

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



**VLIV GOECKERMANOVY TERAPIE NA VYBRANÉ PARAMETRY IMUNITY
U PACIENTŮ S PSORIÁZOU**

Kateřina Kondělková

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Lékařská imunologie

Hradec Králové

2012

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Lékařské imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Kateřina Kondělková
Ústav klinické imunologie a alergologie, Univerzita Karlova v Praze,
Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec
Králové

Školitel: doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.
Ústav klinické imunologie a alergologie, Univerzita Karlova v Praze,
Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec
Králové

Školitel konzultant: doc. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.
Ústav patologické fyziologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská
fakulta v Hradci Králové

Oponenti: prof. MUDr. Evžen Weigl, CSc.
Ústav imunologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

MUDr. Helena Marečková, CSc.
Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita
Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie LF UK a FN Hradec Králové dne ... v ... hodin.

Tato práce vznikla za podpory grantů MZCR č. 00179906, MŠMT č. MSM0021620812, SVV-2011-262902 a programu PRVOUK P37/09.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie

Obsah

Seznam použitých zkratk	4
1. Souhrn	5
2. Summary	6
3. Úvod do problematiky	7
4. Cíle disertační práce	9
5. Metodika	10
5.1. Soubor pacientů	10
5.1.1. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu T regulačních lymfocytů	10
5.1.2. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu solubilní formy vychytávacího receptoru sCD163	10
5.1.3. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové formy vychytávacího receptoru CD163	10
5.1.4. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové TLR2 a TLR4 a solubilní sTLR2	11
5.2. Goeckermanova terapie	11
5.3. Odběr vzorků	11
5.4. Laboratorní metody	12
5.4.1. Průtoková cytometrie	12
5.4.2. ELISA technika	12
5.5. Statistická analýza	13
6. Výsledky	14
6.1. Stanovení relativního počtu Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií	14
6.2. Stanovení hladin solubilní formy CD163 (sCD163) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií	15
6.3. Stanovení exprese povrchové formy CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií	15
6.4. Stanovení hladin solubilní formy TLR2 (sTLR2) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií	16
6.5. Stanovení exprese povrchové formy TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií	17
6.6. Stanovení exprese povrchové formy TLR4 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií	18
7. Diskuse	19
8. Závěr	24
9. Použitá literatura	26
10. Přehled publikační činnosti	33

Seznam použitých zkratk

CTLA4	cytotoxický s T lymfocyty asociovaný antigen
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GITR	glukokortikoidy indukovaný receptor pro tumor nekrotizující faktor
GT	Goeckermanova terapie
Hb	hemoglobin
Hp	haptoglobin
IL	interleukin
INF	interferon
MFI	mean fluorescence index
PAMP	molekulové vzory asociované s patogenem
PASI	psoriasis area and severity index
PRR	pattern recognition receptor
sCD163	solubilní CD163
sTLR2	solubilní TLR2
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor
Treg	T regulační lymfocyty

1. Souhrn

Vliv Goeckermanovy terapie na vybrané parametry imunity u pacientů s psoriázou

Psoriáza je systémová zánětlivá choroba s manifestací na kůži. Goeckermanova terapie (GT) představuje klasický přístup léčby psoriázy a je založena na denní aplikaci farmaceutického uhelného dehtu na zasaženou pokožku s následnou expozicí UV světla.

Cílem této práce bylo sledovat vybrané imunologické markery a populace buněk u pacientů s psoriázou a zkoumat vliv GT na tyto parametry. Hodnotili jsme počty T regulačních lymfocytů (Treg), membránovou expresi vychytávacího receptoru CD163 na monocytech, hladiny solubilní CD163 (sCD163), membránovou expresi TLR2 a TLR4 na monocytech a solubilní TLR2 v séru (sTLR2). Imunofluorescenční analýza byla provedena na zlyzované periferní krvi pomocí průtokového cytometru FC500 Cytomics (Beckman Coulter) and FACSCalibur (Becton Dickinson). Hladina solubilních markerů byla stanovena pomocí ELISA kitů.

Nenašli jsme žádné významné rozdíly v relativních počtech Treg lymfocytů v periferní krvi kontrolní skupiny a pacientů s psoriázou před zahájením léčby GT. Po GT došlo k výraznému vzestupu v relativním počtu Treg lymfocytů. V porovnání s hodnotami u kontrolní skupiny byly hodnoty jak CD163 tak sCD163 u pacientů s psoriázou před GT signifikantně vyšší. sCD163 byla u pacientů po terapii výrazně snižena. Exprese CD163 na monocytech u pacientů nebyla významně ovlivněna GT. Sérové hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou byly významně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. Membránová exprese TLR2 na monocytech byla v porovnání se zdravými dárci krve u pacientů s psoriázou vyšší. GT neovlivnila ani sTLR2 ani membránovou expresi TLR2. V porovnání s kontrolní skupinou jsme nenalezli žádné statistické rozdíly mezi expresí TLR4 u pacientů s psoriázou jak před tak po Goeckermanově terapii.

V porovnání se zdravou kontrolní skupinou jsme zaznamenali výrazné změny ve většině sledovaných imunologických markerů u pacientů s psoriázou. Goeckermanova terapie měla vliv na některé vyšetřované parametry imunity. S ohledem na naše výsledky předpokládáme, že Treg lymfocyty, (s)CD163 a Toll-like receptory mohou přispívat do patogeneze psoriázy. Sledování různých imunologických parametrů je důležité k lepšímu pochopení imunomodulačních efektů Goeckermanovy terapie.

2. Summary

The effect of Goeckerman therapy on selected immune markers in patients with psoriasis

Psoriasis is a systemic inflammatory disorder with skin manifestation. Classical approach to treat psoriasis is Goeckerman therapy (GT) which is based on daily application of pharmaceutical coal tar on affected skin with subsequent exposition to UV light.

The aim of this study was to observe selected immunological markers and cell subpopulations in patients with psoriasis and to elucidate the effect of GT on these parameters. We evaluated T regulatory cells (Treg), membrane CD163 expression on monocytes, serum levels of CD163 (sCD163), membrane TLR2 and TLR4 expression on monocytes and serum levels of TLR2 (sTLR2). The immunofluorescent analysis was performed on erythrocyte lysed peripheral blood using a flow cytometer FC500 Cytomics (Beckman Coulter) and FACSCalibur (Becton Dickinson). The level of soluble markers was detected by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

There was no significant difference in the relative number of Treg cells in the peripheral blood of healthy blood donors and patients with psoriasis before initiation of GT. The relative number of Treg is significantly increased in psoriatic patients after GT compared to the pre-treatment level. In comparison with levels in controls the level of both CD163 and sCD163 in patients with psoriasis before GT was significantly higher. sCD163 in patients was significantly diminished after therapy. Expression of CD163 on monocytes in patients with psoriasis was not affected by GT. In comparison with serum level in healthy controls, serum level of sTLR2 in patients with psoriasis was significantly lower. In comparison with controls, the intensity of membrane TLR2 expression in patients with psoriasis was significantly higher. Both serum level of sTLR2 and TLR2 on monocytes was not significantly affected by GT. Compared to membrane expression TLR4 on monocytes we found no significant differences in this expression in patients with psoriasis both before and after GT.

In comparison with control group, we found the significant differences in the most determined immunological markers in patients with psoriasis. We found that select immunological parameters are affected by GT. With regard to our results we propose that the number and/or function of Treg cells, (s)CD163 and Toll-like receptors may be involved in the pathogenesis of psoriasis. Investigation of different immunological markers adds a substantial supplementary piece to the list of GT immunomodulatory effects.

3. Úvod do problematiky

Kožní imunitní systém je tvořen řadou buněčných typů a humorálních faktorů. Deregulace kožního imunitního systému může vést k zánětu v kůži. Psoriáza je typickým příkladem takto škodlivé zánětlivé reakce. Psoriáza postihuje přibližně 1 - 3% populace a má výrazný vliv na fyzické, psychické i sociální aspekty kvality života jedince (4, 8, 37). Tato choroba je definována jako T lymfocyty zprostředkovaná imunitní systémová zánětlivá choroba s manifestací na pokožce. Je charakterizována hyperproliferační a abnormální diferenciací keratinocytů, zánětlivými změnami na cévách, infiltráty z aktivovaných T lymfocytů, hromaděním polymorfonukleárů, hojnou proliferací endotelových buněk a deregulací apoptózy (5). Do patofyziologie psoriázy přispívá jak přirozený tak adaptivní imunitní systém (15).

V léčbě psoriázy se uplatňuje kromě řady dalších postupů i Goeckermanova metoda terapie (GT), která je založená na denní aplikaci farmaceutického uhelného dehtu na zasaženou pokožku s následnou expozicí těla kontrolovanému množství UV záření. Navzdory potenciálnímu zvýšenému genotoxickému riziku v důsledku přímého vystavení pokožky uhlovodíkům nacházejících se v uhelném dehtu, je tato terapie preferována z několika důvodů. Mezi nimi jsou nejdůležitější snadná aplikace, nízká cena a dosažení dobrých klinických výsledků s dlouhodobou remisí (16, 29). GT je založena na kombinaci protizánětlivých a imunomodulačních efektů alifatických a aromatických uhlovodíků a imunosupresivních a imunomodulačních aktivitách UV záření. Tato terapie je vysoce účinná v léčbě psoriázy a dosahuje dobré klinické odpovědi následované dlouhodobou remisí u většiny pacientů.

T regulační lymfocyty (Treg) jsou charakterizované jako funkčně specializovaná subpopulace T lymfocytů, zodpovědná za optimalizaci imunitních odpovědí (19, 24, 48). Tyto buňky se účastní zahájení a udržení imunitní periferní tolerance rozpoznáním autoantigenů a následně spouští imunitní odpověď, zprostředkovanou buď buněčným kontaktem nebo cytokiny (19, 39, 45, 46, 47). Nedávno byla u pacientů s psoriázou prokázána nerovnováha mezi Treg a efektoivními T lymfocyty. Proto je pravděpodobné, že počet a/nebo funkce Treg může být u pacientů s psoriázou narušena, což může vést ke zvýšené proliferaci patogenních T lymfocytů. Předpokládá se, že defektní Treg lymfocyty jsou zapojené do patogeneze psoriázy (22, 44, 49, 52).

Monocyty a makrofágy jsou velmi důležité buňky vrozeného imunitního systému a jejich vědecké zkoumání je nezbytně nutné k porozumění zánětlivé podstaty psoriázy (12). Receptor CD163 je transmembránový glykoprotein nalézáný výhradně na

monocytech/makrofázích, který je důležitý k vychytávání komplexů haptoglobin-hemoglobin (Hp-Hb) (30, 33). CD163 se vyskytuje také jako solubilní protein v plasmě (sCD163). Jeho přítomnost v plasmě je způsobena proteolytickým štěpením membránové formy. Podobně jako membránová forma, solubilní sCD163 také váže Hp-Hb komplexy, a tím se podílí na protizánětlivých regulačních reakcích (30, 34, 50). Exprese CD163 je zvýšená během pozdní fáze akutního zánětu i u chronického zánětu (11, 42). Solubilní molekula sCD163 v periferní krvi je nyní považována za nový biomarker zánětu, zatímco membránová exprese CD163 na monocytech je spojena s protizánětlivým fenoménem (26).

Toll-like receptory (TLR) jsou skupinou membránových glykoproteinů vrozeného imunitního systému a vyskytují se zejména na monocytech, makrofázích a dendritických buňkách. TLR patří mezi PRR (Pattern Recognition Receptor) a rozpoznávají molekulové vzory asociované s patogenem (PAMP) (3). Jsou důležitou součástí přirozené imunity a jejich abnormální exprese může být zapojena do řady zánětlivých chorob, včetně psoriázy. Toll-like receptory existují kromě povrchové membránové formy také v podobě solubilní (9, 27, 28). Některé studie prokázaly podstatně vyšší expresi TLR2 na monocytech/makrofázích u pacientů se zánětlivým onemocněním v porovnání se zdravými kontrolami (20, 23). Begon a spol. ve své studii uvedli, že je TLR2 exprese zvýšená v psoritických lézích a naznačili, že TLR receptory mohou hrát významnou roli v patogenezi řady zánětlivých chorob, včetně psoriázy (3).

4. Cíle disertační práce

Předkládaná práce je zaměřena na sledování dynamiky a intenzity exprese vybraných parametrů imunitního systému v průběhu Goeckermanovy terapie. Hlavním cílem je určit, jak různé buněčné populace přispívají do patogeneze psoriázy, zda hladina vybraných markerů koreluje s aktivitou choroby a jestli se mění v závislosti na terapii. Protože se ověřují nové terapie psoriázy, bylo by velmi přínosné nalézt spolehlivý biomarker aktivity choroby.

Hlavní cíle práce:

1. sledovat vybrané parametry imunitního systému u pacientů s psoriázou a porovnat naměřené výsledky s kontrolní skupinou zdravých dárců krve
2. zhodnotit vliv Goeckermanovy terapie na počet vybraných buněčných populací, povrchovou expresi a sérovou hladinu vybraných markerů imunitního systému
3. na základě výsledků navrhnout ukazatele vhodné pro monitorování úspěšnosti terapie a aktivity psoriázy

5. Metodika

Práce vznikla za podpory grantů MZCR č. 00179906, MŠMT č. MSM0021620812, SVV-2011-262902 a programu PRVOUK P37/09.

5.1. Soubor pacientů

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Každý pacient i zdravý dárce krve podepsal informovaný souhlas.

5.1.1. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu T regulačních lymfocytů

Do naší studie bylo přijato 27 dospělých pacientů trpících psoriázou. Naše studijní skupina se skládala z 16 žen a 11 mužů. Průměrný věk se pohyboval okolo $44,5 \pm 22,7$ let. Průměrná doba Goeckermanovy terapie byla 15 dní.

19 zdravých dárců krve (6 žen, 13 mužů, průměrný věk $38,9 \pm 10,9$ let) sloužilo jako kontrolní skupina.

5.1.2. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu solubilní formy vychytávacího receptoru sCD163

Solubilní forma vychytávacího receptoru sCD163 byla stanovena v séru 71 pacientů s psoriázou. Z nich bylo 33 žen a 38 mužů. Průměrný věk byl $39,3 \pm 19,0$ let. Průměrná délka Goeckermanovy terapie byla 20 dní.

Kontrolní skupinu tvořilo 57 zdravých dobrovolníků, dárců krve. Jejich průměrný věk byl $38,4 \pm 13,3$ let. V kontrolní skupině bylo 29 žen a 28 mužů.

5.1.3. Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové formy vychytávacího receptoru CD163

Do studované skupiny bylo zařazeno 40 pacientů s psoriázou (23 mužů, 17 žen). Průměrný věk byl $38,3 \pm 19,1$ let. Průměrná délka Goeckermanovy terapie se pohybovala okolo 22 dní.

Kontrolní skupinu tvořilo 25 zdravých dárců krve. Jejich průměrný věk byl $39,6 \pm 10,8$ let. V kontrolní skupině bylo 18 mužů a 7 žen.

5.1.4 Sestava pacientů s psoriázou pro analýzu povrchové TLR2 a TLR4 a solubilní sTLR2

TLR2, TLR4 a sTLR2 receptor byl stanoven u 20 pacientů s psoriázou. Naše studijní skupina se skládala z 9 žen a 11 mužů (průměrný věk $38,0 \pm 17,9$ let). Průměrná doba Goeckermanovy terapie byla 18 dnů.

Kontrolní skupinu tvořilo 20 zdravých dárců krve (10 žen a 10 mužů). Jejich průměrný věk byl $37,0 \pm 10,3$ let.

5.2. Goeckermanova terapie

Goeckermanova terapie byla každému pacientovi indikována dermatologem individuálně na základě aktivity choroby. Účinnost a objektivizace terapie byla stanovena podle zarudnutí, zánětlivé infiltrace a šupinatosti lézí použitím PASI skóre (Psoriasis Area Severity Index). Pro každého pacienta bylo PASI vypočítáno před a po skončení léčby. Pokud jsme dosáhli snížení PASI o 30%, byla GT ukončena.

Goeckermanova terapie je kombinací fototerapie s lokální aplikací dehtu. Nemocnému je každý večer aplikována dehtová mast obsahující 5% farmaceutický uhelný dehet (pix lithantracis) na postižená místa kůže (10 - 75% povrchu těla). Mast se nechá působit přes noc a ráno je odstraněna pomocí olejové lázně. Následně je pacient ozářen UV zářením.

5.3. Odběr vzorků

Vzorky krve z kubitální vény byly od pacientů léčených Goeckermanovou terapií odebrány do odběrových zkumavek s citrátem sodným (BD Vacutainer®, Becton Dickinson) před začátkem léčby a v den propuštění z nemocniční péče. Ve stejných časových intervalech byla odebrána i srážlivá krev pro separaci séra a sérum bylo zmrazeno při -80°C . Před vlastním zpracováním byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě. Srážlivá i nesrážlivá krev byla odebrána i od zdravých dárců krve, kteří sloužili jako kontrolní skupina.

5.4. Laboratorní metody

5.4.1. Průtoková cytometrie

Imunofluorescenční analýza Treg lymfocytů byla provedena pomocí průtokového cytometru FC500 Cytomics (Beckman Coulter). Byl použit 4 barevný panel protilátek (Immunotech): CD3-FITC/CD127-PE/CD25-PC5/CD4-PC7. Naměřená data byla analyzována použitím softwaru CXP (Beckman Coulter). Treg buňky byly charakterizovány $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ expresí.

Analýza povrchové molekuly CD163 byla provedena pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson) opatřeným argonovým laserem. K ovládání cytometru, akvizici, uchovávání a analýze dat byl použit softwarový program CELLQuestsTM (Becton Dickinson). K detekci byla použita třibarevná analýza s využitím monoklonálních protilátek, konjugovaných s FITC, PerCP a APC. Byl použit 3-barevný panel protilátek: CD163-FITC (Trillium Diagnostics) /CD14-PerCP (BD Biosciences) /CD3-APC (Beckman Coulter).

Expres povrchové formy TLR2 receptoru byla naměřena pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson). Byl použit 3-barvený panel protilátek: TLR2-PE (Serotec) /CD14-PerCP (BD Biosciences) /CD3-APC (Beckman Coulter).

Expres povrchové formy TLR4 receptoru byla hodnocena pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson) s použitím 3-barevného panelu protilátek: TLR4-PE (Serotec) /CD14-PerCP (BD Biosciences) /CD3-APC (Beckman Coulter).

5.4.2. ELISA technika

Hladina solubilní sCD163 byla detekována pomocí komerčního diagnostického ELISA kitu Macro163TM (IQ Products, Nizozemí). Test byl proveden podle pokynů poskytnutých výrobcem. Spektrofotometrické měření bylo realizováno pomocí ELISA readeru Multiscan RC (Thermo Scientific) s 450nm filtrem.

Hladina solubilní formy sTLR2 receptoru byla změřena pomocí diagnostického ELISA kitu pro lidský Toll-like receptor 2 (TLR2) (Uscn Life Science Inc., Čína). Test byl proveden podle pokynů doporučených výrobcem. Spektrofotometrické měření bylo realizováno pomocí ELISA readeru Multiscan RC (Thermo Scientific) s 450nm filtrem.

5.5. Statistická analýza

Po zhodnocení normality dat, byly statistické rozdíly mezi skupinami a mezi pacienty před a po terapii hodnoceny párovým a nepárovým t-testem, případně neparametrickým Wilcoxonůvým testem (MedCalc software, Belgie). Nepárový t-test a chi-square byl použit k vyloučení matoucích vlivů věku a pohlaví mezi pacienty a kontrolami.

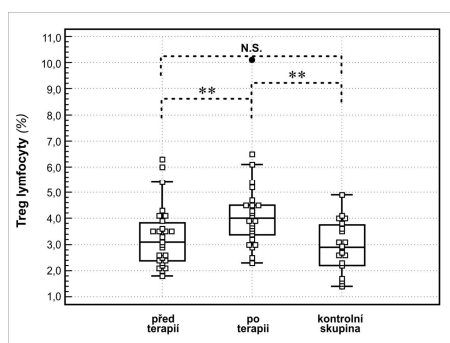
Výsledky Treg, povrchové CD163 a solubilní sTLR2 jsou uvedeny jako průměr \pm standardní odchylka a jako medián (nejnižší až nejvyšší kvartil) u s CD163 analýzy a membránové formy TLR2 a TLR4 na monocytech. P hodnoty menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

6. Výsledky

6.1. Stanovení relativního počtu Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Goeckermanova terapie významně pozitivně ovlivnila aktivitu choroby. U všech pacientů bylo dosaženo dobré klinické odpovědi. PASI skóre naměřené před terapií pokleslo z $17,5 \pm 6,5$ na $8,4 \pm 4,6$ po terapii ($P < 0,0001$). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi počty T regulačních lymfocytů a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

Při porovnávání hladin Treg lymfocytů v periferní krvi mezi zdravými kontrolami ($2,9 \pm 1,0\%$) a pacienty s psoriázou před zahájením terapie ($3,3 \pm 1,2\%$) jsme nenalezli statisticky významné rozdíly ($P = 0,2668$). Relativní počet Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou po GT ($4,3 \pm 1,6\%$) byl významně vyšší v porovnání s počtem těchto buněk u kontrolní skupiny ($2,9 \pm 1,0\%$), $P = 0,0019$. Relativní počet Treg lymfocytů byl u pacientů s psoriázou po GT ($4,3 \pm 1,6\%$) statisticky významně vyšší než před zahájením terapie ($3,3 \pm 1,2\%$), $P = 0,0042$. Naše výsledky jsou shrnuty v grafu č. 1.

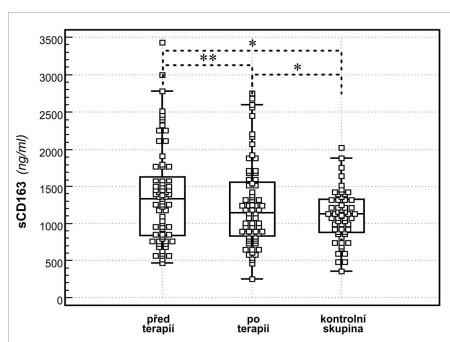


Graf č. 1: Procentuální zastoupení Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou před a po GT a u zdravých dobrovolníků.

6.2. Stanovení hladin solubilní formy CD163 (sCD163) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Hodnoty PASI skóre u pacientů s psoriázou poklesly z počáteční hodnoty $19,3 \pm 7,0$ na $10,1 \pm 6,4$ po terapii ($P = 0,0001$). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami sCD163 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání s hladinou u kontrol (1128,0 ng/ml (887,8 – 1325,0)) byly sérové hladiny sCD163 u pacientů před terapií (1363,0 ng/ml (852,5 – 1778,5)) značně vyšší ($P = 0,0154$). Hladina sCD163 byla silně ovlivněna Goeckermanovou terapií. Sérové hladiny klesly z 1363,0 ng/ml (852,5 – 1778,5) před terapií na 1182,0 ng/ml (850,0 – 1610,3) po terapii ($P = 0,0037$). V porovnání se zdravými kontrolami (1128,0 ng/ml (887,8 – 1325,0)) zůstaly sérové hladiny sCD163 u pacientů s psoriázou po GT (1182,0 ng/ml (850,0 – 1610,3)) nepatrně zvýšené ($P = 0,0459$). Výsledky týkající se hladin solubilní sCD163 u pacientů s psoriázou a kontrolní skupiny jsou shrnuty v grafu č. 2.



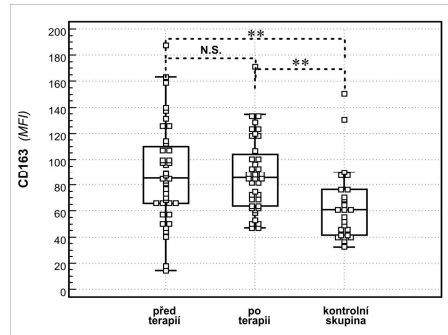
Graf č. 2: Sérové hladiny sCD163 a pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

6.3. Stanovení exprese povrchové formy CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Došlo k výraznému snížení PASI z $18,2 \pm 6,8$ před terapií na $8,5 \pm 4,0$ po léčbě ($P = 0,0001$). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi intenzitou fluorescence membránové exprese CD163 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání s kontrolami ($64,5 \pm 28,6$) byla intenzita membránové exprese CD163, vyjádřená jako MFI, u pacientů s psoriázou před Goeckermanovou terapií ($88,9 \pm 38,2$) významně vyšší; $P = 0,0078$. Expresí membránové formy CD163 zůstala v porovnání s kontrolní skupinou ($64,5 \pm 28,6$) významně vyšší i po Goeckermanově terapii ($88,1 \pm 28,5$);

$P = 0,0019$. Exprese membránové CD163 na monocytech nebyla významně ovlivněna GT ($P = 0,8666$). Výsledky týkající se membránové exprese CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou a kontrolní skupiny jsou shrnuty v grafu č. 3.

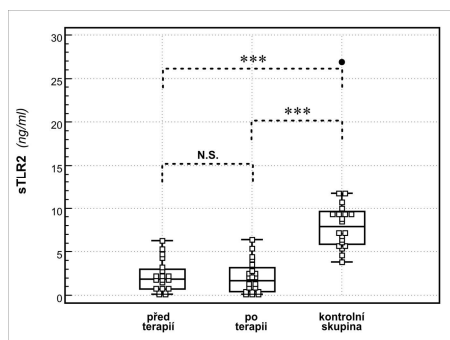


Graf č. 3: Membránová exprese CD163 na monocytech u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

6.4. Stanovení hladin solubilní formy TLR2 (sTLR2) u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Všichni pacienti s psoriázou měli pozitivní odezvu na léčbu. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty $18,6 \pm 7,2$ na $8,0 \pm 3,7$ po terapii ($P < 0,0001$). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami sTLR2 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání se sérovou hladinou u kontrol ($8,8 \pm 4,8$ ng/ml) byly sérové hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou před terapií ($2,2 \pm 1,8$ ng/ml) značně nižší ($P < 0,0001$). Hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou zůstaly v porovnání s kontrolní skupinou ($8,8 \pm 4,8$ ng/ml) významně nižší i po ukončení Goeckermanovy terapie ($2,1 \pm 1,8$ ng/ml); $P < 0,0001$. Goeckermanova terapie neměla žádný signifikantní vliv na sérové hladiny solubilní formy Toll-like receptoru 2 ($P = 0,7322$). Výsledky týkající se hladin solubilní formy sTLR2 receptoru u pacientů s psoriázou a kontrolní skupiny jsou shrnuty v grafu č. 4.

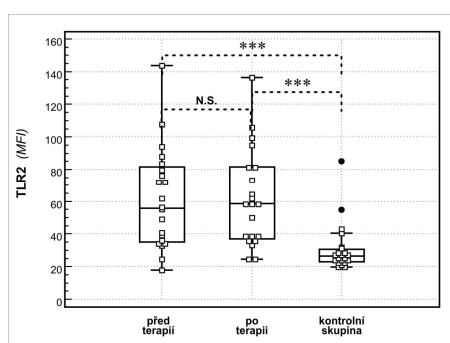


Graf č. 4: Sérové hladiny sTLR2 u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

6.5. Stanovení exprese povrchové formy TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Terapeutický efekt GT byl velmi vysoký. U všech pacientů byla dosažena dobrá klinická odpověď. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty $18,6 \pm 7,2$ na $8,0 \pm 3,7$ po terapii ($P < 0.0001$). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi TLR2 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání s hladinou exprese TLR2 na monocytech u kontrolní skupiny (26,5 (23,4 - 30,6)) byla intenzita membránové exprese (MFI) TLR2 u pacientů s psoriázou jak před Goeckermanovou terapií (55,8 (35,5 - 81,6), $P = 0,0003$) tak po ukončení léčby (58,6 (37,2 - 81,5), $P = 0,0001$) významně vyšší. Exprese membránové formy TLR2 nebyla ovlivněna Goeckermanovou terapií ($P = 0,9836$). Naše výsledky týkající se membránové exprese TLR2 jsou shrnuty v grafu č. 5.



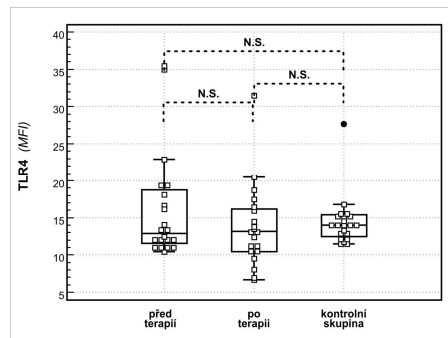
Graf č. 5: Membránová exprese TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

6.6. Stanovení exprese povrchové formy TLR4 na monocytech u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Všichni pacienti s psoriázou měli pozitivní odezvu na léčbu. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty $18,6 \pm 7,2$ na $8,0 \pm 3,7$ po terapii ($P < 0.0001$). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi expresí TLR4 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

V porovnání s kontrolní skupinou ($14,0$ ($12,6 - 15,4$)) jsme nenalezli žádné statistické rozdíly mezi expresí TLR4, vyjádřenou jako MFI, u pacientů s psoriázou jak před ($12,9$ ($11,6 - 18,7$); $P = 0,6168$) tak po ($13,2$ ($10,5 - 16,2$); $P = 0,6333$) Goeckermanově terapii.

Expresie membránové formy TLR4 na monocytech nebyla ovlivněna Goeckermanovou terapií ($P = 0,2$). Výsledky týkající se membránové exprese TLR4 jsou shrnuty v grafu č. 6.



Graf č. 6: Membránová exprese TLR4 na monocytech u pacientů s psoriázou před a po GT a kontrolní skupiny.

7. Diskuse

Jak zdravá tak psoriatická kůže představuje dynamickou, periferně situovanou bariéru zejména proti chemickému, mechanickému, fyzikálnímu, světelnému a radiačnímu poškození. Její další významnou funkcí je obrana proti pronikání mikroorganismů (7). Psoriáza je jedna z nejčastějších kožních nemocí s často celoživotně recidivujícím průběhem. Je to chronické onemocnění, které výrazně zhoršuje kvalitu života. Léčba psoriázy je komplikovaná a vyžaduje individuální, odborný a citlivý přístup lékaře. Goeckermanova terapie patří v České republice mezi stále velmi často používané léčebné postupy. GT kombinuje protizánětlivé a imunomodulační efekty alifatických a aromatických uhlovodíků a imunosupresivní a imunomodulační aktivity UV záření. GT je vysoce účinná v dosažení remise (8).

Tato práce byla zaměřená na sledování změn různých buněčných populací a imunologických markerů v průběhu Goeckermanovy terapie. Také jsme porovnávali míru exprese těchto markerů u pacientů s psoriázou a u zdravých kontrol. Zaměřili jsme se na stanovení T regulačních lymfocytů, expresi membránové formy vycytávacího receptoru CD163, Toll-like receptoru 2 a 4 a hladiny solubilní sCD163 a solubilní sTLR2.

Deficitní **Treg** lymfocyty byly nalezeny v řadě autoimunitních stavů, včetně roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy a psoriázy. Chen a spol. zdůraznili, že pro efektivní imunitní odpověď je velmi důležitá rovnováha mezi aktivovanými efektorovými buňkami a Treg lymfocyty (22). Nedávno řada vědců popsala nerovnováhu mezi Treg a efektorovými T lymfocyty u pacientů s psoriázou. Jejich zjištění naznačují, že počet a/nebo funkce Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou může být narušena a to následně vede ke zvýšené proliferaci patogenních T lymfocytů (22, 44, 49, 52). Bovenschen a spol. zjistili, že v biopsii kůže zdravých lidí se Treg lymfocyty nenacházejí, zatímco u pacientů s psoriázou byly nalezeny jak v dermis tak v menším množství i v epidermis. Ve své práci naznačili, že Treg lymfocyty jak v dermis tak epidermis nejsou schopné vykonávat své supresorové funkce (6). Goodman a spol. vyslovili hypotézu, že vysoké hladiny IL-6 v postižené psoriatické tkáni mohou tlumit supresorové funkce Treg a že tento prozánětlivý cytokin umožňuje efektorovým buňkám unikat před Treg supresí, což přispívá ke zvýšeným počtům efektorových buněk v psoriatických placích. Tento cytokin je u pacientů s psoriázou v lézích výrazně zvýšený a je produkován zejména endoteliálními buňkami, dendritickými buňkami a Th17. IL-6 stimuluje keratinocyty, podporuje diferenciaci T lymfocytů produkujících IL-17 a zároveň snižuje Treg diferenciaci (18). Maeda a spol. a Schwarz a spol. zjistili, že UV záření vede k indukci Treg lymfocytů (UV-Treg). Tyto UV-Treg mají na svém povrchu molekuly CD4, CD25, CTLA-4,

GITR a neurophilin-1 a produkují cytokin IL-10. Protože mají schopnost potlačovat imunitní odpovědi prostřednictvím antigen specifické reakce, představují terapeutický potenciál stejně jako ostatní typy Treg buněk (31, 43).

V souladu s dalšími studii (22, 38, 41, 44, 52) jsme zjistili, že počty Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou jsou srovnatelné s počty těchto buněk u zdravých kontrol. Chen a spol. stejně tak jako Zhang a spol. uvedli, že nezjistili žádné významné rozdíly v počtech Treg lymfocytů mezi pacienty s psoriázou a kontrolní skupinou (22, 52). Saito a spol. informovali, že procento $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou před bath-PUVA terapií je nepatrně nižší než u zdravých dobrovolníků, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný (38). V souladu s našimi výsledky bylo procento Treg lymfocytů u psoriatických pacientů po bath-PUVA terapii významně vyšší. Furuhashi a spol. uvedli, že léčba pomocí monochromatického záření 308nm (Excimer laser) vede ke zvýšení počtu T regulačních lymfocytů (13). Quaglino a spol. zjistili, že biologická léčba (etanercept, infliximab, efalizumab) také vyvolává zvýšení počtů Treg lymfocytů a dosažení dobré klinické odpovědi (35). Sugiyama a spol. zjistili, že Treg lymfocyty u pacientů s psoriázou projevují oslabenou supresorovou aktivitu, zároveň ale nedochází ke snížení jejich počtu v periferní krvi. Navrhli, že toto funkční oslabení Treg lymfocytů u pacientů s psoriázou může vést k selhání regulace autoreaktivních T lymfocytů s následným nárůstem jejich počtu (15, 44).

Tato studie, ve které jsme dokázali, že po Goeckermanově terapii dochází ke zvýšení počtu Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů s psoriázou, přispívá k dalšímu objasnění imunomodulačních efektů Goeckermanovy terapie.

CD163 je nový specifický monocyto/makrofágový biomarker spojený s různými klinickými stavy, jako jsou ateroskleróza, srdeční choroby, transplantace, rakovina, infekce a autoimunita (1, 10, 12, 14, 17). CD163 molekula by mohla sloužit jako prognostický marker u vybraných zánětlivých chorob (34, 53). Na rozdíl od jiných zánětlivých markerů je CD163 receptor vyjádřen výhradně na monocytech/makrofázích.

Naše výsledky prokázaly, že hladiny jak membránové exprese CD163 na monocytech tak solubilní sCD163 v séru jsou u pacientů s psoriázou před GT významně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami. Tento nárůst CD163 receptoru svědčí o probíhajícím zánětlivém procesu u pacientů s psoriázou. V souladu s našimi výsledky, Zaba a spol. ve svém článku uvedli, že CD163 pozitivní buňky projevily trojnásobné zvýšení v lézích psoriatické kůže a po efektivní léčbě etanerceptem se vrátily na hladiny odpovídající počtům v kůži bez lézí (51).

Fuentes-Duculan a spol. došli k závěru, že makrofágy u psoriázy pravděpodobně přispívají k rozvoji patogenního zánětu uvolňováním klíčových zánětlivých produktů (12).

Zjistili jsme, že sérové hladiny sCD163, které jsou u pacientů s psoriázou před terapií zvýšené, významně klesají po terapii. Na druhou stranu jsme nenaměřili žádné rozdíly v expresi membránového CD163 receptoru na monocytech před a po terapii. V porovnání s kontrolní skupinou je monocytární exprese membránové CD163 u pacientů s psoriázou významně vyšší a nedochází pomocí GT k podstatnému ovlivnění. Toto zjištění může být vysvětleno tím, že je přítomnost protizánětlivých makrofágů v kůži výhodná. Proto zůstává membránová exprese CD163 zvýšená i po terapii a prodlužuje její protizánětlivé působení i po ukončení GT. Naopak, hladiny sCD163 v cirkulaci byly po terapii sniženy, protože GT snižuje aktivitu metaloproteináz, které jsou odpovědné za odštěpování CD163 z membránových povrchů (21).

Solubilní molekula sCD163 v periferní krvi je nyní považována za nový biomarker zánětu, zatímco membránová exprese CD163 na monocytech je spojena s protizánětlivým fenoménem (26).

Na závěr lze říct, že exprese jak membránově vázané CD163 tak solubilní sCD163 odráží probíhající zánětlivý proces u pacientů s psoriázou a je výrazně vyšší než u kontrolní skupiny. GT u pacientů s psoriázou značně snižuje sérové hladiny sCD163.

TLR mohou zasahovat do patogeneze řady zánětlivých chorob, včetně chorob kůže jako je psoriáza. Proto jsme se zaměřili na stanovení jak membránové tak solubilní formy vybraných Toll-like receptorů u pacientů s psoriázou.

Některé studie prokázaly podstatně vyšší expresi **TLR2** na monocytech/makrofázích u pacientů se zánětlivým onemocněním v porovnání se zdravými kontrolami (20, 23). Baker a spol. naznačili, že určité mikroorganismy mohou spouštět nebo zhoršovat tuto kožní chorobu aktivací TLR na keratinocytech. Dále zjistili, že distribuce TLR2 je u pacientů s psoriázou odlišná než u zdravých jedinců. U zdravé kůže je nejvyšší exprese TLR2 na bazálních keratinocytech. Naopak, u pacientů s psoriázou je exprese TLR2 vyšší na keratinocytech ve vyšších vrstvách epidermis. Tato zvýšená exprese TLR2 ve vyšších vrstvách epidermis v psoriatických lézích může být způsobena odpovědí na přítomnost grampozitivních bakterií. Dalším vysvětlením je vliv prozánětlivých cytokinů (TNF- α , INF- γ) na zvýšenou expresi TLR2. Tato odlišná exprese TLR2 může být také vyvolaná zvýšenou proliferací a/nebo narušenou maturací keratinocytů (2).

Begon a spol. ve své práci uvedli, že keratinocyty exprimují všechny TLR receptory a že cytokiny TNF- α a INF- γ zvyšují cytoplazmatickou i povrchovou expresi většiny TLR,

včetně TLR2, 3 a 4. V jejich studii uvedli, že je TLR2 exprese zvýšená v psoriatických lézích a naznačili, že TLR receptory mohou hrát významnou roli v patogenezi řady zánětlivých chorob, včetně psoriázy. TLR receptory mohou podporovat chronický zánět v psoriatické kůži uvolňováním prozánětlivých cytokinů. Psoriáza je kožní onemocnění s převahou Th1 odpovědi, pro které je typická produkce cytokinů TNF- α a IFN- γ . Tyto cytokiny jsou uvolňovány mimo jiné i keratinocyty po jejich stimulaci prostřednictvím TLR infekčních ligandů. TNF- α a IFN- γ cytokiny zvyšují expresi TLR2 receptoru (3).

LeBouder a spol. naznačili, že hlavním zdrojem solubilní formy sTLR2 v plazmě mohou být monocyty a že sTLR2 vzniká přeměnou povrchové TLR2. Le Bouder a spol. ve své studii také prokázali, že buněčná aktivace vede ke snížení povrchové formy TLR2 a naopak k rychlému uvolňování sTLR2 (28). Raby a spol. demonstrovali, že sTLR2 reguluje buněčné odpovědi zprostředkované TLR2. Regulace prostřednictvím sTLR2 je důležitý fyziologický mechanismus přirozené imunity (36).

Naše výsledky prokazují, že membránová exprese TLR2 na monocytech je ve srovnání s kontrolní skupinou u pacientů s psoriázou výrazně vyšší jak před tak po ukončení GT. Hausmann a spol. a Iwahashi a spol. ve svých pracích dokázali zvýšenou expresi TLR2 na monocytech či makrofázích u pacientů s různými zánětlivými chorobami (20, 23). Naše práce podporuje tato tvrzení, protože jsme zjistili vyšší hodnoty TLR2 na monocytech u pacientů s psoriázou, která je považována za zánětlivé onemocnění. Hladina solubilní sTLR2 byla v porovnání s kontrolní skupinou naopak signifikantně nižší u pacientů s psoriázou jak před tak i po GT.

Zvýšená exprese TLR2 na monocytech v periferní krvi pacientů s psoriázou může být způsobena prozánětlivým prostředím typickým pro tuto chorobu. Cytokiny TNF- α a IFN- γ zvyšují expresi většiny TLR, včetně TLR2. Dalším vysvětlením může být přítomnost signálů nebezpečí. Zvýšená exprese TLR2 vede k další prozánětlivé signalizaci. U nemocných s psoriázou je snížen protizánětlivý efekt sTLR2, což pravděpodobně také přispívá ke zvýšené expresi TLR2 na monocytech.

Přestože Goeckermanova terapie působí protizánětlivě, není schopná terapeuticky zasáhnout do exprese membránové TLR2 a solubilní sTLR2. V naší práci jsme prokázali, že některé parametry imunity jsou ovlivněny touto terapií, např. že GT je schopná snížit hladiny sCD163 a naopak zvýšit počty Treg lymfocytů. Neschopnost zvýšit hladiny sTLR2 a naopak snížit expresi membránové formy TLR2 na monocytech v průběhu GT může být způsobena možným přetrváváním bakteriálních PAMP (molekulové vzory asociované s patogenem) i po úspěšné léčbě pomocí Goeckermanovy terapie. Tento fakt může být jedním z důvodů relapsu

psoriázy. Exprese TLR2 na monocytech a hladina sTLR2 v séru odráží probíhající zánět u pacientů s psoriázou.

Zvýšená exprese TLR2 naznačuje zapojení těchto receptorů přirozené imunity do patogeneze kožních zánětů. U psoriázy je pravděpodobně nedostatečná regulace aktivace TLR receptorů a to vede k přehnané odpovědi přirozené imunity.

Nenašli jsme žádné statisticky významné rozdíly v **TLR4** expresi mezi pacienty s psoriázou a kontrolní skupinou. Mita a spol. ve své studii uvedli, že IL-2 a IFN- γ zvyšují TLR4 expresi na monocytech, zatímco přítomnost cytokinu IL-4 vede ke snížení TLR4 receptoru na monocytech. Naznačili, že Th1 cytokinová odpověď zesiluje působení Toll-like receptorů na gramnegativní bakterie (32). Přestože je psoriáza považována za chorobu s převahou Th1 cytokinové odpovědi, nezjistili jsme u našich pacientů vyšší expresi TLR4 na monocytech v porovnání s kontrolní skupinou. Hausmann a spol. imunohistochemickým barvením prokázali vyšší expresi TLR4 na makrofázích ve střevní sliznici, kde probíhá zánět (20). Seung a spol. ve shodě s našimi výsledky nenalezli žádné rozdíly mezi expresí TLR4 u pacientů s psoriázou a zdravými kontrolami (25, 40).

Vzhledem k naší výsledkům lze předpokládat, že TLR2 a TLR4 hrají v patogenezi psoriázy odlišné role.

8. Závěr

Cílem této disertační práce bylo zhodnotit vybrané parametry imunitního systému u pacientů s psoriázou a jejich dynamiku v souvislosti s Goeckermanovou terapií.

Soubor nemocných zahrnoval dospělé pacienty s diagnózou psoriázy, u kterých byla na Klinice nemocí kožních a pohlavních Fakultní nemocnice Hradec Králové indikována Goeckermanova terapie. Závažnost onemocnění a zároveň účinnost léčby byla hodnocena pomocí PASI skóre. Vzorky krve byly od pacientů odebrány před začátkem Goeckermanovy terapie a v den propuštění z nemocniční péče. Zároveň byly odebrány vzorky krve i od zdravých dárců krve na Tranfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, kteří sloužili jako kontrolní skupina. Skupiny pacientů a kontrol se statisticky nelišily věkem, ani zastoupením jednotlivých pohlaví.

Byly vybrány následující parametry imunitního systému: T regulační lymfocyty (Treg), membránově vázaný vycytávací receptor CD163 na monocytech v periferní krvi, solubilní CD163 (sCD163) v séru, membránová forma Toll-like receptoru 2 (TLR2) a 4 (TLR4) a solubilní forma TLR2 (sTLR2). Hodnocení parametrů buněčné imunity bylo provedeno na průtokovém cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson) a FC500 Cytomics (Beckman Coulter). Sérové hladiny sCD163 a sTLR2 byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity.

Počty T regulačních lymfocytů se u pacientů s psoriázou před zahájením terapie a u zdravých kontrol významně nelišily. Podařilo se nám prokázat zvýšení počtu Treg lymfocytů po ukončení Goeckermanovy terapie. Na základě našich výsledků lze konstatovat, že počet Treg lymfocytů není u pacientů s psoriázou odlišný v porovnání s kontrolní skupinou, ale pro dostatečné regulační funkce Treg lymfocytů jsou u těchto pacientů potřebné vyšší počty. GT pozitivně působí na zvyšování počtu této regulační populace T lymfocytů.

Stanovovali jsme efekt GT na expresi vycytávacího receptoru CD163 na monocytech. Na rozdíl od jiných zánětlivých markerů je CD163 receptor vyjádřen výhradně na monocytech/makrofázích. Membránová exprese CD163 na monocytech je v porovnání se zdravými kontrolami u pacientů s psoriázou před GT významně vyšší. Tato vysoká exprese CD163 receptoru svědčí o probíhajícím zánětlivém procesu u těchto pacientů. Exprese membránové CD163 na monocytech není významně ovlivněna GT.

Sérové hladiny sCD163, které jsou u pacientů s psoriázou před terapií v porovnání s kontrolní skupinou zvýšené, významně klesají po terapii. Pokles solubilní molekuly sCD163 svědčí o snížení zánětlivého procesu po GT, která působí protizánětlivě a imunomodulačně.

TLR mohou zasahovat do patogeneze řady zánětlivých chorob, včetně psoriázy. Membránová exprese TLR2 na monocyttech je ve srovnání s kontrolní skupinou u pacientů s psoriázou výrazně vyšší jak před tak po ukončení GT. Hladina solubilní sTLR2 je naopak oproti kontrolám snížena. GT není schopná terapeuticky zasáhnout do exprese membránové TLR2 a solubilní sTLR2. Nenašli jsme žádné statisticky významné rozdíly v TLR4 expresi mezi pacienty s psoriázou a kontrolní skupinou. GT nijak neovlivnila expresi TLR4.

Znalost kvalitativních i kvantitativních změn různých parametrů imunity u psoriázy a jejich ovlivnění terapií, např. Goeckermanovou, by mohla vést k identifikaci specifických markerů pro monitorování progresu a chorobné aktivity psoriázy. Z naší studie vyplývá, že Goeckermanova terapie má pozitivní vliv na počty Treg lymfocytů a snižuje hladiny sCD163 molekuly, která je považována za nový biomarker zánětu. Zvýšená exprese TLR2 a naopak snížená hladina sTLR2 svědčí o stále probíhajícím zánětu u pacientů s psoriázou i po vymizení klinických příznaků po GT. Proto lze konstatovat, že Toll-like receptory mají pravděpodobně určitý podíl na patogenezi psoriázy.

Přes účinnost léčby zůstává psoriáza stále nevléčitelnou nemocí. Goeckermanova terapie je schopná navodit dlouhodobou remisi u většiny pacientů. Přesto imunitní systém i kůže psoriatiků vykazuje abnormality i v období bez klinických příznaků.

9. Použitá literatura

1. Aristoteli, L.P., Möller, H.J., Bailey, B., Moestrup, S.K., Kritharides, L. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2006, vol. 184, s. 342–347.
2. Baker, B.S, Ovigne, J-M., Powles, A.V., Corcoran, S., Fry, L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*, 2003, vol. 148, no. 4, s. 670-679.
3. Begon, E., Michel, L., Flageul, B., Beaudoin, I., Jean-Louis, F., Bachelez, H., Dubertret, L., Musette, P. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol*, 2007, vol. 17, no. 6, s. 497-506.
4. Benáková, N. Psoriáza a současné léčebné možnosti. *Interní medicína pro praxi*, 2005, vol. 14, no. 2, s. 88-91.
5. Bevelacqua, V., Libra, M., Mazzarino, M.C., Gangemi, P., Nicotra, G., Curatolo, S., Massimino, D., Plumari, A., Merito, P., Valente, G., Stivala, F., La Greca, S., Malaponte, G. Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients. *Int J Mol Med*, 2006, vol. 18, no. 3, s. 415–423.
6. Bovenschen, H.J., van Vlijmen-Willems, I.M., van de Kerkhof, P.C., van Erp, P.E. Identification of lesional CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in Psoriasis. *Dermatology*, 2006, vol. 213, no. 2, s. 111–117.
7. Curry, J.L., Qin, J-Z., Bonish, B., Carrick, R., Bacon, P., Panella, J., Robinson, J., Nickoloff, B.J. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med*, 2003, vol. 127, no. 2, s. 178–186.

8. de Miguel, R., el-Azhary, R. Efficacy, safety, and cost of Goeckerman therapy compared with biologics in the treatment of moderate to severe psoriasis. *Int J Dermatol*, 2009, vol. 48, no. 6, s. 653–658.
9. Dulay, A.T., Buhimschi, C.S., Zhao, G., Oliver, E.A., Mbele, A., Jing, S., Buhimschi, I.A. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. *J Immunol*, 2009, vol. 182, no. 11, s. 7244–7253.
10. Feighery, C., Dunne, J., Bingham, E.A., Feighery, C.F. Evaluation of soluble CD163 as a marker of inflammation in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 2011, vol. 36, no. 2, s. 201–203.
11. Frings, W., Dreier, J., Sorg, C. Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Lett*, 2002, vol. 526, no. 1-3, s. 93–96.
12. Fuentes-Duculan, J., Suárez-Fariñas, M., Zaba, L.C., Nograies, K.E., Pierson, K.C., Mitsui, H., Pensabene, C.A., Kzhyshkowska, J., Krueger, J.G., Lowes, M.A. A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2010, vol. 130, no. 10, s. 2412–2422.
13. Furuhashi, T., Torii, K., Kato, H., Nishida, E., Saito, C., Morita, A. Efficacy of excimer light therapy (308 nm) for palmoplantar pustulosis with the induction of circulating regulatory T cells. *Exp Dermatol*, 2001, vol. 20, no. 9, s. 768–770.
14. Gaïni, S., Pedersen, S.S., Koldkaer, O.G., Pedersen, C., Moestrup, S.K., Møller, H.J. New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin Exp Immunol*, 2008, vol. 151, no. 3, s. 423–431.
15. Gaspari, A.A. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 2006, vol. 54, no. 3 suppl 2, s. 67-80.
16. Goeckerman, W.H. Treatment of psoriasis. *Northwest Med*, 1925, vol. 24, s. 229–231.

17. Goldstein, J.I., Goldstein, K.A., Wardwell, K., Fahrner, S.L., Goonan, K.E., Cheney, M.D., Yeager, M.P., Guyre, P.M. Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Atherosclerosis*, 2003, vol. 170, no. 2, s. 325–332.
18. Goodman, W.A., Levine, A.D., Massari, J.V., Sugiyama, H., McCormick, T.S., Cooper, K.D. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol*, 2009, vol. 183, no. 5, s. 3170–3176.
19. Grant, J., Bourcier, K., Wallace, S., Pan, D., Conway, A., Seyfert-Margolis, V., Wallace, P.K. Validated protocol for FoxP3 reveals increased expression in type 1 diabetes patients. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009, vol. 76, no. 2, s. 69–78.
20. Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., Rogler, G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 2002, vol. 122, no. 7, s. 1987–2000.
21. Hintz, K.A., Rassias, A.J., Wardwell, K., Moss, M.L., Morganelli, P.M., Pioli, P.A., Givan, A.L., Wallace, P.K., Yeager, M.P., Guyre, P.M. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*, 2002, vol. 72, no. 4, s. 711–717.
22. Chen, L., Shen, Z., Wang, G., Fan, P., Liu, Y. Dynamic frequency of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells in Psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*, 2008, vol. 51, no. 3, s. 200–203.
23. Iwahashi, M., Yamamura, M., Aita, T., Okamoto, A., Ueno, A., Ogawa, N., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J., Makino, H. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004, vol. 50, no. 5, s. 1457–1467.

24. Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 2001, vol. 193, no. 11, s. 1285–1294.
25. Kim, S.K., Park, S., Lee, E-S. Toll-like receptors and antimicrobial peptides expressions of psoriasis: correlation with serum vitamin D level. *J Korean Med Sci*, 2010, vol. 25, no. 10, s. 1506–1512.
26. Kolackova, M., Lonsky, V., Trojackova Kudlova, M., Mandak, J., Kunes, P., Svitek, V., Jankovicova, K., Vlaskova, D., Andrys, C., Krejsek, J. Serum level of sCD163, a soluble receptor for hemoglobin, is influenced by cardiac surgery. *Perfusion*, 2009, vol. 24, no. 4, s. 263–269.
27. Krejsek, J., Kunes, P., Kolackova, M., Kudlova, M., Lonsky, V., Mandak, J., Andrys, C. The expression of Toll-like receptor 2 and 4 on innate immunity cells is modulated by cardiac surgical operation. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008, vol. 68, no. 8, s. 749–758.
28. LeBouder, E., Rey-Nores, J.E., Rushmere, N.K., Grigorov, M., Lawn, S.D., Affolter, M., Griffin, G.E., Ferrara, P., Schiffrin, E.J., Morgan, B.P., Labéta, M.O. Soluble form of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and bread milk. *J Immunol*, 2003, vol. 171, no. 12, s. 6680–6689.
29. Lebwohl, M., Ali, S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *J Am Acad Dermatol*, 2001, vol. 45, no. 4, s. 487–498.
30. Madsen, M., Møller, H.J., Nielsen, M.J., Jacobsen, C., Graversen, J.H., van den Berg, T., Moestrup, S.K. Molecular characterization of the haptoglobin.hemoglobin receptor CD163.
31. Maeda, A., Beissert, S., Schwarz, T., Schwarz, A. Phenotypic and functional characterization of ultraviolet radiation-induced regulatory T cells. *J Immunol*, 2008, vol. 180, no. 5, s. 3065–3071.

32. Mita, Y., Dobashi, K., Endou, K., Kawata, T., Shimizu, Y., Nakazawa, T., Mori, M. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunol Lett*, 2002, vol. 81, no. 1, s. 71–75.
33. Nielsen, M.J., Madsen, M., Møller, H.J., Moestrup, S.K. The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *J Leukoc Biol*, 2006, vol. 79, no. 4, s. 837–845.
34. Onofre, G., Kolackova, M., Jankovicova, K., Krejsek, J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2009, 52, s. 57–61.
35. Quaglino, P., Bergallo, M., Ponti, R., Barberio, E., Cicchelli, S., Buffa, E., Comessatti, A., Costa, C., Terlizzi, M.E., Astegiano, S., Novelli, M., Cavallo, R., Bernengo, M.G. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. *Dermatology*, 2011, vol. 223, no. 1, s. 57–67.
36. Raby, A.C., Le Boude, E., Colmont, C., Davies, J., Richards, P., Coles, B., George, CH., Jones, S.A., Brennan, P., Topley, N., Labéta, M.O. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering. *J Immunol*, 2009, vol. 183, no. 1, s. 506–517.
37. Rapp SR, Feldman SR, Exum LM, Fleischer AB Jr, Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*, 1999, vol. 41, no. 3 Pt 1, s. 401–407.
38. Saito, C., Maeda, A., Morita, A. Bath-PUVA therapy induces circulating regulatory T cells in patients with psoriasis. *J Dermatol Sci*, 2009, vol. 53, no. 3, s. 231–233.
39. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 2005, vol. 6, no. 4, s. 345–352.

40. Seung, N.R., Park, E.J., Kim, C.W., Kim, K.H., Kim, K.J., Cho, H.J., Park, H.R. Comparison of expression of heat-shock protein 60, Toll-like receptors 2 and 4, and T-cell receptor $\gamma\delta$ in plaque and guttate psoriasis. *J Cutan Pathol*, 2007, vol. 34, no. 12, s. 903–911.
41. Shehata, I.H., Elghandour, T.M. A possible pathogenic role of CD4+CD25+ T-regulatory cells in psoriasis. *Egypt J Immunol*, 2007, vol. 14, no. 1, s. 21–31.
42. Schaer, C.A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M.O., Schaer, D.J. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res*, 2006, vol. 99, no. 9, s. 943–950.
43. Schwarz, A., Maeda, A., Wild, M.K., Kernebeck, K., Gross, N., Aragane, Y., Beissert, S., Vestweber, D., Schwarz, T. Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. *J Immunol*, 2004, vol. 172, no. 2, s. 1036–1043.
44. Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S.R., McCormick, T.S., Cooper, K.D. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 2005, vol. 174, no. 1, s. 164–173.
45. Thornton, A.M., Shevach, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 1998, vol. 188, no. 2, s. 287–296.
46. Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.L., Stinissen, P. Natural naive CD4+CD25+CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol*, 2008, vol. 180, no. 9, s. 6411–6420.
47. Veselá, I., Stříž, I. T regulační buňky a jejich úloha v imunitních reakcích. *Alergie*, 2004, vol. 1, s. 43–52.

48. Vojdani, A., Erde, J. Regulatory T cells, a potent immunoregulatory target for CAM researchers: modulating tumor immunity, autoimmunity and alloreactive immunity (III). *eCAM*, 2006, vol. 3, no. 3, s. 309–316.
49. Wang, H., Paters, T., Sindrilaru, A., Kess, D., Oreshkova, T., Yu, X., Seier, A.M., Schreiber, H., Wlachek, M., Blakytyn, R., Röhrbein, J., Schulz, G., Weiss, J.M., Scharffetter-Kochanek, K. TGF- β -dependent suppressive function of Tregs requires wild-type levels of CD18 in a mouse model of psoriasis. *J Clin Invest*, 2008, vol. 118, no. 7, s. 2629–2639.
50. Weaver, L.K., Pioli, P.A., Wardwell, K., Vogel, S.N., Guyre, P.M. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2007, vol. 81, no. 3, s. 663–671.
51. Zaba, L.C., Cardinale, I., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Novitskaya, I., Khatcherian, A., Bluth, M.J., Lowes, M.A., Krueger, J.G. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*, 2007, vol. 204, no. 13, s. 3183–3194.
52. Zhang, L., Yang, X.Q., Cheng, J., Hui, R.S., Gao, T.W. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin Immunol*, 2010, vol. 135, no. 1, s. 108–117.
53. Zuwała-Jagiello, J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Pol*, 2006, vol. 53, s. 257–268.

10. Přehled publikační činnosti

Původní články

Kondělková, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., Hamáková, K., Andrýs, C. The number of immunoregulatory T cells is increased in patients with psoriasis after Goeckerman therapy. Acta Medica (Hradec Kralove), 2012 (přijato do tisku).

Kondelkova, K., Krejsek, J., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Andrys, C. Expression of soluble sCD163 in serum of psoriatic patients is modulated by Goeckerman therapy. Allergol Immunopathol (Madr.), 2012 (přijato do tisku) **IF = 0,63**.

Habal, P., Mandřák, J., Šimek, J., Štětina, M., Jankovičová, K., **Kondělková, K.**, Krejsek, J. Monitorace efektivity chirurgické léčby maligních pleurálních výpotků. Klin Onkol, 2010, vol. 23, no. 2, s. 99-103.

Přehledové články

Kondělková, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., Andrýs, C. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. Acta Medica (Hradec Kralove), 2010, vol. 53, no. 2, s. 73-77.

Krejsek, J., Hrnčířová, L., **Kondelkova, K.**, Andrýs, C. The Role of Autoimmunity in Gastroenterology. Dig Dis, 2012 (přijato do tisku) **IF = 1,0**.

Přednášky a postery na odborných setkáních

Kondělková, K. The number of immunoregulatory T cells (Treg) is increased in patients with psoriasis after Goeckerman therapy (přednáška). 7th Postgraduate Medical Students Conference, LF HK, 17.10.2011.

Kondelkova, K., Vokurkova, D., Borská, L., Fiala, Z., Hamáková, K., Rehacek, V. Elevated regulatory T cells (Tregs) in the blood of psoriatic patients treated with Goeckerman therapy (poster). Mezinárodní konference Analytical Cytometry V, Olomouc, 5. - 8.9.2009

Kondělková, K., Andrýs, C., Hamáková, K., Řeháček, V., Borská, L. Expres vyčytávacího receptoru pro hemoglobin CD163 na monocytech pacientů s psoriázou a změny po Goeckermanově terapii (poster). XXVII. Sjezd Českých a Slovenských Alergologů a Klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc, 6. - 9.10.2010.

Kondělková, K., Hamáková, K., Řeháček, V., Borská, L., Andrýs., C. Expression of haemoglobin scavenger receptor CD163 on monocytes of psoriatic patients and its changes after Goeckerman's therapy (poster). Mezinárodní konference Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI) with the co-operation with the national societies of Croatia, Czech Republic, Hungary, Slovakia and Slovenia, Vídeň, 3. - 5.12.2010.