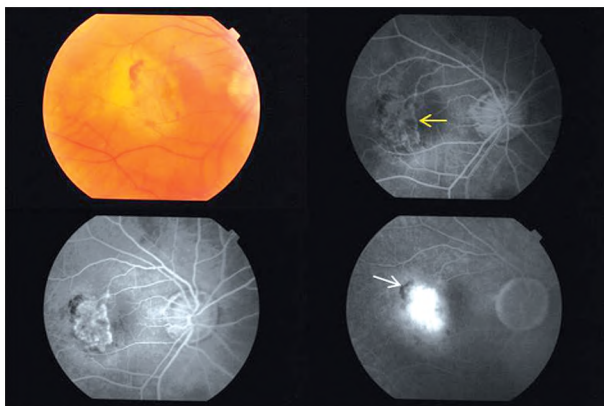


Ryc. 5. Masywny wylew krwi w plamce w przebiegu wysiękowej postaci AMD

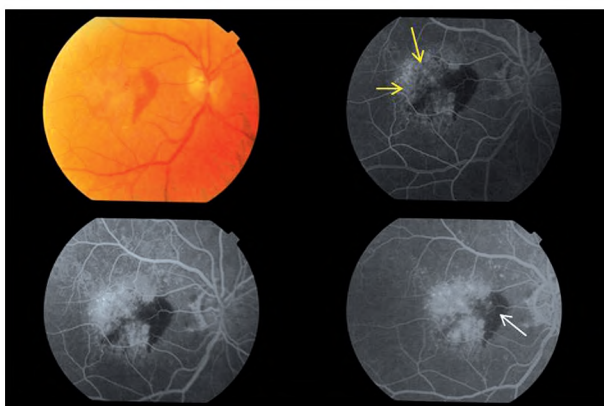


Ryc. 6. Włóknista blizna w plamce – zejściowe stadium wysiękowej postaci AMD





Ryc. 7. Angiografia fluoresceinowa dna oka prawego; we wczesnych fazach badania widoczne ognisko hiperfluorescencji o „koronkowej” strukturze (strzałka żółta), w fazie późnej dające homogenną, rozlaną hiperfluorescencję. Skroniowo góra przy ognisku hiperfluorescencji mały obszar hipofluorescencji, odpowiadający krwotokowi widocznemu na kolorowej fotografii (biała strzałka)

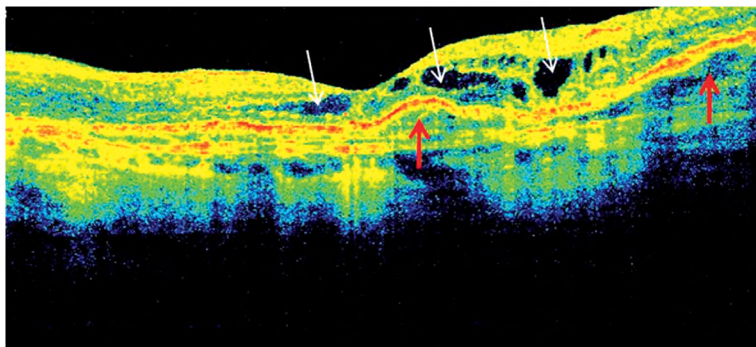


Ryc. 8. Angiografia fluoresceinowa dna oka prawego; we wczesnych fazach badania widoczne ognisko plamisto-ziarnistej hiperfluorescencji (strzałki żółte), w fazie późnej dające nieznacznie wzmocnioną ziarnistą hiperfluorescencję. Nosowo obszar hipofluorescencji odpowiadający krwotokowi widocznemu na kolorowej fotografii (strzałka biała)

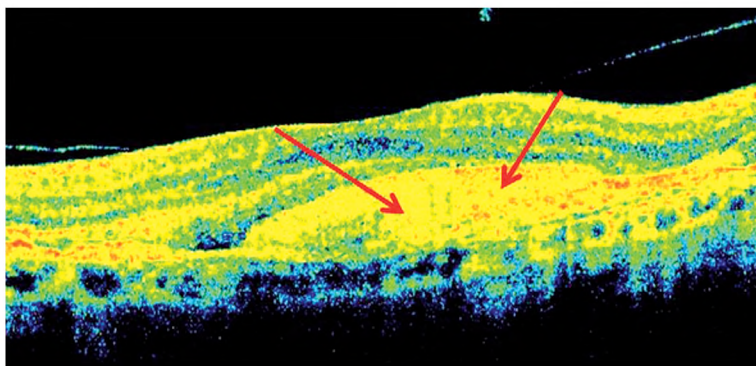
kowego AMD, tj. polipoidalną naczyniówkową waskulopatię (*polypoidal choroidal vasculopathy* – PCV) lub proliferację naczyniową siatkówki (*retinal angiomatous proliferation* – RAP) [150, 151].

OCT pozwala na uzyskanie poprzecznych przekrojów o wysokiej rozdzielczości umożliwiających wizualizację morfologii siatkówki *in vivo*. W oczach z AMD badanie to umożliwia przestrzenną ocenę morfologii plamki, pomiar centralnej grubości siatkówki (*central retinal thickness* – CRT), ocenę RPE i fotoreceptorów z możliwością odniesienia do normatywnej bazy danych [152–155]. W wysiękowym AMD w skanach OCT

obserwuje się: hiperrefleksyjne zniekształcenie i pogrubienie linii RPE–choriokapilary, odpowiadające CNV, oraz obecność hiporefleksyjnych płynowych przestrzeni pod siatkówką, pod RPE i obrzęk śródsiatkówkowy, które świadczą o stopniu aktywności CNV (ryc. 9). W oczach ze zmianami bliznowatymi stwierdza się ich hiperrefleksyjność, czasami z obecnością retencyjnych przestrzeni płynowych (ryc. 10). OCT pozwala także różnicować postać klasyczną CNV, zlokalizowaną pod siatkówką, z postacią ukrytą, która nie przekracza linii RPE [152–155]. OCT pozwala przede wszystkim na pomiary ilościowe określonych objawów związanych z wysiękową postacią AMD, podczas gdy obydwie badania angiograficzne są wykorzystywane do oceny jakościowej przecieku z CNV. Należy pamiętać, że wszystkie wymienione powyżej metody badania plamki wzajemnie się uzupełniają i dlatego też dokładna ocena plamki jest możliwa tylko i wyłącznie dzięki łącznej interpretacji uzyskanych wyników przedstawionych powyżej badań.



Ryc. 9. Przekrój OCT plamki: czynna błona neowaskularna (CNV); zaburzenie morfologii dołka z obecnością przestrzeni płynowych śródsiatkówkowych, świadczących o aktywności CNV (strzałki białe), uniesienie RPE (strzałki czerwone)



Ryc. 10. Przekrój OCT plamki: widoczny obszar hiperrefleksyjny odpowiadający bliznie (strzałki czerwone)

1.6. Klasyfikacja kliniczna zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

AMD występuje w dwóch postaciach klinicznych: suchej (niewysiękowej) oraz wysiękowej. Postać sucha stanowi około 90% wszystkich przypadków AMD [1, 8, 10, 69, 70, 140, 141]. Charakteryzuje się ona występowaniem druz, zanikiem fotoreceptorów, komórek RPE oraz warstwy choriokapilarów, które w zaawansowanym stadium prowadzą do zaniku geograficznego. Postęp tej postaci AMD jest powolny, a rokowanie jest lepsze niż w postaci wysiękowej [8, 9, 156]. U 10–20% chorych postać sucha AMD może przechodzić w wysiękową [120, 121, 123, 156].

Wysiękowa postać AMD stanowi tylko 10–20% wszystkich przypadków tego schorzenia, ale aż w 80–90% prowadzi do gwałtownej utraty widzenia centralnego [1, 69, 70, 140, 141]. W przebiegu tej postaci choroby dochodzi do rozrostu nieprawidłowych naczyń krwionośnych, które proliferują z warstwy choriokapilar do przestrzeni pod RPE (I typ neowaskularyzacji) lub pod neurosensoryczną część siatkówki (II typ neowaskularyzacji), lub do obu tych przestrzeni jednocześnie (III typ neowaskularyzacji). Te nowe, niepełnowartościowe, patologiczne naczynia tworzą neowaskularną błonę naczyniówkową. Typ I neowaskularyzacji odpowiada ukrytej (80–85% przypadków), a typ II klasycznej CNV (15–20% przypadków) w obrazie FA [1, 69, 151].

Istnieje kilka systemów klasyfikacji AMD: Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System, Age-Related Disease Study Grading System (AREDS) czy ostatnio opracowany – uproszczony system klasyfikacji AMD – Clinical Age-Related Maculopathy Staging System (CARMS) [157–159]. Na podstawie badania dna oka AMD dzieli się na pięć stadiów:

- **Stadium 1** – brak objawów AMD – brak druz lub obecność mniej niż 10 małych druz ($< 63 \mu\text{m}$), bez zaburzeń RPE;
- **Stadium 2** – wczesne stadium – więcej niż 10 małych druz lub mniej niż 15 druz średniej wielkości ($63\text{--}124 \mu\text{m}$), lub hipo-/hiperpigmentacja RPE, lub druzy z obecnością zmian na poziomie RPE (hipo-/hiperpigmentacja);
- **Stadium 3** – średnio zaawansowane stadium – obecność co najmniej 15 druz średniej wielkości bez druzoidalnego odłączenia RPE lub z druzoidalnym odłączeniem RPE;
- **Stadium 4** – stadium zaawansowane – obecność zaniku geograficznego obejmującego dołeczki lub zanik geograficzny wykraczający poza centrum plamki o średnicy $> 350 \mu\text{m}$;
- **Stadium 5** – stadium zaawansowane – postać wysiękowa AMD: surowicze odłączenie RPE, CNV lub blizna.

Do nietypowych form wysiękowej postaci AMD należy PCV oraz RAP [1, 69, 70].

PCV jest rzadką postacią AMD, występującą częściej u osób innych ras niż biała. Średni wiek chorych z PCV jest istotnie niższy niż średni wiek chorych z AMD. Rozwija się w wyniku uszkodzenia wewnętrznej warstwy blaszki naczyniowej naczyniówki, w obrębie której naczynia krwionośne ulegają kolbkowatemu rozdęciu. Powikłaniami tych zmian są surowiczo-krwotoczne odwarstwienia RPE, które lokalizują się w plamce lub w obszarze okołotarczowym. Rokowanie w większości przypadków jest dobre; wysięki i krwotoki spontanicznie się wchłaniają [1, 140, 141].

RAP natomiast rozwija się jako wynik proliferacji śródsiatkówkowych naczyń włosowatych w obszarze plamkowym, które tworzą anastomozy siatkówkowo-naczyniówkowe. Stanowi ona 10–15% przypadków AMD, dotyczy częściej mężczyzn, a średnia wieku wynosi 80 lat. Sugeruje się, że RAP mogą być pierwszą manifestacją rozwijającego się AMD [1, 140, 141].

1.7. Współczesne metody leczenia zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

Przez wiele lat w leczeniu wysiękowej postaci AMD stosowano terapie, które pomimo zniszczenia CNV, głównej przyczyny utraty widzenia centralnego w przebiegu tej choroby, rzadko prowadziły do poprawy funkcji leczonego oka. Najstarszą metodą leczenia jest fotokoagulacja za pomocą lasera argonowego. Termiczna ablacja ogniska CNV skutkuje nieodwracalnymi zmianami w siatkówce i naczyniówce, co wiąże się z powstaniem mroczka w centralnym polu widzenia. Z tego też powodu tę metodę leczenia można rozważać tylko w przypadku błon o lokalizacji zewnątrzdołkowej. Ponadto zabieg ten wiąże się z wysokim ryzykiem nawrotów choroby; w ciągu 5 lat u ponad połowy chorych obserwuje się nawrót CNV [160, 161]. Lokalna radioterapia, przezżreniczna termoterapia (*transpupillary thermotherapy* – TTT), próby chirurgicznego usuwania błon podsiatkówkowych czy translokacji plamki także nie przyniosły oczekiwanego efektu terapeutycznego w postaci poprawy czy stabilizacji ostrości wzroku [162–172].

W ostatnich latach do leczenia wysiękowej postaci AMD wprowadzono leczenie farmakologiczne, takie jak terapia fotodynamiczna (*photodynamic therapy* – PDT) z zastosowaniem werteoporfiny oraz doszkliskowe iniekcje inhibitorów czynnika VEGF-A i angiostatycznych steroidów. Efektem zastosowania PDT jest fotochemiczna oksydacja komórek śródbłonna, zachodząca pod wpływem działania lasera diodowego na kumulującą się w sposób selektywny w CNV werteopfinę, co prowadzi do tworzenia się zakrzepów i zamknięcia patologicznych naczyń, tworzących błonę neowaskularną [173, 174]. Wbrew oczekiwaniom PDT uszkadza także prawidłowe naczynia naczyniówki. Dwuletnie obserwacje wykazały stabilizację ostrości wzroku u 58% chorych, poprawę odnotowano tylko w 2–5% przypadków [173]. Tak więc PDT u większości chorych nie prowadzi do poprawy ostrości wzroku, a zmniejsza jedynie ryzyko poważnego uszkodzenia widzenia. PDT powoduje nadmierną ekspresję VEGF, co jest główną przyczyną nawrotów choroby i małej skuteczności tej metody leczenia [175, 174]. Ponadto największą skuteczność PDT stwierdza się w grupie chorych z dominującą klasyczną CNV, podczas gdy inne postacie CNV nie reagują wcale lub wykazują słabą odpowiedź na powyższe leczenie [174–176]. Duże zainteresowanie budzą takie metody leczenia wysiękowej postaci AMD, jak: fototromboza indukowana zielenią indocyjaninową (*indocyanine green-mediated photothrombosis* – iMP), radioterapia czy przeszczep komórek RPE do przestrzeni podsiatkówkowej [177–179].

Pierwszym lekiem zastosowanym w leczeniu wysiękowej postaci AMD o charakterze selektywnego blokera VEGF-A był pegaptanib sodu (Macugen, Pfizer). Wyniki badań klinicznych III fazy wykazały, iż podawane co 6 tygodni doszkliskowe iniekcje

tego leku spowalniają progresję wysiękowej postaci AMD, jednak nie powstrzymują postępu choroby i nie poprawiają ostrości wzroku [180]. Prawdziwym przełomem było wprowadzenie w 2006 roku do leczenia wysiękowej postaci AMD nieselektywnego inhibitora VEGF-A ranibizumabu (Lucentis, Novartis), który jest pierwszym lekiem, nie tylko stabilizującym, ale i poprawiającym ostrość wzroku u 35–40% chorych [181]. Jednak bardzo wysoki koszt leczenia istotnie ogranicza dostęp do tej terapii. Z tego względu na całym świecie, jak również w Polsce, coraz szersze zastosowanie w leczeniu wysiękowego AMD znajduje bewacizumab (Avastin, Roche), który jest pierwszym zarejestrowanym inhibitorem VEGF, znajdującym zastosowanie w onkologii [182]. Ze względu na niskie koszty leczenia jest on często preferowanym lekiem w leczeniu chorych z wysiękową postacią AMD, przy czym należy podkreślić, że jest to terapia stosowana poza wskazaniami (na zasadzie *off-label*) [124, 183–186].

Zarówno PDT, jak i doszklisktowe iniekcje preparatów anti-VEGF wymagają wielokrotnego powtarzania (w przypadku PDT co 3 miesiące, w przypadku preparatów anti-VEGF co 4–6 tygodni w pierwszym roku terapii), a mimo to nie gwarantują wyleczenia. U chorych leczonych tymi metodami nierzadko zawieszenie terapii prowadzi do aktywacji CNV [176, 184, 185].

Stosowanie angiostatycznych steroidów ma uzasadnienie w patogenezie AMD. Acetonid triamcynolonu, lek szeroko stosowany w reumatologii, podawany w AMD doszklisktowo skutecznie blokuje VEGF i zmniejsza obrzęk siatkówki, lecz jest stosowany podobnie jak bewacizumab poza wskazaniami [187, 188]. Obecnie trwają badania kliniczne nad oceną bezpieczeństwa i skuteczności terapii dwóch innych steroidów: doszklisktowego implantu acetonidu fluocinolonu i podawanego do przestrzeni nadtwardówkowej w okolicę plamki octanu anakortawu. Najczęściej jednak są one stosowane jako uzupełnienie innych terapii [189–193].

Pojedyncze doniesienia wskazują na korzystny efekt stosowanych miejscowo kropli ocznych z niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym – nepafenakiem. Lek ten hamuje m.in. w siatkówce i naczyniówce syntezę prostaglandyn, biorących udział w indukcji zapalenia i angiogenezy [194]. Prowadzone są również prace doświadczalne i kliniczne nad nowymi metodami leczenia AMD, takimi jak: doszklisktowe iniekcje endogenego pochodzenia czynników hamujących VEGF, tj. PEDF, angiostatyny, endostatyny [195–200]. Te ostatnie, oprócz efektu zmniejszenia stężenia lipidów, hamują aktywację czynników transkrypcji pośredniczących w zapaleniu, ograniczając w ten sposób uwalnianie prozapalnych cytokin, które są uwikłane w patogenezę AMD. Poza tym wykazują aktywność antyoksydantów. W badaniach doświadczalnych wykazano fosforylację receptora kinazy tyrozynowej (*kinase insert domain receptor* – KDR) pod wpływem VEGF oraz blokadę tego zjawiska przez inhibitory kaskady tyrozynowej, co zwraca uwagę na możliwość wykorzystania tych czynników w zahamowaniu rozwoju CNV [201]. Duże zainteresowanie wzbudza także grupa preparatów blokujących na poziomie matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA) przez małe interferujące RNA (*small interfering RNA* – siRNA) produkcję wszystkich izoform VEGF-A (Cand 5) lub zastępujących prawidłowe receptory dla VEGF (VEGFR-1 i VEGFR-2) receptorami „pułapkami” (VEGF Trap-Eye) [202–207].

W ostatnim czasie ze względu powszechną akceptację udziału dopełniacza w patogenezie AMD duże zainteresowanie budzą strategie terapeutyczne ukierunkowane na hamowanie białek układu dopełniacza. Takim potencjalnym lekiem może okazać się

komplementowa wiążąca składnik C3b, a także POT-4, który wiąże się z elementem C3c składnika C3, zapobiega jego rozszczepieniu na C3a i C3b, oraz ARC1905, który jest anti-C5 aptamerem [103, 208, 209].

Należy również wspomnieć o leczeniu uzupełniającym, polegającym na suplementacji przeciwutleniaczy (luteiny, zeaksantyny, witamin E i C, cynku, seleny) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Oczekiwany przez chorych efekt powstrzymania progresji AMD raczej nie występuje, ale w części przypadków obserwuje się spowolnienie rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce [210–212].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

W 1906 roku Hess i Romer jako pierwsi zwrócili uwagę na występowanie przeciwciał przeciwko komórkom pręcikowym siatkówki [za 213]. Cztery lata później Elschnig wysunął hipotezę o autoimmunizacyjnym mechanizmie rozwoju współczulnego zapalenia błony naczyniowej (*ophthalmia sipmatica*) i jako pierwszy opisał antygen S, czyli arestynę, do tej pory uważaną za najbardziej immuno- i uveitogenny antygen siatkówkowy [214]. W późniejszych latach odkrywano kolejne antygeny siatkówkowe, odgrywające ważną rolę w patologii schorzeń siatkówki: międzyreceptorowe białko wiążące retinoid (*interphotoreceptor retinoid binding protein* – IRBP), transducynę, rodopsynę, fosfodiesterazę cyklicznego GMP i glejowe kwaśne białko włókienkowe (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP) [215–218]. Wśród autoantygenów ocznych należy również wymienić te, które są uwikłane w etiopatogenezę retinopatii towarzyszących zespołom paraneoplastycznym: retinopatii towarzyszącej czerniakowi skóry (*melanoma-associated retinopathy* – MAR), retinopatii towarzyszącej rakowi drobnokomórkowemu (*carcinoma-associated retinopathy* – CAR), a należą do nich rekaweryna i wizinina – białka wiążące jony wapniowe [219–223]. Przeciwciała skierowane przeciwko tym antygenom są odpowiedzialne za rozwój ciężkiej postaci retinopatii. Te wyodrębnione autoantygeny zlokalizowane są prawie wyłącznie w komórkach fotoreceptorowych, w obu warstwach jądrzastych, w warstwie komórek dwubiegunowych oraz w warstwie komórek zwojowych siatkówki [217, 221, 224–226].

Siatkówka zawiera zarówno antygeny specyficzne jedynie dla tej tkanki, jak i wspólne z innymi strukturami gałki ocznej (np. RPE) lub innymi tkankami organizmu (mózgiem, szyszynką, jądrami, nerkami) [225].

Obecnie jest znanych wiele schorzeń narządu wzroku, w których patogenezę zaangażowane są procesy autoimmunizacyjne. Należą do nich zarówno genetycznie uwarunkowane zwyrodnienia siatkówki, jak i nabyte choroby siatkówki i naczyniówki. W literaturze przedmiotu opisano przypadki obecności w surowicy przeciwciał przeciw-siatkówkowych (PPS) w przebiegu endogennych zapaleń błony naczyniowej, idiopatycznego zapalenia naczyń siatkówki, zapaleń błony naczyniowej w przebiegu zakażenia *Toxoplasma gondii* czy *Onchocerca volvulus*, w chorobie Harady, Vogta i Koyanagięgo, w przebiegu zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, w zapaleniu współczulnym, jaskrze prostej otwartego kąta, w przebiegu stwardnienia rozsianego u chorych z zajęciem narządu wzroku [227–242]. W witreoretinopatii proliferacyjnej oraz po laserokoagulacji argonowej siatkówki w przebiegu proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej stwierdzono obecność autoprzeciwciał reagujących z antygenem S komórek fotoreceptorowych [243, 244].

Wiele publikacji, w tym i moje własne obserwacje, wskazują na istnienie zależności pomiędzy występowaniem PPS w surowicy a nasileniem klinicznych objawów idiopatycznego zapalenia naczyń siatkówki i endogennego zapalenia błony naczyniowej [237–242]. W ostatnim czasie, ze względu na powszechnie akceptowany udział mechanizmów immunologicznych, pojawiły się pojedyncze doniesienia na temat roli PPS w zapoczątkowaniu, a następnie modulacji przebiegu AMD [224–226, 245, 246]. Wstępne wyniki moich badań, podobnie jak wyniki badań klinicznych przeprowadzonych w innych ośrodkach, wskazują na istnienie zależności pomiędzy występowaniem PPS w surowicy a stopniem zaawansowania i aktywności zmian zwyrodnieniowych w plamce w przebiegu AMD (224, 226, 247–255]. Kilka publikacji nie podziela jednak takich obserwacji [256, 257].

Jak powszechnie wiadomo, wczesne rozpoznanie AMD i podjęcie działań profilaktyczno-leczniczych może mieć duże znaczenie dla powstrzymania bądź opóźnienia rozwoju i progresji choroby. Obecnie nie ma wiarygodnych testów diagnostycznych, które mogłyby mieć zastosowanie jako badania przesiewowe w celu dokonania selekcji chorych zagrożonych rozwojem AMD, czy też które byłyby markerem skuteczności leczenia i byłyby pomocne w wątpliwych przypadkach w podjęciu decyzji o dalszym postępowaniu. Nie zawsze bowiem wyniki badania klinicznego (BCVA, FA, OCT), na podstawie którego okulista kwalifikuje chorego do rozpoczęcia terapii, jej kontynuacji lub przerwania, są jednoznaczne. Weźmy na przykład pod uwagę chorych z ukrytą CNV. W tych przypadkach kryterium kwalifikacji chorego do leczenia stanowi obserwacja, kiedy dojdzie do pogorszenia funkcji oka o 1 linię w skali Snellena lub powiększenia się rozmiarów CNV o co najmniej 10% w FA lub pojawienia się nowego wylewu krwi w plamce w okresie 12 tygodni od poprzedniego badania. Mając na względzie schemat leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF, w okresie 12 tygodni chory, który zostaje zakwalifikowany do leczenia, otrzymuje pełną nasycającą dawkę leku, co w znacznej większości przypadków wiąże się z poprawą BCVA i zmniejszeniem obrzęku siatkówki w dołeczku (CRT). Czy zatem znalezienie biomarkera ryzyka progresji zmian zwyrodnieniowych w plamce nie byłoby cennym uzupełnieniem diagnostyki chorego na AMD, pomocnym w podjęciu w trudnych przypadkach decyzji o dalszym postępowaniu?

Brak biomarkerów dla AMD wynika z niepełnej wiedzy na temat etiopatogenezy tego schorzenia. Wielkie nadzieje wiązano z biomarkerami genetycznymi, które mogłyby wskazywać na realne ryzyko zachorowania na AMD. Znanych jest kilka genów, których polimorfizm może przyczyniać się do rozwoju tego schorzenia. Najbardziej kojarzony z rozwojem AMD jest polimorfizm genów *ARMS2*, *HTRA1* oraz mutacje dotyczące czterech genów kodujących białka dopełniacza: *CFH*, *CFB/C2* i *C3*, o których już wcześniej wspomniano w rozdziale 1.3.3. Choć są one biomarkerami dla AMD, to mogą być traktowane jedynie jako wczesny wskaźnik ryzyka zachorowania, bowiem ich obecność nie oznacza, że u osoby genetycznie predysponowanej rozwinie się choroba [62, 64, 65, 258]. Poza tym obecność polimorfizmu tych genów może pełnić rolę biomarkera statycznego, informującego jedynie o potencjalnym ryzyku zachorowania, a nie odzwierciedlającego przebieg kliniczny choroby.

Lokalny proces zapalny i aktywacja układu immunologicznego są czynnikami spustowymi dla rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce. Mobilizacja układu immunologicznego w kompleksie tkankowym: fotoreceptory–RPE–błona Brucha–choriokapilary, uwikłanym w patogenezę AMD, wiąże się z napływem, kumulacją i aktywacją

wielu komórek zapalnych w przestrzeni podsiatkówkowej [39, 86–92]. Pierwszymi dostrzegalnymi w badaniu dna oka zmianami rozwijającymi się w przebiegu AMD są druzy – bezpostaciowe, lipidowo-białkowe złogi zewnątrzkomórkowe, odkładające się między RPE a błoną Brucha [89, 259]. Analiza biochemiczna i histochemiczna materiału druzowego wykazała, jak już wcześniej zaznaczono, obecność licznych elementów układu immunologicznego [89, 98, 104, 106, 260]. Wśród wielu białek znajdujących się w druzach stwierdzono występowanie koniugatu CEP–białko, związku o silnych właściwościach immunogennych, zdolnego do generowania autoprzeciwciał anti-CEP i odpowiedzialnego za rozwój CNV niezależny od czynnika VEGF. CEP jest produktem peroksydacji kwasu dokozaheksaenowego, głównego składnika błon plazmatycznych zewnętrznych segmentów fotoreceptorów (POS), którego obfitość w tym regionie siatkówki wyróżnia ten typ komórek spośród wielu innych w organizmie człowieka [62, 97, 131, 132, 261]. Zarówno immunoreaktywność, jak i autoprzeciwciała zależne od CEP wykryto w surowicy chorych na AMD [62, 97, 132, 261]. Ostatnio wykazano, że oznaczanie koniugatu CEP–białko i przeciwciał przeciwko temu adduktowi w surowicy chorych na AMD, w połączeniu z genotypowaniem, wykazuje 80% wartość diagnostyczną dla tego schorzenia [97]. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic pomiędzy poziomami tych autoprzeciwciał w surowicy a stadiami zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w plamce. Techniki analityczne niezbędne do wykonywania tego badania są zaawansowane i unikatowe, co może stwarzać poważne problemy z dostępnością do tych testów. Nieustannie więc poszukuje się nowych biomarkerów AMD, które odzwierciedlałyby aktywność zmian zwyrodnieniowych w plamce i jednocześnie mogłyby być nieskomplikowaną i powszechnie używaną metodą monitorowania skuteczności leczenia, a w trudnych i wątpliwych przypadkach byłyby pomocne w podjęciu decyzji o dalszym postępowaniu.

Biorąc pod uwagę przedstawione założenia, podjęłam badania, które miały na celu:

1. Ocenę profilu oraz częstości występowania PPS w surowicy chorych z wysiękową postacią AMD.
2. Określenie, czy istnieje zależność pomiędzy typem i mianem krążących PPS a stopniem zaawansowania choroby.
3. Ocenę dynamiki zmian poziomu PPS w surowicy w trakcie leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin).
4. Poszukiwanie zależności pomiędzy mianem krążących PPS a ocenianymi w trakcie leczenia parametrami aktywności CNV, takimi jak BCVA i CRT.
5. Wykazanie, czy krążące PPS mogą być biomarkerem aktywności AMD oraz czy mogą służyć monitorowaniu leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin).

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka grupy badanej oraz grupy kontrolnej

Badaniami objęto 98 chorych (108 oczu) z wysiękową postacią AMD zakwalifikowanych do leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin, Roche). Wśród badanych było 38 mężczyzn (39%) oraz 60 kobiet (61%) w wieku 55–93 lata; średni wiek 76 lat. U żadnego z badanych nie przeprowadzono wcześniej leczenia zmian zwyrodnieniowych plamki. Z badań wykluczono chorych, u których stwierdzono przebyte lub współistniejące schorzenia siatkówki, zapalenie błony naczyniowej i/lub naczyni siatkówki, paraneoplastyczne retinopatie, jaskrę, cukrzycę oraz osoby przewlekłe przyjmujące steroidy i/lub leki immunosupresyjne. Wśród badanych nie występowały żadne ogólnoustrojowe schorzenia o podłożu autoimmunizacyjnym.

Grupę kontrolną stanowiło 50 ogólnie zdrowych osób odpowiednio dobranych pod względem wieku i płci, operowanych w naszej klinice z powodu zaćmy starczej. Grupa ta obejmowała 20 mężczyzn (40%) i 30 kobiet (60%) w wieku 53–91 lat; średni wiek 75,2 roku. U tych osób poza zaćmieniami w soczewkach i rzekomosoczewkowością w oku towarzyszącym, stwierdzoną w 12 przypadkach, nie wykazano innych nieprawidłowości w narządzie wzroku. Do grupy kontrolnej nie włączano osób z przewlekłymi schorzeniami ogólnoustrojowymi, które mogłyby potencjalnie wpłynąć na profil krążących autoprzeciwciał, oraz wykluczono osoby stosujące steroidy i/lub leki immunosupresyjne.

3.2. Metody badań

3.2.1. Wstępne badanie okulistyczne

U wszystkich chorych przeprowadzono wstępne badanie okulistyczne, które obejmowało:

- ocenę BCVA w dal i z bliska przy użyciu tablic Snellena;
- wykonanie testu Amslera;
- badanie przedniego odcinka gałki ocznej w lampie szczelinowej;

- ocenę dna oka, a w szczególności okolicy plamki po poszerzeniu źrenicy w obrazie stereoskopowym przy użyciu soczewki Volk +90D i +78D;
- pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego metodą tonometrii aplanacyjnej (Ta);
- (FA) (Topcon, TRC 50 DX, Tokio, Japonia), na podstawie której oceniano rodzaj, lokalizację oraz wielkość CNV;
- (OCT) (Optovue Inc, Fremont, CA, USA), w której oceniano stopień aktywności CNV; CRT w dołeczku, obecność płynu pod RPE, pod częścią neurosensoryczną siatkówki oraz przestrzeni płynowych śródsiatkówkowych;
- w przypadku stwierdzenia w FA źle odgraniczonej postaci CNV, towarzyszącej surowiczemu lub krwotocznemu odwarstwieniu RPE, dodatkowo wykonywano ICGA (Heidelberg Retina Angiograph, Heidelberg Engineering, Niemcy).

3.2.2. Kontrolne badania okulistyczne

W okresie prowadzonej ośmiomiesięcznej obserwacji kontrolne badania okulistyczne były przeprowadzane w odstępach comiesięcznych i obejmowały:

- ocenę BCVA w dal i z bliska przy użyciu tablic Snellena;
- wykonanie testu Amslera;
- badanie przedniego odcinka gałki ocznej w lampie szczelinowej;
- ocenę obwodowej części dna oka oraz okolicy plamki po poszerzeniu źrenicy w obrazie stereoskopowym przy użyciu soczewki Volk +90D i +78D;
- pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego (Ta) lub metodą bezkontaktową;
- OCT, w której oceniano zmianę CRT w dołeczku oraz zachowanie się płynu pod RPE, pod częścią neurosensoryczną siatkówki i przestrzeni płynowych śródsiatkówkowych w porównaniu z poprzednim badaniem;
- FA w przypadku niewyjaśnionego spadku BCVA.

3.2.3. Wstępne badanie ogólne

W każdym przypadku przeprowadzono staranne badanie podmiotowe w kierunku wystąpienia potencjalnych chorób ogólnych, które stanowią przeciwwskazania do podania bewacizumabu (ogólne kryteria wyłączenia z badania przedstawiono we wcześniejszym rozdziale). Ponadto kwalifikując chorego do doszkliskowych iniekcji bewacizumabu, wykonywano następujące badania:

- morfologię krwi;
- glikemię na czczo;
- poziom elektrolitów (sód, potas);
- układ krzepnięcia (APTT, PT, fibrynogen);
- ogólne badanie moczu;
- elektrokardiografię (EKG);
- pomiar ciśnienia tętniczego krwi.

Dodatkowo u chorych obciążonych przewlekłymi chorobami układu sercowo-naczyniowego, stosujących leki antykoagulacyjne, przeprowadzono konsultację internistyczną lub kardiologiczną w celu uzyskania zgody na planowane leczenie.

3.2.4. Kryteria włączenia do badań

Wszyscy chorzy zakwalifikowani do leczenia doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin) musieli spełnić następujące warunki:

- wyrażenie pisemnej zgody na leczenie doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu;
- brak ogólnych i miejscowych przeciwwskazań do podania doszkliskowej iniekcji bewacizumabu (patrz kryteria wyłączenia);
- każdy typ aktywnej, nieleczonej CNV związany z wysiękową postacią AMD o lokalizacji poddołkowej lub okołodołkowej, gdy zmiana zagraża zajęciem dołka, zdiagnozowany w FA lub w ICGA;
- całkowita wielkość zmiany nieprzekraczająca 12 DA;
- aktywna CNV stanowiąca $\geq 50\%$ powierzchni całej zmiany;
- BCVA wynosząca 0,1–0,5 w skali Snellena;
- przejrzyste ośrodki optyczne umożliwiające ocenę dna oka i wykonanie FA/ICGA.

3.2.5. Kryteria wyłączenia z badań

W przypadku stwierdzenia przedstawionych poniżej miejscowych i/lub ogólnych kryteriów chorego nie kwalifikowano do zaplanowanych badań.

A. Miejskowe kryteria wyłączenia:

- brak zgody pacjenta na leczenie doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu;
- brak przejrzystości ośrodków optycznych umożliwiających ocenę dna oka i wykonanie FA/ICGA;
- CNV nietowarzysząca wysiękowej postaci AMD;
- wcześniej przeprowadzone leczenie CNV (TTT, PDT, laserokoagulacja argonowa, doszkliskowe iniekcje czynnika anty-VEGF);
- dominujące bliznowacenie ($> 50\%$ powierzchni zmiany) obejmujące centrum plamki;
- dominujący zanik geograficzny ($> 50\%$) obejmujący centrum plamki;
- dominujący podsiatkówkowy wylew krwi obejmujący centrum plamki;
- stabilny, surowiczy PED bez cech CNV;
- chorzy po operacji zaćmy w okresie krótszym niż miesiąc po zabiegu;
- nieuregulowana jaskra lub zaawansowana neuropatia jaskrowa z możliwością jej znacznej progresji na skutek wyżek ciśnienia wewnątrzgałkowego po zabiegach doszkliskowego podania leku;
- stan po przebytych zabiegach chirurgicznych witreoretinalnych, przeciwjaskrowych;
- zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe obwodowej siatkówki;
- chorzy po fotokoagulacji siatkówki obwodowej w okresie krótszym niż miesiąc;
- aktywne zmiany zapalne w obrębie gałki ocznej i aparatu ochronnego oka;
- chorzy z przebyłym lub aktywnym zapaleniem błony naczyniowej i naczyń siatkówki;
- współistnienie chorób miejscowych, które mogą wpłynąć na profil autoprzeciwciał w surowicy: jaskra, zapalenia błony naczyniowej endogenne i o podłożu infekcyjnym, zapalenie naczyń siatkówki, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, retinopatia cukrzycowa.

B. Ogólne kryteria wyłączenia:

- stan po przebytych zawale mięśnia sercowego w ostatnich 6 miesiącach;
- stan po przebytych udarze mózgu w ostatnich 6 miesiącach;
- niestabilna choroba wieńcowa;
- nieuregulowane nadciśnienie tętnicze;
- niewydolność nerek;
- niewydolność oddechowa;
- dodatni wywiad w kierunku zakrzepicy zatorowej tętnic i żył;
- planowane zabiegi operacyjne;
- choroby ogólne, które mogą wpłynąć na profil autoprzeciwciał w surowicy: cukrzyca, zespoły paraneoplastyczne, systemowe choroby o podłożu autoimmunizacyjnym;
- systemowa steroidoterapia i/lub stosowanie leków immunosupresyjnych;
- leczenie antykoagulantami, jeśli INR przekracza 1,5.

3.2.6. Kryteria kontynuacji leczenia

Leczenie doszklistikowymi iniekcjami bewacizumabu kontynuowano po spełnieniu następujących kryteriów:

- spadek BCVA o 1 linię w skali Snellena (w porównaniu z poprzednią wizytą) spowodowany aktywnym wysiękowym AMD;
- obecność utrzymującego się, narastającego lub nowego płynu śródsiatkówkowego;
- narastanie lub nowy płyn podsiatkówkowy i/lub pod RPE;
- świeże krwawienia śródsiatkówkowe i podsiatkówkowe;
- nowe ognisko CNV, powiększenie się rozmiarów CNV.

3.2.7. Kryteria zawieszenia leczenia

Leczenie doszklistikowymi iniekcjami bewacizumabu zawieszano w przypadku osiągnięcia stabilizacji, którą definiowano jako:

- stabilizacja BCVA lub jej poprawa w stosunku do poprzedniego badania;
- brak nowych zmian w OCT;
- brak nowych zmian w badaniu dna oka w porównaniu z poprzednią wizytą.

3.2.8. Kryteria przerwania leczenia

Leczenie doszklistikowymi iniekcjami bewacizumabu przerywano, gdy:

- chory nie wyrażał zgody na dalsze leczenie;
- wystąpiło ciężkie działanie niepożądane związane z działaniem leku;
- CNV uległa zbliznowaceniu pomimo leczenia;
- stwierdzano brak odpowiedzi na leczenie pomimo stosowanego leczenia.

3.2.9. Zastosowane leczenie

U wszystkich chorych zastosowano leczenie doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin, Roche Pharma AG). Bewacizumab jest rekombinowanym, humanizowanym, monoklonalnym pełnej długości przeciwciałem IgG1 o masie cząsteczkowej 149 kDa. Okres połowicznego rozpadu tego przeciwciała wynosi około 20 dni. Bewacizumab wiążąc i blokując wszystkie biologicznie aktywne izoformy VEGF-A, powoduje hamowanie procesu angiogenezy [183–185]. Jest on pierwszym inhibitorem VEGF zatwierdzonym do stosowania przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration – FDA*), przy czym jest zarejestrowany do dożylnego stosowania u pacjentów ze schorzeniami onkologicznymi, m.in. z przerzutowym rakiem jelita grubego [182, 184, 185]. Stosowanie bewacizumabu w postaci doszklistkowych iniekcji u chorych z wysiękową postacią AMD stanowi zatem terapię poza wskazaniami rejestracyjnymi (*off-label*). Ze względu na istotne zmniejszenie się aktywności choroby wraz z wchłanianiem się płynu podsiatkówkowego, zmniejszeniem obrzęku śródsiatkówkowego i z jednoczesną stabilizacją lub poprawą ostrości wzroku przy jednocześnie wykazanym bezpieczeństwie i niskich kosztach tego leczenia stosowanie doszklistkowych iniekcji bewacizumabu stało się powszechną metodą postępowania w wielu przypadkach AMD na całym świecie [262]. Opublikowane w kwietniu 2011 roku roczne wyniki wieloośrodkowych badań klinicznych, porównujących skuteczność ranibizumabu i bewacizumabu w leczeniu wysiękowej postaci AMD, określone akronimem CATT Study – *Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials Study*, wykazały że terapia preparatem Avastin nie jest mniej skuteczna niż lekiem Lucentis [263].

Na leczenie chorych z wysiękową postacią AMD doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu uzyskano zgodę Komisji Bioetyki UJ CM (KBET/165/B/2009). Ponadto chory, objęty badaniem, przed każdym zabiegiem podpisywał świadomą zgodę na leczenie (w aneksie zamieszczono wzór zgody). Leczenie obejmowało dwie fazy: fazę „nasycającą”, podczas której każdy chory otrzymywał trzy kolejne iniekcje bewacizumabu w odstępach comiesięcznych, i fazę „podtrzymującą”, w której decyzję o podtrzymaniu lub zawieszeniu leczenia opierano na przedstawionych powyżej kryteriach. Leczenie w fazie „podtrzymującej” było prowadzone według schematu *pro re nata* (w razie potrzeby). U chorych ze wskazaniami do leczenia obu oczu odstęp pomiędzy iniekcjami, które wykonywano na przemian raz w jednym, raz w drugim oku, wynosił od 7–10 dni, przy jednoczesnym przestrzeganiu wcześniej przedstawionego schematu postępowania tj. comiesięcznych iniekcji do każdego oka w okresie fazy „nasycającej” leczenia i następnie według reguły *pro re nata*. Wybór oka kwalifikowanego do leczenia w pierwszej kolejności zależał od decyzji pacjenta i lekarza, przy czym preferowano leczenie najpierw oka lepiej rokującego. Okres prowadzonego leczenia i obserwacji wynosił osiem miesięcy.

Procedurę wykonania iniekcji doszklistkowej przeprowadzano w sali operacyjnej z zachowaniem zasad aseptyki podczas przygotowywania żądanej dawki leku, narzędzi, pola operacyjnego i podania leku. Z fiołki zawierającej 100 mg/4 ml bewacizumabu pobierano do strzykawki tuberkulinowej 1,25 mg/0,05 ml leku. Taką dawkę bewacizumabu w leczeniu chorych z wysiękową postacią AMD użyto w badaniu CATT oraz w wielu innych wcześniejszych badaniach klinicznych [185, 186, 263–267]. Po zakończeniu zaplanowanej w danym dniu sesji iniekcji doszklistkowych fiołka z pozostałościami leku była

wyrzucana. Iniekcję wykonywano igłą 30 G. Przez trzy dni przed planowaną iniekcją i następnie przez trzy dni po niej każdy chory stosował do leczonego oka krople z antybiotykiem o szerokim spektrum działania – lewofloksacynę (0,5% Oftaquix) cztery razy dziennie. W dniu wykonania iniekcji w każdym przypadku oceniano przedni odcinek gałki ocznej w celu wyeliminowania chorych z ewentualną infekcją aparatu ochronnego oka, mierzono ciśnienie wewnątrzgałkowe i po poszerzeniu źrenicy 1% Tropicamidem badano dno oka. W przypadku odnotowanego wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego po wcześniejszych iniekcjach lub stwierdzenia wyjściowego ciśnienia wynoszącego 18–21 mmHg podawano dodatkowo do oka krople 2% Trusopt (dorzolamid).

Procedura doszkliskowej iniekcji bewacizumabu (Avastin)

- Zakropienie do worka spojówkowego antybiotyku (0,5% Oftaquix) i następnie kropli znieczulających miejscowo (0,5% Alcaine – chlorowoderek proksymetalkainy).
- Umycie skóry wokół oka, skóry powiek i rzęs 10% roztworem powidonu jodyny.
- Przepłukanie worka spojówkowego 5% roztworem powidonu jodyny i pozostawienie go na okres 90 sekund.
- Wypłukanie worka spojówkowego roztworem soli fizjologicznej.
- Nałożenie sterylnego obłożenia wraz z folią zabezpieczającą rzęsy.
- Założenie na powieki rozwórki.
- Zakropienie kropli 5% roztworu jodopowidonu bezpośrednio w miejsce, gdzie zostanie wykonana iniekcja.
- Przyłożenie do miejsca wykonania iniekcji pakułki zakończonej watą nasączoną kroplami miejscowo znieczulającymi (0,5% Alcaine) na około 60 sekund.
- Zaznaczenie cyrklem miejsca wykonania iniekcji w odległości 3,5 mm w oczach ze sztuczną soczewką wewnątrzgałkową i 4,0 mm od rąbka rogówki w przypadku soczewki własnej, zmieniając miejsce podania kolejnych iniekcji, kierując igłę w stronę centrum gałki ocznej.
- Podanie do komory ciała szklistego przygotowanego w strzykawce leku (1,25 mg/0,05 ml).
- Wysłunięcie igły i wykonanie masażu gałki ocznej przy użyciu sterylnej pakułki.
- Podanie do worka spojówkowego kropli 0,5% Oftaquix.
- Ocena poczucia światła w oku poddanym iniekcji.
- Założenie na oko jałowego opatrunku.
- Kontrola ciśnienia wewnątrzgałkowego i badanie okulistyczne w lampie szczelinowej 30–60 minut po iniekcji.

W przypadku stwierdzenia podwyższonych wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego włączano miejscowo 2% Trusopt (dorzolamid) lub 0,5% Oftensin (timolol).

Chorego informowano o konieczności przeprowadzenia kontrolnego badania okulistycznego w okresie 2–7 dni po iniekcji oraz niezwłocznego zgłoszenia się do okulisty w przypadku pojawienia się bólu, zaczerwienienia oka, nadwrażliwości na światło, mętów w polu widzenia, pogorszenia widzenia w oku po iniekcji.

Podczas leczenia monitorowano potencjalne działania niepożądane miejscowe i ogólne związane z doszkliskową iniekcją bewacizumabu (Avastin).

3.2.10. Test immunofluorescencji do oznaczania przeciwciał przeciwiśiatkówkowych oraz przeciwciał przeciwno komórkom śródbłonna

Badania immunologiczne przeprowadzono w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej UJ CM w Krakowie. Krew do badania w objętości około 5 ml pobierano z żyły łokciowej, a surowicę po odwirowaniu (3000 obrotów/s, czas 10 min), przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania testu.

Obecność PPS w surowicy oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej (*indirect immunofluorescence test* – IIF) przy użyciu standardowego substratu tkankowego – skrawków mrożakowych prawidłowej siatkówki małpiej (Euroimmun, Lubeka, Niemcy) oraz poliwalentnej koziej surowicy antyglobulinowej (*anti-human IgAGM*) związanej z izotiocyjanianem fluoresceiny (Euroimmun, Niemcy) jako wtórnego przeciwciała. IIF wykonywano zgodnie z podaną przez producenta procedurą. Po rozmrożeniu badane surowice przygotowywano do badania w seryjnych rozcieńczeniach 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 itd.

Wszystkie preparaty były oceniane niezależnie – przez dwie osoby (A.K-T. i J.W.) – przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Axioscope fl z lampą HBO 100). Oceniający preparaty nie znali rozpoznania ani stadium choroby. Analizowano rodzaje immunofluorescencji we wszystkich warstwach siatkówki, a maksymalne miano PPS odpowiadało największemu rozcieńczeniu badanej surowicy, które nadal dawało pozytywną reakcję z substratem. W przypadku stwierdzenia w badanej surowicy kilku typów PPS w ocenie skuteczności leczenia anty-VEGF brano pod uwagę tylko te PPS, które występowały w badaniu wyjściowym w danej surowicy w najwyższych mianach.

W przypadku stwierdzenia pozytywnej reakcji w obrębie naczyń krwionośnych siatkówki surowicę badano w kierunku obecności przeciwciał przeciwno komórkom śródbłonna naczyń krwionośnych (AECA) przy użyciu skrawków mięśnia lędźwiowo-biodrowego małpy i ludzkich komórek śródbłonna żyły pępownikowej (*human umbilical vein endothelial cells* – HUVEC) jako substratu.

W wybranych przypadkach wykonano kolorową fotografię preparatów przy użyciu dostawki cyfrowej fotograficznej firmy Zeiss.

3.2.11. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu StatSoft, Inc. (2010) STATISTICA (data analysis software system), version 9.1. <http://www.statsoft.com>. Dla porównania rozkładów zmiennych w dwóch grupach zastosowano test t-Studenta lub nieparametryczny test Manna i Whitneya. Przy porównywaniu rozkładów zmiennych w więcej niż dwóch grupach stosowano nieparametryczny test Kruskala i Wallisa, ewentualnie uzupełniony testem wielokrotnych porównań Dunna. Związek między zmiennymi jakościowymi badano w tabelach wielodzielczych przy zastosowaniu testu chi-kwadrat. W celu określenia siły związku pomiędzy zmiennymi typu ilorazowego (wielkość CNV, CRT) i typu porządkowego (rangowego) (BCVA, Sn, miano PPS) użyto współczynnika korelacji liniowej Pearsona lub korelacji rang Spearmana. Dla zbadania istotności współczynnika korelacji korzystano z testu t-Studenta. Zależność pomiędzy mianem PPS w surowicy a klinicznymi cechami aktywności wysiękowego AMD w trakcie kolejnych badań kontrolnych oceniano za pomocą współczynnika korelacji liniowej

Pearsona lub współczynnika rang Spearmana. W każdym badaniu kontrolnym analizie statystycznej poddawano tylko te PPS, które w badaniu wyjściowym występowały w najwyższym mianie, niezależnie od ich typu.

Przy przytaczaniu wyników analiz statystycznych podawano wartość prawdopodobieństwa p statystyki testowej. Jako istotne przyjęto wyniki, dla których $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Wyniki wyjściowego badania okulistycznego

Najczęściej zgłaszanymi przez chorych objawami było postępujące lub nagłe pogorszenie ostrości wzroku w dal i/lub z bliska, krzywienie linii, obecność „ciemnych plam” w centralnym polu widzenia, obniżenie postrzegania kontrastu oraz zaburzenia widzenia barwnego. Czas, jaki upłynął od chwili pojawienia się pierwszych objawów choroby do zgłoszenia się chorego do okulisty, wahał się od 2 tygodni do 7 miesięcy (średnio 8,2 tygodnia). W badaniu przedmiotowym u wszystkich chorych odnotowano nieprawidłowości w teście Amslera (tab. II). W badanej grupie chorych BCVA wynosiła od 0,05 do 0,5 w skali Snellena, ostrość wzroku z bliska (Sn) natomiast wahała się od 6,0 do 0,5 (tab. III). Nieprawidłowości przedniego odcinka leczonego oka przedstawiono w tabeli IV. Wyniki badania dna leczonego oka oraz oka towarzyszącego zamieszczono w tabeli V. Wartości ciśnienia wewnątrzgałkowego (Ta) w badanej grupie chorych wahały się od 12 do 22 mmHg (średnio 15,3 mmHg). W oparciu o wynik FA najczęściej rozpoznawano mieszaną postać CNV, tj. dominująco klasyczną oraz minimalnie klasyczną (61,1% przypadków), najrzadziej natomiast czystą postać klasyczną CNV (13,0% przypadków) (tab. VI). Największy wymiar liniowy CNV mierzony w FA wahał się od 1125 do 6680 μm (średnio 3502,4 μm). CRT oceniana w OCT wynosiła 204–864 μm (średnio 479,3 μm) (tab. VII). W oparciu o wynik badania klinicznego u wszystkich chorych rozpoznano 5. stadium wysiękowej postaci AMD według klasyfikacji Clinical Age-Related Maculopathy Staging System (CARMS) [159].

Szczegółowe wyniki wyjściowego badania okulistycznego przedstawiono w tabelach II–VII.

Tabela II

Nieprawidłowości w teście Amslera w badanej grupie chorych

Test Amslera	Liczba oczu
Metamorfopsje	99 [91,7%]
Linie siatki widoczne niewyraźnie	69 [63,9%]
Mroczek/mroczki paracentralne	53 [49,1%]
Mroczek/mroczki centralne (punkt fiksacji niewidoczny)	32 [29,7%]

Tabela III

Najlepiej skorygowana ostrość wzroku w dal (BCVA) i z bliska (Sn)
w badanej grupie chorych

BCVA	Liczba oczu
0,05–0,1	54 [50%]
0,2–0,3	31 [28,7%]
0,4–0,5	23 [21,3%]
0,6–1,0	0 [0%]
Sn	Liczba oczu
6,0–3,0	38 [35,2%]
2,25–1,5	35 [32,4%]
1,25–0,5	35 [32,4%]

Tabela IV

Nieprawidłowości w przednim odcinku leczonego oka w badanej grupie chorych

Przedni odcinek gałki ocznej	Liczba oczu
Rzekomosooczewkowość	39 [36,1%]
Zaćmienia w soczewce	51 [47,2%]
WzmóŜona opalescencja soczewki	18 [16,7%]
Obwódka starcza	38 [35,2%]
Skrzydlik	2 [1,7%]
Wywinięcia listka barwnikowego tęczówki	8 [7,4%]
Przymglenia rogówki	12 [11,1%]

Tabela V

Zmiany w plamce oka leczonego oraz w dnie oka towarzyszącego w badanej grupie chorych

Dno oka leczonego	Liczba oczu
Szarzielone ognisko podsiatkówkowe (CNV)	65 [60,2%]
Wybroczyny/krwotoki podsiatkówkowe	72 [66,6%]
Obrzęk siatkówki	81 [75,0%]
Twarde wysięki	7 [6,5%]
Zaniki RPE	19 [17,6%]
Druzy	48 [44,4%]
Surowicze odwarstwienie RPE	12 [11,1%]
Dno oka towarzyszącego	Liczba oczu
Druzy twarde	22 [20,4%]
Druzy miękkie	49 [45,4%]
Druzy mieszane	57 [52,8%]
Hipo- lub hiperpigmentacja RPE	68 [62,9%]
Zanik geograficzny	25 [23,1%]
Tarczowata blizna	34 [31,5%]

Tabela VI

Rodzaj neowaskularyzacji naczyniówkowej (CNV) na podstawie angiografii fluoresceinowej (FA) i średnia wielkość CNV w badanej grupie chorych

Rodzaj CNV w FA	Liczba oczu
Klasyczna	14 [13,0%]
Dominująco klasyczna	48 [44,4%]
Minimalnie klasyczna	18 [16,7%]
Ukryta	28 [25,9%]
Średnia wielkość CNV	3502,4 μm (min. 1125 μm – maks. 6680 μm)

Tabela VII

Wyniki badania OCT w badanej grupie chorych

Centralna grubość siatkówki (CRT)	Liczba oczu
< 300 μm	76 [70,3%]
\geq 300 μm	32 [29,7%]
średnia CRT	479,3 μm (min. 204 μm – maks. 864 μm)
Przestrzenie płynowe	Liczba oczu
Śródsiatkówkowe	89 [82,4%]
Pod neurosensoryczną siatkówką	86 [79,6%]
Pod nabłonkiem barwnikowym siatkówki	38 [35,2%]

4.2. Przeciwciała przeciwiśiatkówkowe w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem i w grupie kontrolnej w badaniu wyjściowym

W badaniu wyjściowym spośród 98 chorych z wysiękową postacią AMD w surowicy 94 (95,9%) wykazano obecność PPS, które występowały w mianach od 1:40 do 1:5120. W grupie kontrolnej PPS występowały w 32% badanych surowic, a ich miana wahały się od 1:10 do 1:40. W pozostałych 68% kontrolnych surowic nie stwierdzono obecności krążących PPS (ryc. 11). Różnica w częstości występowania krążących PPS w kontrolnych surowicach oraz w surowicy chorych na AMD była istotna statystycznie ($p = 0,0000$), podobnie jak wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy poziomami tych autoprzeciwciał w obu grupach ($p = 0,0000$) (ryc. 12).

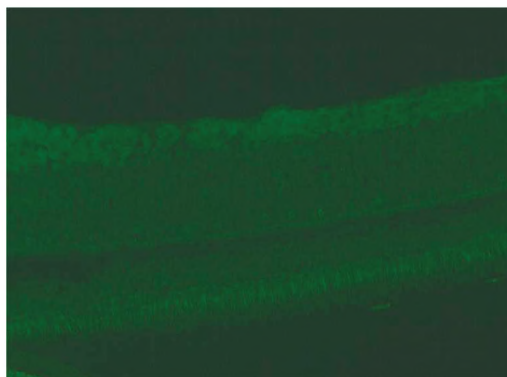
W badanej grupie chorych najwyższe miana PPS odnotowano w przypadkach z obustronną CNV ($n = 10$) (1:160–1:5120). W surowicy chorych z obecnością CNV w jednym oku oraz druz miękkich i/lub przegrupowań barwnika na poziomie RPE w oku towarzyszącym ($n = 54$) miana krążących PPS wahały się od 1:80–1:640. U pacjentów z tarczową blizną w jednym oku i czynną CNV w oku towarzyszącym ($n = 30$) PPS występowały w mianach od 1:40 do 1:160. Szczegółowy rozkład mian PPS w przedstawionych powyżej grupach chorych zaprezentowano na rycinie 13.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy mianem PPS w surowicy a wiekiem i płcią chorych.

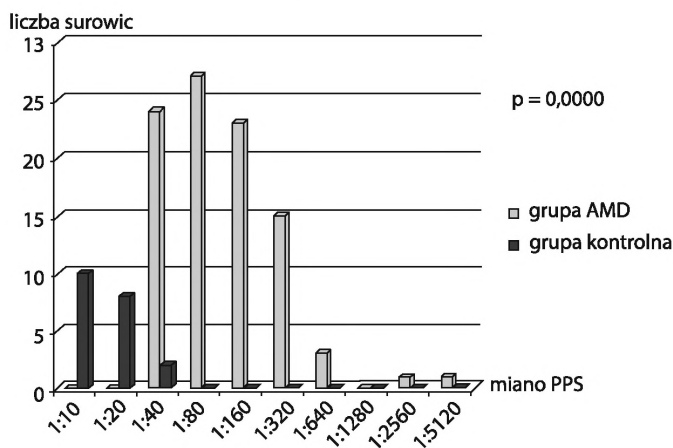
W grupie chorych na AMD zidentyfikowano pięć różnych idiotypów PPS, podczas gdy grupa kontrolna wykazała cztery typy immunofluorescencji. Najczęściej w surowicy chorych na AMD występowały PPS reagujące z warstwą włókien nerwowych (60,2%) (ryc. 14), pręcikami (55,1%) (ryc. 15) oraz czopkami (43,9%) (ryc. 16). U prawie połowy chorych z pozytywną immunofluorescencją czopków wykazano reakcję tylko ze szczytem tych komórek (ryc. 17). Najrzadziej natomiast obserwowano reakcję z cytoplazmą komórek warstwy jądrazstej wewnętrznej i zewnętrznej (16,3%) (ryc. 18) oraz przeciwko komórkom zwojowym siatkówki (9,2%) (ryc. 19). W grupie kontrolnej zaobserwowano obecność immunofluorescencji na poziomie warstwy włókien nerwowych (26%), pręcików (22%), komórek zwojowych (16%) i czopków (4%). Różnice w rozkładzie idiotypów PPS w surowicy chorych na AMD i w grupie kontrolnej były istotne statystycznie dla czterech idiotypów PPS ($p = 0,0000$). Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie różnicy w występowaniu krążących przeciwciał przeciwko komórkom zwojowym siatkówki w grupie kontrolnej i w grupie AMD ($p = 0,8379$).

Szczegółową charakterystykę idiotypów PPS, występujących w surowicy chorych na AMD oraz w grupie kontrolnej, przedstawiono na rycinie 20.

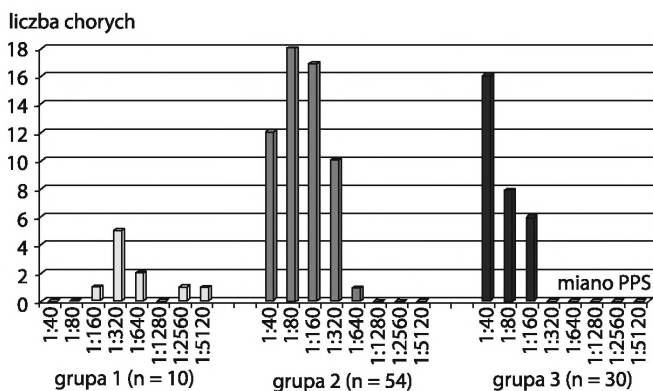
W badanej grupie chorych stwierdzono obecność przeciwciał przeciwjądrowych (*antinuclear antibodies* – ANA) w surowicy 21 chorych (21,4%) w mianach od 1:10 do 1:160; najczęściej były to przeciwciała o homogennym typie świecenia, a w dwóch przypadkach dające ziarnistą reakcję z jądrami obu warstw jądrazstych siatkówki (ryc. 21 i 22). Ponieważ częstość występowania ANA wzrasta z wiekiem, analizie nie poddawano tych autoprzeciwciał. Ze względu na możliwość występowania fałszywie dodatnich wyników testu dla ANA, m.in. u chorych z zapaleniami błony naczyniowej oka, uważa się, iż rutynowe oznaczanie tych autoprzeciwciał u chorych z izolowanymi



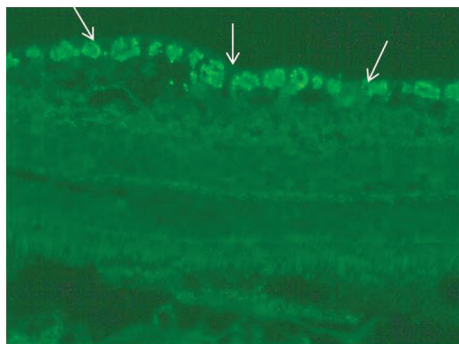
Ryc. 11. Skrawek siatkówki małej w mikroskopie fluorescencyjnym po reakcji z surowicą kontrolną – brak immunofluorescencji substratu wskazuje na nieobecność PPS



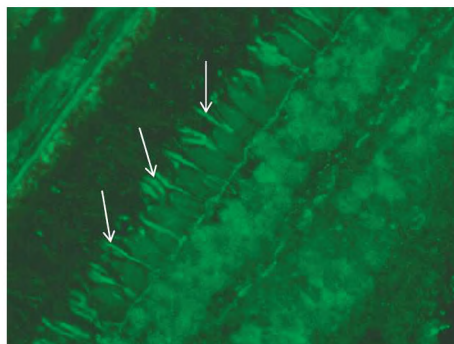
Ryc. 12. Porównanie rozkładu mian przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS) w grupie chorych na AMD oraz w grupie kontrolnej



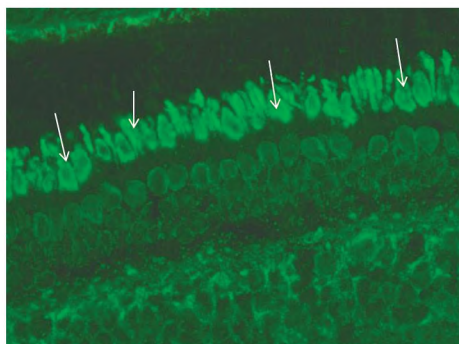
Ryc. 13. Rozkład mian przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS) w surowicy chorych na AMD: grupa 1 – chorzy z obustronną CNV; grupa 2 – chorzy z CNV w jednym oku i druzami lub przegrupowaniami barwnika w oku towarzyszącym; grupa 3 – chorzy z CNV w jednym oku i blizną w plamce w oku towarzyszącym



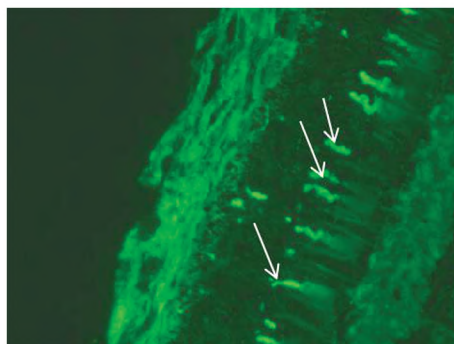
Ryc. 14. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) reagujące z włóknami nerwowymi siatkówki (strzałki)



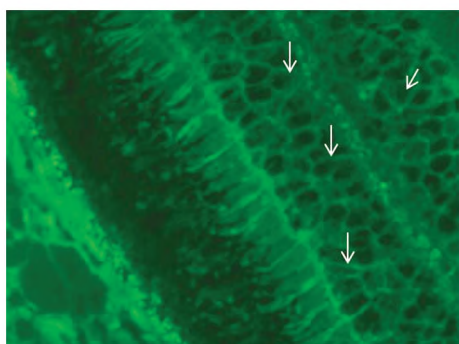
Ryc.15. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) reagujące z komórkami pręcikowymi siatkówki (strzałki)



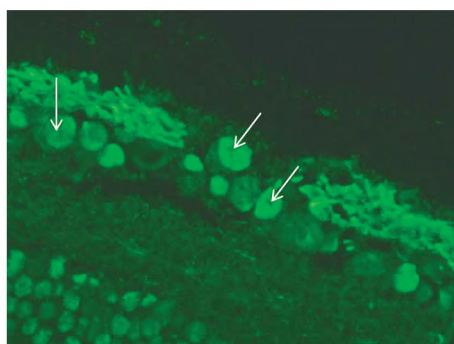
Ryc. 16. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) reagujące z komórkami czopkowymi siatkówki (strzałki)



Ryc. 17. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) reagujące ze szczytami czopków siatkówki (strzałki)



Ryc. 18. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) reagujące z cytoplazmą komórek warstwy jądrazstej wewnętrznej i zewnętrznej siatkówki (strzałki)



Ryc. 19. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) reagujące z komórkami zwojowymi siatkówki (strzałki)

schorzeniami narządu wzroku nie ma większej wartości diagnostycznej [242, 268]. We wszystkich przypadkach występujące w surowicy 21 chorych na AMD ANA współlistniały z innymi autoprzeciwciałami dającymi pozytywną reakcję z siatkówką w teście IIF. Dla porównania: w grupie kontrolnej ANA występowały u 13 osób (26%), a ich miana wahały się od 1:40 do 1:160. W 12 przypadkach były to ANA o homogennym typie świecenia, a w jednym o typie ziarnistym. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania oraz w mianach i typach immunofluorescencji ANA w badanej grupie chorych oraz w grupie kontrolnej.

W 61,2% surowic chorych na AMD stwierdzono więcej niż jeden typ immunofluorescencji, tzn. autoprzeciwciała wykazywały swoistość względem więcej niż jednej grupy komórek siatkówki, podczas gdy 38,8% badanych surowic wykazało obecność tylko jednego typu reakcji. W grupie kontrolnej natomiast mnogość PPS stwierdzono tylko w 15% surowic, znacznie częściej natomiast, bo aż w 85% przypadków, wykazano tylko jeden rodzaj reakcji z siatkówką. Te różnice w występowaniu różnej liczby idiotypów PPS w surowicy chorych na AMD i w grupie kontrolnej były istotne statystycznie dla obecności w surowicy dwóch, trzech oraz czterech typów autoprzeciwciał.

Szczegółowe zestawienie różnic w liczbie idiotypów PPS w badanych oraz kontrolnych surowicach przedstawiono w tabeli VIII.

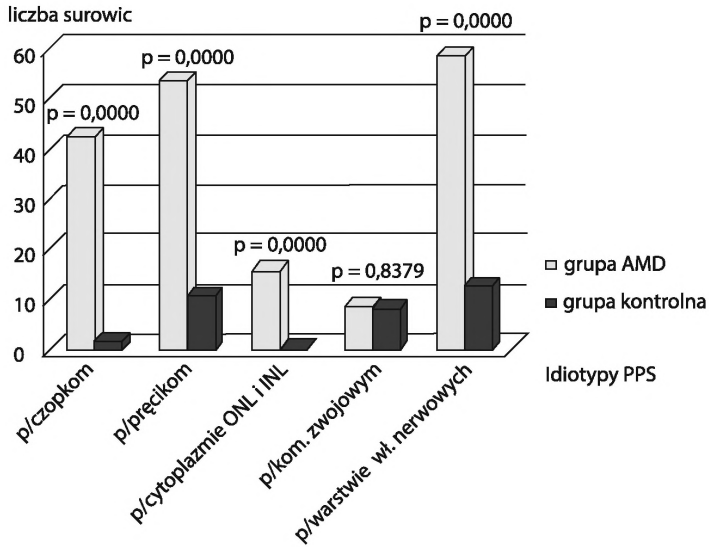
Nie wykazano korelacji pomiędzy idiotypami krążącymi PPS a wiekiem i płcią badanych osób.

4.3. Przeciwciała przeciwsiatkówkowe w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem a zaawansowanie zmian zwyrodnieniowych w plamce w badaniu wyjściowym

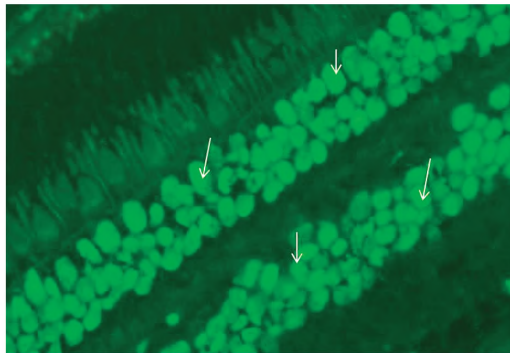
Ze względu na występowanie u większości chorych mnogości idiotypów PPS w surowicy dla ułatwienia interpretacji uzyskanych wyników oraz monitorowania zachowania się tych autoprzeciwciał w okresie prowadzonej obserwacji w kolejnych badaniach kontrolnych analizie poddano tylko te PPS, które w wyjściowym badaniu występowały w największym, maksymalnym mianie (PPS_{max}), niezależnie od idiotypu.

W badaniu wyjściowym wykazano dodatnią istotną statystycznie zależność pomiędzy mianem PPS_{max} w surowicy chorych na AMD a wielkością CNV ocenianą w FA ($p = 0,0000$) oraz CRT mierzoną w OCT ($p = 0,0000$). Ponadto wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy średnim mianem PPS_{max} a typem CNV. Największą średnią wartość miana PPS_{max} obserwowano w grupie pacjentów z minimalnie klasyczną i ukrytą CNV (1:160), a najniższą medianę miana PPS_{max} stwierdzono w grupie chorych z klasyczną postacią CNV (1:40). Różnice te pomiędzy grupami chorych z minimalnie klasyczną i ukrytą oraz klasyczną postacią CNV były istotne statystycznie ($p = 0,0002$).

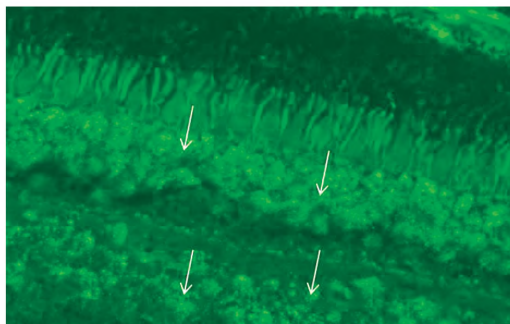
Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała zależności pomiędzy idiotypami PPS a rodzajem i aktywnością CNV. Odnotowano natomiast istotną statystycznie korelację pomiędzy aktywnością i zaawansowaniem zmian zwyrodnieniowych w plamce, ocenianych jako średnica CNV i CRT, a mnogością idiotypów krążących PPS, przy czym wzrost liczby idiotypów PPS w surowicy powyżej trzech nie korelował już istotnie ze



Ryc. 20. Rozkład idiotypów krążących przeciwciał przeciwiątkówkowych (PPS) w surowicy chorych na AMD oraz w grupie kontrolnej



Ryc. 21. Skrawek siatkówki małej (IIF) – przeciwciała przeciwiątkówkowe (PPS) reagujące z warstwą jądrazastą wewnętrzną i zewnętrzną – typ świecenia homogenny (strzałki)



Ryc. 22. Skrawek siatkówki małej (IIF) – przeciwciała przeciwiątkówkowe (PPS) reagujące z warstwą jądrazastą wewnętrzną i zewnętrzną – typ świecenia ziarnisty (strzałki)

Tabela VIII

Zestawienie występowania różnej liczby idiotypów przeciwciał przeciwiśiatkówkowych (PPS) w surowicy chorych na AMD oraz w grupie kontrolnej

Liczba idiotypów PPS w badanej surowicy	Liczba surowic z grupy chorych na AMD	Liczba surowic z grupy kontrolnej	P
Mnogość idiotypów PPS	60 [61,2%]	34 [15,0%]	0,0000
Jeden idiotyp PPS	38 [38,8%]	16 [85%]	0,1921
Dwa idiotypy PPS – przeciwko czopkom + pręcikom – przeciwko pręcikom + cytoplazmie – przeciwko komórkom zwojowym + warstwie włókien nerwowych	16 [16,3%] 12 [12,2%] 8 [8,2%]	0 [0%] 0 [0%] 4 [15,0%]	0,0016
Trzy idiotypy PPS – przeciwko czopkom + pręcikom + warstwie włókien nerwowych	21 [21,4%]	0 [0%]	0,0000
Cztery idiotypy PPS – przeciwko czopkom + pręcikom + warstwie włókien nerwowych + komórkom śródbłonna naczyń krwionośnych	3 [3,1%]	0 [0%]	0,0000

wzrostem nasilenia klinicznych objawów aktywności CNV. W grupie chorych, u których stwierdzono występowanie kilku idiotypów PPS, średnia wielkość CNV oraz średnia wartość CRT różniły się istotnie statystycznie od wartości, jakie stwierdzono w surowicy osób, u których wykazano jeden rodzaj PPS; obie te cechy kliniczne miały średnie wartości większe w grupie chorych, u których odnotowano więcej niż jeden idiotyp PPS (tab. IX).

Nie wykazano zależności pomiędzy mianem, rodzajem i mnogością idiotypów PPS w surowicy chorych na AMD a funkcją leczonego oka.

Szczegółowe porównanie miana i rodzaju PPS_{max} oraz liczby idiotypów PPS w surowicy chorych na AMD a cechami klinicznymi choroby, takimi jak: rodzaj i wielkość CNV, CRT oraz funkcją leczonego oka (BCVA i Sn), przedstawiono w tabeli X.

4.4. Przeciwciała przeciwko komórkom śródbłonna w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem i w grupie kontrolnej w badaniu wyjściowym

U 30 chorych (30,6%) na AMD w teście IIF przy użyciu siatkówki małpiej jako substratu stwierdzono reakcję badanych surowic z naczyniami krwionośnymi siatkówki (ryc. 23), przy czym w czterech przypadkach (4,1%) były to jedyne autoprzeciwciała jakie wykazano w surowicy chorych w badaniu wyjściowym przy użyciu tej metody. Testy

Tabela IX

Porównanie średniej wielkości neowaskularyzacji naczyńwłkowej (CNV) oraz średniej grubości centralnej siatkówki (CRT) u chorych z jednym idiotypem oraz wieloma idiotypami krążących przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS)

Badana cecha kliniczna	Chorzy z jednym idiotypem PPS	Chorzy z wieloma idiotypami PPS
Średnia wielkość CNV	2960 μm	3709 μm
Średnia CRT	422 μm	501 μm

Tabela X

Zależności pomiędzy mianem przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS_{max}), idiotypami PPS_{max} i mnogością występowania idiotypów PPS w surowicy a cechami klinicznymi choroby, tj. rodzajem i wielkością neowaskularyzacji naczyńwłkowej (CNV), grubością centralnej siatkówki (CRT) oraz funkcją leczonego oka (BCVA, Sn)

Badana cecha kliniczna	Miano PPS _{max}	Idiotyp PPS _{max}	Mnogość idiotypów PPS w surowicy
Rodzaj CNV	p = 0,0002	ns	ns
Średnica CNV	p = 0,0000	ns	p = 0,0108
CRT	p = 0,0000	ns	p = 0,0210
BCVA	ns	ns	ns
Sn	ns	ns	ns

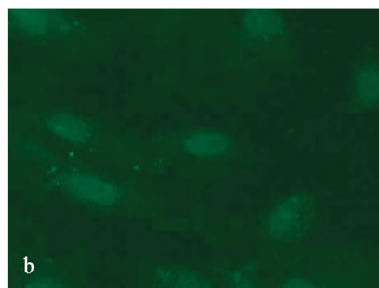
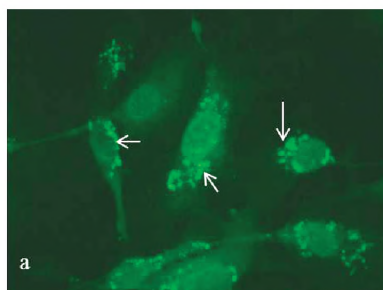
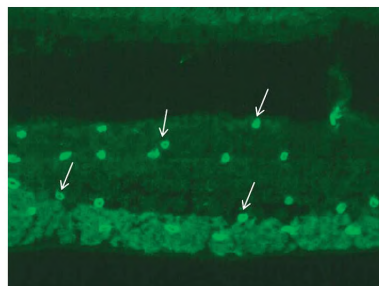
IIF wykonane z zastosowaniem komórek HUVEC (ryc. 24a i 24b) oraz komórek mięśnia łądźwiowo-biodrowego małpy (ryc. 25a i 25b) potwierdziły obecność przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonna (*anti-endothelial cell antibody* – AECA) we wszystkich 30 badanych surowicach. Miano AECA wahało się od 1:10 do 1:320.

W grupie kontrolnej AECA wykazano tylko w 9 przypadkach (18%), a miana tych autoprzeciwciał wahały się od 1:20 do 1:80 (ryc. 26).

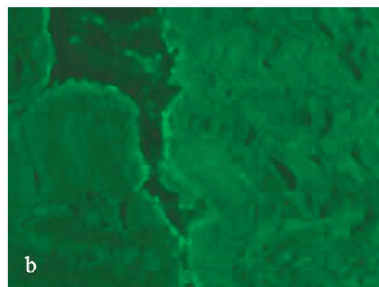
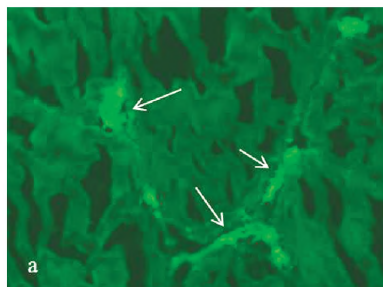
Różnica w częstości występowania AECA w surowicy chorych na AMD i w grupie kontrolnej była istotna statystycznie (p = 0,0000). Nie wykazano jednak istotnych różnic pomiędzy średnimi mianami AECA w wyjściowym badaniu pomiędzy tymi dwiema grupami. Wynik testu należy jednak traktować ostrożnie z powodu dużej dysproporcji w liczbie danych w obu grupach.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznie zależności pomiędzy występowaniem AECA w surowicy chorych na AMD a cechami klinicznej aktywności zmian zwyrodnieniowych w plamce.

Ryc. 23. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – immunofluorescencja naczyń krwionośnych siatkówki – przekroje poprzeczne (białe strzałki)

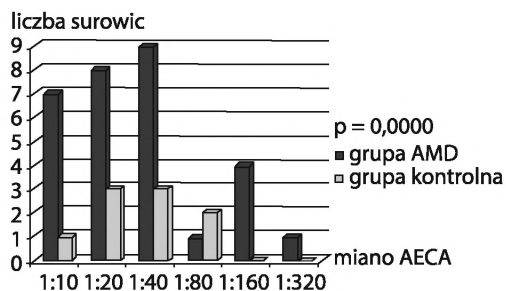


Ryc. 24 a, b. Skrawek mięśnia lędźwiowo-biodrowego małpy (IIF) – typ świecenia przeciwciał przeciw komórkom śródbłonna naczyń krwionośnych (strzałki) (a); kontrola ujemna (b)



Ryc. 25 a, b. Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC, IIF) – typ świecenia przeciwciał przeciw antygenom cytoplazmy komórek śródbłonna naczyń (AECA, strzałki) (a); kontrola ujemna (b)

Ryc. 26. Rozkład mian przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonna (AECA) w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanej z wiekiem (AMD) oraz w grupie kontrolnej



4.5. Wyniki kontrolnych badań okulistycznych

Największą poprawę BCVA odnotowano podczas dwóch pierwszych badań kontrolnych, tj. po pierwszej i drugiej iniekcji doszklistkowej bewacizumabu. W trzecim i czwartym badaniu kontrolnym zaobserwowano stabilizację średniej BCVA, która utrzymywała się na średnim poziomie wynoszącym około 0,3 w skali Snellena. W V, VI oraz VII badaniu kontrolnym średnie wartości BCVA nieznacznie się obniżyły, a w ostatnim badaniu średnia BCVA ponownie osiągnęła wyższe wartości, podobne do tych w badaniu kontrolnym IV. Zmiany BCVA oraz wykresy średnich i przedziałów ufności (95%) BCVA w kolejnych miesiącach obserwacji przedstawiono na rycinach 27 i 28.

Podobnie największą poprawę średniej ostrości wzroku z bliska (Sn) odnotowano w ciągu pierwszych trzech miesięcy leczenia (faza „nasycająca” leczenia). W IV i V badaniu kontrolnym stwierdzono pogorszenie średniej ostrości wzroku z bliska (Sn), która następnie nieznacznie poprawiła się i ustabilizowała w VI–VII badaniu kontrolnym (7. i 8. miesiąc obserwacji) na średnim poziomie 1,25–1,5 w skali Snellena. Zmiany Sn oraz wykres średniej i przedziałów ufności (95%) Sn przedstawiono na rycinach 29 i 30.

Pod koniec okresu obserwacji, tj. podczas VIII badania kontrolnego, poprawę BCVA o co najmniej dwie linie w skali Snellena w stosunku do wartości wyjściowej stwierdzono w 35 oczach (32,4%). W 63 oczach (58,3%) wykazano stabilizację ostrości wzroku, tj. brak poprawy, pogorszenie lub poprawę BCVA o jedną linię w skali Snellena, a w 10 oczach (9,3%) obserwowano pogorszenie BCVA, oceniane jako spadek ostrości wzroku o dwie linie, co było spowodowane powstaniem blizny w plamce leczonego oka. Odsetek chorych z poprawą, stabilizacją oraz pogorszeniem BCVA w stosunku do wartości wyjściowej w 8. miesiącu obserwacji, przedstawiono na rycinie 31.

W ostatnim badaniu kontrolnym największą grupę chorych (54,6%) stanowiły osoby, u których stwierdzono stabilizację ostrości wzroku z bliska (Sn), ocenianą jako brak zmiany, pogorszenie lub poprawę funkcji o jeden rząd w skali Snellena. Poprawa ostrości wzroku z bliska wystąpiła w 32,4% przypadków (poprawa o co najmniej dwa rzędy), a u 13% oczu wykazano pogorszenie widzenia z bliska (obniżenie ostrości wzroku o więcej niż jeden rząd). Średnią zmianę Sn w stosunku do wartości wyjściowej w badanej grupie chorych w 8. miesiącu obserwacji przedstawiono na rycinie 32.

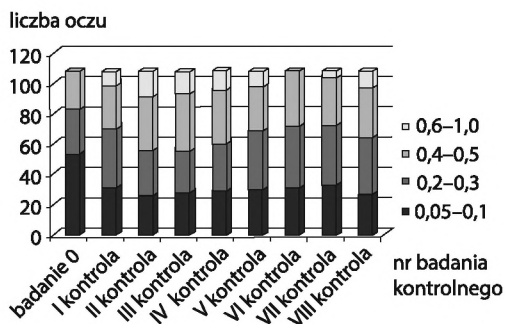
W okresie leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu wykazano zmniejszenie się CRT. Największą redukcję średniej CRT odnotowano podczas dwóch pierwszych miesięcy obserwacji – odpowiednio o 42% i 23% w pierwszym i drugim badaniu kontrolnym (ryc. 33).

W okresie prowadzonej obserwacji CRT w dołku uległa istotnemu zmniejszeniu w stosunku do wartości wyjściowych; grubość ta zmniejszyła się w okresie ośmiu miesięcy leczenia średnio o ponad 250 μm ($p = 0,0011$). Średnią CRT w badanej grupie chorych w badaniu wyjściowym oraz pod koniec okresu obserwacji przedstawiono na rycinie 34.

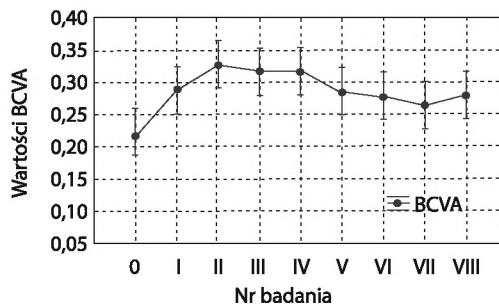
Wyniki ośmiomiesięcznej obserwacji wykazały istotne zmniejszenie się średniej wielkości CNV ocenianej w FA ($p = 0,001$) (ryc. 35).

Pod koniec okresu obserwacji kontrolne badanie FA wykazało całkowity brak przecieku z CNV w 49 oczach, podczas gdy w 53 stwierdzono obecność resztkowego przecieku z CNV. W sześciu oczach badanie wykazało zatrzymanie kontrastu w CNV (*staining*), co wskazywało na cechy bliznowacenia CNV (ryc. 36).

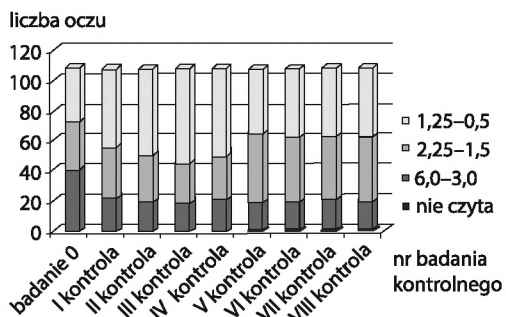
Ryc. 27. Zmiany najlepiej skorygowanej ostrości wzroku w dal (BCVA) w oczach z wysiękową postacią AMD w okresie obserwacji



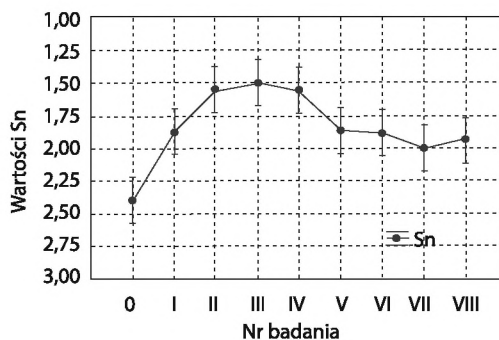
Ryc. 28. Wykres średnich oraz 95% przedziały ufności najlepiej skorygowanej ostrości wzroku w dal (BCVA) w kolejnych badaniach kontrolnych

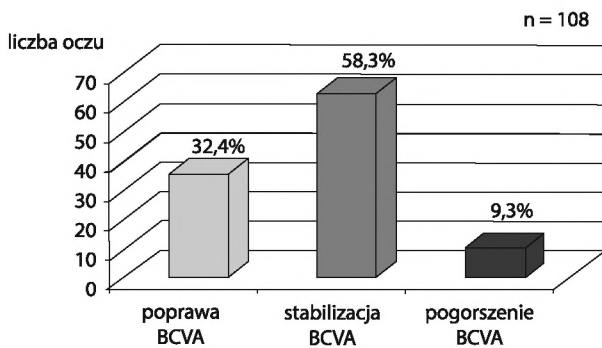


Ryc. 29. Zmiany ostrości wzroku z bliska (Sn) w oczach z wysiękową postacią AMD w kolejnych badaniach kontrolnych

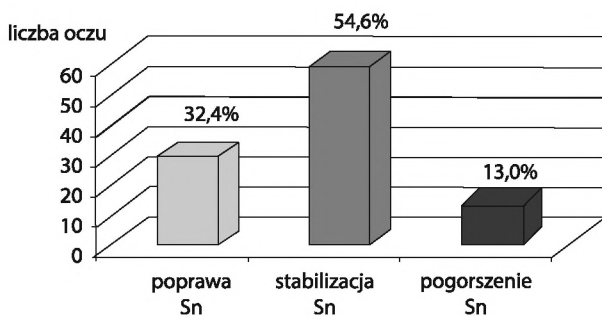


Ryc. 30. Wykres średnich oraz 95% przedziały ufności ostrości wzroku z bliska (Sn) w kolejnych miesiącach leczenia

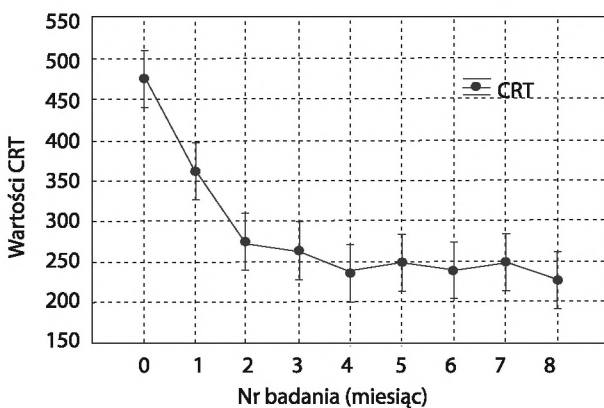




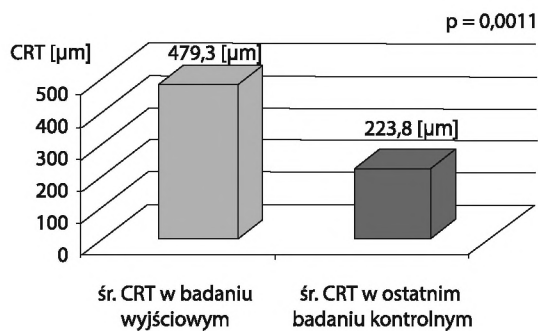
Ryc. 31. Odsetek oczu z poprawą, stabilizacją i pogorszeniem najlepiej skorygowanej ostrości wzroku w dal (BCVA) w ostatnim badaniu kontrolnym



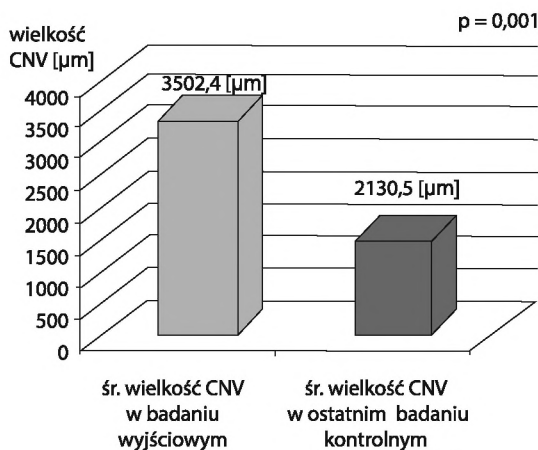
Ryc. 32. Odsetek oczu z poprawą, stabilizacją i pogorszeniem ostrości wzroku z bliska (Sn) w ostatnim badaniu kontrolnym



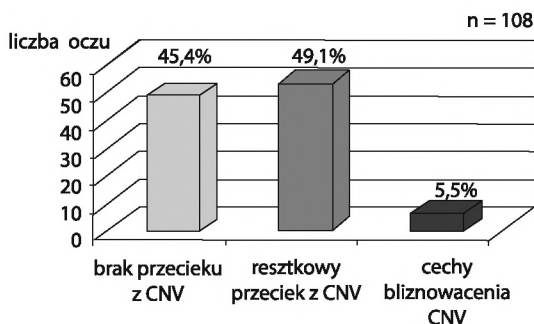
Ryc. 33. Wykres średnich oraz przedziały ufności (95%) grubości centralnej siatkówki (CRT) w okresie obserwacji



Ryc. 34. Średnia grubość centralnej siatkówki (CRT) oceniana w OCT w badanej grupie chorych w badaniu wyjściowym oraz w ostatnim badaniu kontrolnym



Ryc. 35. Średnia wielkość neowaskularyzacji naczyniówkowej (CNV) oceniana w angiografii fluoresceinowej (FA) w wyjściowym oraz ostatnim badaniu kontrolnym



Ryc. 36. Odsetek oczu bez przecieku, z resztkowym przeciekiem oraz cechami bliznowacenia neowaskularyzacji naczyniówkowej (CNV) w angiografii fluoresceinowej (FA) w ostatnim badaniu kontrolnym

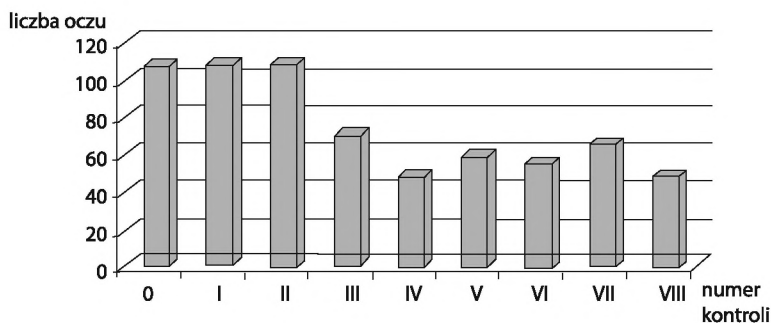
4.6. Liczba wykonanych doszklistkowych iniekcji bewacizumabu (Avastin) w badanej grupie chorych w okresie ośmiomiesięcznej obserwacji

W okresie ośmiomiesięcznej obserwacji w badanej grupie chorych wykonano 636 doszklistkowych iniekcji bewacizumabu. U 10 chorych, u których zdiagnozowano obustronną czynną CNV, odstęp czasu pomiędzy wykonywanymi iniekcjami do obu oczu wynosił 7–10 dni.

Na rycinie 37 przedstawiono liczbę doszklistkowych iniekcji bewacizumabu wykonanych podczas ośmiomiesięcznego okresu obserwacji.

W badanej grupie chorych wykonano 3–9 doszklistkowych iniekcji bewacizumabu (średnio 5,9 iniekcji). Najczęściej chorzy otrzymywali 5–6 iniekcji (50,9%), natomiast najmniejszą liczbę iniekcji, w liczbie trzech, podano w 3 oczach (2,8%) (tab. XI).

W okresie prowadzonych badań tylko u trzech chorych po fazie „nasycającej” leczenia uzyskano stabilizację stanu miejscowego w obrazie OCT oraz funkcji leczonego oka bez konieczności kontynuacji terapii w fazie „podtrzymującej” leczenia. W ośmiu



Ryc. 37. Liczba doszklistkowych iniekcji bewacizumabu (Avastin) wykonanych w kolejnych miesiącach leczenia

Tabela XI

Liczba doszklistkowych iniekcji bewacizumabu i liczba oczu, w których wykonano iniekcje w okresie prowadzonego leczenia

Liczba doszklistkowych iniekcji	Liczba oczu
3	3
4	17
5	25
6	30
7	18
8	7
9	8

przypadkach natomiast ze względu na utrzymujące się przestrzenie płynowe pod neurosensoryczną siatkówką i/lub pod RPE oraz niestabilną, zmienną funkcję leczonego oka w kolejnych badaniach kontrolnych iniekcje bewacizumabu podawano co miesiąc przez cały okres obserwacji. W grupie tej znalazła się m.in. chora jednooczna (stan po wyłuszczeniu gałki ocznej lewej z powodu przebytego urazu oka 60 lat temu) oraz pięciu chorych z tarczowatą blizną w płamce oka towarzyszącej.

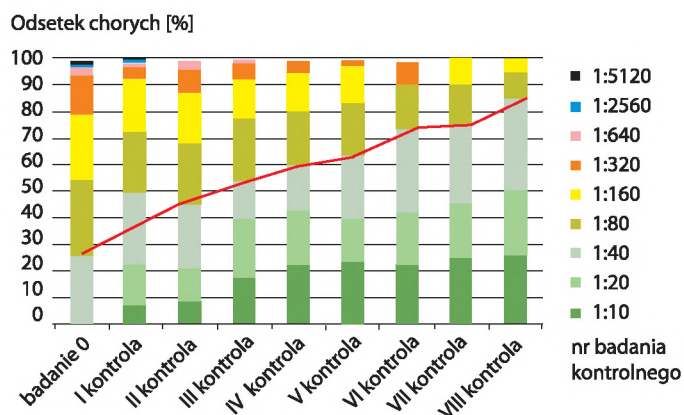
U sześciu chorych w okresie pomiędzy 4. a 7. miesiącem obserwacji z powodu wystąpienia cech bliznowacenia CNV pomimo leczenia – terapię przerwano. U tych chorych w kolejnych miesiącach obserwacji kontynuowano jedynie badania kontrolne, obejmujące okulistyczną ocenę narządu wzroku oraz oznaczenie PPS w surowicy.

Podczas całego okresu obserwacji poza przejściowymi wzrostami ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz pojawieniem się krwawienia podspojówkowego w miejscu wykonania iniekcji nie odnotowano innych, niepożądanych, miejscowych zdarzeń związanych z zabiegiem doszklistkowego podania leku. W żadnym przypadku nie pojawiły się ogólnoustrojowe powikłania związane z leczeniem antyangiogenym.

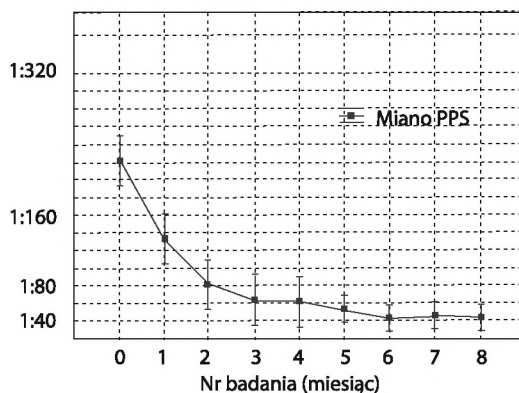
Wszystkich 98 chorych z wysiękową postacią AMD objętych leczeniem doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu ukończyło badanie.

4.7. Zachowanie się miana PPS_{max} w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem w okresie leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin) oraz zależność pomiędzy dynamiką zmian miana PPS_{max} a klinicznymi cechami aktywności choroby

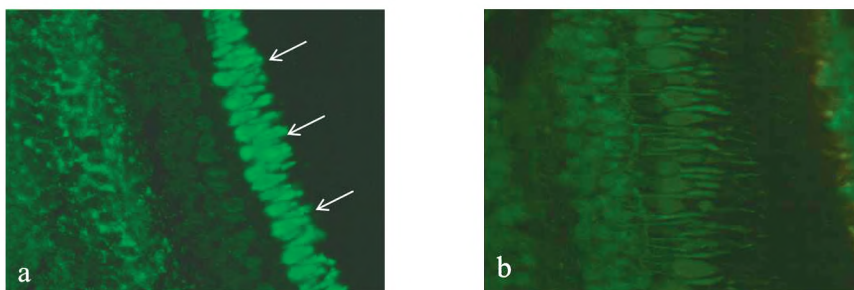
Na podstawie przeprowadzonych obserwacji można zauważyć wyraźne obniżenie się poziomu PPS_{max} w surowicy chorych na AMD w wyniku zastosowanego leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (ryc. 38 i 39).



Ryc. 38. Szczegółowy rozkład mian przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS_{max}) w surowicy chorych na AMD w czasie kolejnych badań kontrolnych (niebieską linią zaznaczono wzrastającą w okresie prowadzonej obserwacji liczbę chorych z niskimi mianami PPS_{max})



Ryc. 39. Średnie i 95% przedziały ufności maksymalnego miana przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS_{max}) w kolejnych badaniach kontrolnych



Ryc. 40 a, b. Skrawek siatkówki małpy (IIF) – immunofluorescencja w warstwie komórek fotoreceptorowych (rozcieńczenie surowicy 1:80, strzałki) (a); surowica tego samego chorego po trzech doszkliskowych iniekcjach bewacizumabu – nie stwierdzono obecności PPS (b)

Już w pierwszym miesiącu od włączenia leczenia pojawił się istotny statystycznie spadek miana PPS_{max} ($p = 0,006$), jak również w tym okresie obserwowano największą dynamikę obniżania poziomu PPS_{max}, która wynosiła średnio 58%. W drugim miesiącu obserwacji również stwierdzono istotny spadek miana krążących PPS_{max} ($p = 0,009$), a dynamika spadku miana PPS_{max} była również wysoka i wynosiła średnio 49%. W trzecim miesiącu od rozpoczęcia leczenia miana PPS_{max} zmniejszyły się średnio o 21% w porównaniu z poprzednim badaniem ($p = 0,01$). W kolejnych badaniach kontrolnych (IV–VIII) dynamika zmiany poziomu PPS_{max} w surowicy wyraźnie się zmniejszyła, a średnie zmiany poziomu PPS_{max} były nieistotne statystycznie. W okresie fazy „nasycającej” leczenia średnie miano PPS_{max} spadło z poziomu 1:160 do 1:40. W kolejnych badaniach kontrolnych, obejmujących fazę „podtrzymującą” leczenia, średnie miano PPS_{max} w surowicy chorych na AMD oscylowało wokół wartości 1:40 i wykazywało tendencję do nieznacznego obniżania się ($p = ns$).

Po pierwszym miesiącu leczenia zmniejszenie się poziomu PPS_{max} w surowicy wystąpiło u 53 chorych (54,1%). Spadek miana o jedno rozcieńczenie stwierdzono u 35 chorych, o dwa – u 14, a w 4 przypadkach miano PPS_{max} obniżyło się trzykrotnie w porównaniu z badaniem wyjściowym. U 40 chorych miano PPS_{max} w surowicy utrzymywało się na niezmiennym poziomie w porównaniu z wynikiem wyjściowym testu. U dwóch chorych stwierdzono wzrost poziomu PPS_{max} w surowicy o dwa miana.

W drugim badaniu kontrolnym odnotowano zmniejszenie się miana PPS_{max} u 55 chorych, o jedno miano u 30, o dwa u 18 i o trzy miana u 7 chorych, podczas gdy w 39 przypadkach poziom PPS_{max} pozostał niezmienny. W jednym przypadku miano PPS_{max} spadło do zera, ale pojawiły się nowe, niewykrywalne do tej pory PPS skierowane przeciwko komórkom czopkowym w mianie 1:40. U chorego, u którego w poprzednim badaniu stwierdzono wzrost miana PPS_{max} w surowicy, pozostało ono na tym samym poziomie.

W kolejnym badaniu u 48 chorych miana PPS_{max} pozostały niezmienione w porównaniu z poprzednim badaniem, natomiast u 43 odnotowano zmniejszenie się miana PPS_{max} o jedno do trzech mian. Trzy surowice wykazały wzrost poziomu PPS_{max} o trzy miana w porównaniu z poprzednim badaniem kontrolnym. W 13 surowicach pojawiły się nowe PPS (1:20–1:80), skierowane przeciwko komórkom czopkowym, warstwie włókien nerwowych i komórkom zwojowym siatkówki.

Po czterech miesiącach poziom krążących PPS_{max} pozostał stabilny aż u 69 chorych. Dalsze obniżanie się miana PPS_{max} w surowicy odnotowano w 20 przypadkach, podczas gdy w czterech test IIF wykazał wzrost poziomu tych autoprzeciwciał o jedno miano, a w jednym przypadku o trzy. U 11 chorych pojawiły się nowe, niewystępujące wcześniej PPS w mianie 1:10–1:40, reagujące z czopkami oraz z komórkami zwojowymi siatkówki.

W V badaniu kontrolnym zaobserwowano większą różnorodność zmian poziomu PPS_{max} w surowicy chorych na AMD. U 35 chorych odnotowano spadek miana PPS_{max} ; o jedno miano u 29 chorych, o dwa w 6 przypadkach. Wzrost poziomu PPS_{max} stwierdzono u 19 chorych, przy czym u 12 był to wzrost o jedno miano, u 7 o dwa. Tylko u 40 chorych miano PPS pozostało niezmienione w porównaniu z poprzednim badaniem kontrolnym. W jednym przypadku test IIF wykazał obecność nowych idiotypów PPS w mianie 1:20, reagujących z komórkami zwojowymi oraz pręcikami siatkówki.

Podobnie dużą różnorodność zmian poziomu PPS_{max} odnotowano w kolejnym badaniu kontrolnym, które wykazało dalsze zmniejszanie się miana PPS_{max} w surowicy u 34 chorych, podczas gdy u 14 stwierdzono wzrost miana PPS_{max} . Stabilizację poziomu tych autoprzeciwciał wykazano u 46 chorych. W surowicy 8 chorych ze stabilizacją PPS_{max} wykazano obecność nowych PPS w mianie 1:10–1:40, które dały immunofluorescencję na poziomie warstwy włókien nerwowych siatkówki i czopków.

W 7. miesiącu obserwacji różnorodność zachowania się poziomu PPS_{max} w surowicy była już znacznie mniejsza. U większości chorych (66 osób) nie stwierdzono zmiany miana krążących PPS_{max} , spadek poziomu PPS_{max} odnotowano u 16 chorych, a ich wzrost o jedno miano tylko w 12 przypadkach.

W ostatnim, VIII badaniu kontrolnym, stabilizację miana PPS_{max} wykazano u 58 chorych, zmniejszenie się poziomu PPS zaobserwowano w 24 przypadkach, a 12 surowic wykazało wzrost miana PPS_{max} .

Dynamikę zmian miana PPS_{max} w surowicy chorych na AMD w okresie ośmiomiesięcznej obserwacji przedstawiono w tabeli XII.

W okresie prowadzonych badań po pierwszej doszkliskowej iniekcji bewacizumabu wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy obniżaniem się miana PPS_{max} w surowicy a redukcją CRT (ryc. 40 a, b oraz ryc. 41 a, b). Nie wykazano jednak takiej zależności w przypadku parametrów odzwierciedlających funkcję leczonego oka (BCVA i Sn). W kolejnych badaniach kontrolnych dodatnia korelacja pomiędzy spadkiem miana PPS_{max} a zmniejszającą się CRT nadal się utrzymywała i zależność ta była bardzo silna. Od drugiego do ostatniego badania kontrolnego zaobserwowano ponadto istnienie ujemnej zależności pomiędzy zmieniającymi się mianami krążących PPS_{max} a zachowaniem się BCVA i Sn; wzrost miana PPS korelował z obniżeniem się BCVA i/lub Sn, natomiast spadek poziomu tych autoprzeciwciał wiązał się z poprawą funkcji leczonego oka. Zależności te były lepiej wyrażone w przypadku BCVA niż Sn (tab. XIII).

Tabela XII

Zmiany miana przeciwciał przeciwiątkówkowych (PPS_{max}) w surowicy chorych na AMD w okresie ośmiomiesięcznej obserwacji

Numer badania kontrolnego	Wzrost PPS _{max} (liczba surowic)			Brak zmian poziomu PPS _{max} (liczba surowic)	Spadek PPS _{max} (liczba surowic)		
	o 3 miana	o 2 miana	o 1 miano		o 1 miano	o 2 miana	o 3 miana
I	4	14	35	45	–	–	–
II	7	18	30	39	–	–	–
III	3	11	29	48	3	–	–
IV	1	3	16	69	4	–	1
V	–	6	29	40	12	7	–
VI	–	8	26	46	7	7	–
VII	–	2	13	66	8	4	–
VIII	–	7	17	58	7	5	–

Tabela XIII

Zależności pomiędzy mianem przeciwciał przeciwiątkówkowych (PPS_{max}) a grubością centralnej siatkówki (CRT) i funkcją leczonego oka (BCVA i Sn) w kolejnych badaniach kontrolnych określone za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona

Badana cecha kliniczna	Badanie kontrolne							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
CRT	p = 0,0000	p = 0,0000	p = 0,0000	p = 0,0000	p = 0,0000	p = 0,0000	p = 0,0000	p = 0,0000
BCVA	ns	p = 0,0235	p = 0,0019	p = 0,0001	p = 0,0008	p = 0,0205	p = 0,0082	p = 0,0001
Sn	ns	ns	p = 0,0197	p = 0,0004	p = 0,0003	p = 0,0147	p = 0,0062	p = 0,0001

U 19 chorych wykazano bardzo słabą odpowiedź na zastosowane leczenie doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu; u 6 z nich doszło do zwłóknienia CNV w okresie obserwacji. W kontrolnych badaniach okulistycznych u chorych tych obserwowano stabilizację lub pogarszanie się funkcji leczonego oka, utrzymywanie się przestrzeni płynowych śród- i podsiatkówkowych oraz pod RPE i/lub cechy włóknienia podsiatkówkowego w badaniu OCT. W FA stwierdzono utrzymujące się cechy aktywności CNV w postaci przecieku w późnych fazach badania (*leakage*) lub gromadzenia się barwnika w obrębie CNV (*staining*), co wskazywało na jej bliznowacenie. W całym okresie obserwacji 13 chorych wykazało nieistotny spadek miana krążących PPS, które utrzymywało się na poziomie 1:40–1:160, natomiast u 6 chorych, w oczach których w trakcie leczenia doszło do zbliźnowacenia CNV, miana PPS wykazywały tendencję do obniżania się i w ostatnim badaniu kontrolnym były one wykrywalne w mianach od 1:10 do 1:40 lub w ogóle nie wykazano ich obecności.

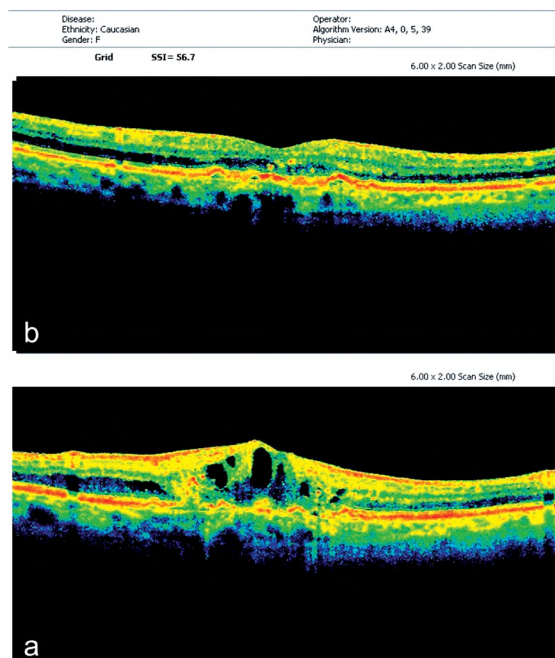
We wszystkich badaniach kontrolnych, z wyjątkiem badania VII, analiza statystyczna wykazała istnienie dodatniej korelacji pomiędzy wzrostem miana PPS_{max} w surowicy a kwalifikacją chorego do kolejnej doszkliskowej iniekcji bewacizumabu (Avastin) w fazie „podtrzymującej” leczenia (tab. XIV).

Ciekawym spostrzeżeniem pozostaje fakt pojawiania się nowych, niewystępujących wcześniej idiotypów PPS w surowicy 34 (34,7%) chorych. Przeciwciała te występowały w mianach od 1:10 do 1:80 i najczęściej pojawiały się w 3. i 4. miesiącu obserwacji. Zazwyczaj był to jeden idiotyp PPS, ale u pięciu chorych stwierdzono pojawienie się dwóch nowych idiotypów PPS, a u jednego chorego aż trzech. Najczęściej były to przeciwciała reagujące z warstwą włókien nerwowych siatkówki, czopkami, komórkami zwojowymi siatkówki oraz pręcikami. Nie wykazano istnienia zależności pomiędzy pojawianiem się krążących PPS *de novo* a charakterystyką kliniczną zmian w plamce.

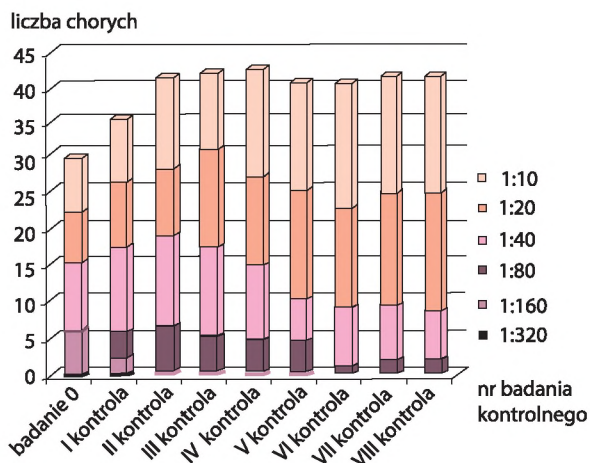
Tabela XIV

Zależność pomiędzy wzrostem miana przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS_{max}) a kwalifikacją chorego do kolejnej iniekcji doszkliskowej bewacizumabu (Avastin) w fazie „podtrzymującej” leczenia

Badanie kontrolne III (kwalifikacja do 4. iniekcji)	Badanie kontrolne IV (kwalifikacja do 5. iniekcji)	Badanie kontrolne V (kwalifikacja do 6. iniekcji)	Badanie kontrolne VI (kwalifikacja do 7. iniekcji)	Badanie kontrolne VII (kwalifikacja do 8. iniekcji)	Badanie kontrolne VIII (kwalifikacja do 9. iniekcji)
p = 0,0056	p = 0,0402	p = 0,0000	p = 0,0073	ns	p = 0,0017



Ryc. 41 a, b. Przekrój OCT: plamka chorego z czynną neowaskularyzacją naczyńkową (CNV) przed leczeniem (a) i następnie po trzech doszkliskowych iniekcjach bewacizumabu – odtworzona morfologia dołeczka (b)



Ryc. 42. Szczegółowe zestawienie mian przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonka (AECA) w surowicy chorych na AMD w czasie kolejnych badań kontrolnych

4.8. Zachowanie się przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonka w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem w okresie obserwacji

Przed rozpoczęciem leczenia w 30 badanych surowicach stwierdzono obecność AECA w mianach od 1:10 do 1:320, przy czym u czterech chorych były to jedyne auto-przeciwciała, jakie wykryto w IIF przy użyciu mrożakowych skrawków siatkówki jako substratu. W surowicy pozostałych 26 chorych na AMD obok AECA stwierdzono występowanie PPS. W grupie czterech chorych, u których AECA były jedynymi występującymi autoprzeciwciałami, w jednym przypadku podczas drugiego badania kontrolnego wykazano w surowicy obecność PPS, które wcześniej nie występowały, i których obecność obok AECA utrzymywała się do końca okresu obserwacji. U pozostałych 3 chorych AECA były jedynymi autoprzeciwciałami, jakie obserwowano w surowicy podczas całego okresu leczenia, a ich miana pozostawały na stałym poziomie i wahały się od 1:20 do 1:80.

Największą dynamikę zmiany mian AECA w surowicy obserwowano podczas pierwszych czterech miesięcy leczenia, kiedy to wykazano obniżenie się poziomu tych autoprzeciwciał o 32% w I badaniu, o 28% w II badaniu, o 36% w III badaniu i o 41% w IV badaniu kontrolnym. W kolejnych miesiącach obserwacji dynamika zmian zachowania się AECA w badanych surowicach była mniej zaznaczona, a miana tych autoprzeciwciał pozostawały na prawie niezmiennym poziomie do ostatniego badania kontrolnego i wahały się od 1:10 do 1:80.

W okresie prowadzonej obserwacji odnotowano pojawienie się AECA *de novo* w 13 przypadkach (13,3%) w mianach od 1:10 do 1:80. Pojawienie się tych autoprzeciwciał odnotowano głównie w pierwszym i drugim badaniu kontrolnym, tj. po drugiej i trzeciej doszkliskowej iniekcji bewacizumabu (Avastin) (ryc. 42).

Występowanie w surowicy chorych na AMD AECA nie wykazało istotnej statystycznie zależności pomiędzy tymi autoprzeciwciałami a cechami klinicznymi AMD, tj. wielkością CNV, CRT, a także BCVA czy Sn, z wyjątkiem V badania kontrolnego, w którym istotna statystycznie korelacja wystąpiła pomiędzy AECA a CRT ($p = 0,03$), oraz VI badaniem, w którym istotna statystycznie korelacja pojawiła się pomiędzy tymi autoprzeciwciałami a BCVA ($p = 0,02$).

W okresie prowadzonej obserwacji nie odnotowano zależności pomiędzy zachowaniem się mian PPS_{max} i AECA w surowicy chorych na AMD. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy obecnością określonego idiotypu PPS_{max} a występowaniem krążących AECA w badanej grupie chorych.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Od ponad 20 lat w różnych ośrodkach na całym świecie prowadzone są badania mające na celu określenie roli czynników immunologicznych w etiopatogenezie AMD. Ostatnie doniesienia wskazują, iż nadreaktywność układu dopełniacza, autoimmunoagresja w stosunku do antygenów siatkówki oraz przewlekły odczyn zapalny mogą stanowić zasadniczy mechanizm rozwoju i progresji zmian zwyrodnieniowych w płamce [43–46, 48, 49, 225, 245, 246, 269–271]. Układ dopełniacza jest uważany za głównego induktora rozwijającej się patologii w przebiegu AMD. Jego aktywacja może powodować uszkodzenie tkanek w wyniku tworzenia kompleksów immunologicznych *in vivo*, które z kolei mogą być czynnikiem spustowym dla druzogenezy, zmian zwyrodnieniowych w komórkach RPE i fotoreceptorów oraz uszkodzenia błony Brucha, co sprzyja procesowi neowaskularyzacji [39, 45, 87, 89, 105]. Lokalna mobilizacja układu immunologicznego w kompleksie tkankowym fotoreceptory–RPE–błona Brucha–choriokapilary, uwikłanym w patogenezę AMD, wiąże się z napływem, kumulacją i aktywacją wielu komórek zapalnych w przestrzeni podsiatkówkowej. Zjawiska te rozwijają się jednak dopiero wówczas, gdy dojdzie do zachwiania tolerancji immunologicznej oka i przerwania barier ochronnych tego narządu [272–277].

W świetle współczesnej wiedzy na temat roli grasiczych i pozagrasicznych mechanizmów odpornościowych stworzono koncepcje dotyczące zjawiska tolerancji immunologicznej oka. Jedną z nich jest teoria o braku „prawdziwej” tolerancji w stosunku do ocznych antygenów [278]. Brak w grasicy ich reprezentacji oraz ich wczesna izolacja od układu odpornościowego w okresie ontogenezy powodują, iż krążące limfocyty T, reaktywne w stosunku do ocznych antygenów, nie muszą podlegać klonalnej delecji, inaktywacji lub powstawaniu odpowiedzi tolerogennej. Stwierdzono, że limfocyty T, reagujące z białkami siatkówki, są obecne we krwi osób zdrowych, a ich liczba wyraźnie wzrasta, na przykład u chorych z zapaleniem błony naczyniowej [279–281]. Podobne spostrzeżenia dotyczą humoralnej reaktywności w stosunku do siatkówkowych antygenów. Występowanie w niskich mianach PPS stwierdzono bowiem w surowicy osób zdrowych [238, 246–252, 254, 255, 281–284]. Innymi czynnikami stojącymi na straży zachowania tolerancji immunologicznej w stosunku do własnych antygenów siatkówkowych są tzw. lokalne mechanizmy obronne. Należą do nich: bariera krew–siatkówka, supresja wywołana komórkami rezydentnymi („resident” cells) oraz płyny wewnątrzgałkowe. Bariera krew–siatkówka, składająca się z bariery wewnętrznej utworzonej przez ciasne połączenia komórek śródbłonka naczyń włosowatych oraz zewnętrznej, którą formują ściśle połączenia stref zamykających (*zonula occludens*) i stref przylegania

(*zonula adherens*), znajdujących się pomiędzy komórkami RPE, stanowi pierwszą linię obrony, chroniącą immunologicznie uprzywilejowane środowisko wewnątrzgałkowe przed przenikaniem wysokocząsteczkowych substancji immunogennych oraz komórek układu odpornościowego [278, 285]. Caspi i wsp. jako pierwsi stwierdzili, że komórki glejowe Müllera, specjalny rodzaj astrocytów występujących w siatkówce, pełnią rolę potencjalnych komórek supresyjnych, zdolnych do zahamowania proliferacji limfocytów T pomocniczych [278, 286]. Podobne właściwości okazało się mieć wiele innych komórek oka: komórki RPE, komórki śródbłonka ciała rzęskowego, komórki mezenchymalne tęczęwki i ciała rzęskowego, rogówkowe fibroblasty, komórki dendrytyczne oraz komórki śródbłonka rogówki [287–291]. W określonych warunkach, gdy następuje przełamanie pierwszej linii obrony, na powierzchni tych aktywowanych komórek dochodzi do ekspresji antygenów klasy MHC II, co powoduje bezpośredni kontakt limfocytów T pomocniczych, który wywiera efekt supresyjny na aktywację limfocytów. W rezultacie zahamowaniu ulega komórkowa odpowiedź immunologiczna [278, 292]. Zjawisko to zostało określone jako efekt „lepcza na muchy” [278]. Komórki o takich właściwościach immunosupresyjnych, nazywane rezydentnymi, stanowią zatem drugą, aktywną linię obrony. Płyny wewnątrzgałkowe są trzecią zaporą chroniącą środowisko wewnątrzgałkowe. Aktywowane komórki układu odpornościowego, które przedostały się przez barierę krew–siatkówka oraz barierę komórek o właściwościach supresyjnych, są przechwytywane przez immunosupresyjne środowisko wewnątrzgałkowych płynów [293]. Zarówno ciecz wodnista, jak i ciało szkliste zawierają rozpuszczalne czynniki hamujące aktywację limfocytów i ich proliferację [294–298]. Supresyjne właściwości wewnątrzgałkowych płynów są uzależnione od czynników wytwarzanych przez komórki wyściełające komory gałki ocznej, takie jak: melanokortyny, kortyzol, rozpuszczalny receptor dla IL-1, prostaglandyny, wazoaktywny peptyd jelitowy oraz TGF- β 2 [299–302]. Lokalne mikrośrodowisko gałki ocznej bierze więc ścisły udział w indukcji systemowej tolerancji w stosunku do ocznych antygenów, zamykając w ten sposób immunologiczne koło regulacyjne tego narządu.

Ekspozycja układu immunologicznego na antygeny oka następuje po uszkodzeniu bariery krew–siatkówka, co przejawia się autoimmunizacją i zniesieniem stanu tolerancji immunologicznej oka [278]. Wyniki ostatnich obserwacji wskazują, że w utrzymaniu „szczelności” bariery krew–siatkówka ważną rolę odgrywają astrocyty siatkówki. Penfold i wsp. jako pierwsi zwrócili uwagę na obecność w surowicy chorych na AMD przeciwciał przeciwko GFAP, które jest markerem komórek Müllera. Prawdopodobnie te autoprzeciwciała przyczyniają się do uszkodzenia bariery krew–siatkówka, której dysfunkcja z kolei umożliwia wtargnięcie dużego „ładunku” komórek układu immunologicznego do wnętrza oka [251]. Podobnie Gurne i wsp. oraz Bressler i wsp. uważają, iż uszkodzenie bariery krew–siatkówka jest zjawiskiem inicjującym aktywację komórek układu odpornościowego w stosunku do wewnątrzgałkowych antygenów, co jest głównym patomechanizmem rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce [251, 259]. Bezpośredni kontakt komórek układu immunologicznego z antygenami oka stymuluje produkcję autoprzeciwciał. Dochodzi do utraty naturalnych mechanizmów miejscowej immunosupresji i rozwoju choroby o podłożu autoimmunoagresji, a za taką obecnie uważa się AMD. Pod wpływem różnorodnych czynników środowiskowych oraz indywidualnych cech osobniczych, będących czynnikami ryzyka rozwoju AMD, dochodzi do aktywacji m.in. komórek RPE, komórek śródbłonka, astrocytów i do ekspresji na ich po-

wierzchni antygenów głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex* – MHC) klasy II, a także molekuł adhezyjnych, takich jak: cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (*intercellular adhesion molecule-1* – ICAM-1), antygen związany z aktywnością limfocytów 1 (*leukocyte function-associated antigen-1* – LFA-1) [244, 302–304]. Cząsteczki te biorą udział w prezentacji ocznych antygenów limfocytom T pomocniczym. Te z kolei, przy braku czynników supresyjnych, takich jak: TGF- β 1, IL-10, IL-4, stymulują limfocyty typu B do produkcji autoprzeciwciał, co wyzwała niszczące komórki reakcje zapalne. W konsekwencji dochodzi do uwalniania coraz większej ilości naturalnie występujących antygenów siatkówkowych lub naturalnych antygenów o zmodyfikowanej strukturze, na przykład pod wpływem czynników oksydacyjnych. Po przełamaniu stanu tolerancji immunologicznej oka powstaje zjawisko „błędnego koła” (*circulum vitiosus*) [244]. Zainicjowane patologiczne procesy immunologiczne prowadzą do rozwoju zmian zwyrodnieniowych w plamce.

McGeer i wsp. wykazali, iż AMD jest chorobą, której etiopatogeneza wiąże się z udziałem nie tylko przedstawionych powyżej mechanizmów autoimmunoagresji, ale w którą uwikłany jest „tłący się” chroniczny odczyn zapalny, tzw. *para-inflammation* [305]. Zjawisko to McGeer określił mianem autotoksyczności. W wyniku aktywacji tkankowych monocytów pod wpływem uwalnianych miejscowo mediatorów zapalnych, takich jak: prostaglandyny, anafilatoksyny, cytokiny, chemokiny, proteazy, molekuły adhezyjne oraz wolne rodniki, dochodzi do pobudzenia limfocytów „atakujących” własne białka organizmu. Obserwacje te zostały potwierdzone także przez innych autorów [87, 90, 101, 102].

Coraz częściej sugeruje się, że AMD jest ogólnoustrojowym schorzeniem immunologicznym o lokalnej ekspresji objawów klinicznych wynikającej z dysfunkcji układu odpornościowego [91, 92, 98, 103, 306]. W literaturze przedmiotu istnieją doniesienia podkreślające podobieństwa w patomechanizmie i symptomatologii całkowicie odmiennych chorób, jakimi są AMD i na przykład błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (b-r KZN). W obydwu schorzeniach występuje układowa nadaktywność dopełniacza, będąca wynikiem zazwyczaj wtórnego niedoboru lub braku czynnika H układu dopełniacza, która jest inicjatorem choroby, zarówno oka, jak i nerki [98, 103, 306–308]. Ponadto wykazano podobieństwo pod względem składu odkładających się w zajętych tkankach depozytów: druz w AMD i złogów w b-r KZN [98, 103, 306–308]. Na uwagę zasługuje także fakt występowania druz w oczach chorych z b-r KZN [103, 307]. Pewne podobieństwa w składzie druz odnajduje się także w przypadku złogów występujących w innych narządach w przebiegu amyloidozy, elastozy, miażdżycy, choroby Alzheimera [98]. Łączącą cechą wszystkich wymienionych chorób, podobnie jak w przypadku AMD i b-r KZN, jest ich wspólny patomechanizm związany z nadreaktywnością układu dopełniacza. Wiadome jest, iż aktywacja układu dopełniacza ma konsekwencje ogólnoustrojowe, a nie tylko lokalne, ograniczone do objętego chorobą narządu. Nie można zatem wykluczyć, że AMD jest wyrazem lokalnej manifestacji systemowej patologii według zasady wygłoszonej przez Lagrange’a „chore oko w chorym ciele” [90, 92, 98, 103, 306].

We krwi chorych na AMD stwierdzono występowanie podwyższonych poziomów markerów zapalenia, takich jak: białko C-reaktywne (*C-reactive protein* – CRP), czynnik martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor α* – TNF α), interleukina-6, fibrynogen, ICAM-1, cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna (*vascular cell adhesion pro-*

tein-1 – VCAM-1), krążące białka układu dopełniacza, co również wskazuje na udział mechanizmów zapalnych oraz przemawia za systemową aktywacją układu odpornościowego. Przeprowadzone badania kliniczne wykazały, iż wzrost stężenia tych białek we krwi poprzedza rozwój klinicznie znaczących zmian zwyrodnieniowych w plamce i może być czynnikiem ryzyka rozwoju CNV [309–313]. Nie wszyscy jednak zgadzają się z tym spostrzeżeniem. Wu i wsp. oraz Klein i wsp. nie stwierdzili istnienia zależności pomiędzy podwyższonymi poziomami krążących markerów zapalenia u chorych na AMD a progresją zmian zwyrodnieniowych w plamce [314, 315]. Pomimo istnienia rozbieżności w wynikach badań dotyczących zachowania się krążących markerów zapalnych u chorych na AMD przedstawione powyżej obserwacje większości autorów mogą stanowić kolejny dowód na to, że AMD, którego symptomatologia jest ograniczona do narządu wzroku, może być w rzeczywistości zaburzeniem ogólnoustrojowym, w które uwikłane są skomplikowane procesy zapalne i immunologiczne.

Poszukując biomarkerów AMD, Morohoshi i wsp. wykazali, iż w surowicy chorych na AMD stosunek immunoglobulin IgG/IgM skierowanych przeciwko fosfatydyloserynie, która bierze udział w budowie i prawidłowym funkcjonowaniu błony komórkowej, jest istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną i koreluje ze zwiększonym ryzykiem rozwoju CNV [316]. Guymier i wsp. natomiast stwierdzili istnienie dodatniej zależności pomiędzy podwyższonymi poziomami wydalanych z moczem cytokin, takich jak: TGF- β 1 i MCP-1, a wczesnym stadium AMD [317].

Powszechnie znanym jest spostrzeżenie, że w przebiegu tych chorób oczu, których patogenezą jest związana z udziałem mechanizmów zapalnych i immunologicznych, często stwierdza się występowanie krążących autoprzeciwciał reagujących z różnymi antygenami siatkówkowymi [227–233, 236, 241, 242]. W oparciu o dane z piśmiennictwa wśród tych schorzeń, które szczegółowo przedstawiono we wstępie pracy, znajduje się także AMD [224, 226–251, 253–256]. Umeda i wsp. stwierdzili obecność PPS w surowicy małp *Macaca fascicularis*, u których obserwuje się rozwój zmian zwyrodnieniowych w plamce podobnych do tych, jakie powstają u ludzi w przebiegu AMD [94]. PPS wykazano w surowicy małp z druzami, ogniskami hipo- i/lub hiperpigmentacji w plamce, podczas gdy u osobników zdrowych bez zmian zwyrodnieniowych te autoprzeciwciała nie występowały. Podobnie przeprowadzone badania kliniczne, w tym także moje własne obserwacje, zwróciły uwagę na występowanie PPS w surowicy chorych na AMD [224, 226–251, 253–256]. Jednak żadne z opublikowanych do tej pory doniesień nie wyjaśnia w sposób jednoznaczny roli tych autoprzeciwciał w patologii tego schorzenia. Istnieją poglądy sugerujące, że obecność PPS w surowicy chorych na AMD może być epifenomenem, będącym wyrazem niespecyficznego odpowiedzi na uszkodzenie siatkówki w przebiegu stresu oksydacyjnego i lokalnego niedokrwienia, inni natomiast uważają, iż PPS mogą być istotnym inicjatorem rozwoju i progresji choroby [94, 226, 251, 253]. Tę ostatnią hipotezę podtrzymuje Umeda i wsp. oraz Penfold i wsp., którzy sugerują, że humoralna odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko antygenom siatkówki może prowadzić wtórnie do aktywacji kaskady układu dopełniacza w miejscu tworzących się druz – pierwszego klinicznego objawu AMD – które, jak już wspomniano, zawierają wiele czynników systemu odpornościowego, w tym białek układu dopełniacza [94, 226].

Wyniki licznych obserwacji wskazują, iż krążące PPS mogą występować fizjologicznie w surowicy osób zdrowych [226–233, 236, 241, 242, 247–251, 253–256]. Obecność tych autoprzeciwciał w zdrowej populacji może sugerować pełnienie przez nie roli

ochronnej i określa się je mianem „naturalnie występujących autoprzeciwciał” [318–320]. Nie podlegają one selekcji klonalnej i są produkowane w sposób ciągły bez udziału antygenowej stymulacji, a ich obecność ma związek z wrodzoną odpornością immunologiczną. Wzrost syntezy „naturalnie występujących autoprzeciwciał” lub pojawienie się ich *de novo* towarzyszy chorobom przebiegającym z uszkodzeniem tkanek [318–320]. Biorą one udział w tworzeniu krążących kompleksów immunologicznych, aktywują układ dopełniacza oraz wspomagają fagocytozę obumarłych komórek [283, 318, 320]. Uważa się, że podobną rolę odgrywają one w początkowych stadiach AMD, kiedy to w odpowiedzi na wczesne uszkodzenie komórek RPE i gromadzenie się nieprawidłowych depozytów w zewnętrznych warstwach siatkówki dochodzi do wzrostu produkcji tych „naturalnie występujących autoprzeciwciał” [254]. Pełnią one wówczas rolę ochronną, eliminując w sposób kontrolowany nieprawidłowe komórki. Pod wpływem przewlekłego działania różnorodnych czynników zewnętrznych, intensyfikujących zjawiska degeneracji i śmierci komórek, których aktywność przewyższa zdolności kompensacyjne organizmu, tj. ich eliminację przez „naturalnie występujące autoprzeciwciała” oraz ich uprzątanie przez fagocyty, dochodzi do niekontrolowanego wzrostu ich produkcji i „ataku” skierowanego przeciwko uwalnianym w coraz to większej ilości antygenom oka. Powstaje patologia [253, 254]. Istotnym warunkiem zainicjowania rozwijających się nieprawidłowych reakcji jest uszkodzenie bariery krew–siatkówka, w które mogą być zaangażowane, jak już wcześniej wspomniano, PPS [251, 278]. „Inwazja” do wnętrza oka przez uszkodzoną barierę krew–siatkówka krążących autoprzeciwciał oraz różnych komórek układu odpornościowego powoduje załamanie stanu tolerancji immunologicznej tego narządu. Przedostające się do środowiska wewnątrzgałkowego PPS oraz limfocyty T, które do tej pory były izolowane od antygenów oka, wchodzi z nimi w reakcję, nasilając zainicjowane procesy patologiczne [226]. Nie można zatem wykluczyć, iż patologiczne PPS pojawiające się w surowicy chorych z AMD są zaangażowane w etiopatogenezę AMD i jednocześnie mogą odzwierciedlać dynamikę odpowiedzi na postępujące uszkodzenie tkanek, modulując w ten sposób przebieg kliniczny tego schorzenia.

Większość przeprowadzonych do tej pory badań klinicznych, jak również moje własne obserwacje, wykazały istnienie związku pomiędzy występowaniem w surowicy chorych na AMD krążących PPS a stadium zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w płamce [248–251, 253, 255].

Penfold i wsp. w teście immunofluorescencji pośredniej wykonanej przy użyciu prawidłowej siatkówki ludzkiej, szczurzej i mysiej wykazali w grupie 128 chorych na AMD występowanie krążących PPS w 61% przypadków [226]. Badana grupa chorych obejmowała osoby z początkowymi zmianami zwyrodnieniowymi w płamce (druzy i przegrupowania barwnikowe), z zanikiem geograficznym oraz tarczowatą blizną. Należy podkreślić, że wśród chorych nie było przypadków z czynną CNV, a ocenę PPS przeprowadzano w jednym rozcieńczeniu surowicy, wynoszącym 1:10. PPS najczęściej występowały w surowicach chorych z druzami (w 61% przypadków) i z przegrupowaniami barwnika na poziomie RPE (w 57% przypadków), rzadziej u chorych z bliznami (w 52% przypadków) i tylko w 29% przypadków z zanikiem geograficznym w płamce. Autorzy opisali pięć idiotypów PPS: przeciwko astrocytom siatkówki, komórkom zwojowym, komórkom fotoreceptorowym, warstwie włókien nerwowych oraz rozlany wzór immunofluorescencji obejmujący wszystkie warstwy siatkówki. W grupie kontrolnej natomiast, w której PPS były obecne tylko w 20% surowic, autorzy znaleźli trzy

typy immunofluorescencji, przy czym najczęściej była to reakcja z warstwą włókien nerwowych, rzadziej z astrocytami i komórkami zwojowymi siatkówki. Większość badanych surowic wykazała jeden typ reakcji w teście IIF. Moje spostrzeżenia są odmienne, bowiem w badanej grupie u większości chorych (61,2%) odnotowałam występowanie złożonego profilu krążących PPS. Te różnice mogą wynikać m.in. z odmiennej charakterystyki chorych objętych obserwacją. Penfold i wsp. do badań włączyli chorych z wczesnym stadium AMD, z obecnością zmian bliznowatych w plamce oraz z suchą postacią tego schorzenia. Mój materiał kliniczny natomiast obejmował jedynie chorych z wysiękową postacią AMD w jednym oku lub w obu oczach. Penfold i wsp. wykazali istnienie zależności pomiędzy stopniem zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w plamce a idiotypem PPS; w grupie chorych z wczesnym stadium AMD najczęściej stwierdzano reakcję z komórkami astrocytarnymi, podczas gdy u chorych z obustronnymi bliznami obserwowano rozlaną immunofluorescencję całej siatkówki. Moje obserwacje nie potwierdziły istnienia zależności pomiędzy idiotypem PPS a zaawansowaniem zmian zwyrodnieniowych w plamce, co może być związane z objęciem badaniami bardziej jednorodnej grupy chorych, aniżeli miało to miejsce w przypadku obserwacji prowadzonych przez Penfolda i wsp. Wyniki moich badań wykazały występowanie pięciu, lecz nieco innych od opisanych przez Penfolda i wsp., typów reakcji badanych surowic w teście IIF. Autorzy ci opisali PPS skierowane przeciwko astrocytom siatkówki, których nie stwierdziłam w moim materiale klinicznym. Zaobserwowałam natomiast występowanie PPS reagujących z cytoplazmą komórek obu warstw jądrzastych, których z kolei nie opisali Penfold i wsp. [226].

Penfold i wsp. przedstawili koncepcję, że pojawiające się w surowicy chorych na AMD PPS mogą być odpowiedzialne nie tylko za progresję już istniejących zmian zwyrodnieniowych, ale mogą inicjować rozwój zmian zwyrodnieniowych w plamce oka towarzyszącego [226].

Gurne i wsp. w grupie 30 chorych z AMD, w tym u 19 z czynną CNV, u 6 z zanikiem geograficznym oraz u 5 z obustronnymi druzami, wykazali techniką immunoblotu obecność krążących PPS [251]. Surowice 14 chorych (47%) wykazały silną reakcję z homogenatem ludzkiej siatkówki na poziomie białek o masie cząsteczkowej 58–62 kD, podczas gdy 16 (53,3%) nie dało żadnej reakcji lub była ona bardzo słaba. Surowice grupy kontrolnej (n = 12) w żadnym przypadku nie wykazały pozytywnej reakcji z homogenatem siatkówki lub była ona słabo zaznaczona. W teście IIF wykonanym tylko u 3 z 9 chorych z aktywną CNV, których surowice wykazały silną immunoreaktywność w stosunku do homogenatu ludzkiej siatkówki w immunoblocie, stwierdzono pozytywną reakcję na poziomie zewnętrznych członów komórek fotoreceptorowych i słabszą w warstwie splotowatej i jądrzastej zewnętrznej. We wszystkich przypadkach ocenę PPS przeprowadzono w niskich rozcieńczeniach badanych surowic – 1:2 i 1:4. W przeciwieństwie do spostrzeżeń Penfolda obserwacje Gurne'a i wsp. oraz moje własne nie wykazały występowania przeciwciał przeciwko astrocytom siatkówki, których obecność może odzwierciedlać udział układu immunologicznego we wczesnym stadium rozwoju AMD. Ponadto spostrzeżenia Gurne'a i wsp. są zbieżne z wynikami moich badań w kwestii braku zależności pomiędzy idiotypem PPS a stopniem aktywności choroby.

W prezentowanych obserwacjach własnych PPS wykazano w surowicy 95,9% chorych z wysiękową postacią AMD. W materiale klinicznym zaprezentowanym przez Penfolda oraz Gurne'a i wsp. autoprzeciwciała te pojawiły się odpowiednio u 61% i 46%

chorych na AMD. Ta rozbieżność w częstości występowania PPS może wynikać z zastosowania różnych metod ich oznaczania i stosowania różnych rozcieńczeń badanych surowic, a także może wiązać się z brakiem jednorodności badanych grup chorych, różniących się między sobą rodzajem i stopniem zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w plamce.

Uważa się, iż częstsze występowanie PPS w surowicy chorych na AMD, w porównaniu z grupą kontrolną, jest związane z aktywacją komórek pamięci B, które mogą produkować te przeciwciała. We krwi osób zdrowych wykazano bowiem występowanie autoreaktywnych limfocytów B, które będąc pod kontrolą czynników hamujących, pozostają nieaktywne wobec antygenów wewnątrzgałkowych. Nie wiadomo do końca, co jest czynnikiem stymulującym krążące limfocyty B do podziałów i wytwarzania auto-przeciwciał. Wysunięto hipotezę, iż zachwianie równowagi pomiędzy idiotypową i antyidiotypową siecią przeciwciał może przełamać regulatorowe bariery immunologiczne i prowadzić do utraty autotolerancji. Ponadto ekspresja antygenów na powierzchni zmienionych komórek RPE może być dodatkowym czynnikiem pobudzającym odpowiedź autoimmunologiczną [321, 322].

Wysoki odsetek chorych na AMD, u których stwierdzono krążące PPS, opisali również Chen i wsp., którzy wykazali obecność tych autoprzeciwciał w 66% badanych surowic [272]. Przy użyciu metody immunoblotów autorzy wykazali, iż PPS reagowały najczęściej z białkami o masie cząsteczkowej 28–32 kD, a rzadziej z białkami o masie cząsteczkowej 38–42 kD, 48–52 kD, 62–65 kD oraz 110–130 kD. Podobnie jak inni Chen i wsp. opisali częstsze występowanie dwóch lub większej liczby idiotypów PPS u chorych na AMD w porównaniu z grupą kontrolną. Obserwacje te są zgodne z wynikami moich badań, w których w surowicy większości chorych na AMD stwierdziłam występowanie złożoności profilu krążących PPS, podczas gdy w grupie kontrolnej przeważała obecność jednego idiotypu tych autoprzeciwciał.

Patel i wsp. stosując barwienie immunohistochemiczne wykonane przy użyciu skrawków siatkówki myszy, wykazali obecność PPS u 93,7% chorych z wczesnym stadium AMD oraz w 82,2% przypadków z aktywną CNV [253]. W surowicy chorych ze zmianami bliznowatymi i cechami włóknienia podsiatkówkowego nie odnotowali występowania krążących PPS. W grupie kontrolnej natomiast autorzy stwierdzili występowanie PPS tylko w 8,6% surowic. Wszystkie surowice do badań były przygotowywane w dwóch rozcieńczeniach – 1:10 i 1:100. Autorzy uważają, że obecność PPS w surowicy osób z wczesnymi zmianami zwyrodnieniowymi w plamce, takimi jak druzy oraz z CNV, może wskazywać na istotną rolę układu immunologicznego w patogenezie i w progresji AMD. U kilku chorych z druzami PPS nie występowały, co według autorów mogło mieć związek z rozpoczynającym się dopiero zapaleniem, mającym początkowo jedynie ograniczony, lokalny charakter. Natomiast brak PPS w surowicy chorych z końcowym stadium choroby, gdy zmiany zwyrodnieniowe stają się nieaktywne wskutek włóknienia CNV, jest rezultatem wygaszenia miejscowego zapalenia i toczących się reakcji immunologicznych [253]. Wyniki badań Patela i wsp., podobnie jak wcześniejsze doniesienia, wskazują na występowanie mnogości idiotypów PPS w surowicach chorych na AMD. Autorzy wykazali, iż surowice te najczęściej reagowały z warstwą jądrazą zewnętrzną i wewnętrzną, komórkami zwojowymi siatkówki, a w kilku przypadkach wykazano obecność przeciwciał reagujących z wewnętrznymi członami fotoreceptorów oraz z komórkami RPE. Ani moje, ani obserwacje innych nie wykazały występowania tych ostat-

nich autoprzeciwciał w surowicy chorych na AMD [226, 248–253]. Dość powszechnym zjawiskiem jest natomiast obecność PPS skierowanych przeciwko komórkom RPE u chorych na endogenne zapalenie błony naczyniowej oraz z izolowanym zapaleniem naczyń siatkówki [237, 238, 240–242, 323]. Pomimo kilku doniesień wskazujących na występowanie przeciwciał przeciwko obu warstwom jądrzastym siatkówki u chorych na AMD uważam, że z powodu braku tkankowej swoistości antygenów jądrowych oraz ze względu na charakterystykę badanej populacji, w której częstość występowania tych autoprzeciwciał może fizjologicznie wzrastać z wiekiem, nie mają one większego znaczenia diagnostycznego, tym bardziej, że wykazywano je w niskich, klinicznie nieistotnych mianach.

Ciekawym spostrzeżeniem poczynionym przez Patela i wsp. jest istnienie pewnej tendencji do wzrostu miana krążących PPS lub pojawienia się ich *de novo* w przypadku progresji zmian zwyrodnieniowych w plamce. Jednak, jak podkreślają autorzy, zjawisko to wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach klinicznych [253].

Opublikowane w 2006 roku wstępne wyniki wieloośrodkowego badania *Blue Mountain Study* wykazały istnienie dodatniej zależności pomiędzy występowaniem PPS a początkowym stadium AMD, natomiast w dziesięcioletniej obserwacji progresji zmian zwyrodnieniowych w plamce takiej korelacji już nie odnotowano [254]. Spośród 47 chorych z wczesnym stadium AMD, u których oznaczano w wyjściowym badaniu PPS, po 10 latach tylko u 11 (23,4%) doszło do progresji zmian w plamce. Nie można jednak wykluczyć, że podczas prowadzonych obserwacji zmieniał się profil PPS nie tylko u 47 wyłonionych chorych, ale i u pozostałych uczestników badania, których było w sumie 3654. PPS były oznaczane tylko raz i to w bardzo małej grupie chorych, co z całą pewnością nie pozwala na wysunięcie wiążących i jednoznacznych wniosków. Niejasny pozostaje fakt progresji zmian zwyrodnieniowych w plamce tylko u 11 osób z dodatnimi PPS. Autorzy spekulują, że być może progresja choroby jest związana z występowaniem ściśle określonego idiotypu PPS lub też że PPS nie mają żadnego wpływu na progresję choroby. Z takimi obserwacjami nie zgadzają się jednak inni autorzy [226, 248–253]. Podobnie wyniki moich badań wykazały, że wyjściowe miano PPS wykazuje dodatnią korelację z zaawansowaniem zmian w plamce, a poprawa stanu miejscowego w trakcie leczenia doszklitkowymi iniekcjami anti-VEGF wiąże się ze spadkiem poziomów tych autoprzeciwciał w surowicy. Oczywiście takie obserwacje nie odpowiadają w sposób jednoznaczny na pytanie, czy PPS są bezpośrednio uwikłane w etiopatogenezę AMD, czy też są tylko epifenomenem pojawiającym się jako odpowiedź na uszkodzenie tkanek w wyniku toczącego się procesu zwyrodnieniowego w plamce. Niezależnie jednak od pełnionej roli przez PSS nie wyklucza to ich zastosowania jako biomarkera aktywności wysiękowej postaci AMD.

Złożoność profilu idiotypowego przeciwciał przeciwko antygenom siatkówkowym w badaniu immunoblotem u 39 chorych z wysiękową postacią AMD wykazał także Joachim i wsp. [255]. Opisałi oni obecność PPS reagujących z antygenami o masie cząsteczkowej 10–180 kDa. Najczęściej występowały przeciwciała reagujące z α -enolazą (67% chorych) oraz GFAP (44% przypadków). Alfa-enolaza jest enzymem glikolitycznym i należy do rodziny białek szoku termicznego [324, 325]. Przeciwciała przeciwko α -enolazie opisano m.in. w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS), w toczniu rumieniowatym układowym (SLE), w przebiegu nowotworów płuca, piersi, prostaty, w retinopatiach paraneoplastycznych [324–328]. W przypadku retinopatii paraneopla-

stycznych przeciwciała przeciwko α -enolazie prawdopodobnie przenikają do komórek zwojowych i komórek warstwy jądrzastej wewnętrznej, prowadząc do apoptozy komórek siatkówki [328]. Obecność przeciwciał skierowanych przeciwko GFAP u chorych na AMD opisali już wcześniej Penfold i wsp., Chen i wsp. oraz Madigan i wsp. [226, 272, 329]. GFAP, główny składnik dojrzałych astrocytów, jest białkiem, którego produkcja wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek. Podwyższone poziomy tego białka stwierdzono w surowicy chorych ze stwardnieniem rozsianym, urazem nerwu wzrokowego oraz u osób z podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym [330–332]. Uważa się, iż zmiany poziomów GFAP i α -enolazy wskazują na immunologiczny czynnik rozwoju AMD [329].

Podobnie jak większość autorów Joachim i wsp. również nie znaleźli zależności pomiędzy typem wykrytych PPS a aktywnością kliniczną AMD, co jest również zgodne z moimi obserwacjami [226, 253, 255, 272].

W Polsce pierwsze doniesienia o badaniach immunologicznych u chorych na AMD pochodzą z lat 2004 i 2005. Obserwacje Misiuk-Hojło i wsp. nie dowiodły w sposób jednoznaczny związku pomiędzy częstością występowania krążących PPS a AMD. Przy użyciu immunoblotów uzyskano najczęstsze reakcje badanych surowic z antygenami zlokalizowanymi w warstwie komórek fotoreceptorowych – α -enolazą i arestyną [256, 257].

Wyniki badań Smużyńskiej natomiast wykazały istnienie zależności pomiędzy obecnością PPS a rozwojem suchej postaci AMD [333]. W badanej grupie chorych autorka wykazała występowanie dwóch idiotypów PPS, skierowanych przeciwko zewnętrznym członom fotoreceptorów oraz wewnętrznym warstwom siatkówki.

Według opublikowanych doniesień PPS występują częściej w surowicy chorych na AMD aniżeli w zdrowej populacji [224, 226, 247–251, 253–256]. We własnym materiale klinicznym PPS wykazałam w 30% surowic kontrolnych, co nie odbiega od danych przedstawionych przez innych autorów, według których częstość występowania PPS u osób zdrowych waha się od 2–37% [224, 226–233, 236, 241, 242, 247–251, 253–256, 283, 285]. Dla porównania odsetek chorych na AMD z dodatnimi krążącymi PPS sięga 47–66% przypadków [224, 226, 247–251, 253–256]. W analizowanych badaniach własnych w wyjściowym badaniu PPS występowały aż u 95,9% chorych. Ta rozbieżność w częstości występowania krążących PPS u chorych na AMD może wynikać z zastosowania różnych metod oznaczania tych autooprzeciwciał, stosowania różnych rozcieńczeń badanych surowic, różnej liczebności oraz niejednorodności badanych grup chorych. We wszystkich prezentowanych do tej pory pracach obserwacje dotyczyły chorych, zarówno z wczesnym, jak i późnym stadium AMD, podczas gdy mój materiał kliniczny obejmował osoby tylko z aktywną wysiękową postacią tego schorzenia. W większości opublikowanych badań klinicznych krążące PPS oznaczano metodą immunoblotu lub stosowano barwienie immunohistochemiczne, natomiast w przeprowadzonych badaniach własnych posłużyłam się testem IIF, który od ponad 10 lat jest wykorzystywany w naszej klinice w diagnostyce immunologicznej chorób siatkówki i naczyńówki.

Na uwagę zasługuje również fakt, że prezentowana praca stanowi pierwszą, w której oceniano nie tylko częstość występowania i idiotypy PPS, ale także analizowano poziom krążących PPS metodą mianowania i oceniano związek pomiędzy poziomem tych przeciwciał a aktywnością CNV. Ponadto przedstawione przeze mnie badania mają charakter nowatorski, jest to bowiem pierwsze opracowanie, które omawia dynamikę zachowania się PPS w surowicy chorych na AMD w okresie leczenia doszkliskowymi iniekcja-

mi bewacizumabu (Avastin). Jednocześnie po raz pierwszy podjęto próbę wykazania, czy zmiany poziomu PPS, obok CRT oraz BCVA, mogą być czynnikiem dodatkowym, pomocnym w podjęciu decyzji o przerwaniu, zawieszeniu lub kontynuacji leczenia do-
szklistkowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF.

Nölle w surowicy chorych na zapalenie błony naczyniowej wykazał obecność aż 14 różnych idiotypów PPS [334]. Wśród nich opisał również przeciwciała skierowane przeciwko komórkom śródbłonka naczyń krwionośnych siatkówki (AECA). Ta heterogenna grupa przeciwciał, reagująca z błonami komórek śródbłonka, występuje w przebiegu wielu systemowych schorzeń o podłożu autoimmunizacyjnym, przebiegających z zapaleniem naczyń krwionośnych (*vasculitides*), tj. SLE, twardzina uogólniona, RZS, pierwotne zapalenie naczyń nerkowych, choroba Kawasaki, ziarniniakowatość Wegenera, choroba Behçeta, stwardnienie rozsiane [335–339]. Chociaż wykrycie AECA nie odgrywa istotnej roli w diagnostyce tych chorób, to jednak mogą one mieć znaczenie w monitorowaniu aktywności choroby [337]. W SLE miano AECA koreluje ze stopniem zajęcia nerek i stawów, a w chorobie Behçeta z objawami ogólnoustrojowego zakrzepowego zapalenia naczyń żylnych (*thrombophlebitis*) [337, 340, 341]. Obecność krążących AECA stwierdzono także w surowicy 26–31% chorych z izolowanym zapaleniem naczyń siatkówki oraz błony naczyniowej [342, 343]. Nie odnotowano jednak istotnych zależności pomiędzy aktywnością zapalenia wewnątrzgałkowego a mianem AECA w surowicy tych chorych [342, 343]. Nie są jednak znane publikacje na temat występowania AECA w surowicy chorych na AMD. Przedstawione wyniki badań własnych są zatem pierwsze, które opisują AECA w przebiegu wysiękowej postaci AMD. W ostatnim czasie ukazały się natomiast pojedyncze doniesienia, w których opisano występowanie krążących komórek śródbłonka naczyń krwionośnych we krwi chorych na AMD [344, 345]. Autorzy uważają, że zjawisko to jest przejawem przewlekłej dysfunkcji naczyniowej towarzyszącej temu schorzeniu, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o niedokrwieniu RPE jako kluczowym elemencie etiopatogenezy AMD [73–82]. Przewlekła dysfunkcja śródbłonka spowodowana na przykład stresem oksydacyjnym lub niedotlenieniem prowadzi zatem do zaburzenia homeostazy wewnątrznaczyniowej i stanowi wykładnik choroby naczyniowej o wymiarze ogólnoustrojowym [346]. O dysfunkcji komórek śródbłonka w patogenezy AMD może świadczyć występowanie w osoczu chorych podwyższonych poziomów czynnika von Willebranda, fibrynogenu, inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1), cząstek adhezyjnych uwalnianych w wyniku uszkodzenia komórek śródbłonka [347–349]. Sugeruje się, iż obecność krążących AECA może być reakcją organizmu na uszkodzenie komórek śródbłonka, nie można jednak wykluczyć ich bezpośredniego działania cytotoksycznego – ich pojawienie się może zatem stanowić integralną część niszczącego procesu zapalnego [342, 343]. Większość publikacji zaprzecza jednak cytotoksycznym właściwościom AECA, sugerując, iż są one raczej zdolne do pobudzania nadmiernej ekspresji molekuł adhezyjnych (selektyn, integryn, cząsteczek: ICAM-1, VCAM-1) oraz produkcji cytokin i chemokin, które powodują rekrutację leukocytów, ich przyleganie do komórek śródbłonka, co z kolei prowadzi do ich uszkodzenia [350, 351]. Tak więc uważa się, że zapalenie naczyń krwionośnych w przebiegu chorób z autoagresji jest związane z patologiczną aktywacją kaskady prozapalnych cytokin. Nadmierna ekspresja molekuł adhezyjnych oraz cytokin w śródbłonku naczyń krwionośnych jest manifestacją uszkodzenia komórek śródbłonka, które może zostać zapoczątkowane przez wiele różnych czynników, takich jak: wirusy,

bakterie, kompleksy immunologiczne oraz same AECA [352]. Takiego patomechanizmu inicjacji i progresji uszkodzenia tkanek nie można wykluczyć w przebiegu AMD [353]. Nie wiadomo jednak, czy AECA, podobnie jak PPS, odgrywają pierwotną rolę w etiopatogenezie AMD, czy też pojawiają się one wtórnie jako odpowiedź na dysfunkcję komórek śródbłonna naczyń, która może towarzyszyć lub występować całkowicie niezależnie od uszkodzenia innych komórek siatkówki.

W analizowanym materiale klinicznym AECA wykazano w surowicy 30 chorych (30,6%) na AMD. W czterech przypadkach były to jedyne autoprzeciwciała, jakie stwierdzono w badaniu wyjściowym, przy czym u jednego chorego w piątym miesiącu obserwacji wykazano pojawienie się dodatkowo krążących PPS. W pozostałych trzech przypadkach AECA były jedynymi autoprzeciwciałami wykazywanymi w IIF w całym okresie obserwacji. Najprawdopodobniej pojawienie się krążących PPS w przedstawionym powyżej przypadku mogło być odpowiedzią na progresję zmian zwyrodnieniowych w plamce leczonego oka (w FA stwierdzono powiększenie się wymiarów CNV oraz wzrost grubości centralnej siatkówki w OCT). Niewyjaśnione pozostaje zjawisko pojawienia się AECA *de novo* w surowicy 13 chorych (13,3%) w trakcie badań. Najczęściej odnotowywano je po drugiej i trzeciej doszkliskowej iniekcji bewacizumabu. W kolejnych miesiącach obserwacji ich miano utrzymywało się na stałym poziomie lub nieznacznie malało.

Badania doświadczalne wykazały, że inkubacja ludzkich komórek śródbłonna mikronaczyń (*human microvascular endothelial cells* – HMECs) z czynnikiem anty-VEGF doprowadza do wzrostu apoptozy tych komórek i jednoczesnego zmniejszenia współczynnika ich proliferacji oraz migracji [354, 355]. W kilku opublikowanych niedawno pracach wykazano, iż u chorych leczonych ogólnie bewacizumabem dochodzi do dysfunkcji komórek śródbłonna, co objawia się wzrostem liczby krążących komórek śródbłonna oraz ich komórek progenitorowych [356–359]. U chorych leczonych doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu wykazano, iż lek ten przenika do krążenia, gdzie się utrzymuje około 20 dni [360]. Nie można zatem wykluczyć, że bewacizumab stosowany u chorych na AMD poprzez swoje działanie ogólnoustrojowe może powodować wzrost liczby krążących komórek endotelialnych. Wzrost „ładunku” tych komórek w krążeniu może indukować produkcję autoprzeciwciał AECA. Rozwijająca się w wyniku lokalnej terapii anty-VEGF dysfunkcja komórek śródbłonna może być inicjatorem autoimmunizacji i prowadzić do wytwarzania autoprzeciwciał przeciwko tym komórkom. Pojawienie się AECA w trakcie leczenia doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu może zatem stanowić „immunologiczne powikłanie” tej terapii. Istnieją poglądy sugerujące, że występowanie u chorych na AMD AECA może świadczyć o autoimmunizacji narządowo nieswoistej, czyli „układowej”, która z niewyjaśnionych przyczyn pojawia się w przebiegu tego schorzenia [360]. Z całą pewnością te obserwacje wymagają wyjaśnienia i prowadzenia dalszych badań.

W badanej grupie chorych wykazano w okresie prowadzonej obserwacji pojawianie się nowych, niewystępujących wcześniej idiotypów PPS u 34 (34,7%) chorych. W dojrzałej siatkówce VEGF jest wytwarzany głównie przez komórki RPE i odgrywa ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej funkcji komórek części neurosensorycznej siatkówki [360]. Izoforma VEGF-A hamuje apoptozę neuronów siatkówki i opóźnia zwyrodnienie komórek zwojowych siatkówki [361]. Wykazano, że zahamowanie aktywności VEGF prowadzi do zmniejszenia grubości prawidłowej siatkówki. Sugeruje się, że lokalny spa-

dek stężenia VEGF, który wykazuje działanie cytoprotekcyjne w stosunku do komórek siatkówki, może prowadzić do ich zwyrodnienia [361, 362]. Nie można zatem wykluczyć, iż pojawiające się PPS *de novo* w naszej grupie chorych w okresie prowadzonego leczenia są wyrazem odpowiedzi na wywołane jatrogennie uszkodzenie siatkówki.

Należy przeanalizować, czy obecne w surowicy chorych na AMD PPS, reagujące z wyjątkową pod względem budowy histologicznej tkanką, jaką jest siatkówka, charakteryzującą się mnogością i różnorodnością rozpoznawanych antygenów, są rzeczywiście autoprzeciwciałami, prowadzącymi do narządowo swoistej autoimmunizacji. Wspomniano już wcześniej o podobieństwie niektórych antygenów oka z antygenami występującymi w innych, odległych narządach [225]. Wiadomo, że u osób z AMD pojawiają się przeciwciała przeciwko białku GFAP, które jest markerem astocytów i które występuje zarówno w siatkówce, jak i w komórkach ośrodkowego układu nerwowego [251]. Zjawisko to może być kolejnym dowodem na to, że AMD jest lokalną manifestacją schorzenia ogólnoustrojowego. Nie można wykluczyć, iż może właśnie dlatego stosowane obecnie metody leczenia wysiękowej postaci AMD mają ograniczoną skuteczność. Współczesne terapie nie leczą bowiem choroby *sensu stricto*, lecz jedynie spowalniają proces utraty widzenia centralnego, wydłużając tym samym czas, w którym chory może cieszyć się dobrą, użyteczną ostrością wzroku.

Ośmiomiesięczny okres obserwacji, obejmujący fazę „nasycającą” oraz „podtrzymującą” leczenia, wykazał wysoką skuteczność i bezpieczeństwo leczenia doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu w grupie 98 chorych z wysiękową postacią AMD. Największą poprawę funkcji leczonego oka obserwowano podczas początkowej, trzymiesięcznej fazy leczenia, a kolejne iniekcje podtrzymywały osiągnięty wynik terapii. Moje obserwacje są zgodne z wynikami badania PrONTO oraz wieloośrodkowego badania SUSTAIN [363, 364]. W obu badaniach, podobnie jak w moim, schemat postępowania terapeutycznego był identyczny, tj. wszyscy chorzy otrzymywali trzy pierwsze iniekcje w odstępach comiesięcznych, a następnie harmonogram doszklistkowych iniekcji był zindywidualizowany i oparty na wynikach comiesięcznych badań kontrolnych. W badaniach SUSTAIN i PrONTO odsetek chorych, którzy utracili mniej niż 15 liter w skali EDTRS (co odpowiada trzem liniom na tablicach Snellena), wynosił odpowiednio 92,5% i 95% [363–365]. W moim materiale klinicznym pod koniec okresu obserwacji mniej niż trzy linie BCVA w skali Snellena utraciło 88% chorych. W badanej grupie chorych zaobserwowałam całkowite zamknięcie przecieku z CNV w 48,14% przypadków, dla porównania w grupie chorych objętych badaniem SUSTAIN odsetek ten wynosił 41,2%. Istotne zmniejszenie się CRT, przyjęte jako CRT < 225 μ m, odnotowano u 47,2% chorych w badaniu SUSTAIN i u 57,14% w badaniach własnych. Nieznaczne rozbieżności w uzyskanych wynikach badań mogą wynikać z faktu, że w badaniu SUSTAIN zastosowano inny preparat anty-VEGF (ranibizumab – Lucentis), okres obserwacji był dłuższy i wynosił 12 miesięcy, a badaniami objęto znacznie większą grupę chorych.

6. PODSUMOWANIE

W analizowanym materiale klinicznym PPS w surowicy chorych na AMD nie tylko występowały częściej, ale również w istotnie wyższych mianach niż u osób zdrowych. Poziom krążących PPS_{max} wykazał istotną statystyczną korelację ze stopniem zaawansowania wysiękowego AMD. Zwraca uwagę także złożoność profilu PPS u obserwowanych chorych, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [226, 247–255]. Jak wykazała analiza, żaden idiotyp PPS nie korelował z nasileniem zmian zwyrodnieniowych w płamce, co nie odbiega od obserwacji innych autorów [226, 251–255]. Mnogość i złożoność idiotypów PPS w surowicy chorych na AMD jest bardzo różna i waha się od 2 do 5 różnych swoistości antygenowo-komórkowych w zależności od publikacji, przy czym wszyscy są zgodni, że występowanie różnorodności idiotypów PPS w grupach kontrolnych jest zjawiskiem rzadszym, co również potwierdziły moje obserwacje. Złożony profil krążących PPS w surowicy chorych na AMD może sugerować udział wielu różnych mechanizmów immunologicznych w etiopatogenezie tego schorzenia. Nie można jednak wykluczyć, iż przeciwciała te pojawiają się wtórnie do już rozwiniętej patologii w płamce, a ich różnorodność może sugerować udział wielu czynników uszkodzających, działających na różnym poziomie siatkówki.

Leczenie wysiękowej postaci AMD doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu prowadzi do miejscowego zmniejszenia stężenia czynnika VEGF, zmniejszenia przepuszczalności naczyń krwionośnych i ograniczenia kontaktu komórek immunokompetentnych z antygenami siatkówkowymi, co może klinicznie objawiać się spadkiem produkcji krążących PPS. Ponadto uważa się, że zablokowanie czynnika VEGF ogranicza przechodzenie do środowiska wewnątrzgałkowego limfocytów biorących udział w produkcji tej cytokiny [288, 366]. Terapia anti-VEGF prowadzi zatem nie tylko do zamknięcia patologicznych naczyń w przestrzeni podsiatkówkowej, ale aktywnie hamuje zapalne i autoimmunologiczne reakcje uwikłane w patogenezę AMD.

Wyniki moich badań wskazują, iż krążące PPS mogą odzwierciedlać zaangażowanie mechanizmów zapalnych i autoimmunoagresji w patogenezę AMD i jednocześnie mogą być cennym wskaźnikiem aktywności CNV – istoty wysiękowej postaci tego schorzenia. Wyniki moich badań są pierwsze, które wykazały występowanie w surowicy chorych na wysiękową postać AMD przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonna naczyń krwionośnych (AECA). Nie wiadomo jednak, jaka jest dokładna rola tych autoprzeciwciał; być może, podobnie jak PPS, są one zaangażowane w patogenezę AMD, ale nie można też wykluczyć, że ich obecność jest epifenomenem, pojawiającym się wtórnie

do już istniejących zmian zwyrodnieniowych w plamce lub też stanowią uboczny efekt terapii czynnikiem anty-VEGF.

Wyniki dotychczasowych badań, jak również moje własne obserwacje, zwracają uwagę na autoimmunizacyjne podłoże AMD, lecz nie wskazują jednoznacznie na PPS jako czynnik odgrywający nadrzędną rolę w patogenezie tej choroby. Wydaje się, iż krążące PPS u chorych na wysiękową postać AMD mogą nasilać procesy zwyrodnieniowe, inicjowane przez różnorodne czynniki etiologiczne, doprowadzając do dramatycznej w swoich konsekwencjach przemiany ochronnej roli układu odpornościowego w autodestrukcyjną.

7. WNIOSKI

1. Obecność krążących PPS w surowicy u 95,9% chorych z wysiękową postacią AMD wskazuje na istotny udział autoimmunoagresji w patomechanizmie tego schorzenia.

2. Miano krążących PPS_{max} koreluje z nasileniem zmian zwyrodnieniowych w plamce u chorych z wysiękową postacią AMD; wyższe miano PPS_{max} występują w przypadkach z większym obrzękiem siatkówki, większą CNV oraz niższą BCVA.

3. Złożony profil idiotypowy PPS u 61,2% chorych może odzwierciedlać udział wielu czynników uszkodzających, działających na różnym poziomie siatkówki; nie ma zależności pomiędzy swoistością antygenową tych autoprzeciwciał a zaawansowaniem wysiękowego AMD.

4. Leczenie doszklistkowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin) prowadzi do zmniejszenia miana krążących PPS_{max}; dynamika ta jest największa w fazie „nasycającej” leczenia.

5. Obniżanie się miana PPS_{max} w surowicy chorych na AMD podczas prowadzonego leczenia antyangiogennego koreluje z poprawą BCVA oraz redukcją CRT, przy czym zależności te są najsilniej wyrażone w fazie „nasycającej” leczenia.

6. Oznaczanie w surowicy chorych z wysiękową postacią AMD krążących PPS może być cennym parametrem aktywności choroby. Przeciwciała te mogą pełnić rolę biomarkera wysiękowej postaci AMD oraz mogą służyć monitorowaniu leczenia doszklistkowymi iniekcjami anti-VEGF.

8. STRESZCZENIE

Wstęp

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (*age-related macular degeneration* – AMD) stało się w ostatnich latach poważnym problemem społecznym, stanowi bowiem najważniejszą przyczynę utraty widzenia centralnego u osób powyżej 50. roku życia w krajach rozwiniętych. Pomimo prowadzonych na całym świecie badań doświadczalnych i klinicznych patogenezę tego schorzenia pozostaje wciąż niewyjaśniona. Ostatnio sugeruje się, iż ważną rolę w rozwoju AMD odgrywa aktywacja układu immunologicznego. Uważa się, że nadreaktywność układu dopełniacza oraz immunoreaktywność w stosunku do antygenów siatkówki mogą stanowić zasadniczy mechanizm rozwoju i progresji zmian zwyrodnieniowych w plamce. Powszechnie znane jest zjawisko występowania w przebiegu chorób oczu, których patogenezę wiąże się z udziałem mechanizmów zapalnych i immunologicznych, krążących autoprzeciwciał, reagujących z różnymi antygenami siatkówkowymi. Przeprowadzone badania kliniczne zwróciły uwagę na występowanie w surowicy chorych na AMD przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS). Jednak żadne z opublikowanych do tej pory doniesień nie wyjaśnia w sposób jednoznaczny roli tych autoprzeciwciał w patologii tego schorzenia. Jednocześnie duże nadzieje wiąże się z nieustannie poszukiwanymi biomarkerami AMD, które odzwierciedlałyby aktywność zmian zwyrodnieniowych w plamce i jednocześnie mogłyby być powszechnie używaną metodą monitorowania skuteczności leczenia, a w trudnych i wątpliwych przypadkach byłyby pomocne w podjęciu decyzji o dalszym postępowaniu.

Cele pracy

Celem pracy było oszacowanie częstości występowania oraz profilu PPS w surowicy chorych z wysiękową postacią AMD oraz określenie, czy istnieje zależność pomiędzy idiotypem i mianem krążących PPS a stopniem zaawansowania choroby. W badaniach podjęto się ponadto oceny dynamiki zmian poziomu PPS w surowicy chorych w trakcie leczenia doszklistikowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin, Roche) i określenie zależności pomiędzy mianem krążących PPS a ocenianymi w trakcie leczenia parametrami

aktywności neowaskularyzacji naczyńkowej (*choroidal neovascularization* – CNV), takimi jak: najlepiej skorygowana ostrość wzroku (*best corrected visual acuity* – BCVA) i centralna grubość siatkówki (*central retinal thickness* – CRT). Celem pracy było także wykazanie, czy krążące PPS mogą być biomarkerem aktywności wysiękowej postaci AMD oraz czy mogą służyć monitorowaniu miejscowego leczenia antyangiogennego.

Material i metody

Badaniami objęto 98 chorych (108 oczu) z wysiękową postacią AMD zakwalifikowanych do leczenia doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin). Wśród badanych było 38 mężczyzn (39%) oraz 60 kobiet (61%) w wieku od 55 do 93 lat; średni wiek 76 lat. U żadnego z badanych nie przeprowadzono wcześniej leczenia zmian zwyrodnieniowych plamki. Z badań wykluczono chorych, u których stwierdzono przebyte lub współistniejące schorzenia siatkówki, zapalenie błony naczyniowej i/lub naczyń siatkówki, paraneoplastyczne retinopatie, jaskrę, cukrzycę oraz osoby przewlekle przyjmujące steroidy i/lub leki immunosupresyjne. Wśród badanych nie występowały żadne ogólnoustrojowe schorzenia o podłożu autoimmunizacyjnym.

Grupę kontrolną stanowiło 50 ogólnie zdrowych osób odpowiednio dobranych pod względem wieku i płci, bez zmian zwyrodnieniowych w plamce oraz bez żadnych innych współistniejących przewlekłych chorób narządu wzroku. Grupę tę wyłoniono spośród chorych operowanych z powodu zaćmy starczej. Obejmowała ona 20 mężczyzn (40%) i 30 kobiet (60%) w wieku od 53–91 lat; średni wiek 75,2 roku.

We wszystkich przypadkach przeprowadzono wstępne badanie okulistyczne, które obejmowało ocenę BCVA, przedniego odcinka i dna oka, CRT mierzoną przy użyciu optycznej koherentnej tomografii (*optical coherence tomography* – OCT) oraz angiografię fluoresceinową (FA), a w wybranych przypadkach angiografię indocyjaninową (*indocyanine green angiography* – ICGA). Kontrolne badania okulistyczne były przeprowadzane w odstępach comiesięcznych i obejmowały wszystkie parametry badania wyjściowego z wyjątkiem badań angiograficznych. Leczenie doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin, 1,25 mg) obejmowało dwie fazy: fazę „nasycającą”, podczas której każdy chory otrzymywał trzy kolejne iniekcje bewacizumabu w odstępach comiesięcznych, i fazę „podtrzymującą”, w której decyzję o podtrzymaniu lub zawieszeniu leczenia opierano na wyniku BCVA i CRT.

Obecność PPS w surowicy oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej (*indirect immunofluorescence test* – IIF) przy użyciu standardowego substratu tkankowego – skrawków mroźakowych prawidłowej siatkówki małpiej (Euroimmun, Lubeka, Niemcy) oraz poliwalentnej koziej surowicy antyglobulinowej (*anti-human IgAGM*) związanej z fluoresceiną (Euroimmun, Niemcy) jako wtórnego przeciwciała. W przypadku stwierdzenia pozytywnej reakcji w obrębie naczyń krwionośnych siatkówki surowicę badano w kierunku obecności przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonna (*anti-endothelial cell antibodies* – AECA) przy użyciu skrawków mięśnia lędźwiowo-biodrowego małpy i ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (*human umbilical vein endothelial cells* – HUVEC) jako substratu.

Autoprzeciwciała w surowicy oznaczano podczas badania wyjściowego oraz następnie w odstępach comiesięcznych w dniu kwalifikacji do kolejnych doszklistkowych iniekcji bewacizumabu (Avastin). Okres obserwacji wyniósł osiem miesięcy.

Wyniki

W badaniu wyjściowym spośród 98 chorych z wysiękową postacią AMD, w surowicy 94 (95,9%) wykazano obecność PPS, które występowały w mianach od 1:40 do 1:5120. W badanej grupie chorych najwyższe miana PPS odnotowano u chorych z obustronną CNV ($n = 10$) (1:160–1:5120). W surowicy chorych z obecnością CNV w jednym oku oraz druz miękkich i/lub przegrupowań barwnika na poziomie RPE w oku towarzyszącym ($n = 54$) miana krążących PPS wahały się od 1:80 do 1:640. W przypadkach z tarczową blizną w jednym oku i czynną CNV w oku towarzyszącym ($n = 30$) PPS występowały w mianach od 1:40 do 1:160. W grupie kontrolnej PPS występowały w 32% surowic, a ich miana wahały się od 1:10 do 1:40 ($p = 0,0000$). W grupie chorych na AMD zidentyfikowano pięć różnych idiotypów PPS, podczas gdy grupa kontrolna wykazała cztery typy immunofluorescencji. Różnice w rozkładzie idiotypów PPS w surowicy chorych na AMD i w grupie kontrolnej były istotne statystycznie ($p = 0,0000$). W 61,2% badanych surowic stwierdzono więcej niż jeden typ immunofluorescencji, podczas gdy w grupie kontrolnej mnogość PPS stwierdzono tylko w 15% surowic.

Ze względu na występowanie mnogości idiotypów PPS w badanych surowicach dla ułatwienia interpretacji uzyskanych wyników oraz monitorowania zachowania się tych autoprzeciwciał w okresie prowadzonej obserwacji w kolejnych badaniach kontrolnych analizie poddano tylko te PPS, które w wyjściowym badaniu występowały w największym, maksymalnym mianie (PPS_{max}) bez rozróżniania ich idiotypów.

W badaniu wyjściowym wykazano dodatnią istotną statystycznie zależność pomiędzy mianem PPS_{max} w surowicy chorych na AMD a wielkością CNV ocenianą w FA ($p = 0,0000$) oraz CRT mierzoną w OCT ($p = 0,0000$). Ponadto wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy średnim mianem PPS_{max} a typem CNV ($p = 0,0002$). Odnotowano także istotną zależność pomiędzy aktywnością i zaawansowaniem zmian zwyrodnieniowych w plamce, ocenianych jako średnica CNV i CRT a mnogością idiotypów krążących PPS, przy czym wzrost liczby idiotypów PPS w surowicy powyżej trzech nie wpływał już istotnie na wzrost nasilenia klinicznych objawów aktywności CNV.

U 30 (30,6%) chorych na AMD w teście IIF przy użyciu siatkówki małpiej jako substratu stwierdzono reakcję badanych surowic z naczyniami krwionośnymi siatkówki. IIF wykonane z zastosowaniem komórek HUVEC oraz komórek mięśnia lędźwiowo-biodrowego małpy potwierdziły obecność AECA we wszystkich 30 badanych surowicach w mianach od 1:10 do 1:320. W grupie kontrolnej AECA wykazano tylko w 9 przypadkach (18%), a miana tych autoprzeciwciał wahały się od 1:20 do 1:80. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznie zależności pomiędzy występowaniem AECA w surowicy chorych na AMD a cechami klinicznej aktywności CNV.

W okresie osmiomiesięcznej obserwacji odnotowano obniżanie się poziomu PPS_{max} w surowicy chorych na AMD w wyniku zastosowanego leczenia doszklistkowymi

iniekcjami bewacizumabu. Już w pierwszym miesiącu od włączenia leczenia pojawił się istotny statystycznie spadek miana PPS_{max} ($p = 0,006$), jak również w tym okresie obserwowano największą dynamikę obniżania poziomu PPS_{max}, która wynosiła średnio 58%. W drugim miesiącu obserwacji również stwierdzono istotny spadek miana krążących PPS_{max} ($p = 0,009$), a dynamika spadku miana PPS_{max} była również wysoka i wynosiła średnio 49%. W trzecim miesiącu od rozpoczęcia leczenia miana PPS_{max} zmniejszyły się średnio o 21% w porównaniu do poprzedniego badania ($p = 0,01$). W kolejnych badaniach kontrolnych (IV–VIII) dynamika zmian poziomu PPS_{max} w surowicy wyraźnie się zmniejszyła, a średnie zmiany miana PPS_{max} były nieistotne statystycznie.

W okresie prowadzonej obserwacji po pierwszej doszkliskowej iniekcji bewacizumabu wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy obniżaniem się miana PPS_{max} w surowicy a redukcją CRT. Od drugiej do ostatniej kontroli zaobserwowano, iż spadek poziomu tych autoprzeciwciał wiązał się z poprawą funkcji leczonego oka.

We wszystkich badaniach kontrolnych, z wyjątkiem badania VII, analiza statystyczna wykazała istnienie dodatniej korelacji pomiędzy wzrostem miana PPS_{max} w surowicy a kwalifikacją chorego do kolejnej doszkliskowej iniekcji bewacizumabu w fazie „podtrzymującej” leczenia.

W okresie obserwacji w surowicy 34 (34,7%) chorych odnotowano pojawienie się nowych idiotypów PPS. Nie wykazano jednak zależności pomiędzy pojawianiem się krążących PPS *de novo* a charakterystyką kliniczną zmian w plamce.

Wnioski

1. Obecność krążących PPS w surowicy u 95,9% chorych z wysiękową postacią AMD wskazuje na istotny udział autoimmunoagresji w patomechanizmie tego schorzenia.

2. Miano krążących PPS_{max} koreluje z nasileniem zmian zwyrodnieniowych w plamce u chorych z wysiękową postacią AMD; wyższe miano PPS_{max} występują w przypadkach z większym obrzękiem siatkówki, większą średnicą CNV oraz niższą BCVA.

3. Złożony profil idiotypowy PPS u 61,2% chorych może odzwierciedlać udział wielu czynników uszkodzających, działających na różnym poziomie siatkówki; nie ma zależności pomiędzy swoistością antygenową tych autoprzeciwciał a zaawansowaniem wysiękowego AMD.

4. Leczenie doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin) prowadzi do zmniejszenia miana krążących PPS_{max}; dynamika ta jest największa w fazie „nasycającej” leczenia.

5. Obniżanie się miana PPS_{max} w surowicy chorych na AMD podczas prowadzonego leczenia koreluje z poprawą BCVA oraz redukcją CRT, a zależności te są najsilniej wyrażone w fazie „nasycającej” leczenia.

6. Oznaczanie w surowicy chorych z wysiękową postacią AMD krążących PPS może być cennym parametrem aktywności choroby. Przeciwciała te mogą pełnić rolę biomarkera wysiękowej postaci AMD oraz mogą służyć monitorowaniu leczenia doszkliskowymi iniekcjami anty-VEGF.

9. ABSTRACT

Background

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of blindness in people over the age of 50 years in developed countries. Despite world-wide experimental and clinical studies, the pathogenesis of AMD still remains unclear. Several studies have implicated that hyperactivity and autoimmunity of the complement system against retinal antigens might be important in the disease process and progression. It has been known that ocular diseases in which inflammatory and autoimmune components play an important role, may be associated with the presence of circulating anti-retinal autoantibodies (ARA). Although the presence of serum ARA in patients with AMD has previously been reported, their precise role in the pathogenesis of the disease is not completely understood. Further search for optimal serum biomarkers of AMD, which might reflect disease activity and aid in monitoring treatment, especially in difficult cases, is under investigations.

Aim

The aim of this study was to assess the presence and profile of serum ARA in patients with exudative AMD, and to establish the correlation between the idiotypes and levels of ARA and disease activity. A second aim was to determine changes in ARA levels during intravitreal bevacizumab (Avastin, Roche) therapy and to assess the correlations between circulating ARA and the clinical parameters of disease activity, notably best corrected visual acuity (BCVA) and central retinal thickness (CRT). This study also attempts to determine whether ARA could act as serum biomarkers of the efficacy of anti-VEGF therapy.

Material and methods

The study included 98 patients (108 eyes) with exudative AMD treated with intravitreal bevacizumab (Avastin). There were 38 males (39%) and 60 females (61%) aged 55–93 years; mean age: 76 years. No previous treatment for AMD was performed in any patient included in the study. Exclusion criteria included: other retinal diseases, uveitis and/or retinal vasculitis, paraneoplastic retinopathies, glaucoma, diabetes and diabetic retinopathy, and systemic steroid and/or immunosuppressive medication. None of the patients had an associated autoimmune systemic disease. Fifty age- and sex-matched healthy subjects with no history of AMD or any chronic eye disease, requiring surgery for age-related cataracts served as controls. The control group consisted of 20 males (40%) and 30 females (60%) aged 53–91 years; mean age: 75.2 years.

Baseline examination in all cases included BCVA, slit lamp and fundus examination, OCT, and fluorescein angiography (FA); indocyanine green angiography (ICGA) was performed in selected cases. Follow-up were performed monthly and was the same as the baseline examination, except for angiography. All patients were treated with intravitreal bevacizumab (Avastin) 1.25 mg every four weeks during the first three months (a “loading” phase) and then the decision concerning reinjection was based on the results of BCVA and OCT (a “maintainance” phase).

In all patients serum ARA were determined using indirect immunofluorescence (IIF) on frozen sections of normal monkey retina as antigens substrate and fluorescein isothiocyanate – labelled goat’s anti-human IgAGM serum as the secondary antibody (Euroimmun, Lubeck, Germany). The sera of patients with a positive reaction within retinal vessels, were evaluated for the presence of anti-endothelial cell antibodies (AECA) on iliopsoas muscle sections and on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as substrates. Serum autoantibodies were detected at the beginning of the study and then immunohistochemical studies were repeated at 4 weekly intervals independently on the need to reinject. The total follow-up was 8 months.

Results

At baseline examination, 94 (95.5%) of the 98 patients with exudative AMD were positive for ARA at titres ranging from 1:40 to 1:5120. The highest titres were found in patients with bilateral CNV ($n = 10$) (1:160–1:5120). In patients with CNV in one eye and soft drusen and/or RPE disturbances in the other ($n = 54$) titres ranged from 1:80–1:640. In cases with a disciform scar in one eye and CNV in the other ($n = 30$), ARA were detected in titres ranging from 1:40 to 1:160. In the control group ARA were present in 32% of cases ranging from 1:10 to 1:40. The differences between the presence of and titres levels of ARA in patients with AMD and controls were statistically significant ($p = 0.0000$). In the AMD group five idiotypes of ARA were observed, while control sera demonstrated four staining patterns of reactivity against retinal tissue. Differences in ARA idiotypes in AMD and controls were statistically significant ($p = 0.0000$).

The sera of 61.2% patients with AMD showed more than one immunofluorescence type, while in control group the complexity of ARA idiotypes was observed only in 15%. During the follow-up period in patients whose sera were positive for more than one ARA idiootype, only that which occurred at the highest titres at the baseline examination was further evaluated (ARA_{max}).

At the baseline examination a positive correlation was found between titres of ARA_{max} and the diameter of CNV measured by FA ($p=0.0000$), and CRT assessed by OCT ($p = 0.0000$). A statistically significant correlation was noted between mean titres of ARA_{max} and the morphology of CNV ($p = 0.0002$). A positive correlation was also found between CNV diameter, CRT and the complexity of circulating ARA, however, the number of serum ARA idiotypes above three did not significantly influence disease activity.

In 30 patients (30.6%) IIF on frozen sections of normal monkey retina showed the presence of reaction within retinal vessels. IIF testing performed on monkey iliopsoas muscle and HUVEC cells confirmed the presence of AECA in these patients at titres ranging from 1:10 to 1:320. In the control group AECA were present in only 9 sera (18%), with titres ranging between 1:20 and 1:80. Statistical analysis did not show any significant correlation between the presence of AECA and activity of maculopathy.

During eight months of the follow-up a reduction of serum ARA_{max} titres was found. One month after the first injection a statistically significant decrease of ARA_{max} ($p = 0.006$) was noted, with changes in levels that achieved 58% as compared with the baseline examination. At the second follow-up a significant reduction of serum ARA_{max} titres was also observed ($p = 0.009$) with changes in levels assessed as 49%. At the end of the “loading” phase of therapy, the mean reduction of serum ARA_{max} titres was 21% as compared with the previous levels ($p = 0.01$). At further follow-ups (IV–VIII) the changes in circulating ARA_{max} decreased significantly but the mean reduction was not statistically significant.

During the follow-up after the first injection a significant correlation was noted between the decrease of serum ARA_{max} titres and reduction of CRT. At follow-ups II–VIII the decrease in circulating ARA_{max} titres correlated with improvement of BCVA.

In all follow-ups, except no. VII, statistical analysis showed a positive correlation between increase of serum ARA_{max} and the intravitreal reinjection of bevacizumab during the “maintainance” phase of therapy.

During the follow-up new idiotypes of ARA were detected in 34 (34.7%) of sera. No correlation was found between serum ARA that occur *de novo* and clinical activity of the disease.

Conclusions

1. The presence of serum ARA in 95.9% patients with exudative AMD indicates the involvement of an autoimmune mechanism in the disease process.

2. Serum levels of ARA_{max} correlate with the degree of AMD activity; higher titres being present in patients with more severe macular edema, large diameter CNV, and lower levels of BCVA.

3. The presence of circulating ARA idiotypes complexity in 61.2% of patients reflects the involvement of many factors acting at various levels of retinal tissue, but no correlation was found between ARA idotype and disease activity.

4. Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) reduce serum levels of ARA_{max} , with the greatest dynamics of deduction of titres being observed during the “loading” phase of therapy.

5. Reduction of serum ARA_{max} levels in patients with exudative AMD during anti-VEGF therapy correlates with improvement of BCVA and decrease in CRT, particularly during the “loading” phase.

6. Analysis of circulating ARA reflects the activity of exudative AMD. These autoantibodies aid in monitoring anti-VEGF therapy, and are helpful in deciding on the appropriate treatment regimen.

10. ANEKS

10.1. Zgody Komisji Bioetycznej UJ CM na leczenia chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin)

0000/00/542/3/08

19.08.2008



KOMISJA BIOETYCZNA UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

31-010 Kraków, ul. Jagiellońska 10 tel./fax: 012 431-26-59

Kraków, 19 sierpnia 2008 r.

DK/KB/CM-0031/577/2008

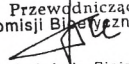
Wnioskodawca:

Dr hab. n. med. Bożena Romanowska – Dixon
Oddział Kliniczny Kliniki Okulistyki
i Onkologii Okulistycznej
Szpital Uniwersytecki w Krakowie
ul. Kopernika 18
31-501 Kraków

Szanowna Pani Docent,

W nawiązaniu do wniosku z dnia 24.06.2008 r i pisma z dnia 30.07.2008 r. pragnę poinformować o wyrażeniu zgody przez Komisję Bioetyczną UJ na zastosowanie u 60 pacjentów preparatu AVASTIN poza jego wskazaniami rejestracyjnymi.

Z poważaniem,

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej UJ

Prof. dr hab. Piotr Thor

DUWiO0/542/1/09

Npi. 26 II 2009.



KOMISJA BIOETYCZNA UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

31-010 Kraków, ul. Jagiellońska 10 tel./fax: 012 431-26-59

Kraków, 26 luty 2009 r.

DK/KB/CM-0031/223/2009

Wnioskodawca:

Dr hab. n. med. Bożena Romanowska – Dixon
Oddział Kliniczny Kliniki Okulistyki
i Onkologii Okulistycznej
Szpital Uniwersytecki w Krakowie
ul. Kopernika 18
31-501 Kraków

Szanowna Pani Docent,

W nawiązaniu do pisma z dnia 12.02.2009 r. pragnę poinformować o wyrażeniu zgody przez Komisję Bioetyczną UJ na objęcie leczeniem doszkliskowymi iniekcjami bevacizumabu (Avastin – Genetech) kolejnych 60 pacjentów chorych na wysiekowa postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD).

Z poważaniem,

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej UJ

Prof. dr hab. Piotr Thor



Kraków, 30 września 2010 r.
DK/KB/CM-00314006/2010

UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

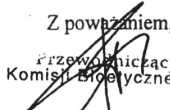
Wnioskodawca:

Dr hab. n. med. Bożena Romanowska – Dixon
Oddział Kliniczny Kliniki Okulistyki
i Onkologii Okulistycznej
Szpital Uniwersytecki w Krakowie
ul. Kopernika 18
31-501 Kraków

Komisja Bioetyczna
Uniwersytetu
Jagiellońskiego

Szanowna Pani Docent,

W nawiązaniu do pisma z dnia 30.06.2010 r. pragnę poinformować o wyrażeniu zgody przez Komisję Bioetyczną UJ na objęcie leczeniem doszklitkowymi iniekcjami bevacizumabu (Avastin – Genetech) kolejnych 60 pacjentów chorych na wysiękowa postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD).

Z poważaniem,

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej UJ
Prof. dr hab. Piotr Thor

ul. Jagiellońska 10
PL 31-010 Kraków
tel. +48(12) 422 04 11
wew. 349
tel./fax +48(12) 431 26 59
kbet@cm-uj.krakow.pl
www.cm-uj.krakow.pl/kbet

10.2. Wzór zgody pacjenta z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) na leczenie doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin)

Szpital Uniwersytecki w Krakowie
Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ
(Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Bożena Romanowska-Dixon)
ul. Kopernika 38, 31-501 Kraków
Sekretariat: tel./fax. 012-424 75 63; tel. 012-424 75 40

**ZGODA PACJENTA NA ZABIEG DOSZKLISKOWEGO PODANIA LEKU
AVASTIN (BEWACIZUMAB)**

I. DANE PACJENTA:

Imię i nazwisko pacjenta:
Data urodzenia:
Numer PESEL:
Rozpoznanie:.....
Proponowany zabieg:

**II. INFORMACJA DLA PACJENTA WRAZ Z OBJAŚNIENIEM RYZYKA
ZABIEGU:**

Przed udzieleniem przez Panią/Pana zgody na proponowany zabieg istnieje potrzeba wyjaśnienia, iż rozpoznano u Pani/Pana **AMD – zwyrodnienie plamki związane z wiekiem**. Zgodnie z zasadami współczesnej wiedzy medycznej na temat tego schorzenia, istnieją u Pani/Pana wskazania do wykonania zabiegu **INIEKCJI DO CIAŁA SZKLISTEGO LEKU AVASTIN**.

Celem proponowanego zabiegu jest w szczególności: zahamowanie procesu chorobowego, zmniejszenie wielkości zmiany chorobowej, oddalenie zagrożenia utraty wzroku. Avastin jest inhibitorem czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, który odgrywa kluczową rolę w rozwoju wysiękowej postaci AMD. Obecnie lek jest zarejestrowany do leczenia nowotworów przewodu pokarmowego i brak jest wskazań rejestracyjnych w schorzeniach okulistycznych. Jednak wyniki badań klinicznych wskazują na skuteczność doszkliskowych iniekcji tego leku w wysiękowej postaci AMD.

Żaden lekarz nie jest w stanie zagwarantować pełnego sukcesu zastosowanego leczenia oraz całkowitego braku ryzyka związanego z tym leczeniem. Ewentualne powikłania związane bezpośrednio lub pośrednio z proponowanym leczeniem mogą m.in. polegać na wystąpieniu: **zapalenia wnętrza gałki ocznej, odwarstwienia siatkówki, wylewu krwi do komory ciała szklistego, uszkodzenia soczewki (rozwój zaćmy), wzrostu ciśnienia wewnątrzgałkowego**. Ciężkie, zagrażające życiu lub śmiertelne powikłania proponowanego Pani/Panu leczenia zdarzają się niezmiernie rzadko.

III. OŚWIADCZENIE PACJENTA O WYRAŻENIU ZGODY NA DOSZKLI- STKOWE PODANIE PREPARATU AVASTIN:

Oświadczam, iż:

1. zostałam/em szczegółowo poinformowana/y o rozpoznanym u mnie schorzeniu oraz proponowanym mi zabiegu, wiem na czym ten zabieg ma polegać i jaki będzie jego zakres i przebieg, jaki jest jego cel i oczekiwany wynik oraz rokowania z nim związane;
2. zostałam/em szczegółowo poinformowana/y o ryzyku i EWENTUALNYCH POWIKŁANIACH związanych z przeprowadzeniem zabiegu, zostałam/em poinformowana/y jakie są alternatywne możliwości leczenia rozpoznanego u mnie schorzenia i mam świadomość zalet oraz wad proponowanego mi zabiegu, również w porównaniu z tymi możliwościami;
3. miałam/em możliwość zadawania pytań lekarzowi i przedstawienia mu swoich wątpliwości, a na zadane pytania i przedstawione wątpliwości uzyskałam/em zrozumiałe i wyczerpujące odpowiedzi oraz wyjaśnienia;
4. zgadzam się na przeprowadzenie zaproponowanego mi zabiegu;
5. zgadzam się, aby zabieg został przeprowadzony w **znieczuleniu miejscowym w trybie jednodniowym**;
6. w historii mojej choroby oraz podczas wywiadu i przeprowadzonych badań ujawniłam/em wszystkie znane mi schorzenia i dolegliwości i zarazem nie zataiłam/em istotnych informacji dotyczących mojego stanu zdrowia oraz przebytych chorób;
7. poinformowano mnie o konieczności odpowiedniego postępowania po przeprowadzeniu zabiegu i zobowiązuję się dokładnie przestrzegać zaleceń pozabiegowych i wizyt kontrolnych;
8. poinformowano mnie, że AVASTIN nie jest lekiem zarejestrowanym do wstrzyknięć do komory ciała szklistego, ale wyniki prowadzonych badań klinicznych z zastosowaniem tego preparatu wskazują na jego skuteczność w leczeniu wysiękowej postaci AMD.

Ewentualne uwagi pacjenta:

.....
(data)

.....
(podpis pacjenta)

.....
(pieczęć i podpis lekarza)

10.3. Wzór zgody pacjenta na pobieranie krwi i monitorowanie w surowicy poziomu przeciwciał przeciwiśiatkówkowych w okresie leczenia doszkliskowymi iniekcjami bewacizumabu (Avastin)

Szpital Uniwersytecki w Krakowie
Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ
(Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Bożena Romanowska-Dixon)
ul. Kopernika 38, 31-501 Kraków
Sekretariat: tel./fax. 012-424 75 63; tel. 012-424 75 40

Imię i nazwisko pacjenta:
PESEL:

**ZGODA PACJENTA NA POBIERANIE KRWI I MONITOROWANIE
W SUROWICY POZIOMU PRZECIWCIAŁ PRZECIWSIATKÓWKOWYCH
W OKRESIE LECZENIA DOSZKLISKOWYMI INIEKCJAMI PREPARATU
AVASTIN (BEWACIZUMAB)**

W związku z moim udziałem w programie pt.: „**Krające przeciwciała przeciwiśiatkówkowe jako immunologiczny marker wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD)**” wyrażam zgodę na pobieranie w czasie badań kontrolnych, które będą przeprowadzane w odstępach comiesięcznych, 3–5 ml krwi w celu oznaczania w surowicy krążących przeciwciał przeciwiśiatkówkowych.

.....
(data i podpis pacjenta)

.....
(data i podpis lekarza prowadzącego badania)

11. PIŚMIENICTWO

1. Alfaro D.V., Liggett P.E., Mieler W.F., Quiroz-Mercado H., Jager R.D., Tano Y.: Age-related macular degeneration. A comprehensive textbook. Lippincott Williams & Wilkinson, 2006, 1–12.
2. Nussbaum J.J., Pruett R.C., Delori F.C.: Historic perspectives: macular yellow pigment; the first 200 years. *Retina* 1981, 1, 296–310.
3. Konturek S.: Fizjologia człowieka. Neurofizjologia. Tom IV, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1998.
4. Blanks J.C.: Morphology and topography of the retina. [w:] Ryan S.J.: *Retina*, tom I, wydanie III, Wydawnictwo Mosby, St. Louis 2001, 32–53.
5. Lens A., Nemeth S.C., Ledford J.K.: Anatomia i fizjologia narządu wzroku. Wydanie pierwsze polskie pod red. Marty Misiuk-Hojło, Górnicki Wydawnictwo Medyczne, Wrocław 2010, 113–120.
6. Engerman R.L.: Development of retinal circulation. *Invest. Ophthalmol.* 1976, 15, 835–840.
7. Vinding T.: Age-related macular degeneration. An epidemiological study of 1000 elderly individuals with reference to prevalence, fundoscopic findings, visual impairment and risk factors. *Acta Ophthalmol. Scand. Suppl.* 1995, 217, 1–32.
8. Fine S.L., Berger J.W., Maguire M.G., Ho A.C.: Age-related macular degeneration. *N. Eng. J. Med.* 2000, 342(7), 483–492.
9. Klein R., Peto T., Bird A., Vannewkirk M.R.: The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 2004, 137(3), 486–495.
10. Mc Connel V., Silvestri G.: Age-related macular degeneration. *Ulster Med. J.* 2005, 74, 82–92.
11. Klein R., Klein B.E., Linton K.L.: Prevalence of age-related macular maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992, 99, 933–943.
12. Kahni H., Leibowitz H.M., Ganley J.P., Kini M.M., Colton T., Nickerson R.S., Dawber T.R.: The Framingham Eye Study. I. Outline and major prevalence findings. *Am. J. Epidemiol.* 1977, 106, 17–32.
13. Vingerling J.R., Dielemans I.M., Bots M.L., Hofman A., Grobbee D.E., de Jong P.T.: Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 1995, 142(4), 404–409.
14. Stankiewicz A.: Krytyczne spojrzenie na badanie CATT. [w:] *Badania kliniczne. Badanie CATT – okiem eksperta.* Wydawnictwa Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011, 2–7.
15. Krytyczne spojrzenie na badanie CATT. *Badanie CATT – okiem eksperta.* Wydawnictwa Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011, 12–15.
16. Nowak J.Z., Bienias W.: Zwyródnienie plamki związane z wiekiem (AMD): etiopatogeneza i strategie terapeutyczne. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2007, 61, 83–94.
17. Nowak J.Z.: Rola lipofuscyny w etiopatogenezie zwyródnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). *Mag. Okul.* 2005, 2, 103–114.

18. Duan Y., Mo J., Klein R., Scott I.U., Lin H.M., Caulfield J., Patel M., Liao D.: Age-related macular degeneration is associated with incident myocardial infarction among elderly Americans. *Ophthalmology* 2007, 114(4), 732–737.
19. Vingerling J.R., Hofman A., Grobbee D.E., de Jong P.T.: Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. *Arch. Ophthalmol.* 1996, 114(10), 1193–1196.
20. Klein R., Klein B.E., Moss S.E.: Relation of smoking to the incidence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Am. J. Epidemiol.* 1998, 147(2), 103–110.
21. Fraser-Bell S., Wu J., Klein R., Azen S.P., Varma R.: Smoking, alcohol intake, estrogen use and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Am. J. Ophthalmol.* 2006, 141(1), 79–87.
22. Smith W., Assink J., Klein R., Mitchell P., Klaver C.C., Klein B.E., Hofman A., Jensen S., Wang J., de Jong P.T.: Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 2001, 108(4), 697–704.
23. Mitchel P., Wang J.J., Smith W., Leeder S.R.: Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol.* 2002, 120(10), 1357–1363.
24. Tan J.S., Wang J.J., Liew G., Rochtchina E., Mitchell P.: Age-related macular degeneration and mortality from cardiovascular disease or stroke. *Br. J. Ophthalmol.* 2008, 92, 509–512.
25. Risk factors for exudative age-related macular degeneration. The Eye Disease Case-Control Study Group. *Arch. Ophthalmol.* 1992, 110, 701–708.
26. Snow K.K., Cote J., Yang W., Davis N.J., Seddon J.M.: Association between reproductive and hormonal factors and age-related maculopathy in postmenopausal women. *Am. J. Ophthalmol.* 2001, 134(6), 842–848.
27. Alverre P.V., Marshall J., Seregard S.: Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol. Scan.* 2006, 84, 4–15.
28. Roberts J.E.: Ocular phototoxicity. *J. Phot. Biol.* 2001, 64, 136–143.
29. Macular Photocoagulation Study Group. Five-year follow-up of fellow eyes of patients with age-related macular degeneration and unilateral extrafoveal choroidal neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* 1993, 111(9), 1189–1199.
30. van der Schaft T.L., Mooy C.M., de Bruijn W.C., Mulder P.G., Pameyer J.H., de Jong P.T.: Increased prevalence of disciform macular degeneration after cataract extraction with implantation of an intraocular lens. *Br. J. Ophthalmol.* 1994, 78(6), 441–445.
31. Dong L.M., Stark W.J., Jefferys J.L., Al-Hazzaa S., Bressler S.B., Solomon S.D., Bressler N.M.: Progression of age-related macular degeneration after cataract surgery. *Arch. Ophthalmol.* 2009, 27(11), 1412–1419.
32. Baatz H., Darawsha R., Ackermann H., Scharioth G.B., de Ortueta D., Pavlidis M., Hetttenbach L.O.: Phacoemulsification does not induce neovascular age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008, 49(3), 1079–1083.
33. Freeman E.E., Muntoz B., West S.K., Tielsch J.M., Schein O.D.: Is there an association between cataract surgery and age-related macular degeneration? Data from three population-based studies. *Am. J. Ophthalmol.* 2003, 135(6), 849–856.
34. Armbrecht A.M., Findlay C., Aspinall P.A., Hill A.R., Dhillon B.: Cataract surgery in patients with age-related macular degeneration: one-year outcomes. *J. Cataract. Refract. Surg.* 2003, 29(4), 686–693.
35. Chew E.Y., Sperduto R.D., Milton R.C., Clemons T.E., Gensler G.R., Bressler S.B., Klein R., Klein B.E., Ferris F.L. 3rd: Risk of advanced age-related macular degeneration after cataract surgery in the Age-Related Eye Disease Study: AREDS report 25. *Ophthalmology* 2009, 116(2), 297–303.
36. Strauss O.: The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 2005, 85(3), 845–881.
37. Sparrow J.R., Boulton M.: RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye. Res.* 2005, 80(5), 595–606.

38. Nowak J.Z., Wiktorowska-Owczarek A.: Neowaskularyzacja w tkankach oka: mechanizmy i rola czynników proangiogenicznych. *Klin. Oczna*. 2004, 106(1–2), 90–97.
39. Nowak J.Z., Waszczyk M.: Rola zapalenia i układu dopełniacza w etiopatogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). *Magazyn Okulistyczny* 2006, 3, 142–151.
40. Zhang S.X., Ma J.: Ocular neovascularization: Implication of endogenous inhibitors and potential therapy. *Prog. Retin. Eye. Res.* 2007, 26, 1–37.
41. Bhutto L.A., McLeod D.S., Hasegava T., Kim S.Y., Merges C., Tong P., Luty G.A.: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp. Eye. Res.* 2006, 82, 99–110.
42. Dorrell M., Uusitalo-Jarvinen H., Aguilar E., Friedlander M.: Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv. Ophthalmol.* 2007, 52, 3–19.
43. Nowak J.Z., Bienias W.: Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD): etiopatogeneza i strategie terapeutyczne. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2007, 61, 83–94.
44. Nowak J.Z.: Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol. Rep.* 2006, 58(3), 353–363.
45. Nowak J.Z.: Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem a układ odpornościowy: ile immunologii jest w AMD? *Magazyn Lekarza Okulisty* 2009, 3(2), 102–114.
46. Ng K.P., Gugiu B., Renganathan K., Davies M.W., Gu X., Crabb J.S., Kim S.R., Rózanowska M.B., Bonilha V.L., Rayborn M.E., Salomon R.G., Sparrow J.R., Boulton M.E., Hollyfield J.G., Crabb J.W.: Retinal pigment epithelium lipofuscin proteomics. *Mol. Cell. Proteomics.* 2008, 7(7), 1397–1405.
47. Warburton S., Southwick K., Hardman R.M., Secret A.M., Grow R.K., Xin H., Woolley A.T., Burton G.F., Thulin C.D.: Examining the proteins of functional retinal lipofuscin using proteomic analysis as a guide for understanding its origin. *Mol. Vis.* 2005, 15, 1122–1134.
48. Zhou J., Jang Y.P., Kim S.R., Sparrow J.R.: Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103(44), 16182–16187.
49. Zhou J., Kim S.R., Westlund B.S., Sparrow J.R.: Complement activation by bis-retinoid constituents of RPE lipofuscin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009, 50(3), 1392–1399.
50. Glica M., Stoian I., Atanasiu V., Virgolici B.: The oxidative hypothesis of senescence. *J. Postgrad. Med.* 2007, 53, 207–213.
51. Harman D.: Free radicals theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, 717, 1–15.
52. Beatty S., Koh H.H., Phil M., Henson D., Boulton M.: The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 2000, 45, 115–134.
53. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007, 39, 44–84.
54. Janik-Papis K., Ulińska M., Krzyżanowska A., Stoczyńska E., Borucka A.I., Woźniak K., Zaráś M., Szflik J.P., Błasiak J.: Mechanizmy oksydacyjne w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Klin. Oczna* 2009, 111(4–6), 168–173.
55. SanGiovanni J.P., Chew E.Y.: The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye. Res.* 2005, 24, 87–138.
56. Sparrow J.R., Nakanishi K., Parish C.A.: The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, 41, 1981–1989.
57. Nowak J.Z., Antoniuk K.: Udział genów w etiopatogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). *Magazyn Lekarza Okulisty* 2008, 2(1), 44–53.
58. Janik-Papis K., Zaráś M., Składowska A., Ulińska M., Borucka A.I., Błasiak J.: Aspekty genetyczne zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Klin. Oczna* 2009, 111(4–6), 178–182.

59. Chamberlain M., Baird P., Dirani M., Guymer R.: Unrevealing a complex genetic disease: age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 2006, 51, 576–587.
60. Tuo J., Bojanowski C.M., Chan C.C.: Genetic factors of age-related macular degeneration. *Progr. Retin. Eye. Res.* 2004, 23, 229–249.
61. Antoniak K., Bienias W., Nowak J.Z.: Zwyródnienie plamki związane z wiekiem (AMD) – choroba o wieloczynnikowym podłożu genetycznym. *Klin. Oczna* 2008, 110, 211–218.
62. Nowak J.Z.: W poszukiwaniu biomarkerów dla zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). *Magazyn Lekarza Okulisty* 2009, 3(3), 132–143.
63. Francis P.J., Hamon S.C., Ott J., Weleber R.G., Klein M.L.: Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age-related macular degeneration associated with visual loss. *J. Med. Genet.* 2009, 28(1), 1–18.
64. Jakobson J., Conley Y.P., Weeks D.E., Ferrel R.E., Gorin M.B.: C2 and CFB genes in age-related macular degeneration and joint action with CFH and LOC387715 genes. *PLoS ONE.* 2008, 21, 3(5): e2199.
65. Seitsonen S., Järvelä I., Meri S., Tommila P., Ranta P., Immonen I.: Complement factor H Y402H polymorphism and characteristics of exudative age-related macular degeneration lesions. *Acta Ophthalmol.* 2008, 86(4), 390–394.
66. Klein R.J., Zeiss C., Chew E.Y., Tsai J.Y., Sackler R.S., Haynes C., Henning A.K., SanGiovanni J.P., Mane S.M., Mayne S.T., Bracken M.B., Ferris F.L., Ott J., Barnstable C., Hoh J.: Complement factor H polymorphism in age – related macular degeneration. *Science* 2005, 308, 385–389.
67. Brantley M.A. Jr, Fang A.M., King J.M., Tewari A., Kymes S.M., Shiels A.: Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology* 2007, 114, 2168–2173.
68. Ernis S., Jomary C., Mullins R., Cree A., Chen X., Macleod A., Jones S., Collins A., Stone E., Lotery A.: Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration: a two stage case-control study. *Lancet* 2008, 372, 1828–1834.
69. Stankiewicz A., Figurska M.: Zwyródnienie plamki związane z wiekiem. Przewodnik diagnostyki i terapii. *Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań* 2010, 9–51.
70. Wylegała E., Teper S., Piłat J.: Zwyródnienie plamki związane z wiekiem. *Górnicki Wydawnictwo Medyczne, Wrocław* 2011, 7–11.
71. Myers S.M.: A twin study on age-related macular degeneration. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 1994, 92, 775–884.
72. Kałużny B.J.: Czynniki ryzyka i profilaktyka starczego zwyrodnienia plamki. *Okulistyka* 2002, 2, 9–13.
73. Kuehn B.M.: Gene discovery provides clues to cause of age-related macular degeneration. *JAMA* 2005, 293, 1841–1845.
74. Traboulsi E.I.: The challenges and surprises of studying the genetics of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 2005, 139, 908–911.
75. Friedman E., Ivry M., Ebert E., Glynn R., Gragoudas E.S., Seddon J.: Increased scleral rigidity and age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 1989, 96, 104–108.
76. Friedman E., Krupsky S., Lane A., Oak S., Friedman E., Egan K., Gragoudas E.: Ocular blood flow velocity in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1995, 102, 640–646.
77. Friedman E.: A hemodynamic model of the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 1997, 124, 677–682.
78. Prünte C., Niesel P.: Quantification of choroidal blood-flow parameters using indocyanine green video-fluorescence angiography and statistical picture analysis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1988, 226(1), 55–58.
79. Boker T., Fang T., Steinmetz R.: Refractive error and choroidal perfusion characteristics in patients with choroidal neovascularization and age-related macular degeneration. *Ger. J. Ophthalmol.* 1993, 2, 10–13.

80. Zhao J., Frambach D., Lee P., Lee M., Lopez P.: Delayed macular choriocapillary circulation in age-related macular degeneration. *Int. Ophthalmol.* 1995, 19, 1–12.
81. Pauleikhoff D., Chen J., Chisholm I., Bird A.: Choroidal perfusion abnormality with age-related Bruch's membrane change. *Am. J. Ophthalmol.* 1990, 109, 211–217.
82. Ciulla T.A., Harris A., Martin B.J.: Ocular perfusion and age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2001, 79, 108–115.
83. Ross R., Barofsky J., Cohen G., Baber W., Palao S., Gitter K.: Presumed macular choroidal watershed vascular filling, choroidal neovascularization, and systemic vascular disease in patients with age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 1998, 125, 71–80.
84. Grunwald J., Hariprasad S., DuPont J., Maguire M., Fine S., Brucker A., Maguire A., Ho A.: Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998, 39(2), 385–390.
85. Hageman G.S., Luthert P.J., Chang N.H.V., Johnson L.V., Anderson D.H., Mullins R.F.: An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye. Res.* 2001, 20(6), 705–732.
86. Machalińska A., Karczewicz D.: Rola układu dopełniacza w patogenezie AMD. *Klin. Oczna* 2009, 111 (10–12), 384–387.
87. Donoso L.A., Kim D., Frost A., Callahan A., Hageman G.: The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 2006, 51, 137–152.
88. Johnson L.V., Leitner W.P., Staples M.K., Anderson D.H.: Complement activation and inflammatory processes in drusen formation and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 2001, 73, 887–896.
89. Nowak J.Z.: Druzy, złogi podstawne, proces zapalny i zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD). *Magazyn Okulistyczny* 2005, 2(3), 174–186.
90. Buschini E., Piras A., Nuzzi R., Vercelli A.: Age-related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina. *Prog. Neurobiol.* 2011, 95(1), 14–25.
91. Nitsch D., Douglas I., Smeeth L., Fletcher A.: Age-related macular degeneration and complement activation-related diseases: a population-based case-control study. *Ophthalmology* 2008, 115(11), 1904–1910.
92. Anderson D.H., Radeke M.J., Gallo N.B., Chapin E.A., Johnson P.T., Curletti C.R., Hancox L.S., Hu J., Ebright J.N., Malek G., Hauser M.A., Rickman C.B., Bok D., Hageman G.S., Johnson L.V.: The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog. Retin. Eye. Res.* 2010, 29(2), 95–112.
93. Roitt I., Brostoff J., Male D.: *Immunologia kliniczna*. Wydanie pierwsze polskie pod redakcją Jana Żeromskiego, Wydawnictwo Medyczne Słotwiński Verlag, Brema 1996, 13.1–13.17.
94. Ambati J., Anand A., Fernandez S., Sakurai E., Lynn B.C., Kuziel W.A., Rollins B.J., Ambati B.K.: An animals model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat. Med.* 2003, 9, 1390–1397.
95. Umeda S., Suzuki M.T., Okamoto H., Ono F., Mizota A., Terao K., Yoshikawa Y., Tanaka Y., Iwata T.: Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J.* 2005, 19(12), 1683–1685.
96. Sarks S., Cherepanoff S., Killingsworth M., Sarks J.: Relationship of basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007, 48(3), 986–977.
97. Sarks S.H., Arnold J.J., Killingsworth M., Sarks J.: Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age-related maculopathy: a clinicopathological study. *Br. J. Ophthalmol.* 1999, 83(3), 368–386.

98. Crabb J.W., Miyagi M., Gu X., Shadrach K., West K.A., Sakaguchi H., Kamei M., Hasan A., Yan L., Rayborn M.E., Salomon R.G., Hollyfield J.G.: Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99(23), 14682–14687.
99. Mullins R.F., Russel S.R., Anderson D.H., Hageman G.S.: Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis and dense deposit disease. *FASEB J.* 2000, 14, 835–846.
100. Bora P.S., Sohn J.H., Cruz J.M., Jha P., Nishihori H., Wang Y., Kaliappan S., Kaplan H.J., Bora N.S.: Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J. Immunol.* 2005, 174(1), 491–497.
101. Xu H., Chen M., Forrester J.V.: Para-inflammation in the aging retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 2009, 28(5), 348–368.
102. Augustin A.J., Kirchof J.: Inflammation and the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Expert. Opin. Ther. Targets* 2009, 13(6), 641–651.
103. Nowak J.Z.: AMD i brKZN – podobieństwa w patomechanizmie i symptomatologii: systemowa nadaktywność dopełniacza induktorem choroby oka i nerki. *Magazyn Lekarza Okulisty* 2010, 4(3), 154–168.
104. Johnson L.V., Ozaki S., Staples M.K., Erickson P.A., Anderson D.H.: A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp. Eye. Res.* 2000, 70(4), 441–449.
105. Kijlstra A., La Heij E., Hendrikse F.: Immunological factors in the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2005, 13(1), 3–11.
106. Spraul C.W., Lang G.E., Grossniklaus H.E., Lang G.K.: Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Surv. Ophthalmol.* 1999, 44, Suppl. 1, 166–168.
107. Grossniklaus H.E., Miskala P.H., Green W.R., Bressler S.B., Hawkins B.S., Toth C., Wilson D.J., Bressler N.M.: Histopathologic and ultrastructural features of surgically excised subfoveal choroidal neovascular lesions: submacular surgery trials report no. 7. *Arch. Ophthalmol.* 2005, 123, 914–921.
108. Neumann F.J.: *Chlamydia pneumoniae* – atherosclerosis link: a sound concept in search for clinical relevance. *Circulation* 2002, 106(19), 2414–2416.
109. Shima K., Kuhlenbäumer G., Rupp J.: *Chlamydia pneumoniae* infection and Alzheimer's disease: a connection to remember? *Med. Microbiol. Immunol.* 2010, 199(4), 283–289.
110. Kalayoglu M.V., Galvan C., Mahdi O.S., Byrne G.I., Mansour S.: Serological association between *Chlamydia pneumoniae* infection and age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 2003, 121, 478–482.
111. Robman L., Mahdi O., McCarty C., Dimitrov P., Tikellis G., McNeil J., Byrne G., Taylor H., Guymer R.: Exposure to *Chlamydia pneumoniae* infection and progression of age-related macular degeneration. *Am. J. Epidemiol.* 2005, 161, 1013–1019.
112. Robman L., Mahdi O.S., Wang J.J., Burlutsky G., Mitchell P., Byrne G., Guymer R., Taylor H.: Exposure to *Chlamydia pneumoniae* infection and age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007, 48, 4007–4011.
113. Paldanius M., Bloigu A., Alho M., Leinonen M., Saikku P.: Prevalence and persistence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in healthy laboratory personnel in Finland. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12(5), 654–659.
114. Marrie T.J.: *Chlamydia pneumoniae*. *Thorax* 1993, 6, 7–8.
115. Żaczek-Zakrzewska K., Smużyńska M., Formińska-Kapuścik M.: Rola czynników zapalnych w etiopatogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Magazyn Lekarza Okulisty* 2009, 3(1), 11–18.
116. Kalayoglu M.V., Bula D., Arroyo J., Gragoudas E.S., D'Amico D., Miller J.W.: Identification of *Chlamydia pneumoniae* within human choroidal neovascular membranes second-

- ary to age-related macular degeneration. Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2005, 243, 1080–1090.
117. Klein R., Klein B.E., Knudtson M.D., Wong T.Y., Shankar A., Tsai M.Y.: Systemic markers of inflammation, endothelial dysfunction, and age-related maculopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 2005, 140(1), 35–44.
 118. Kessler W., Jantos C.A., Dreier J., Pavlovic S.: *Chlamydia pneumoniae* is not detectable in subretinal neovascular membranes in the exudative stage of age-related macular degeneration. *Acta. Ophthalmol. Scand.* 2006, 84, 333–337.
 119. Haas P., Steindl K., Schmid-Kubista K.E., Aggermann T., Krugluger W., Hageman G.S., Binder S.: Complement factor H gene polymorphisms and *Chlamydia pneumoniae* infection in age-related macular degeneration. *Eye (Lond.)* 2009, 23(12), 2228–2232.
 120. Dreyhaupt J., Mansmann U., Pritsch M., Dolar-Szczasny J., Bindewald A., Holz F.G.: Modelling the natural history of geographic atrophy in patients with age related macular degeneration. *Ophthalmic Epidemiol.* 2005, 12(6), 353–362.
 121. Holz F.G., Pauleikhoff D., Klein R., Bird A.C.: Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am. J. Ophthalmol.* 2004, 137(3), 504–510.
 122. Zarbin M.A.: Age-related macular degeneration: review of pathogenesis. *Eur. J. Ophthalmol.* 1998, 8(4), 199–206.
 123. Stefánsson E., Geirsdóttir A., Sigurdsson H.: Metabolic physiology in age related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye. Res.* 2011, 30(1), 72–80.
 124. Nowak J.Z., Antoniak K.: Postać wysiękowa zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD): uwarunkowania molekularno-komórkowe i terapia celowana z zastosowaniem preparatu bewacizumab (Avastin). *Magazyn Lekarza Okulisty* 2007, 2, 34–47.
 125. Forooghian F., Razavi R., Timms L.: Hypoxia-inducible factor expression in human RPE cells. *Br. J. Ophthalmol.* 2007, 91, 1406–1410.
 126. Arjamaa O., Nikinmaa M.: Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp. Eye Res.* 2006, 83, 473–483.
 127. Adamis A.P., Shima D.T., Yeo K.T., Yeo T.K., Brown L.F., Berse B., D'Amore P.A., Folkman J.: Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 193(2), 631–638.
 128. Spilisbury K., Garrett K.L., Shen W., Constable I.J., Rakoczy P.E.: Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2000, 157 (1), 135–144.
 129. Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., Crawford S.E., Xu H., Benedict W., Bouck N.P.: Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999, 285(5425), 245–248.
 130. Oh H., Takagi H., Tagaki C., Suzuma K., Otani A., Ishida K., Matsumura M., Ogura Y., Honda Y.: The potential angiogenic role of macrophages in formation of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999, 40(9), 1891–1898.
 131. Renganathan K., Ebrahim Q., Vasanji A., Gu X., Lu L., Sears J., Salomon R.G., Anand-Apte B., Crabb J.W.: Carboxyethylpyrrole adducts, age-related macular degeneration and neovascularization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 613, 261–268.
 132. Gu X., Meer S.G., Miyagi M., Rayborn M.E., Hollyfield J.G., Crabb J.W., Salomon R.G.: Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(43), 42027–42035.
 133. Salomon R.G., Hong L., Hollyfield J.: The discovery of carboxyethylpyrroles (CEPs): critical insights into AMD, autism, cancer and wound healing from basic research on the chemistry of oxidized phospholipids. *Chem. Res. Toxicol.* 2011, October 3, DOI: 10.1021/tx200206v. <http://pubs.acs.org>.
 134. Lambert V., Wielockx B., Munaut C., Galopin C., Jost M., Itoh T., Werb Z., Baker A., Libert C., Krell H.W., Foidart J.M., Noël A., Rakic L.M.: MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB J.* 2003, 17(15), 2290–2292.

135. Tatar O., Adam A., Shinoda K., Eckert T., Scharioth G.B., Klein M., Yoeruek, Bartz-Schmidt K.U., Grisanti S.: Matrix metalloproteinases in human choroidal neovascular membranes excised following verteporfin photodynamic therapy. *Br. J. Ophthalmol.* 2007, 91, 1183–1189.
136. Otani A., Takagi H., Oh H., Koyama S., Matsumura M., Honda Y.: Expressions of angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999, 40(9), 1912–1920.
137. Hangai M., Murata T., Miyawaki N., Spee C., Lim J.I., He S., Hinton D.R., Ryan S.J.: Angiopoietin-1 upregulation by vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001, 42(7), 1617–1625.
138. Sheu S.J., Sakamoto T., Osusky R., Wang H.M., Ogden T.E., Ryan S.J., Hinton D.R., Gopalakrishna R.: Transforming growth factor- β regulates human retinal pigment epithelial cell phagocytosis by influencing a protein kinase C-dependent pathway. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1994, 32(11), 695–701.
139. Bressler N.M.: Early detection and treatment of neovascular age-related macular degeneration. *J. Am. Board. Fam. Pract.* 2002, 15(2), 142–152.
140. Kański J.J., Milewski S.A.: Choroby plamki. Górnicki Wydawnictwo Medyczne, Wrocław 2003, 19–35.
141. Kanski J.J.: Clinical ophthalmology. A systematic approach. Wydanie VI, Wydawnictwa Butterworth-Heinemann-Elsevier, 2007, 627–644.
142. Mattice E., Wolfe C.P.: Using the Amsler grid. *J. Ophthalmic. Nurs. Technol.* 1986, 5(1), 34.
143. Williams R.A., Brody B.L., Thomas R.G., Kaplan R.M., Brown S.I.: The psychosocial impact of macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 1998, 116(4), 514–520.
144. Brody B.L., Gamst A.C., Williams R.A., Smith A.R., Lau P.W., Dolnak D., Rapaport M.H., Kaplan R.M., Brown S.I.: Depression, visual acuity, comorbidity, and disability associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2001, 108(10), 1893–1900.
145. Kubicka-Trząska A., Święch-Zubilewicz A., Jankowska-Lech I.: Rola lekarza pierwszego kontaktu we wczesnym rozpoznawaniu zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). [w:] *Zasady postępowania w AMD*, Warszawa 2006, 7–10.
146. Cook H.L., Patel P.J., Tufail A.: Age-related macular degeneration: diagnosis and management. *Br. Med. Bull.* 2008, 85, 127–149.
147. De Jong P.T.: Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355(14), 1474–1485.
148. Kałużny J., Mierzejewski A., Milewski S.A., Kałużny J.J.: Badania angiograficzne dna oka. Wydawnictwo Volumed, Wrocław 1998, 85–95.
149. Berkow J.W., Flower R.W., Orh D.H., Kelly J.S.: Angiografia fluoresceinowa i indocyjaninowa. Technika i interpretacja. Wydanie pierwsze polskie pod redakcją Marty Misiuk-Hojło, Górnicki Wydawnictwo Medyczne, Wrocław 2004, 91–123.
150. Yanuzzi L.A., Flower R.W., Slakter J.S.: Indocyanine green angiography. Wydawnictwo Mosby, 1997, 151–230.
151. Fukushima I., Kusaka K., Takahashi K., Kishimoto N., Nishimura T., Ohkuma H., Uyama M.: Comparison of indocyanine green and fluorescein angiography of choroidal neovascularization. *Jpn. J. Ophthalmol.* 1997, 41(5), 284–296.
152. Wylegała E., Nowińska A., Teper S.: *Bedeker Okulistyczny. Optyczna koherentna tomografia. Tom II*, Górnicki Wydawnictwo Medyczne, Wrocław 2010, 15–53.
153. Henschel A., Spital G., Lommatzsch A., Pauleikhoff D.: Optical coherence tomography in neovascular age related macular degeneration compared to fluorescein angiography and visual acuity. *Ophthalmologica* 2008, 222(4), 240–244.
154. Liakopoulos S., Ongchin S., Bansal A., Msutta S., Walsh A.C., Updike P.G., Sadda S.R.: Quantitative optical coherence tomography findings in various subtypes of neovascular age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008, 49(11), 5048–5054.

155. Malamos P., Sacu S., Georgopoulos M., Kiss C., Prunte C., Schmidt-Erfurth U.: Correlation of high-definition optical coherence tomography and fluorescein angiography imaging in neovascular macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009, 50(10), 926–933.
156. La Cour M., Kiilgaard J.F., Nissen M.H.: Age-related macular degeneration: Epidemiology and optimal treatment. *Drugs Aging* 2002, 19(2), 101–133.
157. Klein R., Davis M.D., Magli Y.L., Segal P., Klein B.E., Hubbard L.: The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology* 1991, 98(1), 128–134.
158. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2000, 107(2), 224–232.
159. Seddon J.M., Sharma S., Adelman R.A.: Evaluation of the Clinical Age-Related Maculopathy Staging System. *Ophthalmology* 2006, 113(2), 260–266.
160. Macular Photocoagulation Study Group. Laser Photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-year results from randomized clinical trials. *Arch. Ophthalmol.* 1994, 112, 500–509.
161. Macular Photocoagulation Study Group. Laser Photocoagulation for subfoveal neovascular lesion in age-related macular degeneration. Results from randomized clinical trial. *Arch. Ophthalmol.* 1991, 109, 1220–1231.
162. Finger P.T., Berson A., Sherr A., Riley R., Balkin R.A., Bosworth J.L.: Radiation therapy for subretinal neovascularization. *Ophthalmology* 1996, 103(6), 878–889.
163. Hoeller U., Fuisting B., Schwartz R., Roeper B., Richard G., Alberti W.: Results of radiotherapy of subfoveal neovascularization with 16 and 20 Gy. *Eye* 2005, 19(11), 1151–1156.
164. Reichel E., Berrocal A.M., Ip M., Kroll A.J., Desai V., Duker J.S., Puliafito C.A.: Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1999, 106, 1908–1914.
165. Thach A.B., Sipperley J.O., Dugel P.U., Sneed R.S., Park D.W., Cornelius J.: Large-size spot transpupillary thermotherapy for treatment of occult choroidal neovascularization associated with age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 2003, 121, 817–820.
166. Ahuja R.M., Benner J.D., Schwartz J.C., Butler J.W., Steidl S.M.: Efficacy of transpupillary thermotherapy (TTT) in the treatment of occult subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Semin. Ophthalmol.* 2001, 16(2), 81–85.
167. Park C.H., Duker J.S., Mainster M.A., Puliafito C.A., Reichel E.: Transpupillary thermotherapy (TTT) of occult choroidal neovascularization. A retrospective noncomparative case series of fifty-seven eyes. *Semin. Ophthalmol.* 2001, 16(2), 66–69.
168. Algvere P.V., Libert C., Lindgarde G., Seregard S.: Transpupillary thermotherapy of predominantly occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with 12 months follow-up. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2003, 81, 110–117.
169. Kubicka-Trzaska A., Romanowska-Dixon B.: Transpupillary thermotherapy with injections of triamcinolone acetonide under posterior Tenon's capsule in the treatment of exudative age-related macular degeneration (AMD). *Klin. Oczna* 2010, 10–12 (112), 289–292.
170. Kubicka-Trzaska A., Starzyka M., Ortyl E., Górnica-Bednarz A., Karska-Basta I.: Przezręcznicza termoterapia w leczeniu wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Klin. Oczna* 2007, 109, 142–145.
171. Chen F.K., Patel P.J., Uppal G.S., Tufail A., Coffey P.J., Da Cruz L.: Long-term outcomes following full macular translocation surgery in neovascular age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 2010, 94(10), 1347–1343.
172. Submacular Surgery Trials (SST) Research Group, Surgery for Subfoveal Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration: Ophthalmic Findings: SST Report No.11. *Ophthalmology* 2004, 111(11), 1967–1980.
173. Bressler N.M.: Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic Therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin. Two-year results of 2 randomized clinical trials – TAP report 2. *Arch. Ophthalmol.* 2001, 119(2), 198–207.

174. Schmidt-Erfurth U., Schlötzer-Schrehard U., Cursiefen C., Michels S., Beckenndorf A., Naumann G.O.: Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003, 44(10), 4473–4480.
175. Treatment of Age-Related Macular Degeneration With Photodynamic Therapy (TAP) Study Group. Photodynamic Therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: One-year results of 2 randomized clinical trials-TAP report. *Arch. Ophthalmol.* 1999, 117(10), 1329–1345.
176. Blinder K.J., Bradley S., Bressler N.M., Bressler S.B., Donati G., Hao Y., Ma C., Menchini U., Miller J., Potter M.J., Pournaras C., Reaves A., Rosenfeld P.J., Strong H.A., Stur M., Su X.Y., Virgili G.: Treatment of Age-related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy study group: Verteporfin in Photodynamic Therapy study group. Effect of lesion size, visual acuity, and lesion composition on visual acuity change with and without verteporfin therapy for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: TAP and VIP report no. 1. *Am. J. Ophthalmol.* 2003, 136(3), 407–418.
177. Kubicka-Trząska A., Starzycka M.: Zastosowanie zieleni indocyjaninowej w leczeniu fotodynamicznym neowaskularyzacji podsiatkówkowej w przebiegu zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem – doniesienie wstępne. *Klin. Oczna* 2003, 105(6), 351–354.
178. Silva R.A., Moshfeghi A.A., Kaiser P.K., Singh R.P., Moshfeghi D.M.: Radiation treatment for age-related macular degeneration. *Semin. Ophthalmol.* 2011, 26(3), 121–130.
179. Chen F.K., Uppal G.S., MacLaren R.E., Coffey P.J., Rubin G.S., Tufail A., Aylward G.W., Da Cruz L.: Long-term visual and microperimetry outcomes following autologous retinal pigment epithelium choroid graft for neovascular age-related macular degeneration. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 2009, 37(3), 275–285.
180. Gragoudas E.S., Adamis A.P., Cunningham E.T. Jr., Feinsod M., Guyer D.R.: VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group: Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2004, 351(27), 2805–2816.
181. Brown D.M., Kaiser P.K., Michels M., Brown D.M., Kaiser P.K., Michels M., Soubrane G., Heier J.S., Kim R.Y., Sy J.P., Schneider S.: ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355, 1432–1444.
182. de Andrade D.P., Lima J.P., Lima A.D., Sasse A.D., dos Santos L.V.: Bevacizumab in metastatic colorectal cancer and carcino-embryonic antigen kinetics: case report and review of literature. *Anticancer Drugs* 2011, 22, Suppl. 2, 15–17.
183. Cleary C.A., Jungkim S., Ravikumar K., Kelliher C., Acheson R.W., Hickey-Dwyer M.: Intravitreal bevacizumab in the treatment of neovascular age-related macular degeneration, 6- and 9-month results. *Eye* 2008, 22, (1), 82–86.
184. Schouten J.S., La Heij E.C., Webers C.A.B., Lundqvist I.J., Hendrikse F.: A systemic review on the effect of bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2009, 247(1), 1–11.
185. Figurska M.: Efektywność i bezpieczeństwo leczenia wysiękowego zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem doszkliskowymi iniekcjami bevacizumabu w obserwacji 6-miesięcznej. *Klin. Oczna* 2010, 112(7–9), 213–216.
186. Avery R.L., Pieramici D.J., Rabena M.D., Castallerin A.A., Nasir M.A., Guist M.: Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006, 113(30), 363–372.
187. Danis R.P., Ciulla T.A., Pratt L.M., Anliker W.: Intravitreal triamcinolone acetone in exudative age-related macular degeneration. *Retina* 2000, 20(3), 244–250.
188. Geltzer A., Turalba A., Vedula S.S.: Surgical implantation of steroids with antiangiogenic characteristics for treating neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007, 17(4), CD005022.

189. Neovascular Age-Related Macular Degeneration, Periocular Corticosteroids, and Photodynamic Therapy (NAPP) Trial Research Group, Gilson M.M., Bressler N.M., Jabs D.A., Solomon S.D., Thorne J.E., Wilson D.J.: Periocular triamcinolone and photodynamic therapy for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2007, 114(9), 1713–1721.
190. Rechtman E., Danis R.P., Pratt L.M., Harris A.: Intravitreal triamcinolone with photodynamic therapy for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 2004, 88(3), 344–347.
191. Spaide R.F., Sorenson J., Maranan L.: Combined photodynamic therapy with verteporfin and intravitreal triamcinolone acetate for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2003, 110(8), 1517–1525.
192. Spaide R.F., Sorenson J., Maranan L.: Photodynamic therapy with verteporfin combined with intravitreal injection of triamcinolone acetate for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2005, 112(2), 301–304.
193. Arevalo J.F., Mendoza A.J., Fernandez C.F.: Indocyanine green-mediated photothrombosis with and without intravitreal triamcinolone acetate for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: A pilot study. *Retina* 2005, 25(6), 719–726.
194. Libondi T., Jonas J.B.: Topical nepafenac for treatment of exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica* 2010, 88(2), e32–e33.
195. Balaggan K.S., Binley K., Esapa M., MacLaren R.E., Iqbal S., Duran Y., Pearson R.A., Kan O., Barker S.E., Smith A.J., Bainbridge J.W., Naylor S., Ali R.R.: EIAV vector-mediated delivery of endostatin or angiostatin inhibits angiogenesis and vascular hyperpermeability in experimental CNV. *Gene Ther.* 2006, 13, 1153–1165.
196. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J.: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994, 79(2), 315–328.
197. O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., Folkman J.: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997, 88(2), 277–285.
198. Apte R.S., Barreiro R.A., Duh E., Volpert O., Ferguson T.A.: Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004, 45(12), 4491–4497.
199. Lai C.C., Wu W.C., Chen S.L., Xiao X., Tsai T.C., Huan S.J., Chen T.L., Tsai R.J., Tsao Y.P.: Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001, 42(10), 2401–2407.
200. Mori K., Ando A., Gehlbach P., Nesbitt D., Takahashi K., Goldstein D., Penn M., Chen C.T., Mori K., Melia M., Phipps S., Moffat D., Brazzell K., Liao G., Dixon K.H., Campochiaro P.A.: Inhibition of choroidal neovascularization by intravenous injection of adenoviral vectors expressing secreted endostatin. *Am. J. Pathol.* 2001, 159(1), 313–320.
201. Hubschman J.P., Reddy S., Schwartz S.D.: Age-related macular degeneration: experimental and emerging treatments. *Clin. Ophthalmol.* 2009, 3, 167–174.
202. Cejka D., Losert D., Wacheck V.: Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin. Sci. (Lond.)* 2006, 110, 47–58.
203. Reich S.J., Fosnot J., Kuroki A., Tang W., Yang X., Maguire A.M., Bennett J., Tolentino M.J.: Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 2003, 9, 210–216.
204. Kaiser P.K., Symons R.C., Shah S.M., Quinlan E.J., Tabandeh H., Do D.V., Reisen G., Lockridge J.A., Short B., Guerciolini R., Nguyen Q.D.: Sirna-027 Study Investigators. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027. *Am. J. Ophthalmol.* 2010, 150(1), 33–39.

205. Kleinman M.E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J.Z., Albuquerque R.J., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y., Appukuttan B., Gibbs D., Yang Z., Karikó K., Ambati B.K., Wilgus T.A., DiPietro L.A., Sakurai E., Zhang K., Smith J.R., Taylor E.W., Ambati J.: Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008, 452(7187), 591–597.
206. Shen J., Samul R., Silva R.L., Akiyama H., Liu H., Saishin Y., Hackett S.F., Zinnen S., Kossen K., Fosnaugh K., Vargeese C., Gomez A., Bouhana K., Aitchison R., Pavco P., Campochiaro P.A.: Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther.* 2006, 13(3), 225–234.
207. Rudge J.S., Holash J., Hylton D., Russell M., Jiang S., Leidich R., Papadopoulos N., Pyles E.A., Toni A., Wiegand S.J., Thurston G., Stahl N.: Inaugural Article: VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 18363–18370.
208. Janssen B.J., Halff E.F., Lambris J.D., Gros P.: Structure of compstatin in complex with complement component C3c reveals a new mechanism of complement inhibition. *J. Biol. Chem.* 2007, 282(40), 29241–29247.
209. Ricklin D., Lambris J.D.: Compstatin: A Complement inhibitor on its way to clinical application. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 632, 273–292.
210. Age-Related Eye Disease Study Research Group, SanGiovanni J.P., Chew E.Y., Clemons T.E., Ferris F.L. 3rd, Gensler G., Lindblad A.S., Milton R.C., Seddon J.M., Sperduto R.D.: The relationship of dietary carotenoids, vitamin E, and vitamin C with age-related macular degeneration: a case-control study in the Age-Related Eye Disease Study. *AREDS Report No. 22. Arch. Ophthalmol.* 2007, 125(9), 1225–1232.
211. van Leeuwen R., Boekhoorn S., Vingerling J.R., Witteman J.C., Klaver C.C., Hofman A., de Jong P.T.: Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration. *JAMA* 2005, 294(24), 3101–3107.
212. Wiktorowska-Owczarek A., Nowak J.Z.: AMD a stress oksydacyjny. 2. Analiza składników preparatów farmaceutycznych stosowanych w profilaktyce AMD. *Magazyn Lekarza Okulisty* 2008, 3(5), 205–212.
213. Faure J.P.: Autoimmunity and the retina. *Curr. Top. Eye Res.* 1980, 2, 215–302.
214. Elschnig A.: Studien zur sympathischen Ophthalmie. *Albrecht. Von Graefes. Arch. Ophthalmol.* 1911, 78, 549–585.
215. Chan C.C., Li Q.: Immunopathology of uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 1998, 82(1), 91–96.
216. Redmond T.M., Wiggert B., Robey F.A., Nguyen N.Y., Lewis M.S., Lee L., Chader G.J.: Isolation and characterization of monkey interphotoreceptor retinoid-binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina. *Biochemistry* 1985, 24(3), 787–793
217. Misiuk-Hojło M.: Autoantygenu siatkówkowe. *Klin. Oczna* 1994, 96(2), 69–71.
218. Misiuk-Hojło M., Ruiz-Moreno J., Thillaye B., De Kozak Y.: Eksperymentalne immunologiczne zapalenie naczyń i siatkówki wywołane immunizacją antygenem S. *Klin. Oczna* 1993, 95(3–4), 105–106.
219. Milam A.H., Saari J.C., Jacobson S.G., Lubinski W.P., Feun L.G., Alexander K.R.: Autoantibodies against retinal bipolar cells in cutaneous melanoma-associated retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993, 34(1), 91–99.
220. Singh A.D., Milam A.H., Shields C.L., De Potter P., Shields J.A.: Melanoma-associated retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 1995, 119(3), 369–370.
221. Keltner J.L., Roth A.M., Shuhman Chang R.: Photoreceptor degeneration. Possible autoimmune disorder. *Arch. Ophthalmol.* 1983, 101(4), 564–569.
222. Polans A.S., Burton D.B., Haley T.L., Crabb J.W., Palczewski K.: Recoverin, but not visionin, is an autoantigen in the human retina identified with a cancer-associated retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993, 43(1), 81–90.

223. Whitcup S.M., Vistica B.P., Milam A.H., Nussenblatt R.B., Gery I.: Recoverin-associated retinopathy: a clinically and immunologically distinctive disease. *Am. J. Ophthalmol.* 1998, 126(2), 230–237.
224. Smużyńska M., Żaczek-Zakrzewska K., Formińska-Kapuścik: Znaczenie przeciwciał przeciwiątkówkowych w etiopatogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Magazyn Lekarza Okulisty* 2009, 3(5), 283–291.
225. Zarbin M.A.: Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 2004, 122(4), 598–614.
226. Penfold P.L., Provis J.M., Furby J.H., Gatneby P.A., Billson F.A.: Autoantibody to retinal astrocytes associated with age-related macular degeneration. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1990, 228(3), 270–274.
227. Abrahams I.W., Gregerson D.S.: Longitudinal study of serum antibody responses to retinal antigens in acute ocular toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* 1982, 93(2), 224–231.
228. Chan C.C., Palestine A.G., Nussenblatt R.B., Roberge F.G., BenEzra D.: Anti-retinal autoantibodies in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, Behçet disease, and sympathetic ophthalmia. *Ophthalmology* 1985, 92(8), 1025–1028.
229. Chan C.C., Nussenblatt R.B., Kim M.K., Palestine A.G., Awadzi K., Ottesen E.A.: Immunopathology of ocular onchocerciasis. 2. Antiretinal autoantibodies in serum and ocular fluids. *Ophthalmology* 1987, 94(4), 439–443.
230. Adamus G., Gaoying R., WEleber R.G.: Autoantibody against retinal proteins in paraneoplastic and autoimmune retinopathy. *BMC Ophthalmology* 2004, 4, 5.
231. Kahn M., Pepose J., Green R., Miller J., Foos R.: Immunocytologic findings in a case of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Ophthalmology* 1993, 100(8), 1191–1198.
232. Whittle R.M., Wallace G.R., Whiston R.A., Dumonde D.C., Stanford M.R.: Human antiretinal antibodies in toxoplasma retinochoroiditis. *Br. J. Ophthalmol.* 1998, 82(9), 1017–1021.
233. Grus F., Sun D.: Immunological mechanisms in glaucoma. *Semin. Immunopathol.* 2008, 30(2), 121–126.
234. Dutton G.N.: The causes of tissue damage in toxoplasmic retinochoroiditis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 1986, 105(Pt 4), 404–412.
235. Gorczyca W.A., Ejma M., Witkowska D., Misiuk-Hojło M., Kuropatwa M., Mulak M., Szymaniec S.: Retinal antigens are recognized by antibodies present in sera of patients with multiple sclerosis. *Ophthalmic. Res.* 2004, 36(2), 120–123.
236. Heckenlively J.R., Jordan B.L., Aptsiauri N.: Association of antiretinal antibodies and cystoid macular edema in patients with retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* 1999, 127(5), 565–573.
237. Murray Ph.: Serum autoantibodies and uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 1986, 70, 266–268.
238. Dumonde D.C., Kasp-Grochowska E., Baugo J.P., Sanders M.D., Graham E., Stanford M.R., Faure J.P., de Kozak Y., Van Tuyen V.: Autoimmune mechanisms in inflammatory eye disease. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 1985, 104(Pt 3), 232–238.
239. Ellis B.A., Stanford M.R., Graham E., Wallace G.R.: Immunoglobulin isotype usage in retinal vasculitis. [w:] *Advances in Ocular Immunology*, pod redakcją: Nussenblatt R.B., Whitcup S.M., Caspi R.R., Gery I., Wydawnictwo Elsevier Science, 1994, 323–326.
240. Kasp-Grochowska E., Graham E., Sanders M.D., Dumonde D.C., De Kozak Y., Van Tuyen V.: Autoimmunity and circulating immune complexes in retinal vasculitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 1981, 101(Pt 3)(3), 342–348.
241. Graham E., Spalton D.J., Sanders M.D.: Immunological investigations in retinal vasculitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 1981, 101(1), 12–16.
242. Kubicka-Trząska A.: Poziom przeciwciał przeciwiątkówkowych w surowicy a nasilenie objawów endogennego zapalenia tylnego odcinka błony naczyniowej. *Klin. Oczna* 2002, 104(3–4), 231–234.

243. Gregerson D.S., Abrahams W.I., Puklin J.E.: Serum antibody responses to bovine retinal S antigen and rod outer segments in proliferative diabetic retinopathy before and after argon laser photocoagulation. *Ophthalmology* 1982, 89(7), 767–771.
244. Grisanti S., Heimann K., Wiedermann P.: Immune response to specific molecules of the retina in proliferative vitreoretinal disorders. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1994, 32(5), 302–307.
245. Patel M., Chan C.C.: Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Semin. Immunopathol.* 2008, 30(2), 97–110.
246. Penfold P.L., Madigan M.C., Gillies M.C., Provis J.M.: Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Prog. Retin. Eye. Res.* 2001, 20, 385–414.
247. Kubicka-Trzaska A., Wilańska J.: Występowanie przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS) w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) – obserwacje wstępne. *Przegląd Lekarski* 2009, 66(11), 944–947.
248. Kubicka-Trzaska A., Wilańska J.: Przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) przed przezręczniczną termoterapią (TTT) oraz po przezręczniczej termoterapii łączonej z iniekcją octanu triamcinolonu pod tylną pochewkę Tenona (sTTA). *Klin. Oczna* 2011, 113(1–3), 28–33.
249. Kubicka-Trzaska A., Wilańska J., Romanowska-Dixon B., Sanak M.: Przeciwciała przeciwsiatkówkowe i przeciwciała przeciwko komórkom śródbłonna w surowicy chorych z wysiękową postacią zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Okulistyka* 2011, 2(I), 51–56.
250. Kubicka-Trzaska A., Wilańska J., Romanowska-Dixon B., Sanak M.: Circulating anti-retinal antibodies predict the outcome of anti-VEGF therapy in patients with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2011 Aug 23. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02237.
251. Gurne D.H., Tso M.O., Edward D.P., Ripps H.: Antiretinal antibodies in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1991, 98(5), 602–607.
252. Gu X., Meer Sg., Miyagi M., Rayborn M.E., Hollyfield J.G., Crabb J.W., Salomon R.G.: Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(43), 42027–42035.
253. Patel N., Ohbayashi M., Nugent A.K., Ramchand K., Toda M., Chau K.Y., Bunce C., Webster A., Bird A.C., Ono S.J., Chong V.: Circulating anti-retinal antibodies as immune markers in age-related macular degeneration. *Immunology* 2005, 115(3), 422–430.
254. Cherepanoff S., Mitchell P., Wang J.J., Gillies M.C.: Retinal autoantibody profile in early age-related macular degeneration: preliminary findings from the Blue Mountains Eye Study. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2006, 34, 590–59.
255. Joachim S.C., Bruns K., Lackner K.J., Pfeiffer N., Grus F.H.: Analysis of IgG antibody patterns against retinal antigens and antibodies to alpha-crystallin, GFAP, and alpha-enolase in sera of patients with “wet” age-related macular degeneration. *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2007, 245(5), 619–626.
256. Misiuk-Hojło M., Jurowska-Liput J., Agospowicz K., Białek-Szymańska A., Gorczyca W., Kuropatwa M., Witkowska D.: Levels of antibodies against retinal antigens in AMD patients. *Ophthalmic. Res.* 2004, 36, suppl.1, 27.
257. Misiuk-Hojło M., Białek-Szymańska A., Agospowicz K., Jurowska-Liput J., Gorczyca W., Witkowska D., Kuropatwa M.: Badania immunologiczne w zwyrodnieniu plamki związanym z wiekiem. *Magazyn Okulistyczny* 2005, 2(6), 118–120.
258. Spencer K.L., Olson L.M., Anderson B.M., Schnetz-Boutaud N., Scott W.K., Gallins P., Agarwal A., Postel E.A., Pericak-Vance M.A., Haines J.L.: C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2008, 17(12), 1821–1824.

259. Bressler N.M., Silva J.C., Bressler S.B., Fine S.L., Green W.R.: Clinicopathologic correlation of drusen and retinal pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration. *Retina* 1994, 14(2), 130–142.
260. Anderson D.H., Mullins R.F., Hageman G.S., Johnson L.V.: A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am. J. Ophthalmol.* 2002, 134(3), 411–431.
261. Ni J., Yuan X., Gu J., Yue X., Gu X., Nagaraj R.H., Crabb J.W.: Clinical Genomic and Proteomic AMD Study Group. Plasma protein pentosidine and carboxymethyllysine, biomarkers for age-related macular degeneration. *Moll. Cell. Proteomics.* 2009, 8(8), 1921–1933.
262. Fung A.E., Rosenfeld P.J., Reichel E.: The international bevacizumab safety worldwide. *Br. J. Ophthalmol.* 2006, 90, 1344–1349.
263. The CATT Research Group. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2011, 364(18), 1897–1908.
264. Wylegała E., Teper S.J.: VEGF a zwyrodnienie plamki związane z wiekiem. Część II. Inhibitory VEGF w leczeniu zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. *Klin. Oczna* 2007, 109(1–3), 97–100.
265. Ziemssen F., Sobolewska B.: Therapeutic efficacy of bevacizumab for age-related macular degeneration: What are the implications of CATT for routine management? *Drugs Aging* 2011, October 3, [Epub ahead of print].
266. Iqbal K., Baig J., Jamil A.Z., Jamil H., Khan T.: Visual results following intravitreal bevacizumab in neovascular age-related macular degeneration. *J. Coll. Physicians. Surg. Pak.* 2011, 21(9), 535–538.
267. Mitchell P.: A systematic review of the efficacy and safety outcomes of anti-VEGF agents used for treating neovascular age-related macular degeneration: comparison of ranibizumab and bevacizumab. *Curr. Med. Res. Opin.* 2011, 27(7), 1465–1475.
268. Rosenbaum J.T., Wernick R.: The utility of routine screening of patients with uveitis for systemic lupus erythematosus or tuberculosis. A Bayesian analysis. *Arch. Ophthalmol.* 1990, 108(9), 1291–1293.
269. Chant S.M., Hechenlively J., Meyers-Elliott R.H.: Autoimmunity in hereditary retinal degeneration. I. Basic studies. *Br. J. Ophthalmol.* 1985, 69(1), 19–24.
270. Dastgheib K., Green W.R.: Granulomatous reaction to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 1994, 112(6), 813–818.
271. Sysa-Jędrzejowska A.: Choroby tkanki łącznej. [w:] *Immunologia kliniczna*. Pod redakcją Marka L. Kowalskiego, Oficyna Wydawnicza Mediton, Łódź 2000, 341–384.
272. Chen H., Wu L., Pan S., Wu D.Z.: An immunological study on age-related macular degeneration. *Yan Ke Xue Bao* 1993, 9(3), 113–120.
273. Nussenblatt R., Ferris F. III: Age-related macular degeneration and the immune response: Implications for therapy. *Am. J. Ophthalmol.* 2007, 144 (4), 618–626.
274. Nussenblatt R.B., Liu B., Li Z.: Age-related macular degeneration: an immunologically driven disease. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2009, 10(5), 434–442.
275. Morohoshi K., Goodwin A.M., Ohbayashi M., Ono S.J.: Autoimmunity in retinal degeneration: autoimmune retinopathy and age-related macular degeneration. *J. Autoimmun.* 2009, 33(3–4), 247–254.
276. Killingsworth M.C., Sarks J.P., Sarks S.H.: Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye* 1990, 4(Pt 4), 613–621.
277. Hechenlively J.R., Solish A.M., Chant S.M., Meyers-Elliott R.H.: Autoimmunity in hereditary retinal degenerations. II. Clinical studies: antiretinal antibodies and fluorescein angiogram findings. *Br. J. Ophthalmol.* 1985, 69(10), 758–764.
278. Caspi R.R., Nussenblatt R.B.: Natural and therapeutic control of ocular autoimmunity – rodent and man. *Autoimmunity* 1993, 1, 1–26.
279. Hirose S., Mc Allister C.G., Mittal K.K., Vistice B.P., Shihohara T., Gery I.: A cell line and clones of lymphocytes from a healthy donor with specificity to S-antigens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1988, 29(11), 1636–1641.

280. Hirose S., Tanaka T., Nussenblatt R.B., Palestine A.G., Wiggert B., Redmond T.M., Chader G.J., Gery I.: Lymphocyte responses to retinal-specific antigens in uveitis patients and healthy subjects. *Curr. Eye Res.* 1988, 7(4), 393–402.
281. Kijlstra A., Hoekzema R., van Lelij A., Rothova A.: Humoral and cellular immune reactions against retinal antigens in clinical disease. *Curr. Eye Res.* 1990, 9(suppl.), 85–89.
282. De Kozak Y.: Antibody response in uveitis. *Eye* 1997, 11(Pt 2), 194–199.
283. Forrester J.V., Stott D.I., Hercus K.M.: Naturally occurring antibodies to bovine and human retinal S-antigen: a comparison between uveitis patients and healthy volunteers. *Br. J. Ophthalmol.* 1989, 73(2), 155–159.
284. Hoekzema R., Hwan S.B., Rothova A., van Haren M.A., Donoso L.A., Kijlstra A.: Serum antibody response to human and bovine IRBP in uveitis. *Curr. Eye Res.* 1990, 9(12), 1177–1183.
285. Shimazaki K., Jirawuthiworavong G.V., Heckenlively J.R., Gordon L.K.: Frequency of anti-retinal antibodies in normal human serum. *J. Neuroophthalmol.* 2008, 28(1), 5–11.
286. Bill A.: Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiol. Rev.* 1975, 55(3), 383–417.
287. Caspi R.R., Roberge F.G., Nussenblatt R.B.: Organ-resident, nonlymphoid cells suppress proliferation of autoimmune T-helper lymphocytes. *Science* 1987, 237(4818), 1029–1032.
288. Sugita S.: Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2009, 57(4), 263–268.
289. Donnelly J.J., Xi M.S., Rockney J.H.: Inhibition of mixed lymphocyte responses by human corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1989, 30(suppl.), 440.
290. Helbig H., Gurley R.C., Palestine A.G., Nussenblatt R.B., Caspi R.R.: Dual effect of ciliary body cells on T lymphocyte proliferation. *Eur. J. Immunol.* 1990, 20(11), 2457–2463.
291. Kawashima H., Obritsch F.W., Evangelista T., Ketcham J.M., Holland E.J., Gregerson D.S.: Inhibitory effects of corneal endothelial cells on autoimmune T cells *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992, 33(suppl.), 986–991.
292. Streilein J.W., Bradley D.: Analysis of immunosuppressive properties of iris and ciliary body cells and their secretory products. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1991, 32(10), 2700–2710.
293. Okumura A., Mochizuki M., Nishi M., Herbolt C.P.: Endotoxin-induced uveitis (EIU) in the rat: a study of inflammatory and immunological mechanism. *Inter. Ophthalmol.* 1990, 14(1), 31–36.
294. Streilein J.W.: Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr. Opin. Immunol.* 1993, 5(3), 428–432.
295. Kaiser C.J., Ksander B.R., Streilein J.W.: Inhibition of lymphocyte proliferation by aqueous humor. *Reg. Immunol.* 1989, 2(1), 42–49.
296. Koker P., Eisenstein R., Schumacher B., Christianson G., Grant D.: Ocular tissues contain inhibitors of lymphocyte mitogenesis. *Curr. Eye Res.* 1985, 4(7), 807–810.
297. Streilein J.W.: Regulation of ocular immune responses. *Eye* 1997, 11(Pt 2), 171–175.
298. Streilein J.W., Wilbanks G.A., Taylor A., Cousins S.: Eye-derived cytokines and immunosuppressive intraocular microenvironment: a review. *Curr. Eye Res.* 1992, 11(suppl.), 41–47.
299. Yoshitoshi T., Schichi H.: Immunosuppressive factor in porcine vitreous body. *Curr. Eye Res.* 1991, 10(12), 1141–1149.
300. Cousins S.W., Mc Cabe M.M., Danielpour D., Streilein J.W.: Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1991, 32(8), 2202–2211.
301. Tripathi R.C., Li J., Borisuth N.S.C., Tripathi B.J.: Trabecular cells of the eye express messenger RNA for transforming growth factor β_1 and secrete this cytokine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993, 34(8), 2562–2569.
302. Wilbanks G.A., Streilein J.W.: Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). I. Evidence that an antigen-specific, ACAID-inducing, cell-associated signal exists in peripheral blood. *J. Immunol.* 1991, 146(8), 2610–2617.

303. Wilbanks G.A., Mammolenti M.M., Streilein J.W.: Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). III. Induction of ACAID depends on intraocular transforming growth factor β . *Eur. J. Immunol.* 1992, 22(1), 165–173.
304. Lahiri-Munir D., Li T., Garcia C.A., Franklin R.M.: Adhesive mechanisms of human retinal pigment epithelial cells. [w:] *Advances in Ocular Immunology*. Pod redakcją Nussenblatt R.B., Whitcup S.M., Caspi R.R., Gery I., Wydawnictwo Elsevier Science, 1994, 43–46.
305. McGeer P.L., McGeer E.G.: Inflammation and the degenerative disease of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, 1035, 104–116.
306. Scholl H.P., Charbel Issa P., Walier M., Janzer S., Pollok-Kopp B., Börncke F., Fritsche L.G., Chong N.V., Fimmers R., Wienker T., Holz F.G., Weber B.H., Oppermann M.: Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* 2008, 2, 3(7), e:2593.
307. D'souza Y.B., Jones C.J., Short C.D., Roberts I.S., Bonshek R.E.: Oligosaccharide composition is similar in drusen and dense deposits in membranoproliferative glomerulonephritis type II. *Kidney Int.* 2009, 75(8), 824–827.
308. Mullins R.F., Aptsiauri N., Hageman G.S.: Structure of composition of drusen associated with glomerulonephritis: implications for the role of complement activation in drusen biogenesis. *Eye* 2001, 15(Pt 3), 390–395.
309. Coleman H.R., Chan C.C., Ferris F.L., Chew W.Y.: Age-related macular degeneration. *Lancet* 2008, 372(9652), 1835–1845.
310. Schaumberg D.A., Christen W.G., Buring J.E., Glynn R.J., Rifai N., Ridker P.M.: High-sensitivity C-reactive protein, other markers of inflammation, and the incidence of macular degeneration in women. *Arch. Ophthalmol.* 2007, 125(3), 300–305.
311. Seddon J.M., George S., Rosner B., Rifai N.: Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. *Arch. Ophthalmol.* 2005, 123(6), 774–782.
312. Machalińska A., Dziedziczko V., Mozolewska-Piotrowska K., Karczewicz D., Wiszniewska B., Machaliński B.: Elevated plasma levels of C3a complement compound in exudative form of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 2009, 42(1), 54–59.
313. Cousins S.W., Espinosa-Heidmann D.G., Csaky K.G.: Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Arch. Ophthalmol.* 2004, 122(7), 1013–1018.
314. Wu K.H., Tan A.G., Rochtechina E., Favalaro E.J., Williams A., Mitchell P., Wang J.J.: Circulating inflammatory markers and hemostatic factors in age-related maculopathy: a population-based case-control study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007, 48(5), 1983–1988.
315. Klein R., Klein B.E., Knudston M.D., Wong T.Y., Shankar A., Tsai M.Y.: Systemic markers of inflammation, endothelial dysfunction, and age-related maculopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 2005, 140(1), 35–44.
316. Morohosi K., Patel N., Ohbayashi M., Chong V., Grossniklaus H.E., Bird A.C., Ono S.J.: Serum autoantibody biomarkers for age-related macular degeneration and possible regulators of neovascularization. *Exp. Mol. Pathol.* 2012, 92 (1), 64–73.
317. Guymer R.H., Tao L.W., Goh J.K., Liew D., Ischenko O., Robman L.D., Aung K., Cipriani T., Cain M., Richardson A.J., Baird P.N., Langham R.: Identification of urinary biomarkers for age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011, 52(7), 4639–4644.
318. Coutinho A., Kazatchkine M.D., Avrameas S.: Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 1995, 7(6), 812–818.
319. Lacroix-Desmazes S., Kaveri S.V., Mouthon L., Ayouba A., Malanchère E., Coutinho A., Kazatchkine M.D.: Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J. Immunol. Methods* 1998, 216(1–2), 117–137.
320. Guilbert B., Digheiro G., Avrameas S.: Naturally occurring antibodies against nine common antigens in normal human sera. I. Detection, isolation, and characterization. *J. Immunol.* 1982, 128(6), 2779–2787.

321. Bottazzo G.F., Pujol-Borrell R., Hanafusa T., Feldman M.: Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983, 2(8359), 1115–1119.
322. Cohen I.R.: The self, the world and autoimmunity. *Sci. Am.* 1988, 258(4), 52–60.
323. Kasp E., Graham E.M., Stanford M.R., Dumonde D.C.: A point prevalence study of 150 patients with idiopathic retinal vasculitis: 2. Clinical relevance of antiretinal autoimmunity and circulating immune complexes. *Br. J. Ophthalmol.* 1989, 73(9), 722–730.
324. Pratesi F., Moscato S., Sabbatini A., Chimenti D., Bombardieri S., Migliorini P.: Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J. Rheumatol.* 2000, 27(1), 109–115.
325. Capello M., Ferri-Borgogno S., Capello P., Novelli F.: α -Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J* 2011, 278(7), 1064–1074.
326. Seweryn E., Piętkiewicz J., Bednarz-Misa I.S., Ceremuga I., Saczko J., Kulbacka J., Gamiń A.: Localization of enolase in the subfractions of a breast cancer cell line. *Z. Naturforsch. C.*, 2009, 64(9–10), 754–758.
327. Tiseo M., Ardizzoni A., Cafferata M.A., Loprevite M., Chiaramondia M., Filiberti R., Marconi P., Grossi F., Paganuzzi M.: Predictive and prognostic significance of neuron-specific enolase (NSE) in non-small cell lung cancer. *Anticancer. Res.* 2008, 28(1B), 507–513.
328. Dot C., Guigay J., Adamus G.: Anti-alpha-enolase antibodies in cancer-associated retinopathy with small cell carcinoma of the lung. *Am. J. Ophthalmol.* 2005, 139(4), 746–747.
329. Madigan M.C., Penfold P.L., Provis J.M., Balind T.K., Billson F.A.: Intermediate filament expression in human retinal macroglia. Histopathologic changes associated with age-related macular degeneration. *Retina* 1994, 14(1), 65–74.
330. Axelsson M., Malmstrom C., Nilsson S., Haghighi S., Rosengren L., Lycke J.: Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2011, 258(5), 882–888.
331. Chen H., Weber A.J.: Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Müller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. *Glia* 2002, 38(2), 115–125.
332. Lam T.T., Kwong J.M., Tso M.O.: Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003, 44(2), 638–645.
333. Smużyńska M.: Rola przeciwciał przeciwiśiatkówkowych w diagnostyce suchej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem – doniesienie wstępne. Poznań 14–16 kwietnia 2005 – materiały zjazdowe XXVII Sympozjonu Retinologicznego.
334. Nölle B.: Humorale Immunoreaktivität bei entzündlichen Augenerkrankungen – Eine Übersicht. *Z. Ärztl. Fortbild.* 1994, 88, 597–602.
335. Sebastian J.K., Mahr A.D., Ahmed S.S., Stone J.H., Romay-Penabad Z., Davis J.C., Hoffman G.S., McCune W.J., St. Clair E.W., Specks U., Spiera R., Pierangeli S., Merkel P.A.: Antiendothelial cell antibodies in patients with Wegener's granulomatosis: prevalence and correlation with disease activity and manifestations. *J. Rheumatol.* 2007, 34(5), 1027–1031.
336. Dinc A., Takafuta T., Jiang D., Melikoglu M., Saruhan-Direskeneli G., Shapiro S.S.: Antiendothelial cell antibodies in Behçet's disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2003, 21(4 Suppl. 30), S27-30.
337. Navarro M., Cervera R., Font J., Reverter J.C., Monteagudo J., Escolar G., López-Soto A., Ordinas A., Ingelmo M.: Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance. *Lupus* 1997, 6(6), 521–526.
338. Robak E., Kierstan M.K., Kulczycka L., Sysa-Jedrzejowska A.: The role of antiendothelial cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 2007, 15, 61, 413–419.
339. Fujieda M., Oishi N., Kurashige T.: Antibodies to endothelial cells in Kawasaki disease lyse endothelial cells without cytokine pretreatment. *Clin. Exp. Immunol.* 1997, 107(1), 120–126.

340. Souza R.C., Lage L., Goldesntein-Schainberg C., Macedo A.R., Carrasco S., Gonçalves C.A.R.: Anti-endothelial cell antibodies and central nervous system involvement in Behçet's disease. *Clinics (Sao Paulo)* 2007, 62(6), 685–690.
341. Lee K.H., Bang D., Choi E.S., Chun W.H., Lee E.S., Lee S.: Presence of circulating antibodies to a disease-specific antigen on cultured human dermal microvascular endothelial cells antibodies in patients with Behçet disease. *Arch. Dermatol. Res.* 1999, 291(7–8), 374–381.
342. Edelsten C., D'Cruz D.P.: Antiendothelial cell antibodies (AECA) in patients with uveoretinitis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 1997, 15(1), 41–52.
343. Edelsten C., D'Cruz D., Hughes G.R., Graham E.M.: Anti-endothelial cell antibodies in retinal vasculitis. *Curr. Eye Res.* 1992, 11, Suppl., 203–208.
344. Machalińska A., Safranow K., Dziedziejko V., Mozolewska-Piotrowska K., Paczkowska E., Kłos P., Pius E., Grymuła K., Wiszniewska B., Karczewicz D., Machaliński B.: Different populations of circulating endothelial cells in patients with the exudative form of age-related macular degeneration. A novel insight into pathogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010, 52(1), 93–100.
345. Machalińska A., Safranow K., Sylwestrzak Z., Szmatłoch K., Kuprjanowicz L., Karczewicz D.: Wzrost liczby krążących komórek śródbłonna jako wykładnik przewlekłej dysfunkcji naczyniowej w AMD. *Klin. Oczna* 2011, 7–9, 228–232.
346. Haeflinger I.O., Flammer J., Beny J.L., Luscher T.F.: Endothelium-dependent vasoactive modulation in the ophthalmic circulation. *Prog. Retin. Eye Res.* 2001, 20, 209–225.
347. Malukiewicz-Wisniewska G., Rość D., Kałużny B., Kałużny J.J.: Czynniki von Willebranda w osoczu chorych ze starym zwyrodnieniem plamki. *Klin. Oczna* 2005, 107(1–3), 70–72.
348. Lip P.L., Blann A.D., Hope-Ross M., Gibson J.M., Lip G.Y.: Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* 2001, 108, 705–710.
349. Smith W., Mitchell P., Leeder S.R., Wang J.J.: Plasma fibrinogen levels, other cardiovascular risk factors, and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol.* 1998, 116, 583–587.
350. Guilpain P., Mouthon L.: Antiendothelial cells autoantibodies in vasculitis-associated systemic diseases. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* 2008, 35(1–2), 59–65.
351. Emmi L., Brugnolo F., Salvati G., Marchione T.: Immunological aspects of Behçet's disease (editorial). *Clin. Exp. Rheumatol.* 1995, 13(6), 687–691.
352. Haznedaroglu I.C., Özdemir O., Özcebe O., Dündar S.V., Kirazli S.: Circulating thrombomodulin as a clue of endothelial damage in Behçet's disease. *Thromb. Haemost.* 1996, 75(6), 974.
353. Lip P.L., Blann A.D., Hope-Ross M., Gibson J.M., Lip G.Y.: Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* 2001, 108(4), 705–710.
354. Perez-Rico C., Benitez-Herreros J., Castro-Rebollo M., Gómez-SanGil Y., Germain F., Montes-Mollón M.A., Teus M.A.: Endothelial cells analysis after intravitreal ranibizumab (Lucentis) in age-related macular degeneration treatment: a pilot study. *Br. J. Ophthalmol.* 2010, 94(2), 267–268.
355. Costa R., Carneiro A., Rocha A., Pirraco A., Falcao M., Vasques L., Soares R.: Bevacizumab and ranibizumab on microvascular endothelial cells: A comparative study. *J. Cell. Biochem.* 2009, 15, 108(6), 1410–1417.
356. Ronzoni M., Manzoni M., Mariucci S, Loupakis F, Brugnattelli S., Bencardino K., Rovati B., Tinelli C., Falcone A., Villa E., Danova M.: Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as predictive markers of clinical response to bevacizumab-based first-line treatment in advanced colorectal cancer patients. *Ann. Oncol.* 2010, 21(12), 2382–2389.
357. Roodhart J.M., Langenberg M.H., Vermaat J.S., Lolkema M.P., Baars A., Giles R.H., Witteveen E.O., Voest E.E.: Late release of circulating endothelial cells and endothelial pro-

- genitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patient. *Neoplasia* 2010, 12(1), 87–94.
358. Bertolini F., Mancuso P., Shaked Y.: Circulating endothelial cells as biomarkers for patients receiving bevacizumab. *Lancet Oncology* 2011, 12(3), 217–218.
 359. Thanigaimani S., Mangoni A., Karapetis C.S., Kichenadasse G.: Anti-VEGF drugs, endothelial dysfunction, and hypertension: Is there a relationship? *J. Clin. Oncol.* 2010, 28, suppl.; abstr e13585.
 360. Bakri S.J., Snyder M., Reid J.M., Pulido J.S., Singh R.J.: Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007, 90, 1316–1321.
 361. Brar V.S., Sharma R.K., Murthy R.K., Chalam K.V.: Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 2010, 12, 16, 1848–1853.
 362. Saint-Geniez M., Maldonado A.E., D'Amore P.A.: VEGF expression and receptor activation in the choroid during development and in the adult. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006, 47(7), 3135–3142.
 363. Lalwani G.A., Rosenfeld P.J., Fung A.E., Dubovy S.R., Michels S., Feuer W., Davis J.L., Flynn H.W. Jr., Esquiabro M.: A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the RrONTO Study. *Am. J. Ophthalmol.* 2009, 148(1), 43–58.
 364. Holz F.G., Amoaku W., Donate J., Guymer R.H., Kellner U., Schlingemann R.O., Weichselberger A., Staurenghi G.: SUSTAIN Study Group: Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN study. *Ophthalmology* 2011, 118(4), 663–671.
 365. Mitchell P., Korobelnik J.F., Lanzetta P., Holtz F.G., Prunte C., Schmidt-Erfurth U., Tano Y., Wolf S.: Ranibizumab (Lucentis) w leczeniu neowaskularnej (wysiękowej) postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD): dowody uzyskane z badań klinicznych. *Przedruk z Br. J. Ophthalmol.*, Publicado Online First: maj 2009 doi: 10.1136/bjo.2009.159160.
 366. Zhang J., Silva T., Yarovinsky T., Manes T.D., Tavakoli S., Nie L., Tellides G., Pober J.S., Bender J.R., Sadeghi M.M.: VEGF blockade inhibits lymphocyte recruitment and ameliorates immune-mediated vascular remodeling. *Circ. Res.* 2010, 107(3), 408–417.