

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Doktorský studijní program
Lékařská imunologie

VLIV GOECKERMANOVY TERAPIE NA VYBRANÉ PARAMETRY
ANGIOGENEZE A ZÁNĚTU U PACIENTŮ S PSORIÁZOU

THE EFFECT OF GOECKERMAN THERAPY ON SELECTED
MARKERS OF ANGIOGENESIS AND INFLAMMATION IN
PSORIASIS PATIENTS

MUDr. David Pohl

Školitel: Doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.
Školitel konzultant: Doc. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Obhajoba dne:

Prohlášení autora:

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

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

Hradec Králové, 27.6.2011

Poděkování:

Za dokončení a napsání této práce vděčím pomoci velké spousty lidí, ať už z pracovního kolektivu nebo z okruhu rodiny a přátel, a při jejich úplném výčtu bych jistě na někoho zapomněl. Chtěl bych tedy na tomto místě poděkovat těm, jejichž příspěvek byl nejdůležitější. Zvláště pak doc. Andrysovi za jeho vedení a podporu, prof. Krejskovi za povzbuzení k další práci a MUDr. Borské, díky které jsem se začal celé problematice věnovat.

OBSAH

1. Úvod	8
1.1. Definice:.....	9
1.2. Fyziologické procesy a angiogeneze	10
1.2.1. Embryonální vývoj.....	10
1.2.2 Fyziologická angiogeneze v dospělosti.....	12
1.2.3. Zapojení angiogeneze do fyziologických procesů.....	13
1.3. Patofyziologie nemocí a angiogeneze, patologická angiogeneze.....	14
1.3.1. Obecné principy	14
1.3.2. Nadměrná angiogeneze	15
1.3.3. Nedostatečná angiogeneze	17
1.4. Terapeutická modulace angiogeneze.....	18
1.4.1. Obecné principy terapeutické manipulace s angiogenezí	19
1.4.2. Z laboratoře do kliniky. Poučení z vývoje antiangiogenních léčiv....	22
1.4.3. Molekulové terče a šípy léčby.....	25
1.4.4. Příklady klinicky užívaných výlučně anti- a pro-angiogenních léků. 25	
1.4.5. Antiangiogenní účinky klasických léčiv, inkluzivní léky.....	26
1.5. Ukazatele angiogeneze	27
1.5.1. „ <i>In vitro</i> “ modely	27
1.5.2. Zvířecí „ <i>in vivo</i> “ modely	28
1.5.3. Hodnocení angiogeneze u člověka.....	29
1.6. Molekulární mechanismy angiogeneze	32
1.6.1. Angiogenní přepínač	33
1.6.2. Růst cév	35
1.6.3. Molekulární regulace a řízení angiogeneze.....	37
1.6.4. Angiogenní kaskáda	38

1.6.5. Buněčné elementy v angiogenezi	38
1.6.6. Cytokiny a angiogeneze	41
1.7. Angiogeneze a zánět	48
1.8. Angiogeneze a chemokiny	52
1.9. Angiogeneze a kůže	54
1.10. Psoriáza	57
1.10.1. Projevy a formy psoriázy	57
1.10.2. Patofyziologie psoriázy	58
1.10.3. Terapie psoriázy	63
1.10.4. Angiogeneze u psoriázy	65
1.10.5. Terapie psoriázy a angiogeneze	67
2. Cíle práce	68
3. Soubor pacientů a použitá metodika	69
3.1. Soubor pacientů	69
3.1.1. Sestava dospělých pacientů s psoriázou pro analýzu angiogenních faktorů bFGF a VEGF	69
3.1.2. Sestava dětských pacientů s psoriázou pro analýzu angiogenních faktorů a chemokinů pomocí metody proteinových array	69
3.1.3. Sestava dospělých pacientů s psoriázou pro analýzu pentraxinů CRP a pentraxinu 3	70
3.1.4. Sestava dospělých pacientů s psoriázou pro analýzu solubilní formy endoglinu (sCD105)	70
3.2. Goeckermanova terapie psoriázy	70
3.3. Odběry biologického materiálu	71
3.4. Laboratorní metody stanovení angiogenních faktorů a pentraxinů	72
3.4.1 Metoda proteinových array	72
3.4.2. ELISA technika	72

3.4.3. Imunonefelometrie	73
3.5. Statistické vyhodnocení	73
4. Výsledky	74
4.1. Stanovení hladin růstových faktorů VEGF a bFGF u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií	74
4.2. Stanovení hladin angiogenních faktorů u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií metodou proteinových array.	78
4.3. Stanovení koncentrací pentraxinů PTX3 a CRP v sérech pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.	82
4.4. Stanovení hladin solubilní formy endoglinu (CD105) v sérech pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.	85
5. Diskuse	87
5.1. Úvod.....	87
5.2. Diskuse k práci: Andrys, C., Borska, L., Pohl, D., Fiala, Z., Hamakova, K., Krejsek, J. Angiogenic activity in patients with psoriasis is significantly decreased by Goeckerman's therapy. Arch Dermatol Res, 2007, 298, s. 479– 483.....	87
5.3. Diskuse k práci: Pohl, D., Andrys, C., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. Serum level of a soluble form of endoglin (CD105) is decreased after Goeckerman's therapy of psoriasis. Acta Medica (Hradec Králové), 2011, 54, s. 59–62.....	89
5.4. Diskuse k práci: Pohl, D., Andrys, C., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. CC and CXC chemokines patterns in psoriasis determined by protein array method were influenced by Goeckerman's therapy. Acta Medica (Hradec Králové), 2009, 52, s. 9–13.....	90
5.5. Diskuse k práci: Andrys, C., Borska, L., Pohl, D., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. Goeckerman's therapy for psoriasis with special	

reference to serum pentraxin 3 level. Int J Dermatol, 2008, 47, s. 1011–1014	92
6. Souhrn	94
6. Summary.....	97
7. Závěr	101
8. Literatura	103
9. Přílohy.....	127
9.1. Seznam použitých zkratk	127
9.2. Přehled vlastních publikací.....	128

1. Úvod

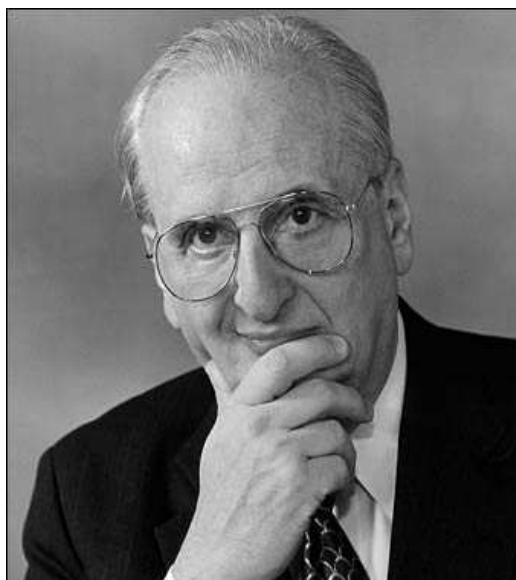
Jedním ze základních stavebních principů lidského organismu je existence cévního řečiště, jehož úkolem je přívod živin a kyslíku do tkání a odvod zplodin metabolismu z tkání. V téměř jakémkoliv orgánu (s výjimkou avaskulárních tkání jako jsou chrupavka či rohovka) není od buňky k nejbližší kapiláře větší vzdálenost než několik μm . Vaskulární systém hraje klíčovou roli v udržení integrity a funkce organismu.

Není tedy žádným překvapením, že existuje složitý a vyvážený systém regulující nabídku a poptávku tkání po dostatečném cévním zásobení. Takový systém, řídící tvorbu cév, byl již dávno teoreticky předpokládán. Představa, že v místech metabolické potřeby rostou nové cévy a umožní tak dodávku živin a kyslíku je velmi stará. Termín angiogeneze pro tento děj použil už anglický chirurg a patolog John Hunter v roce 1787 (1).

Konkrétní a experimentálně ověřené molekulárně biologické základy popisu angiogeneze byly položeny až začátkem 70. let 20. století zvláště díky úsilí skupiny Dr. Judah Folkmana (2). Následoval dynamický rozvoj a stálý nárůst objemu poznatků o novotvorbě cév, vedoucí až k současnému stavu, kdy byla ke klinickému použití schválena první (generace) léčiva vzešlá z výzkumu angiogeneze (snímky převzaty www.google.com).



John Hunter (1728 – 1793)



Judah Folkman (1933 – 2008)

1.1. Definice:

Termínem angiogeneze v moderním smyslu se rozumí proces růstu nových cév z preexistujícího cévního řečiště.

Angiogeneze je komplexní proces s mnoha úrovněmi regulace od makroskopické, orgánově - funkční, přes histologickou (endotel) po molekulární (regulační molekuly). Jeho cílovým orgánem je endotel, který představuje souhrn celé populace endotelových buněk vystylajících povrch všech cév v organismu. Endotel představuje asi 1 kg vážící orgán, který má kromě mechanické funkce i funkci metabolickou a signalizační. Za normálních podmínek v dospělém organismu je většina buněk endotelu ve stavu klidu (quiescence).

Při převaze proangiogenních signálů (angiogenic switch) v dané tkáni dojde ke sledu změn v do té doby neproliferujícím, plně diferencovaném a nepohyblivém tkáňovém endotelu, které vedou k jeho aktivaci. Aktivovaný endotel získá tyto vlastnosti, což vede k pučení nových kapilár (sprouting), vytvoření lumen a průtoku krve a nakonec zásobování oblasti tkáně novou (neoangiogenní) kapilárou. Celý proces končí v závislosti na přetrvávání a kvalitě proangiogenních impulsů buď maturací nové cévy a zapojením nového cévního řečiště do krevního oběhu, nebo naopak v případě nedostatečné signalizace regresí a zánikem cév. Tato plasticita novotvořené vaskulatury ji činí vhodným cílem pro terapeutickou manipulaci.

Fyziologická angiogeneze se dá ve zkratce sumarizovat jako obnova, oprava a obrana tkání. **Patologická angiogeneze** figuruje jako jak nedostatečná, tak nadměrná angiogeneze v patofyziologii nejrozličnějších onemocnění.

Prvním zkoumaným modelem angiogeneze byla nádorová angiogeneze a většina současných informací vychází z těchto pokusů. Zásadním zjištěním byl fakt, že nově vzniklý nádor po dosažení mikroskopické velikosti (objem asi 1-2 mm³) nemůže pokračovat v růstu ani metastazovat, pokud nezíská schopnost iniciovat angiogenezi. Tedy zajistit napojení na cévní řečiště "hostitelského" organismu. Tento krok v progresi tumoru byl nazván „angiogenic switch“ (angiogenní přepínač) a obecně představuje přechod od klidového k angiogennímu fenotypu.

Poznatky získané zkoumáním nádorové angiogeneze byly přeneseny do výzkumu

angiogeneze při fyziologických procesech a v patofyziologii nenádorových nemocí. Za fyziologických podmínek probíhá angiogeneze v embryonálním vývoji a v dospělosti pak hlavně v těch tkáních, kde dochází k epizodám rychlého růstu (cyklus děložní sliznice, růst vlasového foliklu, mikrokly ve střevě) a při obnově integrity tkání při poškození (hojení ran). V patologických procesech je patologická angiogeneze zapojena v patofyziologii nemocí spojených s chronickým zánětem (psoriáza, makulární degenerace, diabetes mellitus, revmatoidní artritida). Pro nenádorové nemoci spojené s angiogenezí se v literatuře ustálil termín „**angiogenesis dependent diseases**“ (3).

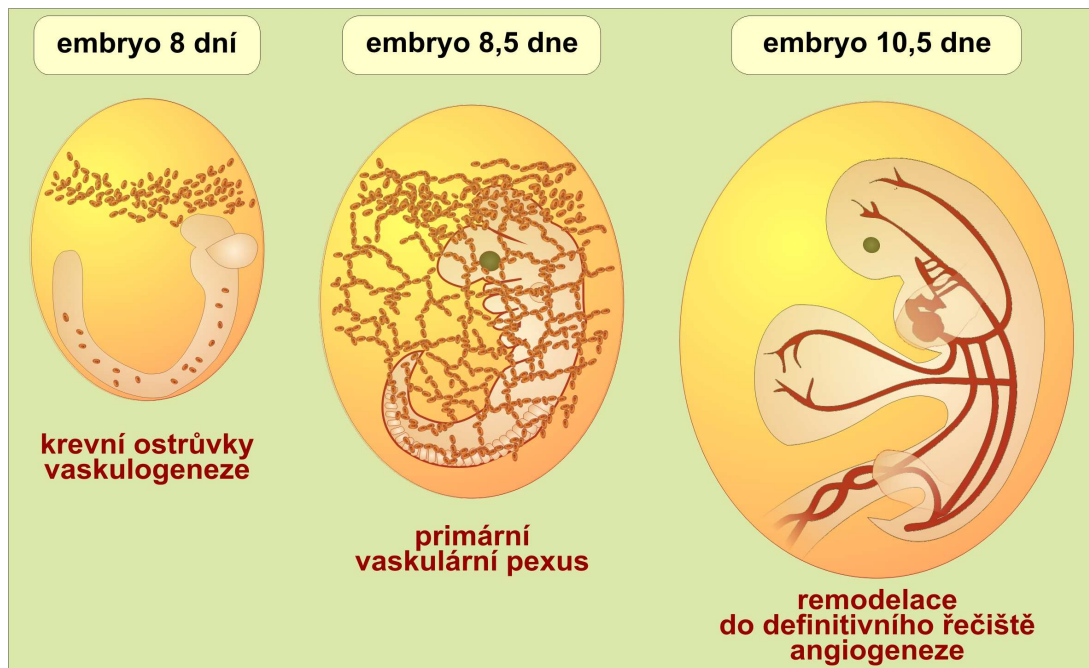
1.2. Fyziologické procesy a angiogeneze

1.2.1. Embryonální vývoj

Výzkum molekulárních mechanismů novotvorby cév vedl k potvrzení zásadní důležitosti angiogeneze pro správný vývoj embrya. Výživa embrya je již časně ve vývoji závislá na vlastním cévním řečišti, a to cca 20. den od fertilizace. Cirkulace oběhu začíná cca 22-28. den vývoje od fertilizace.

V počátcích vývinu má hlavní roli vaskulogeneze, vznik cév *de novo*. Z mezenchymového základu vznikají prekurzorové buňky krevní a endotelové, hemangioblasty. Ty se dále diferencují a formují v zárodečných tkáních tzv. „krevní ostrůvky“, shluky hemapoetických buněk lemovaných endotelem. Tyto jsou propojeny prvotním primitivním krevním řečištěm, které se označuje termínem primární vaskulární plexus (viz obrázek č.1).

Jeho následné rozšiřování, remodelace a pročišťování (pruning) (4), kterými se nový cévní systém přizpůsobuje nárokům rostoucích tkání, již probíhá pomocí angiogeneze. Regulace těchto dějů se účastní řada angiogenních signálních systémů. Hlavními jsou VEGF a delta/Notch (5).



Obr. č.1. Vaskulogeneze a angiogeneze ve vývoji embrya

V časně fázi vývoje vaskulárního systému (vaskulogeneze) vznikají krevní ostrůvky de novo z mesenchymového základu. Okolo osmého dne se ostrůvky spojují do primitivní vaskulatury, která se nazývá primární vaskulární plexus. Zhruba 10. den dochází k remodelaci plexu směrem k definitivní cévní síti na základě metabolických, hemodynamických nároků a předprogramované signalizace. Nyní se uplatňují angiogenní mechanismy.

Důležitost těchto regulačních systémových molekul pro správný vývoj embrya byla experimentálně ověřena v pokusech na myších liniích s cíleně vyřazenými (knock-outovanými) geny.

V systému VEGF vede inaktivace už jedné alely kódující gen pro VEGF-A k plné (100%) embryonální letalitě pokusných myších linií. Non-viabilní heterozygotní fenotyp je v savčí biologii velmi vzácný a potvrzuje tak zásadní důležitost systému VEGF v angiogenezi (6,7)

V systému delta/Notch heterozygotní delece genu pro protein dll4 způsobí parciální embryonální letalitu v cca 60% s četnými cévními defekty hlavně v arteriální části řečiště.

Homozygotní nulový fenotyp (*dll4* $-/-$) má již prakticky 100% prenatalní letalitu s akcentovanými vývojovými defekty podobnými těm u *dll4* $+/-$ (8).

V myším modelu systému TGF beta/endoglin vedla delece obou alel endoglinu k prenatalní letalitě v 10,5 den gestace a byla spojena s kardiálními defekty a špatnou vaskularizací žloutkového váčku (9). Heterozygotní model byl viabilní, ale myši vykazovaly známky porušené vaskulatury, teleangiektázie a AV malformace, obraz podobný hereditární hemoragické teleangiektázii (HHT) neboli Rendu-Osler-Weberově nemoci (ROW) (10).

Skutečně, u nemocných s ROW, byly nalezeny poruchy signalizace cestou TGFbeta a u jednoho podtypu HHT1 i samotná mutace v genu pro endoglin (11).

Endotel vyvíjejícího se embrya je v mnohém odlišný od dospělého. Je prokázána jeho větší plasticita, široká aktivace a výrazná převaha proangiogenní signalizace. Antiangiogenní cytokiny, které v dospělé vaskulatuře udržují stav angiogenního klidu, nemají v embryogenezi prakticky žádný vliv, jak ukázaly transgenní modely s knock-outovanými geny pro antiangiogenní cytokiny trombospondin (TSP) a angiostatin (12,13). Této výrazné angiogenní potenci embryonálních tkání se přičítá jejich schopnost velmi rychlého hojení ran bez následné jizvy (14).

Zajímavé bylo zjištění, že některé angiogenní signální systémy primárně zapojené v embryogenezi, se aktivují i v dospělém organismu při patologických stavech zvýšené metabolické potřeby (a angiogeneze). Rekrutace těchto v dospělosti dormantních angiogenních drah by mohlo mít terapeutické využití např. v léčbě ischemických stavů (ICHS, ICHDKK). Proces je znám pod označením recruitment (15).

1.2.2 Fyziologická angiogeneze v dospělosti

Za normálních okolností je endotel většiny tkání dospělého organismu v klidovém stavu s dlouhým intervalem mezi dělením endotelové buňky v průměru asi 2-3 roky. Výjimku tvoří tkáně s rychlým obratem buněk (střevo, tkáň endometria, ovarií) a výjimečné stavy jako je reparace poškození. V těchto případech je biologická obnova endotelu rychlejší. Při srovnání proliferačního indexu endotelu různých tkání měly angiogenně klidné (quiescent) orgány jako pruhovaný sval a plíce, játra, hodnoty v rozmezí 0,04% až 0,67 %, zatímco angiogenně aktivní tkáně jako granulační tkáň rány a *corpus luteum* měly hodnotu

proliferačního indexu výrazně vyšší (6,7% resp. 36%) (16).

K dalším poznatkům o významu fyziologické angiogeneze přispěl vývoj antiangiogenních léků a zkoumání jejich vlivu na vaskulaturu zdravých, necílových tkání. Inhibitory VEGF signalizace vedly ke změnám převážně na fenestrováných kapilárách, a to jednak k redukci fenestrací a rovněž k regresi těchto kapilár. Postiženy byly zejména kapiláry trachey, klků tenkého střeva, endokrinních orgánů a tukové tkáně. Nejvýraznější byla redukce kapilární sítě štítné žlázy, kde hodnoty poklesly až o 68%. Relativně malé až žádné postižení bylo popsáno u kapilární sítě mozku, retiny, kosterního a srdečního svalu (17).

Vliv antiangiogenní terapie na fyziologickou angiogenezi dokumentují vedlejší účinky bevacizumabu, prvního schváleného antiangiogenního léku. Ty zahrnují zejména sklon ke krvácení (epistaxe, hemoptýza), zpomalené hojení ran a případy perforace GIT (18).

Přesnější znalost zapojení angiogeneze do fyziologických procesů a jejího významu pro funkci a integritu tkání umožní vývoj bezpečnějších antiangiogenních léčiv a terapeutické strategie (16).

1.2.3. Zapojení angiogeneze do fyziologických procesů

Hojení ran a angiogeneze

Hojení ran je příklad maximálně aktivované fyziologické angiogeneze, která zde plní svou funkci reparace poškození a obnovy tkání. Současně představuje model neovaskularizace, který je nejrychleji indukovatelný a nejprístupnější zkoumání. Rána jako model angiogeneze přispěl k osvětlení zejména metabolických regulací iniciace angiogenního přepínače za fyziologických i patologických podmínek.

Angiogeneze hraje významnou roli jak v primárním, tak sekundárním hojení. Nejakcentovanější je ale právě v granulační tkáni vznikající při hojení *per sekundam*. Tato je tvořena prakticky pouze novotvořenými kapilárami a řídkým vazivem.

Hojení ran sestává z několika fází. Již u té nejranější, charakterizované uvolněním působků charakteru růstových faktorů, lze nalézt znaky počínající angiogenní odpovědi. Zdrojem těchto působků v počáteční fázi jsou parenchymové buňky a extracelulární matrix mechanicky porušené při samotném poranění. Další fázi charakterizuje přestup leukocytů

do místa poškození a rozvoj zánětu. Zvyšují se koncentrace dalších proangiogenních faktorů, nyní již jejich aktivní exprese a sekrecí v buňkách rány. Následuje reparace a případná tvorba jizvy.

Intenzita zánětu určuje, zda převládne ukládání ECM-kolagenu (akutní zánět) nebo angiogeneze (mírný zánět) (19).

Patologicky probíhající hojení může vést k nadměrné skarifikaci nebo nedostatečnému hojení.

U bércových vředů se jako jeden z možných patofyziologických modelů nedostatečné angiogeneze jeví tzv. „trap theory“. Růstové a proangiogenní signály jsou podle této představy „naředěny“ místním edémem a nemají pak dostatečnou koncentraci potřebnou k úplnému zhojení. Terapeutické dodání těchto cytokinů by teoreticky vedlo k dosažení dostatečné hladiny a k úspěšnému zhojení rány (20, 21).

U chronických, špatně se hojících ran se proto jako možný terapeutický přístup testuje užití proangiogenních faktorů. Ze všech známých molekul se jako účinné a bezpečné v klinickém použití ukázaly dvě, kyslík a PDGF. U zvířecích modelů vedlo topické užití angiogenních faktorů až k 50% zkrácení doby hojení ran (22,23).

Jedním z hlavních rozdílů mezi fyziologickou a patologickou, např. nádorovou angiogenezí, který znovu ukázal model revaskularizace při hojení ran, je fakt, že fyziologická angiogeneze se zastavuje po zhojení rány a nádorová nikoliv. Nádorové onemocnění bylo nazváno ránou, která se nehojí „Cancer - a wound that doesn't heal“. Důvodem jsou rozdíly v regulacích angiogenního procesu. Konkrétní poznatky o těchto rozdílech, které by mohly mít potenciálně velké využití v terapii, zatím bohužel chybí. Mechanismy jsou podrobněji popsány níže v kapitole o angiogenních regulacích a faktorech.

1.3. Patofyziologie nemocí a angiogeneze, patologická angiogeneze

1.3.1. Obecné principy

Patologická angiogeneze je stav perzistující deregulované neovaskulární signalizace, která neodpovídá stávající fyziologické tkáňové potřebě. Vzhledem k této metabolické

potřebě může být deregulovaná angiogeneze nadměrná nebo nedostatečná. Její patofyziologické projevy souvisí s fyziologickou rolí vaskulatury v přísunu živin a kyslíku do tkání a také s úlohou při migraci leukocytů do tkání při zánětu. Klinickým korelátem tohoto metabolického nepoměru jsou projevy dané nemocí jako jsou růst a metastazování nádoru, tvorba granulační tkáně, perzistence chronického zánětu nebo poruchy trofiky a cytokinové signalizace. Nadměrná i nedostatečná patologická angiogeneze je jedním z významných patofyziologických mechanismů přispívajícím k rozvoji některých onemocnění.

1.3.2. Nadměrná angiogeneze

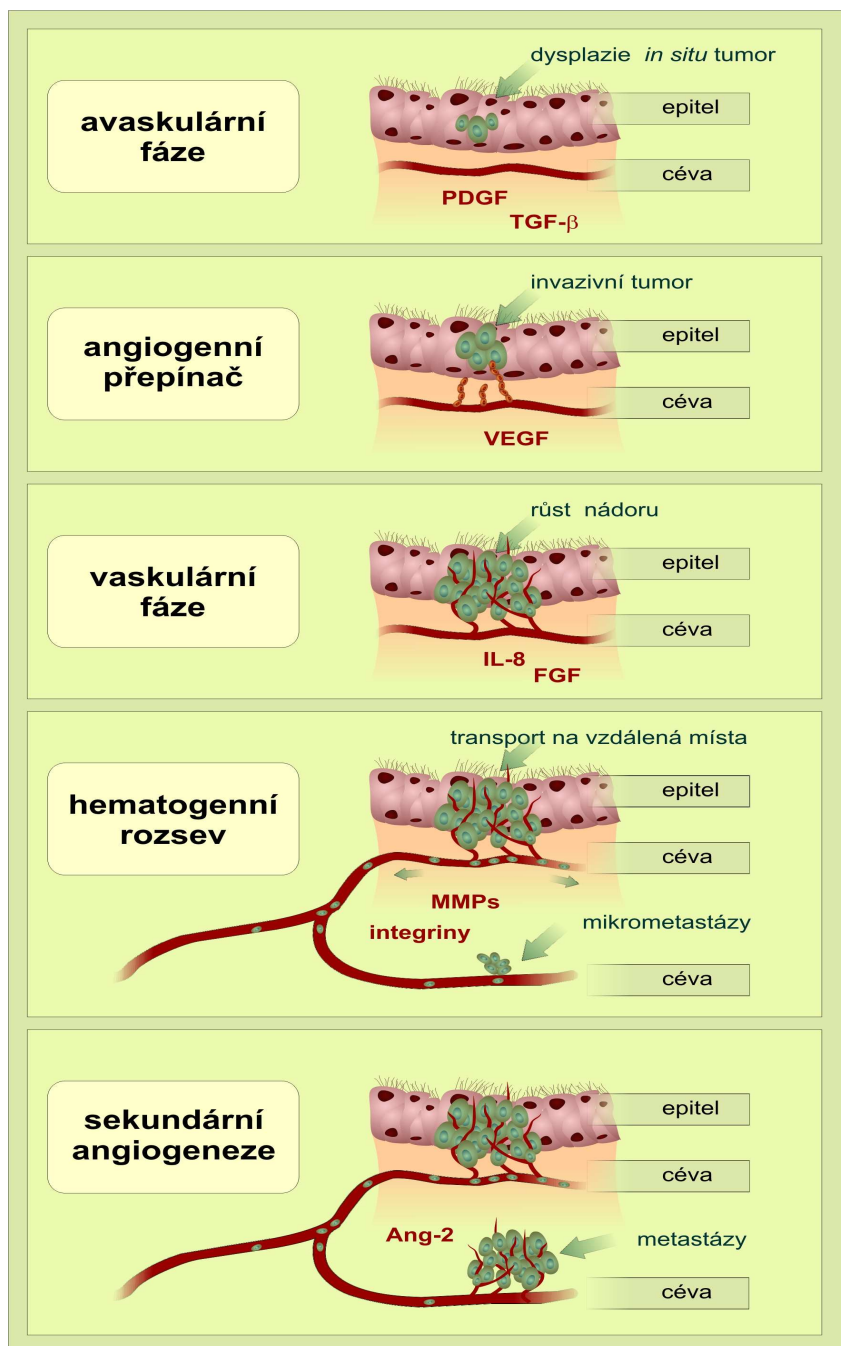
Může se už v embryonálním vývoji projevit tvorbou cévních malformací. V dospělosti se patologická angiogenní signalizace uplatňuje v tumorigenezi a u nemocí spojených s chronickým zánětem.

A, Nádorová angiogeneze

Byla to právě nádorová angiogeneze, která se stala výchozím bodem pro zkoumání angiogeneze jako takové. Jedním z prvních poznatků na tomto poli bylo zjištění týmu Dr. Folkmanna, že nádor o velikosti zhruba 1mm^3 se nemůže dále zvětšovat, pokud není aktivována angiogeneze. Tato hypotéza byla poprvé publikována v roce 1971 (24). Kromě role v tumorigenezi zde bylo také poprvé předpovězeno několik dalších budoucích objevů klíčových pro angiogenezi. Byly to průkaz existence solubilních proangiogenních molekul, angiogenních inhibitorů, možnost antiangiogenní terapie a zvláště využití monoklonálních protilátek pro blokování angiogenních faktorů (24).

Klíčovou roli novotvorby cév v patologii tumorů potvrdila práce Weidnera, ve které prokázal přímý vztah mezi stupněm angiogeneze v primárním tumoru a horší prognózou onemocnění (25). Tato práce definitivně prokázala spojení mezi angiogenezí a metastazováním (Obr.č.2).

Původní průkaz těchto principů u karcinomu prsu byl posléze rozšířen na celou škálu dalších solidních tumorů (26) a ukazatele zvýšené angiogeneze byly nalezeny dokonce i u hematologických malignit, jako jsou mnohočetný myelom a leukemie (27,28,29).



Obr.č.2. Tumorová angiogeneze a progrese nádoru

Angiogeneze zprostředkuje klíčové kroky v progresi nádoru. Zapnutí angiogenního přepínače nastane převahou proangiogenní a/nebo oslabením antiangiogenní signalizace. Avaskulární nádor tím může překonat limitující objem $1mm^3$ a dále nádorové buňky získávají schopnost metastazovat.

B. Chronický zánět („angiogenesis dependent diseases“)

Diabetická retinopatie, stařecká makulární degenerace

Druhou velkou skupinou chorob s podílem přemrštěné angiogeneze jsou nemoci spojované s chronickým zánětem (30).

Revmatoidní artritida a **juvenilní revmatoidní artritida** jsou kloubní nemoci charakterizované přeměnou synoviální membrány v zánětlivě změněnou a bohatě vaskularizovanou granulační tkáň, tzv. pannus, která přerůstá přes povrch chrupavky a eroduje ji. Zánětlivé mikroprostředí pannu prokazatelně vykazuje proangiogenní fenotyp. Zvýšená vaskularizace, která je nutná k migraci leukocytů a naopak přítomnost zánětu je obecně proangiogenní stav. Byla prokázána zvýšená tvorba proangiogenních proteinů fibroblasty pannu. Choroby jsou typickou ukázkou fungování zpětné vazby zánět ↔ vaskularizace.

U **systémové sklerodermie**, nemoci charakterizované časnou generalizovanou funkční a následně i strukturální mikroangiopatií a následnou proliferací a ukládání kolagenu vedoucí k fibróze kůže a dalších orgánů, dysfunkce a aktivace endotelu, o které svědčí zvýšené hladiny angiogenních proteinů, implikuje úlohu angiogeneze hlavně v časných fázích nemoci. Hypoxie z hypoperfúze na podkladě této mikroangiopatie vede ke kompenzační proangiogenní odpovědi a mohla by představovat zpětnovazebnou pozitivní smyčku, zesilující a udržující rozvoj nemoci (31).

1.3.3. Nedostatečná angiogeneze

Vede ke sníženému zásobení tkání, které se může už v embryonálním vývoji projevit postižením neslučitelným s životem nebo trvalou malformací plodu. V dospělosti pak vedou stavy nedostatečné angiogenní signalizace k nedostatečné trofice tkání a poruše hojení ran. Dostatečná angiogenní odpověď pozitivně koreluje s přežitím u pacientů s ischemickou cévní mozkovou příhodou (32). Stárnutí je obecně spojeno s postupným

úbytkem mikrovaskulatury, což je dále příčinou mnoha procesů spojených se stárnutím. Patří k nim zvýšená fragilita kožních cév, osteoporóza a nefropatie (33,34,35).

Hereditární hemoragická teleangiektasie (HHT, Rendu-Osler-Weberova choroba) je autosomálně dominantní porucha s incidencí 1 : 10 000 charakterizovaná teleangiektáziemi, arteriovenózními malformacemi v plicích, játrech a ledvinách. Projevuje se chronickým a akutním krvácením převážně ve formě epistaxe a krvácení do GIT. U lidí, trpících touto chorobou, byl nalezeny poruchy angiogenní signalizace cestou TGFβ/endothelin a u jednoho podtypu HHT1 i samotná mutace v genu pro endothelin (36).

Preeklampsie je charakterizována hypertenzí a proteinurií u pacientek v 3. trimestru gravidity. Nemoc může progredovat a mít potenciálně fatální následky pro matku i plod.

Je spojená s poruchou signalizace v systému TGFβ/endothelin. Zvýšené hladiny solubilních molekul (sCD105, sVEGFR1) sekvestrují své volné ligandy, a tak interferují s proangiogenní signalizací a produkcí NO. Vedou tak k rozvoji endotelové dysfunkce (37). Zajímavé je, že zvyšující se hladiny sCD105 předcházejí rozvoj klinických symptomů o 2-3 měsíce a tak se mohou uplatnit jako časný ukazatel rozvoje nemoci (38).

1.4. Terapeutická modulace angiogeneze

Ovlivnění angiogeneze, ať už ve smyslu pozitivním či negativním, je lákavým cílem terapie nejrůznějších onemocnění.

První dokumentovanou úspěšnou léčbou pomocí látky s antiangiogenním účinkem bylo užití interferonu alfa u pacienta s plicním hemangiomem Dr. Carlem Whitem r. 1989. Jednalo se o off-label podání jako nouzové řešení u progredujícího a neřešitelného krvácivého stavu. V souladu s teorií došlo k regresi hemangiomu a výrazné úpravě stavu. Pacient žije dodnes (39,40)

V současné době jsou vyvíjena nová léčiva působící na angiogenní procesy. Jedná se o tzv. exkluzivní inhibitory, kdy antiangiogenní účinek je jediná vlastnost daného léčiva. Dále existují různé klasické způsoby léčby, kdy byl zjištěn i vliv na novotvorbu cév. Jsou to tzv. inkluzivní inhibitory. Mají antiangiogenní působení jako jeden z více účinků (41).

Jako vůbec první byly zkoumány možnosti inhibice angiogeneze u nádorů a nádorová angiogeneze představuje jeden z hlavních cílů výzkumu i v současné době. Konečným cílem antiangiogenní terapie by bylo převést tumor zpět před angiogenní přepínač a udržet

ho v neangiogenním, dormantním stavu. Z maligního procesu by se tak stal proces chronický a z akutní léčby léčba udržovací. Tohoto cíle zatím u antiangiogenních léků nebylo dosaženo. Jediným zástupcem úspěšného použití tohoto konceptu, i když také s menším úspěchem než se čekalo, je imatinib - gleevec u CML (42).

Zeslabení angiogenního procesu dále vede k prospěchu u retinopatií a některých nemocí spojených s chronickým zánětem.

Naopak posílení novotvorby cév by bylo prospěšné u nemocí se zhoršeným prokrvením orgánů, jako je např. ischemická choroba dolních končetin, diabetická noha nebo ischemická choroba srdeční ICMS (43). Byly provedeny studie u pacientů s diabetem a ICMS.

1.4.1. Obecné principy terapeutické manipulace s angiogenezí

Teoretická východiska pro antivaskulární léčbu platí zejména pro výzkum terapie nádorových chorob. Nicméně většina principů hlavně pro antiangiogenní terapii se dá přenést i na patofyziologii nenádorových chorob, zvláště pak nemocí spojených s chronickým zánětem. Hlavním principem je využití odlišností tumorové a normální vaskulatury, ať už je to přítomnost specifických tumorových endoteliálních markerů (TEM) či aktivované angiogeneze.

Existují dva hlavní terapeutické přístupy k ovlivnění nádorové vaskulatury. První, nazývaný „vascular disrupting agents“ je založen na přímém působení na veškeré tumorové cévy „staré“ i „nové“. Tento koncept je založen na poznatku, že tumorové cévy jsou odlišné od normálních cév a lze nalézt pro ně specifické markery (44). Používané substance jsou často toxické, je nutné podávat množství blízké se maximální tolerované dávkou (MTD) a vyžadují specifické zacílení na markery tumorové cévy (45). Ve zvířecích modelech jsou využívány cytotoxické nebo trombogenní substance vázané na protilátku specifickou pro tumorový endotelový antigen (44).

Druhý přístup, tzv. „antiangiogenic agents“ spočívá v potlačení novotvořených, rostoucích cév (44). Používané látky jsou jen minimálně toxické (hluboko pod MTD) a působí na regulační molekuly angiogenní kaskády (VEGF). Není nutné přesné cílení na antigeny tumorového endotelu, terapie je zaměřena na cévy rostoucí za fyziologických

podmínek velmi vzácně. Nevýhodou je únik nádoru z blokády angiogeneze, a pomalejší účinek (44).

Teoretické výhody antiangiogenní terapie

Antiangiogenní terapie zasahuje jen v místech dělicího se a rostoucího endotelu. Odhaduje se, že v dospělém lidském organismu je za normálních podmínek takto aktivních asi 2% endotelových buněk. Terapie změřená na faktory asociované s proliferací endoteliálních buněk tak představuje vysoce specifickou modalitu s cíleným působením. Na druhou stranu právě nízkou proliferační aktivitou lidské tumorové vaskulatury je vysvětlován neúspěch některých pokusných terapií, které vykazovaly slibné závěry ve zvířecím modelu. Nelze se ani vyhnout interferenci s fyziologickou angiogenezí.

U terapií mířících na endotelovou výstelku jako místo přímého kontaktu krve a tkáně odpadají potíže se špatnou dostupností léčiva k cílové tkáni. Zvláště vhodnými se tyto terapie zdají u postupů založených na podávání léčiv o velké molekulové hmotnosti, jako jsou např. monoklonální protilátky (bevacizumab).

U nádorových tkání se pod vlivem léčby selektují léčbě odolné populace nádorových buněk a dochází k rozvoji rezistence k léčbě. Přestože nádorová vaskulatura se v mnohém liší od vaskulatury normálních tkání, vykazuje často chaotický fenotyp. Samotné endotelové buňky jsou diploidními buňkami bez mutací a proliferačních abnormalit. Vznik rezistence u nich tedy není pravděpodobný (46). Určitá postupná refrakternost na dlouhodobou antiangiogenní terapii však popsána byla.

Cévy vyživující nádory vykazují chaotický fenotyp bez určitého vyhranění k venóznímu nebo arteriálnímu charakteru. Tyto cévy jsou navíc funkčně defektní, mají nedostatečnou bariérovou funkci, vedou k úniku tekutiny a molekul plazmy, zvyšují nitronádorový tlak. Nádorové endotelové buňky se od normálních endotelových buněk liší i výbavou povrchových molekul. Přes heterogenost různých typů nádorů jsou si molekuly a mechanismy zprostředkujících angiogenezi velmi podobné. Tumorová vaskulatura představuje poměrně uniformní cíl, společný pro všechny nádorové procesy.

Zničení cévy či zabránění jejímu růstu vede k zasažení velkého počtu buněk touto cévou vyživovaných, a násobí výsledný efekt léčby. Další důležitý moment je, že není nutné kompletně zničit cévu. Jen drobná změna povrchových vlastností vaskulatury může vést

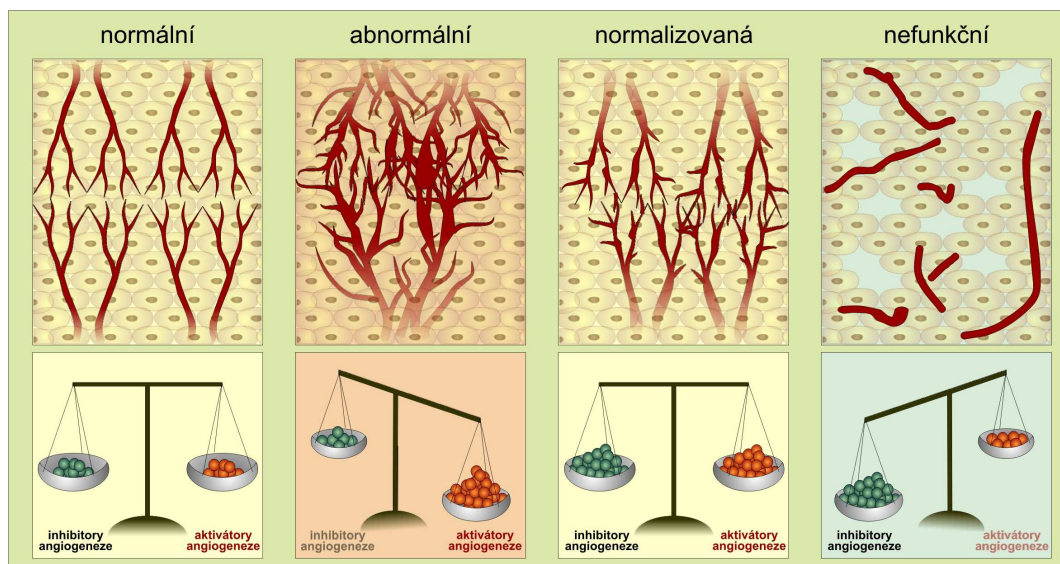
k prokoagulačnímu charakteru a trombóze úplnou či částečnou obstrukcí přísunu živin, devitalizaci (47).

Mechanismus účinku antiangiogenní léčby. Praktická pozorování

Vytvoření prvních angiogenních inhibitorů umožnilo zkoumat jejich skutečný účinek na morfologii a funkci tkání a jejich kapilárních sítí. V pokusu na zvířatech vedla inhibice signalizace systémem VEGF/VEGFR podle předpokladů k regresi tumorových cév, dále pak ke snížení počtu fenestrací na cévách a k vymizení cévních pupenů a vymizení části pericytů. Celkově dochází k snížení vaskularity tumoru (pokles „mean vascular density“ MVD až o 70%) (48). Jednotlivé cévy ztrácejí průchodnost předtím, než začnou regredovat. Následně ztratí integritu stěny, nedochází tedy k hemoragiím. Po regresi cévy zbývají jako poslední v nádoru pruhy bazální membrány obsahující kolagen IV (48).

Po ukončení antiangiogenní terapie dochází k rychlé obnově vaskularizace nádoru i s obnovou průchodnosti a funkce cév. Pruhy bazální membrány hrají pravděpodobně v revaskularizaci zásadní roli podpůrné matrice (48). Nutnost trvalé blokády mohla vysvětlit neúčinnost antiangiogenní monoterapie při léčbě nádorů. K udržení tumoru v dormantním stavu by podle těchto poznatků byla nutná kontinuální udržovací antiangiogenní terapie.

Některé z účinků antiangiogenní terapie na vaskulaturu byly nepředpokládáné. Jedním z nich je normalizace tumorových cév. Antiangiogenní blokáda, zvláště inhibice VEGF systému, vede k morfologické a funkční úpravě tumorových cév k fenotypu normální vaskulatury. Zmenšuje se kapilární propustnost a klesá tumorový interstitiální tlak. Lepší cévní zásobení vede k větší dodávce kyslíku (na které závisí radiosenzitivita) a ostatních podávaných antitumorových léků, nejčastěji cytostatik. Podle tohoto paradigmatu poprvé navrženého v roce 2001 Jainem, by antiangiogenní terapie především zajišťovala permisivitu k jiným terapeutickým modalitám (49) (Obr.č.3).



Obr.č.3. Koncept normalizace jako mechanismu účinku antiangiogenní terapie

Normální cévní řečiště se vyznačuje dynamickou rovnováhou mezi pro a antiangiogenní signalizací. V rostoucím nádoru je vlivem potřeby cévního zásobení angiogenní přepínač v poloze zapnuto (převaha proangiogenní signalizace) a dochází ke vzniku strukturálně a funkčně abnormální vaskulatury nádoru. Po nějaké době trvání antiangiogenní terapie nastane vyrovnaní proangiogenní převahy v signalizaci a cévní řečiště nádoru se normalizuje, dochází ke snížení intratumorového tlaku, zmenšení propustnosti cévní stěny. Zlepšuje se dodávka sekundárního léčiva (cytostatik), kyslíku (a na kyslíku závislé radiosensitivity). V případě abnormální převahy antiangiogenní signalizace nastává regrese cévního řečiště spojená se sníženou dodávkou krve.

1.4.2. Z laboratoře do kliniky. Poučení z vývoje antiangiogenních léčiv

Jako i v jiných případech, převod experimentálních poznatků do klinické praxe se neobešel bez problémů a neočekávaných obtíží. Většina antiangiogenních terapií dobře fungujících v myším modelu už nevykazovala takovou účinnost u člověka. Z klinických studií vyplývá, že samostatné použití angiogenních inhibitorů v terapii nádorů u lidí je neúčinné a v kombinaci s chemoterapií vede “ pouze“ k prodloužení střední doby přežití či

prodloužení doby bez symptomů nemoci (symptom „free survival“). Tyto výsledky jsou velmi vzdáleny teoretickému převedení tumoru do dormantního stavu.

I tyto dílčí neúspěchy vedly alespoň k formulování možných problémů v naší představě o angiogenezi a k položení otázek ohledně konkrétních terapeutických postupů.

Stále ještě není dostatek poznatků o fyziologické angiogenezi, které by nám pomohly odhadnout účinek terapie. Jako jeden z možných důvodů neúspěchu antiangiogenní léčby je udáváno daleko menší procento dělícího se endotelu v lidském organismu na rozdíl od pokusných hlodavců. Na druhou stranu vedlejší účinky antiangiogenních přípravků, jako jsou hypertenze, krvácení, perforace GIT, ukazují na interferenci těchto látek s přirozenou angiogenní homeostázou ve tkáních. Úkolem pro vývoj antiangiogenního léku další generace je spojit maximální účinek s minimální toxicitou.

Proč vedly protinádorové antiangiogenní terapie pouze k prodloužení střední doby přežití a nikoliv k úplné devitalizaci? Možným mechanismem je tzv. únik, evasion. Na zvířecím modelu byla prokázána ztráta účinku v průběhu terapie blokátorem VEGF/VEGFR angiogenní signalizace. V tomto případě se předpokládá náhradní signalizace mediátorem FGF (50). Některé práce přinesly důkazy o kompenzaci léčby zvýšenou expresí VEGF. Tyto úniky z blokády angiogeneze byly nazvány termínem „evasion“ (51).

Je známá pleiotropnost a informační redundance cytokinových sítí, která vede k překryvu různých signálních cest. Zatím je většina terapií založena na blokadě funkce jen jedné molekuly. Je možné, že bude k lepší účinnosti potřeba blokáda více klíčových signálních cest. Tyto vlastnosti mají např. inhibitory proteinových tyrosinových kináz, skupina antiangiogenních léků v současnosti intenzivně zkoumaná.

Již dříve byl zmíněn neobvyklý fenotyp nově tvořených nádorových cév, které svou stavbou neodpovídají klasické struktuře, jsou často strukturálně defektní, s nepravidelným průměrem a zvýšeně propustné. Nejenže vykazují vlastnosti různých cévních druhů najednou, ale dokonce byl prokázán fenomén tzv. vaskulárních mimikry, kdy buňky endotelu vykazují expresi některých povrchových molekul buněk tumoru, který zásobují. Tyto poruchy normální morfogeneze mohou být také odpovědné za nestandardní odpověď na léčbu v porovnání s modelem.

Za příčinu tohoto neuspořádaného fenotypu tumorových cév je pokládána nerovnováha v angiogenních faktorech, zejména převaha VEGF. Blokáda VEGF pak vede k normalizaci

cévního řečiště s výše zmiňovanými výhodami pro konkomitantní léčbu. Účinnost jen duální léčby (antiangiogenní spolu s chemoterapií) v klinických studiích ukazuje na normalizaci cévní stěny jako hlavní mechanismus účinku (52). Důležité je, že normalizace nastane jen v určitém vhodném okně daném časem a kumulativní dávkou antiangiogenního léku. Při následné regresi cév již pozitivní podpůrný účinek normalizace mizí. Najít toto okno pro daný inhibitor je pro účinnou terapii zásadní (53).

Pro angiogenní inhibitory je charakteristická křivka dávka – účinek ve tvaru U (54), tzn. nejlepší účinek má antiangiogenní terapie při střední dávce léku, při nižší a vyšší dávce se účinnost snižuje. Koncept normalizace pak ještě zužuje terapeutické rozpětí, kdy je lék účinný. Je možné, že malý úspěch u některých preparátů byl způsoben právě nepřesným odhadem dávkování. K dobrému odhadu by bylo nutné mít možnost sledovat a kvantifikovat angiogenezu a její utlumení *in vivo*. Angiogenní *in vivo* ukazatele nejsou zatím dostatečně přesné. Ukazatelům angiogeneze se věnuje další kapitola práce.

Obecně se dá shrnout, že podle současného poznání nejlépe reagují na antiangiogenní terapii primární, malé nádory a dobře vaskularizované metastázy (55). Vhodnější než monoterapie je kombinace antiangiogenního léku s látkou fungující na jiném principu, chemoterapeutikem (56,57). Otázky dávkování, délky podávání a počtu jednotlivých cyklů nejsou zatím spolehlivě dořešeny (Obr.č.4).



Obr.č.4.

Optimalizace dávkování antiangiogenní terapie

Při užití antiangiogenního léčiva i ve formě konkomitantní terapie závisí jeho efekt na správném dávkování, tzn. velikosti dávky a jejím načasování, které souvisí s optimální normalizací cévního řečiště.

1.4.3. Molekulové terče a šípy léčby

Obecné strategie terapeutického ovlivnění angiogeneze zahrnují celou škálu od topické či injekční aplikace angiogenních proteinů, monoklonálních protilátek, molekul s konjugovaným toxinem, genovou terapii prostřednictvím virových vektorů, plasmidů až po terapii pomocí kmenových či prekursorových buněk.

Pokusné terapeutické modely zahrnují například cílení na adhezní molekuly cév, terapii xenogenními endotelovými buňkami s rozvojem zkřížené imunitní reakce k omezení novotvorby cév a využití endotelových progenitorových buněk naopak k její podpoře.

Již schválená antiangiogenní terapeutika můžeme obecně dělit podle jejich molekulárně biologického účinku na tři skupiny:

- Monoklonální protilátky proti angiogenním molekulám nebo jejich receptorům
- Inhibitory tyrosin-kináz, které slouží jako receptory růstových i proangiogenních faktorů
- Inhibitory mTOR-serin-threoninové kinázy, nitrobuněčné signální molekuly regulující angiogenezi, buněčný cyklus a dělení buněk.

1.4.4. Příklady klinicky užívaných výlučně anti- a pro-angiogenních léků

Bevacizumab

Prvním lékem schváleným FDA (2004) s antiangiogenním účinkem byl bevacizumab, monoklonální protilátka určená k terapii kolorektálního karcinomu. Podávání současně s chemoterapií vedlo jednoznačně k prodloužení střední doby přežití (58).

Bevacizumab je současně testován v dalších probíhajících klinických studiích u jiných typů nádorů. V roce 2006 bylo prokázáno významné prodloužení střední doby života u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinodem léčených kombinací chemoterapeutik a bevacizumabu (59). Roku 2008 je bevacizumab schválen k léčbě u žen s recidivou či metastázami karcinomu prsu (60).

Regranex

Ve srovnání s výzkumem možností blokování angiogeneze je zkoumání terapeutické podpory tvorby cév na výsledky skoupější.

Podpora angiogeneze slibuje terapeutický přínos u procesů hojení ran. Zvláště u chronických vředů v terénu zatíženém nějakou predisponující chorobou, jako je ischemická choroba dolních končetin nebo diabetes. Není tedy divu, že prvním FDA schváleným proangiogenním lékem (1997) byl regranex určený právě k terapii bércových vředů u diabetu (61).

Zatím pouze ve fázi laboratorního testování, nicméně se slibnými předběžnými výsledky, jsou aplikace angiogenních faktorů u ICHS či užití myokardiocytů s vloženými angiogenními geny u modelu infarktu myokardu.

Ve fázi výzkumu je buněčná terapie s využitím endotelových progenitorových buněk, u kterých byla prokázána podpora angiogenních procesů v ischemických tkáních, rozšiřování kolaterál a zlepšení hojení ischemických vředů.

1.4.5. Antiangiogenní účinky klasických léčiv, inkluzivní léky

První dokumentovanou úspěšnou léčbou pomocí látky s antiangiogenním účinkem bylo užití interferonu alfa u pacienta s plicním hemangiomem Dr. Carlem Whitem r. 1989 (62,63).

Z dalších známých terapeutik byl prokázán vliv na angiogenezu u thalidomidu (64). Podávání thalidomidu jako sedativa a antiemetika těhotným v 50. a 60. letech vedlo u jejich dětí k vývojovým deformitám na končetinách (chybějící prsty až fokomelie) a lék byl vzápětí stažen z prodeje. Při zkoumání mechanismů jeho teratogenního působení byl prokázán výrazný protizánětlivý, imunomodulační a antiangiogenní účinek (65). Pro své antiangiogenní účinky, které jsou pravděpodobnou patofyziologickou příčinou nežádoucích vývojových malformací končetin u lidských plodů, je nyní testovaný v terapii mnohočetného myelomu a lepry. Byla vytvořena thalidomidová analoga s posíleným účinkem (66).

Antiangiogenní účinek mají některé kortikosteroidy. Dále byl antiangiogenní účinek prokázán např. u kalcitriolu, dehtu a retinoidů užívaných v léčbě psoriázy. Carbazol, jedna

ze složek medicínského dehtu, užívaného v terapii psoriázy působí antiangiogenně i protizánětlivě (67).

Antiangiogenní účinek klasických léčiv může být vyvolán i jen odlišným režimem dávkování. Jedná se o tzv. metronomickou aplikaci chemoterapeutik, kdy jsou v kratších intervalech podávány menší dávky než podle klasického schématu odvozeného od maximální tolerované dávky (68,69,70).

1.5. Ukazatele angiogeneze

Kvantifikace míry angiogeneze *in vivo* u pacienta by přispěla k přesnějšímu odhadu antiangiogenního účinku nových léčiv a jejich dávkování převážně při vývoji protinádorových terapií. Senzitivní a specifický ukazatel by umožnil monitorovat odpověď na léčbu u jednotlivých pacientů a dal by lékařovi možnost rychle změnit léčebnou strategii.

Spolehlivě a s větší přesností měřit intenzitu angiogeneze či její regresi v podmínkách živého lidského organismu zatím ještě není možné. V průběhu více než 30-tileté historie zkoumání novotvorby cév ale vznikla celá řada metod sloužících ke zkoumání jednotlivých aspektů angiogeneze.

1.5.1. „*In vitro*“ modely

Zkoumání angiogeneze si brzy po svém začátku vynutilo hledání vhodného „*in vitro*“ modelu. První pokusy o kvantifikaci angiogeneze narážely na fakt, že neexistovala technika pěstování endotelových buněk „*in vitro*“. Podle některých tehdejších názorů byla dokonce kultivace endotelu nemožná. Vhodné podmínky pro růst a pasážování byly definovány v roce 1973 nezávisle na sobě Gimbrinem a Jaffem. Zásadním průlomem bylo zjištění, že k definování růstových faktorů pro endotel je potřeba hodnotit vliv kandidátních molekul na proliferaci před dosažením konfluence. Poté endotelové buňky již na nic nereagují. Na rozdíl od do té doby užívaných fibroblastů, kde se účinek růstových faktorů hodnotí právě až po dosažení monolayeru (71).

Již bylo řečeno, že všechny endotelové buňky nejsou stejné. Endotel velkých, středních cév a kapilár i jednotlivých tkání se ve svých vlastnostech a molekulárních znacích více či

méně liší (72). Pro zkoumání angiogeneze je nejvhodnějším modelem endotel kapilár. Na takto nízké úrovni totiž abiogeneze probíhá.

Jako první byly ale ustaveny *in vitro* techniky pro kultivaci endotelových buněk velkých cév (aorta, karotida, pupeční žíly). Příkladem může být HUVEC, buňky endotelu pupeční žíly. Až v roce 1979 byl dlouhodobě pasážován kapilární endotel nadledvinek. V současné době existují metody pro *in vitro* kultivaci mikrocirkulace prakticky všech orgánů. K nejčastěji používaným mikrovaskulárním endotelovým liniím patří HUDMEC, endotel kapilár dermis.

Další práce týmu Dr.Folkamna (1980) ukázala možnost reprodukovat přímo samotnou angiogenezi *in vitro* (73). Díky této technice bylo dál možno odhalit a studovat jednotlivé komponenty a fáze angiogeneze, jako jsou aktivace, proliferace endotelu, chemotaxe a schopnost tvořit trubice 3D struktury (trubice). Tyto čtyři základní kroky jsou nutné k formování cév.

K *in vitro* zkoumání angiogeneze byly využity i metody tkáňových kultur. Byl sledován růst cév na řezu krysí aorty (74). Pro větší podobnost kapilárnímu endotelu byla technika upravena pro řezy aorty kuřecích embryí (75).

1.5.2. Zvířecí „*in vivo*“ modely

Molekuly ovlivňující proliferaci, migraci či diferenciaci endotelových buněk *in vitro* ještě nemusí stejným způsobem fungovat *in vivo*. Proto bylo vytvořeno několik modelů využívajících laboratorní pokusná zvířata. Jde o podkožní implantace syntetických polymerových matrix (Matrigel) (76) obsahujících buňky nebo angiogenní faktor nebo implantace podobných gelů do chorioallantoické membrány vejce (77), králičí rohovky (78), metoda kožního okénka (79) pro hodnocení kožní angiogeneze aj. (80).

Díky zvířecím modelům byly rozvinuty i metody kvantifikace angiogeneze. Ty se většinou skládají ze dvou kroků. Prvním je identifikace (označení) cév a druhým jejich spočítání a vyhodnocení. Označit cévy v daném preparátu (biopsii, matrigelové či polymerové kapsli, rohovce atd.) lze nespecificky (hemoglobin, lektiny s fluorochromem, protilátka proti PECAM-1 (CD31) a porovnáním s normální vaskularizací nebo specificky novotvořené cévy pomocí protilátek proti endoglinu nebo integrinům ($\alpha V\beta 3$). Vyhodnocení se provádí klasicky pomocí mikroskopu a počítání značených cév v

jednotlivých polích nebo pomocí technik analýzy obrazu a matematického modelování (81).

Moderní metody umožňují zkoumání *in vivo* funkce jednotlivých genů kódujících angiogenní molekuly. Děje se tak pomocí vyřazení genu z funkce (knock-outování, null fenotype), zvýšení exprese genu, a to buď v celém organismu nebo i v určité tkáni pomocí specifického promotoru. Formování vaskulatury v embryogenezi i následná její funkce je u všech obratlovců (tedy i u člověka) podobná. Jako modelové organismy slouží laboratorní kmeny myší i další obratlovci, jako žáby rodu *Xenopus*, *Rana* a ryby *Dani rerio* (zebřička) (82). Zvláště výhodný pro studium embryonální angiogeneze *in vivo* je fakt, že embrya zebřiček jsou průhledná. K ještě lepšímu ozřejmění vývoje vaskulatury u zebřičky byl vytvořen i geneticky upravený model s fluorescentními cévami (cílená exprese GFP barviva medúzy) (83). Další příklady konkrétních transgenních modelů angiogeneze jsou uvedeny jinde v textu.

In vivo metody se užívají především v základním výzkumu, kde slouží hlavně k ověřování angiogenních vlastností zkoumaných molekul. Problémem stále zůstává hodnocení angiogeneze popř. odpovědi na angiogenní terapii u člověka.

1.5.3. Hodnocení angiogeneze u člověka

Invazivní metody vyžadující opakované biopsie dané tkáně

Klasická je imunochemická metoda zobrazení angiogeneze a její kvantifikace při barvení tkáňových řezů specifickými značenými protilátkami proti membránovým CD znakům typickým pro endotelové buňky (viz výše). Tato metoda byla založena na hledání tzv. hot spots - tedy míst s abnormálně zvýšeným počtem cév a jejich následným sčítáním pod větším zvětšením mikroskopu. Hodnotí se jako tzv. MVD („mean vascular density“ - průměrná vaskularita) daného vzorku.

Nové modifikace této metody využívají protilátek proti specifitějším znakům (SMC buňky u zralých cév), dovolujícím např. odlišit staré, zralé a nově zformované, nezralé cévy (integriny, endoglin) (1,2).

Neinvazivní metody *in vivo* u člověka

Jak bylo řečeno, postupy kvantifikace angiogeneze „*in vivo*“ u člověka, tolik potřebné

ke zjišťování odpovědi na léčbu, zatím stále neexistují. Jsou tři hlavní skupiny metod: stanovování hladin angiogenních molekul (ELISA, imunoblot, multiplexové metody, PCR, ISH), dále počet mobilizovaných cirkulujících endotelových buněk či endotelových prekurzorů a jejich subpopulací (průtoková cytometrie) a zobrazovací metody (CT, MRI, PET). Spíše než jeden samostatný ukazatel nebo metoda bude ke zhodnocení míry angiogeneze potřeba sestavit panel parametrů, který poskytne charakteristický vzor angiogeneze.

K detekci **angiogenních molekul v plazmě nebo v séru** se užívají imunochemické metody typu ELISA nebo multiplexové analýzy umožňující stanovit současně větší počet ukazatelů. Nejčastěji je stanovován VEGF. Je to zásadní signální molekula v angiogenní kaskádě. Zvýšené plazmatické hladiny VEGF byly nalezeny u některých nádorů a jsou ukazatelem nepříznivé klinické prognózy nemoci (84,85,86). Podobně u chronického zánětu u JRA byla nalezena korelace mezi hladinou sérového VEGF a aktivitou nemoci (87).

Jako o modelovém antiangiogenním faktoru se uvažuje o solubilní formě membránové molekuly endoteliální výstelky, endoglinu (CD105). Tato molekula funguje jako receptor pro TGF β , významný proangiogenní cytokin. Její solubilní varianta by v tomto modelu vážala TGF β , ovšem bez přenosu následného proangiogenního signálu. Byly prokázány jeho zvýšené hladiny u pacientek s preeklampií a to dokonce 2-3 měsíce před propuknutím klinických příznaků. V případě již klinicky patrné preeklampsie byla nalezena pozitivní korelace mezi hladinami solubilního endoglinu a tíží stavu (88).

Byla nalezena korelace mezi nízkými hladinami solubilního endoglinu a rizikem infarktu myokardu (IM) a dále pak vztah k vyšší mortalitě při IM.

K dalším antiangiogenním ukazatelům patří solubilní VEGFR1, receptor pro VEGF s podobným mechanismem účinku.

Při hodnocení sérových hladin angiogenních faktorů je nutno počítat se systémovými chybami, danými velkou složitostí a příliš povrchním pochopením probíhajících mechanismů. Zdroje těchto chyb jsou několikeré, jak bylo demonstrováno na příkladu hladin VEGF. Svou roli zde hraje zdroj VEGF, problém hladina vs. produkce, varianta a typ VEGF, vazba na složky plazmy, interpretace. Výhodná sterická konformace komplexu VEGF a VEGFR umožňuje při vývoji solubilního VEGF receptoru pro terapeutické účely spolehlivě stanovit produkci a nikoliv jen momentální hladiny VEGF. Ukázalo se, že

nenádorová produkce je vyšší než se obecně předpokládalo. To ztěžuje kvantifikaci, stanovování cut-off limitů patologické angiogeneze (např. diferencování mezi respondéry a non respondéry terapie) a v terapii vede k přehodnocení otázek účinnosti, optimálního dávkování terapeutik. Navíc, jelikož je princip této kvantifikace založen na signalizační kaskádě ligand-receptor, kterou je rovněž angiogeneze v organismu řízena, zdá se být takto stanovená bioavailabilita VEGFR přesnějším zhodnocením funkce VEGF v organismu (89). Existují 4 základní varianty VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C a VEGF-D, z nichž každá má trochu odlišné vlastnosti a angiogenní působení. Klíčová je varianta VEGF-A, ale i u ní existují 4 varianty s odlišnou délkou řetězce a různými vlastnostmi. Varianta dlouhá 120 aminokyselin není nutná pro vývoj embrya, zatímco varianty o délce 165 a 188 ano. Vazby faktoru na složky plazmy, případně na ECM se ze známých molekul účastní FGF pocházející z destiček.

Pomocí průtokové cytometrie lze v periferní krvi stanovit **populace cirkulujících endotelových buněk** (CEC) (90) a méně diferencovaných **endotelových prekurzorových buněk** (EPC). Jejich původ je nejasný. Endotelové buňky se pravděpodobně uvolňují do oběhu z místa angiogenní aktivity. Naopak u prekurzorových buněk se předpokládá přesun z kostní dřeně do místa novotvorby cév, kde zásadně přispívají do procesu vaskulogeneze v dospělosti (91). Zvýšené počty těchto buněčných populací byly nalezeny u nemocí spojených s angiogenezí, u lymfomu a karcinomu prsu. Současně byl zjištěn pokles CEC po chemoterapii lymfomu a karcinomu prsu (92).

Zvýšené hladiny EPC negativně korelují s incidencí kardiovaskulárních příhod na podkladě koronárního syndromu (93) a dále byla prokázána jejich role u mnoha dalších nemocí, jako DM, IM, aterosklerózy (94,95,96). Na myším modelu byl prokázán příspěvek EPC k vaskularizaci a růstu nádorů (97).

Použití hladin CEC a EPC ke kvantifikaci angiogeneze je prozatím zatíženo mnoha nejasnostmi. Existují diskrepance mezi jednotlivými pracemi dané nejednotnou metodikou i rozdílnou interpretací zjištěných dat.

Možnosti jak dosáhnout přesnějších a spolehlivějších výsledků u této metody se hledají ve stanovení širších panelů CD znaků, upřesnění významu subpopulací CEC (viabilní, apoptotická frakce) a osvětlení mechanismu zapojení cirkulujících endotelových buněk v patologické i fyziologické angiogenezi (98).

Bylo vypracováno několik postupů využívajících principy **zobrazovacích metod** jako UZ, CT, PET a MRI. Pomocí těchto metod lze měřit různé fyzikálně - chemické vlastnosti určitého okrsku tkáně (nádoru) jako je cévní průtok nebo permeabilita (99). Pomocí těchto metod byl prokázán pokles průtoku tumorem při terapii endostatinem (100). Změny permeability tumorových cév v průběhu terapie blokátorem proteinových tyrosinových kináz korelovaly se zastavením progresu u nemocných s kolorektálním karcinomem (101).

K co nejpřesnějšímu hodnocení angiogeneze *in vivo* bude nutno sestavit panel vyšetření jako kombinaci všech výše zmíněných metod. Tento panel stanoví individuálně pro každého pacienta charakteristický vzor angiogeneze a zhodnotí odpověď na antiangiogenní léčbu.

V práci Willeta (100), kde byla zjišťována odpověď pacienta s kolorektálním karcinomem na podávání bevacizumabu. Po 12 dnech byl zjištěn dle funkční CT pokles průtoku cévami, histologicky byl nalezen zvýšený počet pericytů lemujících cévy jako ukazatel stabilizace cév a pomocí CFM snížení viabilní subpopulace CEC v periferní krvi. To vše ve výsledku ukazuje na odpověď na terapii, i když klasické parametry jako zmenšení tumoru, ještě nestihly zareagovat.

1.6. Molekulární mechanismy angiogeneze

První poznatky o konkrétních molekulárních mechanismech regulace angiogeneze jsou známy již z druhé poloviny 70. let 20. století zvláště zásluhou týmu Dr. Folkmanna. Mechanismus angiogeneze je složitou souhrou mezi buněčnými elementy (endotelové buňky, prekursorů endotelových buněk (EPC), prekursorů buněk hladkého svalu, leukocyty) a solubilními působky (cytokiny, chemokiny a růstové faktory).

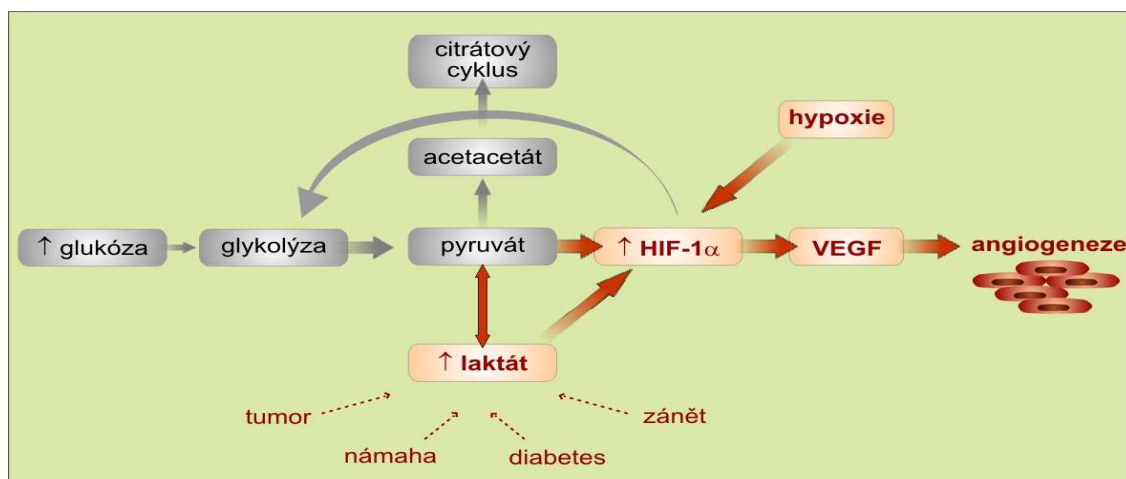
Na počátku procesu je přepnutí angiogenně klidného endotelu do aktivovaného stavu. Aktivace je zprostředkována a udržována lokální převahou proangiogenních signálních molekul nad antiangiogenními. Následuje vícestupňový proces, který je označován jako angiogenní kaskáda. Ta končí maturací zralé cévy a stabilizací nového kapilárního řečiště.

1.6.1. Angiogenní přepínač

Přechod od klidu k nastartování angiogeneze vysvětluje koncept tzv. angiogenního přepínače. Přepnutí tohoto přepínače tedy obecně představuje přechod této angiogenně klidné (quiescent) tkáně k proangiogennímu fenotypu. K jeho přepnutí do aktivního stavu je zapotřebí vhodný stimul: fyzikální (UV, smykové tření, průtok) (102,103), chemicko-metabolický (hypoxie, laktát) (104,105) nebo biologický (mutace, zánět).

Společným jmenovatelem iniciačních stimulů je stav metabolické potřeby dané hypoxií a produkcí laktátu (106). Hypoxie je silným stimulem pro iniciaci angiogeneze. Na buněčné úrovni je zprostředkována expresí transkripčního faktoru HIF (107). Jeho aktivace vede k expresi různých genů, např. genu pro VEGF (108).

Sama o sobě však hypoxie k angiogenezi nestačí. Zvláště v pozdějších fázích tvorby cév je potřeba dostatečná dodávka kyslíku, jinak se jejich růst zastavuje. To představuje zjevný paradox. Vysvětlení se skrývá v metabolismu laktátu. Laktát je nejen meziprodukt energetického metabolismu, ale má i klíčovou signální funkci. Sám o sobě je schopen iniciovat angiogenezi stabilizací HIF (Obr.č.5).



Obr.č.5. Signální funkce laktátu v angiogenezi

Laktát hraje zásadní roli v metabolické signalizaci angiogeneze. Sám je produkován za nejrůznějších okolností, ke kterým patří námaha (cvičení), nádorový metabolismus, zvýšený

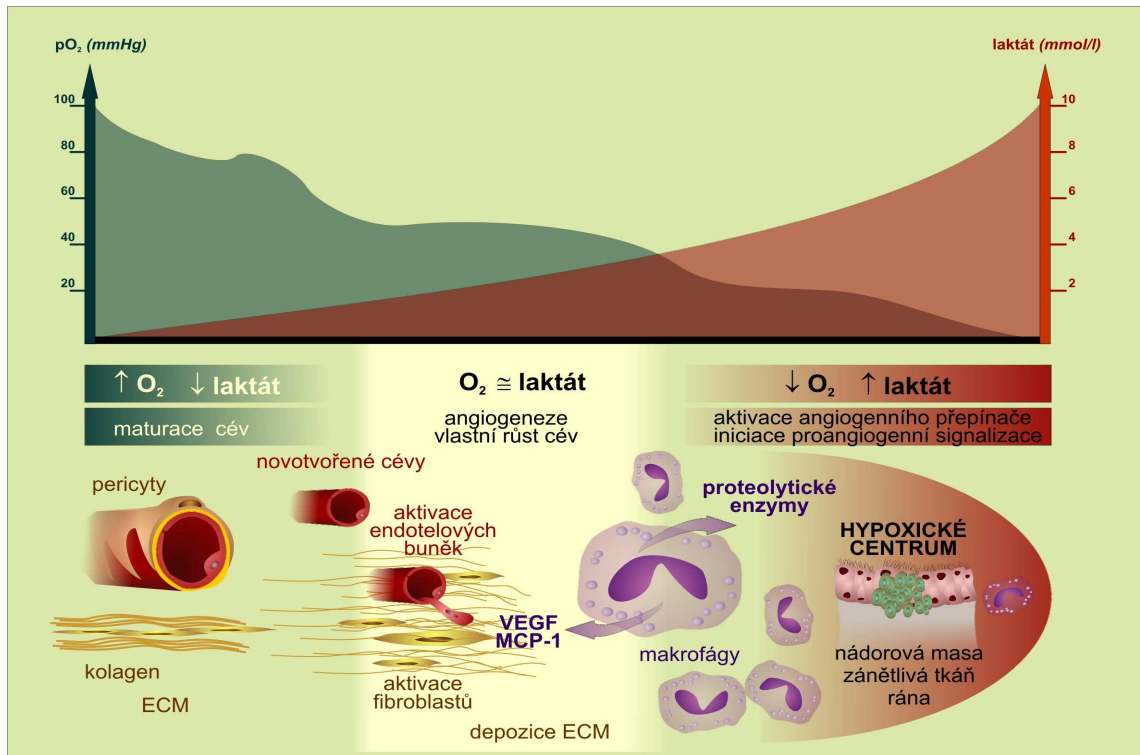
metabolismus leukocytů během zánětu, hyperglykemie u diabetu aj. Společným znakem je hypoxie a s ní spojená aktivace transkripčního faktoru HIF vedoucí k transkripci různých genů (např. pro VEGF).

Podle těchto poznatků zahájení angiogeneze spouští časový a prostorový gradient kyslíku a laktátu. Jednoduchý model můžeme vytvořit takto. V první fázi (v místě ischemie) vzniká hypoxie. Buňky v daném okrsku tkáně se aktivují, což je vyjádřeno expresí transkripčního faktoru HIF. Současně přecházejí na anaerobní metabolismus vedoucí k produkci laktátu. Druhá fáze (oblast na okrajích ischemie) je spuštěna angiogenní kaskáda. Cévy jsou permeabilní a aktivovaný endotel pupenů prorůstá k ischemii. Zvyšuje se hladina O_2 , ale laktát zůstává stále zvýšený. To jsou ideální podmínky k růstu a maturaci cév. Třetí fáze (oblast postupující dovnitř ischemie) je spojena s poklesem laktátu a dodávka O_2 je díky nově tvořeným, stabilním cévám zajištěna.

Tento model souhlasí s poznatkami získanými v hojení ran. Zde byla nalezena zóna progredující k ischemickému centru. Ta se postupně přibližuje ischemické oblasti, až se postižená oblast zcela zhojí, reintegruje. Za fyziologických podmínek je takto zajištěna morfologická i funkční restituce dané tkáně.

Známým rysem patologické angiogeneze je její refrakternost. Nádorové mikroprostředí bylo nazváno „rána, která se nehojí“. Laktátová teorie tento jev vysvětluje signalizační funkcí laktátu. Vychází z toho, že laktát není nutně výsledkem hypoxie. Existují buňky, které získávají energii i za normoxie především aerobní glykolýzou (109). Patří k nim nádorové buňky a leukocyty (110,111). U nádorových a zánětlivých nemocí tedy zvýšený přívod kyslíku a živin nově vytvořenou cévní sítí nevede k poklesu hladin laktátu. Tak není dosaženo negativní zpětné vazby a utlumení angiogeneze. Příčinou zvýšených hladin laktátu v patologickém mikroprostředí není nedostatek kyslíku, ale nádorová mutace resp. aktivace zánětu. U některých nádorových onemocnění byla prokázána korelace tumorové angiogeneze s produkcí laktátu (112).

Přestože je zatím mnoho nejasností v metabolické regulaci angiogeneze, lze říci, že laktát je důležitým mediátorem. Je to spojnice mezi chronickým zánětem, nádorovým růstem, hojením poškození a angiogenezí (Obr.č.6).



Obr.č.6. Model metabolické regulace angiogeneze v tkáni

Laktát a parciální tlak kyslíku jsou v nepřímé úměře. Jejich poměr se mění v závislosti na vzdálenosti od ischemického ložiska a určuje rozdílnou odpověď místních buněk a definuje tak určité histologické zóny, které se mění a postupují směrem k ložisku ischemie s cílem obnovení integrity tkáně a likvidace ischemického ložiska.

1.6.2. Růst cév

Angiogeneze není jediný mechanismus růstu cév. Popisovány jsou nejméně dva další mechanismy: arteriogeneze a vaskulogeneze.

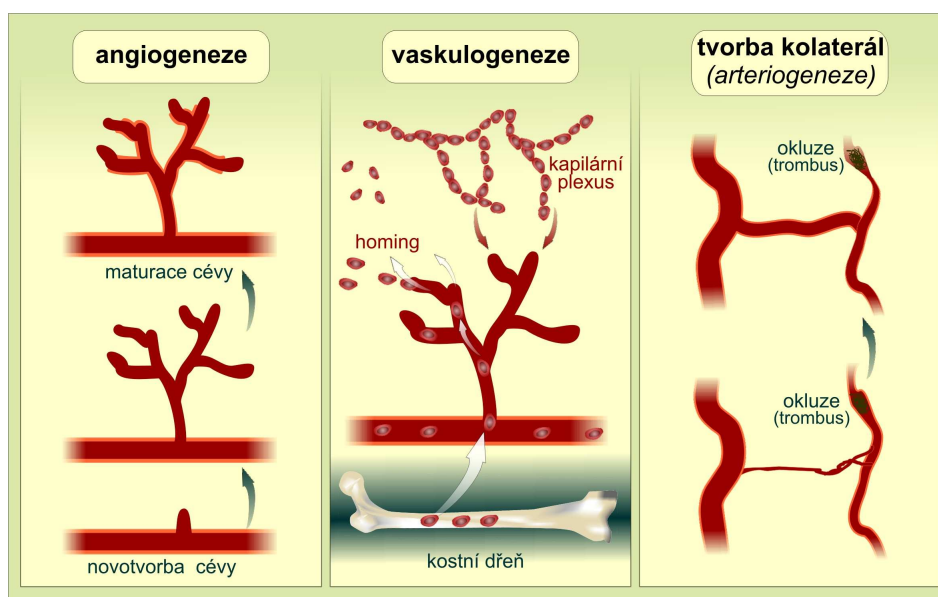
Angiogeneze je novotvorba cév z již existujícího cévního základu. Angiogeneze působí na úrovni distálních kapilár, distribuujících krev k jednotlivým buňkám. Hlavním buněčným elementem je endotel, hlavním cytokinem VEGF.

Vaskulogeneze je formování cév *de novo* z endotelových prekurzorů (angioblastů). Zásadní buňky jsou endotelové prekurzorové buňky (EPC). Hlavní roli má v embryonálním vývoji (113). I v dospělosti se uvažuje o příspěvku kmenových buněk

z kostní dřeně k tvorbě cév. Probíhá v daleko menší míře a zvýšena je zejména u patologických stavů (114).

Tato skutečnost se dá využít k diagnostice i monitorování. Terapeutická manipulace s EPC se jako základ léčby testuje u nejrůznějších patologií, jako IM, ateroskleróza, DM, hojení ran, zánět, nádory, retinopatie.

Arteriogeneze označuje formování a rozšiřování středně velkých cév, které již mají složitější stavbu stěny (endotel, tunica media, adventitia). Arteriogeneze probíhá na úrovni artérií zásobujících okrsky tkání (115). Jedná se zejména o rozšiřování kolaterál mezi dvěma částmi cévního řečiště v případech arteriální okluze. V klinické medicíně se jedná zejména o ischemickou chorobu srdeční a končetin. Výsledky dosavadních studií terapeutické manipulace s arteriogenezí bohužel nespĺňují očekávání. Zásadní jsou VRL (vascular related leukocytes), makrofágy. Role VEGF je zde podružná, zásadní je chemokin MCP-1 (116) (Obr.č.7).



Obr.č.7. Mechanismy růstu cév v dospělém organismu

Angiogeneze je tvorba cév z již existující vaskulatury. Vaskulogeneze představuje novotvorbu cév z endotelových progenitorových buněk pocházejících z kostní dřeně. Arteriogeneze je proces remodelace a maturace již existujících cév nejčastěji tvorbou kolaterál. Při potřebě zvýšené perfúze tkání se uplatňuje kombinace těchto mechanismů, cévy se větví angiogenezí a přívodní cévy vyššího stupně rozšiřují arteriogenezí svůj průtok.

Po aktivování angiogenního spouštěče některým z výše zmiňovaných impulsů dochází k sérii postupných kroků. Všechny tyto kroky vedou za normálních okolností k vyrovnání zvýšených tkáňových nároků na živiny a kyslík a k zpětnovazebnému postupnému utlumení angiogenního signálu, tedy vypnutí angiogenního přepínače.

Prvním z nich je zvýšení permeability, které může být vnímáno jako první krok k navrácení homeostázy zvýšeným přísunem nutrice, kyslíku a zánětlivých buněk do patologickým procesem postižené tkáně. Při přetrvávání proangiogenních impulsů je dalším krokem samotné zahájení růstu nových cév. Po skončení působení původního impulsu dochází k remodelaci původního cévního řečiště. Poměry ve tkáni se takto normalizují buď k původnímu stavu před působením proangiogenního impulsu, nebo vznikne nová rovnováha, kde se zvýšená nabídka rovná zvýšené poptávce. Nové cévy se stabilizují a maturují ke zralému fenotypu, ať už se jedná o angiogenezi nově tvořené kapiláry nebo o arteriogenezi rozšířené cévní řečiště kolaterál.

1.6.3. Molekulární regulace a řízení angiogeneze

Mechanismus angiogeneze je složitou souhrou mezi buněčnými elementy, prekursorů endotelových buněk (EPC), prekursorů buněk hladkého svalu a solubilními působky jako jsou cytokiny, chemokiny a růstové faktory. Angiogeneze je vícestupňový proces, který bývá označován jako **angiogenní kaskáda**. Tato kaskáda je multifaktoriální komplexní děj, který zahrnuje několik dílčích kroků:

- hyperpermeabilitu bazální membrány
- degradaci bazální membrány
- migraci endotelových buněk
- vytvoření lumen
- maturaci nové cévy

Každý z těchto kroků je pečlivě řízen.

1.6.4. Angiogenní kaskáda

Hyperpermeabilitě a degradaci bazální membrány zpravidla předchází vazodilatace, při které se protahuje tvar endotelových buněk, narušuje se plynulost bazální membrány nejen mechanicky, ale též působením proteolytických enzymů. Účinkem angiogenních faktorů se zvyšuje permeabilita membrány umožňující únik fibrinogenu a plazminogenu z cévy a jejich následnou přeměnu na fibrin a plazmin. Síť fibrinových vláken vytváří matrici pro růst novotvořené cévy, plazmin přispívá k disoluci membrány a extracelulární matrix.

Migrace a proliferace endotelií je regulována angiogenními faktory. Endotelové buňky nejprve vytvářejí na povrchu cévy útvary připomínající pupeny, později nabývají endotelie lokomočních schopností a uchyťí se na síti vytvořených fibrinových vláken. Vzniká základ nové cévy.

Maturace cévy probíhá na základě aktivace pericytů. Vytvoří se nová bazální membrána a lumen cévy. To vše na základě zvýšené proliferace fibroblastů a zvýšené syntézy kolagenu účinkem PDGF β a TGF α (117).

1.6.5. Buněčné elementy v angiogenezi

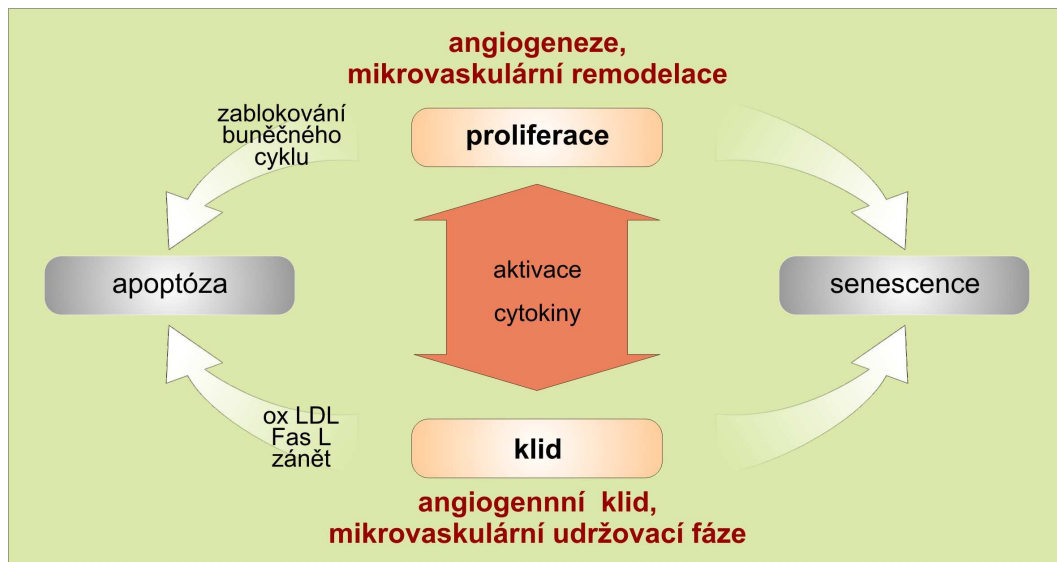
Endotelové buňky (EC)

Základním buněčným elementem a cílem regulačních cytokinových sítí angiogeneze jsou endotelové buňky. Jsou charakterizovány morfologicky jako ploché 1-2 μm široké buňky, 10-30 μm v průměru. Imunohistochemicky vykazují přítomnost některých povrchových znaků, ke kterým patří např. PECAM-1 (CD31), endoglin (CD105) a povrchový glykoprotein CD34. V cytoplasmě nacházíme Weibel-Paladeho tělíska s uloženým vWF faktorem. Povrchové znaky nejsou specifické výlučně pro endotelové buňky, nacházejí se i na jiných typech buněk, nicméně jejich kombinace je pro endotel určující (118,119).

Charakteristická je též heterogenita endotelu v závislosti na orgánu původu (fenestrované u endokrinních tkání, hemato-encefalická bariéra aj.) (120,121) a velikosti průsvitu (kapiláry, arterioly, arterie, vény) (122). Tyto rozdíly existují i na úrovni

endotelových buněk. Předpokládá se exprese buněčných znaků a regulačních molekul či jejich kombinací (tzv. molekulární „zip codes“) charakteristických pro endotel cévního řečiště určité tkáně (123,124).

Jejich funkce v organismu je nejen mechanická, slouží jako výstelka cév, ale i metabolická a signální. Zde se zaměříme na jejich roli v angiogenezi. K rozšíření a větvení cévního řečiště je třeba, aby se endotelové buňky aktivovaly. Angiogenní aktivace je soubor procesů, které změní neangiogenní fenotyp endotelu na angiogenní. Neproliferující, nemigrující endotelové buňky získají schopnost množení, migrace. Je zajištěno jejich přežívání a diferenciaci. Ke správné funkci cév je nutné zajištění vyvrání a stabilizace cévní stěny, kterou zajišťují pericyty (Obr.č.8).



Obr.č.8. Aktivace angiogeneze a klidové období endotelové buňky

Endotelové buňky většiny orgánů mají dlouhý interval mezi děleními (řádově roky). V klidovém období se podílejí na udržování bariérové funkce, přenosu živin a informačních molekul do tkání. Jejich aktivace a proliferace nastává při tkáňové potřebě, kdy je prostřednictvím angiogenní kaskády spuštěna remodelace mikrovaskulární sítě k uspokojení metabolické poptávky tkání. Poškozené endotelové buňky jsou odstraněny apoptózou buď v průběhu buněčného cyklu nebo na základě vnějšího poškození.

Endotelové progenitorové buňky (EPC)

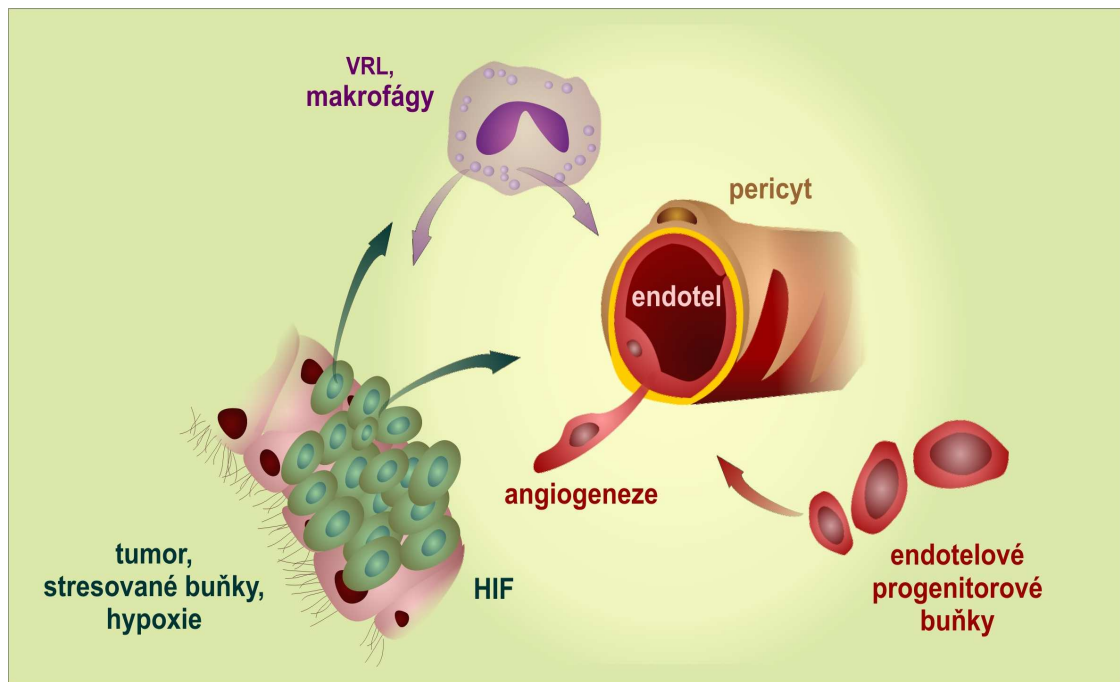
Jednou z teorií snažících se vysvětlit roli endotelových buněk v angiogenezi je předpoklad subpopulace endotelových progenitorových buněk založený zvláště na pracích Asahary a kolektivu z 90 let (125).

Endotelové progenitorové buňky jsou subpopulací buněk v krevním řečišti mající pravděpodobně svůj původ v kostní dřeni. Poprvé byly prokázány v periferní krvi v roce 1997 (125). Od maturovaných endotelových buněk se liší expresí CD znaků. K nim patří např. prominin-1 (CD133), transmembránový glykoprotein specifický pro progenitorové buňky (126). Byla prokázána jejich schopnost produkovat různé, převážně proangiogenní působky (127). Příspěvek EPC k angiogenezi je kontroverzní, i jeho míra, tedy potřebný počet prekurzorových buněk, stanovená teoreticky, se v různých modelech významně liší od 0,1% po 50% (128,129). U pacientů s ischemickými chorobami bylo prokázáno zvýšené zastoupení EPC až tisícinásobné, a tato hodnota korelovala s mírou kardiovaskulárního rizika (130). Terapeutické využití EPC k podpoře angiogeneze je v současnosti předmětem zkoumání. Viz kapitola o terapii.

Dá se shrnout, že EPC přispívají k angiogenezi dvěma způsoby. Jednak jako základní stavební bloky nově tvořené cévy. Jednak jako zdroj proangiogenních působků, kterými zesilují prvotní signály a dokončují tak zpětnovazebnou zesilující smyčku (131).

Pericyty

Buňky hladké svaloviny (SMC) hrají roli v závěrečném procesu tvorby cév (132). Jsou to buňky s četnými výběžky obklopující cévu. Podílejí se na výživě cévy a na udržení cévního tonu. Jejich zdroj u dospělého jedince není tolik prozkoumán jako u EPC. Předpokládá se zvýšení jejich počtu dělením již existujících SMC, jejich maturací z prekurzorů v bazální membráně. Jsou jisté důkazy pro jejich vznik transdiferenciací z EPC a zralých EC. Stejně tak jejich kvantitativní příspěvek k novotvorbě cév není příliš prozkoumán (Obr.č.9).

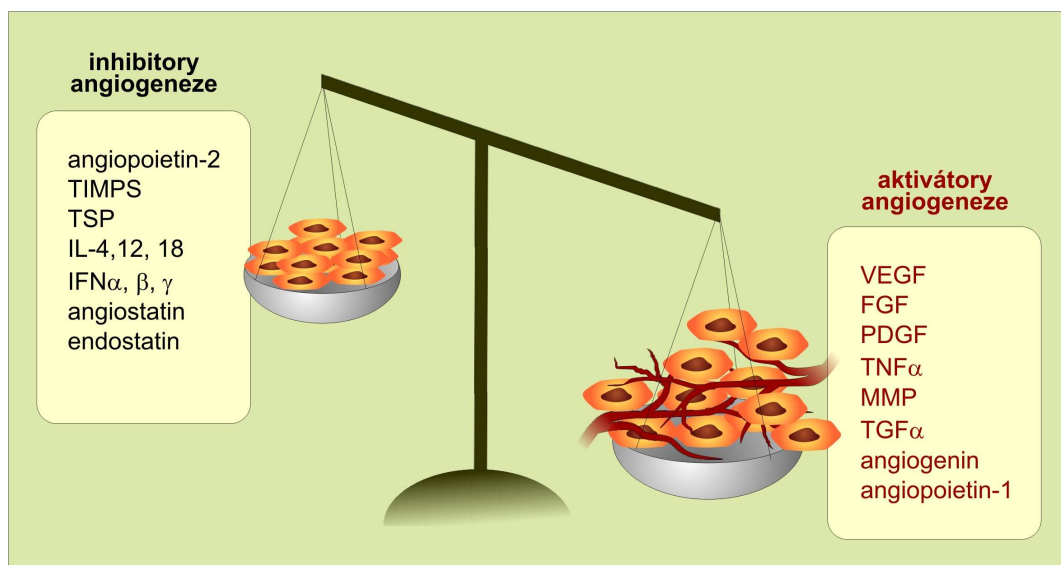


Obr.č.9. Buněčné interakce zapojené v angiogenním procesu

Růst cév je složitý koordinovaný proces vyžadující přesnou souhru různých typů buněk. Iničiaci zahajují buňky v hypoxii, nádorově změněné či zapojené v zánětu. Ty vysílají iničiální signály, jako VEGF. VRL (vascular related leukocytes) regulují a koordinují celý proces. Endotelové buňky jsou aktivovány, prolifерují a vytváří prostorové struktury cévní sítě. EPC (endothelial progenitor cells) mají vliv jak signalizační, tak stavební.

1.6.6. Cytokiny a angiogeneze

Solubilní působky vytvářejí spletitou mnohonásobně regulovanou informační síť charakteristickou polaritou pro a antiangiogenních faktorů (Obr.č.10).



Obr.č.10. Angiogenní přepínač

Za normálních okolností je zralá vaskulatura v klidu. Udržování této rovnováhy závisí na vyrovnaném poměru pro a antiangiogenních signálů. Při iniciaci angiogeneze dochází k místní převaze proangiogenních molekul. Tento jev se také nazývá angiogenic switch (angiogenní přepínač).

A. Proangiogenní faktory

Proangiogenní faktory můžeme rozdělit na přímé (VEGF) a nepřímé (TGF, TNF α), které způsobují uvolnění faktorů přímých, ale samy o sobě angiogenní účinek nemají (jsou účinné v *in vivo* modelu, ale nestimulují endotel k proliferaci *in vitro*).

VEGF

Nejvýznamnější a také nejdříve objevený proangiogenní cytokin je VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor). Hraje nejdůležitější roli hlavně v iniciaci angiogeneze. Je to růstový faktor specifický pro endotelové buňky. Jeho hlavními funkcemi jsou zvýšení cévní permeability, proliferace a migrace endotelových buněk a blokování jejich apoptózy (133).

Bylo identifikováno 6 variant tohoto faktoru tvořících molekulovou rodinu VEGF (A-E a PlGF). Zcela zásadní pro formování cévního řečiště u lidí je VEGF-A. Existuje několik isoform, které jsou produktem alternativních posttranskripčních úprav genu pro VEGF-A.

Nejdůležitější jsou 3, lišící se počtem aminokyselinových zbytků; 121, 165 a 189. S velikostí molekuly se postupně zvyšuje jejich schopnost vázat se na heparin extracelulární matrix. Isoforma 120 dobře difunduje do okolí zdroje cytokinu, zatímco isoforma 189 se dobře váže a vytváří příkrý gradient v jeho těsném okolí. Tyto odlišné vlastnosti distribuce VEGF v okolí zdroje vytvářejí odlišný charakter signálu a odlišný fenotyp vzniklých cév. V myších modelech s cílenou expresí jen jedné varianty vykazoval fenotyp *120 +/+ only* četné defekty a časnou postnatální úmrtnost. U fenotypu *189 +/+ only* umírá část jedinců prenatálně (134). Viabilní jedince s normálními cévami produkoval pouze fenotyp *165 +/+ only*, který má zřejmě vhodný poměr mezi vázanou a difundovanou složkou (135).

Strukturálně je VEGF dimerický glykoprotein obsahující 8 cysteinových zbytků. Je produkován především fibroblasty účinkem nepřímých proangiogenních faktorů (EGF).

VEGF na endotelové buňky působí cestou membránových receptorů charakteru PTK. Dosud jsou popsány VEGFR1 a 2, které se účastní angiogeneze a VEGFR 3 (pro VEGF C a D), který se uplatňuje v angiogenezi u lymfatických cév (136).

VEGF-A působí prostřednictvím receptoru VEGFR-2 na endotelových buňkách mechanismem závislým na dávce. Dál je signál přenášen prostřednictvím kinázového systému ras-MAP, který zprostředkuje proliferaci endotelií a fosfolipázovou cestou, která zprostředkovává signály k migraci endotelových buněk a zvýšené permeabilitě bazální membrány. Další funkce VEGF jsou chemotaxe granulocytů a makrofágů, nepřímá podpora vazodilatace cestou produkce NO a regulace průměru cévy.

Nejdůležitější roli hraje VEGF v embryonálním vývoji, kdy má hlavní úlohu v procesu uspořádání cévního řečiště, jak bylo dokázáno na laboratorních zvířecích modelech u myší, ryb a hmyzu. V těchto modelech vyřazení VEGF způsobilo poruchy neslučitelné s životem embrya, ztráta jedné alely kódující VEGF byla spojena s embryonálními vaskulárními defekty a prenatální letalitou (137,138). Dokonce snížení exprese VEGF jen o 25% způsobilo nedostatečné cévní zásobení míchy u pokusného modelu (139).

Svojí roli má postnatálně v zajištění zvětšujících se požadavků na cévní zásobení u rostoucích orgánů jedince (140,141).

V dospělosti již není organismus životně závislý na VEGF. Přesto jsou jisté udržovací hladiny VEGF nutné k zajištění dobré funkce orgánů (142). Snížení těchto bazálních hladin se může projevit např. preeklampií (143). Naopak zvýšené hladiny VEGF

způsobily u zvířecích modelů růst hemangiomů s charakteristickým chaotickým uspořádáním cév (144).

PGF – růstový faktor odvozený z placenty

Placental growth factor (PGF) hraje důležitou roli během angiogeneze a vaskulogeneze, především v embryonálním vývoji, kdy je jeho hlavním zdrojem placentální trofoblast. Velký význam má i při angiogenní pochodech v dospělém organismu (145), kde je jeho hlavní funkce v regulaci angiogeneze a arteriogeneze. Kromě podpory účinku VEGF zprostředkovává stabilizaci a maturaci novotvořených cév (146).

TGFβ a endoglin (CD105)

TGFβ je pleiotropní cytokin s účastí v mnoha informačních sítích organismu. Účinek TGFβ na angiogenezi je nejednoznačný. Signalizace TGFβ má v různých modelech pro i proti angiogenní působení. Zdá se, že rozhodující je kontext této signalizace zprostředkovaný dalšími zatím ne úplně objasněnými pomocnými signály. Nejznámějším z nich je právě endoglin (CD105), transmembránový pomocný receptor pro TGFβ, který je exprimován převážně na aktivovaných a proliferujících endotelových buňkách. Je považován za ukazatele neoangiogeneze. Na subcelulární úrovni moduluje signální cesty TGFβ kaskády. Existuje i jeho solubilní forma, pravděpodobně produkovaná enzymatickým štěpením membránové formy. Solubilní CD105 má pravděpodobně antagonistickou funkci (147).

Endoglin hraje významnou roli v procesech spojených s angiogenezí, v embryogenezi, tumorigenezi, při zánětu a hojení ran (148). V myším modelu vedla delece obou alel endoglinu k prenatalní letalitě v 10,5 den gestace a byla spojena s kardiálními defekty a špatnou vaskularizací žloutkového vaku. Heterozygotní model byl viabilní, ale myši vykazovaly známky porušené vaskulatury, teleangiektázie a arteriovenózní malformace, obraz podobný HHT neboli Rendu-Osler-Weberově nemoci (149,150).

HHT je autozomálně dominantní porucha s incidencí 1:10000 charakterizovaná právě teleangiektáziemi, arteriovenózními malformacemi (AVM) v plicích, játrech a ledvinách. U lidí trpících touto chorobou byly nalezeny poruchy signalizace cestou TGFβ signalizace a u jednoho podtypu HHT1 i samotná mutace v genu pro endoglin (151).

Druhou chorobou spojenou s poruchou endoglinu je preeklampsie u těhotných. Zvýšené

hladiny solubilního endoglinu (sCD105) ale i sVEGFR1 zde sekvestrují své volné ligandy a tak pravděpodobně interferují s TGF β signalizací a produkcí NO. Vedou tak k rozvoji endotelové dysfunkce. Zajímavé je, že zvyšující se hladiny sCD105 předcházejí rozvoj klinických symptomů o 2-3 měsíce a tak představují lákavou možnost uplatnění jako časných ukazatelů rozvoje nemoci (152).

Třetí skupinou nemocí jsou nádorová onemocnění, u kterých byla prokázána exprese endoglinu jak na nově tvořené vaskulatuře, tak na samotných nádorových buňkách (153). Vysoká míra jeho exprese v nádorovém cévním řečišti je spojena s horší prognózou u určitých typů nádorů (153,154,155). Endoglin proto představuje lákavý terapeutický cíl. První pokusy na myších modelech využívající protilátky proti endoglinu a anti-endoglinovou DNA vakcinaci vedly k příznivým výsledkům (156).

Solubilní endoglin

Role solubilního endoglinu byla zkoumána především u preeklampsie, v jejíž patogenezi hraje zásadní roli. Na základě těchto poznatků se zdá, že solubilní endoglin působí jako scavenger pro TGF β a podobné molekuly a tak interferuje s jeho signalizací. V procesu angiogeneze to znamená tlumivý účinek (157). Antiangiogenního působení sCD105 by bylo možné využít v terapii.

FGF – Fibroblastový růstový faktor

FGF je růstový faktor s pleiotrofními účinky. Významný je jeho vliv na hojení ran. Patří k významným proangiogenním faktorům. Pro jeho funkci v angiogenezi je nutná součinnost s ostatními faktory. Byla popsána jeho acidická (a) a bazická (b) forma. Obě jsou významnými endotelovými mitogeny a blokují u těchto buněk apoptózu. Byla prokázána jejich produkce T-lymfocyty, makrofágy, nádorovými buňkami i autokrinně samotným endotelem. Důležitá je produkce bFGF keratinocyty, která se uplatňuje u hojení ran na kůži dvojím způsobem, jako stimulátor angiogeneze i reepitelizace ovlivněním proliferace keratinocytů (158).

Angiopoietiny

Jsou skupinou molekul, mezi něž patří angiopoietin 1, angiogenin 1 a 2 a angiotropin. Uplatňují se především v pozdních fázích novotvorby cév, rozhodují o konečném osudu cévy.

Angiogenin 1 (Ang-1) zprostředkuje stabilizaci stěny novotvořené cévy aktivací pericytů. Jeho nepřítomnost vede k regresi nově vytvořené cévy. Na rozdíl od jiných proangiogenních faktorů má protizánětlivé účinky. Přispívá tak k normalizaci nově vzniklé rovnováhy ve tkáni. Dále usnadňuje vzájemné kontakty endotelových buněk a jejich vazbu k bazální membráně.

Angiogenin 2 (Ang-2) je antagonistou Ang-1. Zajímavá je synergická funkce Ang-2 s VEGF. V přítomnosti VEGF Ang-2 angiogenezi posiluje. V jeho nepřítomnosti přispívá k regresi cévy (159).

Matrixové metaloproteinázy (MMP)

Je skupina enzymů s proteolytickým účinkem na bazální membránu a extracelulární matrix. V angiogenezi se uplatňují hlavně jednak svou rolí při zvyšování cévní permeability, jednak vytvářením prostoru pro nově vznikající cévu. Nejlépe popsané proangiogenní MMP jsou MMP2 a 9 (160).

IL-8 (CXCL8)

Tento chemokin s mnoha účinky stojí na rozhraní tří systémů. Spojuje v sobě regulační funkce chemotaktické, zánětlivé a angiogenetické (161). Podrobněji bude o IL-8 pojednáno dále

TNF α

Má významnou a pleiotropní roli v procesech zánětu. Je produkován především monocyty a makrofágy. TNF α patří k hlavním prozánětlivým cytokinům. Má parakrinní účinek, podněcuje tvorbu dalších prozánětlivých cytokinů a expresi adhezních molekul. Ve vyšších dávkách působí naopak paradoxně proapoptoticky a může indukovat intravaskulární koagulaci až uzávěr cévy. Má výrazné proangiogenní účinky především při hojení ran (162,163). Uplatňuje se i při degradaci bazální membrány metaloproteinázami. Souhru mezi procesy angiogeneze a zánětu dokazují proangiogenní účinky některých

klasických zánětlivých cytokinů, jako jsou např. IL-1 (stimuluje mitogenezi, zvyšuje expresi endotelových receptorů), IL-6 (ovlivňuje migraci endotelií), IL-8 (chemotaxe, migrace endotelií), interferon γ , GM-CSF. O souvislostech mezi zánětem a novotvorbou cév bude podrobněji pojednáno dále.

B. Antiangiogenní faktory

Zatímco embryogeneze je charakterizována bouřlivou tvorbou cév, je dospělost obdobím angiogenního klidu. Za hlavní mechanismus udržování angiogenního přepínače v inaktivním stavu se považuje převaha antiangiogenní signalizace v dospělé vaskulatuře. Svědčí pro to fakt, že u myších modelů s knock-outovanými geny pro hlavní antiangiogenní cytokiny (thrombospondin a plazmin, prekurzor angiostatinu) nebylo zaznamenána výraznější porucha zárodečného vývoje (164,165). Zatímco proangiogenní molekuly byly ve středu zájmu zkoumání od samotného počátku, o endogenních angiogenních inhibitech bylo poměrně málo informací. Pokrok přišel až v 90. letech 20. století díky dr. O'Reillymu a Bremovi. Oba byli chirurgové a byli si dobře vědomi klinického faktu, že po odstranění primárního tumoru může nastat urychlený růst metastáz. Podobná pozorování podporující tento princip byla učiněna i u zvířecích modelů. Jejich hypotéza předpokládala produkci antiangiogenních faktorů primárním tumorem, který udržuje a kontroluje progresi metastáz. Teorie se potvrdila v roce 1994, kdy byl ze séra a moči pokusných myší s implantovaným Lewisovým plicním karcinomem izolován endogenní inhibitor angiostatin. Stejný princip vedl k izolaci dalšího důležitého angiogenního inhibitoru endostatinu v roce 1997. V současnosti je známo okolo 30 endogenních antiangiogenních molekul.

Angiostatin

Je 40 kD velký fragment plazminu, který je uvolňován postupným enzymatickým štěpením. Na myším modelu s implantovaným Lewisovým karcinomem, kde byl poprvé izolován, vedla radioterapie primárního ložiska s následným podáváním endostatinu k výraznému prodloužení přežití a snížení počtu a velikosti metastáz (166). U lidí byla endogenní produkce angiostatinu prokázána u ovariálního karcinomu, kde je příznivým prognostickým faktorem. Budoucí terapie založená na podávání angiostatinu je stále ještě v experimentálním stádiu, nicméně již nyní je zřejmá jeho velmi nízká toxicita.

Endostatin

Je 20 kD velký fragment kolagenu XVIII uvolňovaný enzymatickým štěpením (167). U pokusných zvířecích modelů vykazuje výraznou inhibici tumorové progresy při pouhém 1,5 násobném zvýšení hladin v plazmě oproti normě s prakticky nulovou toxicitou. Zajímavý je fakt, že gen pro kolagen XVIII u člověka leží na 21 chromozómu. U lidí s Downovým syndromem (trizomie 21) jsou skutečně nalézány v průměru 1,5 vyšší hladiny endostatinu v plazmě. Statistickou analýzou velkých souborů těchto pacientů byla nalezena (s výjimkou testikulárních nádorů a megakaryocytové leukemie) pouze 10% incidence nádorových onemocnění oproti očekávaným počtům odhadovaným pro zdravou (euploidní) populaci. Endostatin je považován za nejméně toxický protinádorový experimentální lék u myši a lidí (168,169). To spolu s vysokou účinností ho činí vhodným pro chronickou terapii a preventivní podávání u rizikových pacientů. Gen pro endostatin je ideálním kandidátem pro genovou terapii.

Sekundární antiangiogenní inhibitory

Do této skupiny patří cytokiny s vedlejším, doplňkovým antiangiogenním účinkem, interferon α , interferon β , TGF β , IL-12 nebo IL-18.

1.7. Angiogeneze a záněť

Informační cytokinové kaskády angiogeneze jsou součástí komplexnějších regulačních mechanismů, zajišťujících růst cév za fyziologických i patologických podmínek. Fyziologická angiogeneze je součástí procesů zajišťujících obranu, opravu a obnovu tkání. Charakteristická je její transientnost- přechodnost. Za patologických okolností je angiogeneze deregulovaná a místo pozitivní funkce přispívá k udržování (fenotypu) nemoci. V tomto případě získává chronický charakter.

Nejvíce informací je o deregulované angiogenezi u tumorů. Novotvorba nádorových cév je zde součástí patologického mikroprostředí rozhraní nádor - "hostitelský" organismus (zdravá tkáň). Slouží k využití energetických zdrojů organismu a rozšíření nemoci (metastazování). Zkoumání nádorové angiogeneze přineslo poznatek o významu imunokompetentních buněk v novotvorbě cév. Z poznatků vyplývá, že leukocyty nalézané

v těsné blízkosti cévních pupenů, tzv. VRL, jsou pro celý proces klíčové (170,171,172). Deplece neutrofilů u modelů angiogeneze redukovala růst cév v modelu korneální angiogeneze zprostředkované bFGF a angiogenezi u hojení ran zprostředkovanou MCP-1.

Samotný zánět a s ním spojená angiogeneze se stala středem zájmu výzkumu krátce po tumorech. Jedním z prvních úkolů ve výzkumu Judy Folkmana bylo dokázat, že vrůstání cév do nádorů není nespecifická reakce na přítomný zánět. Nyní již víme, že jsou to dva různé procesy, které jsou spolu úzce provázány. Zánět má v angiogenezi své místo, ale ta na něm není závislá. Funkční propojení můžeme vidět teleologicky. Společným cílem obou procesů je udržování homeostázy tkání, tedy obrana (zánět), oprava (zánět, angiogeneze) a obnova (angiogeneze).

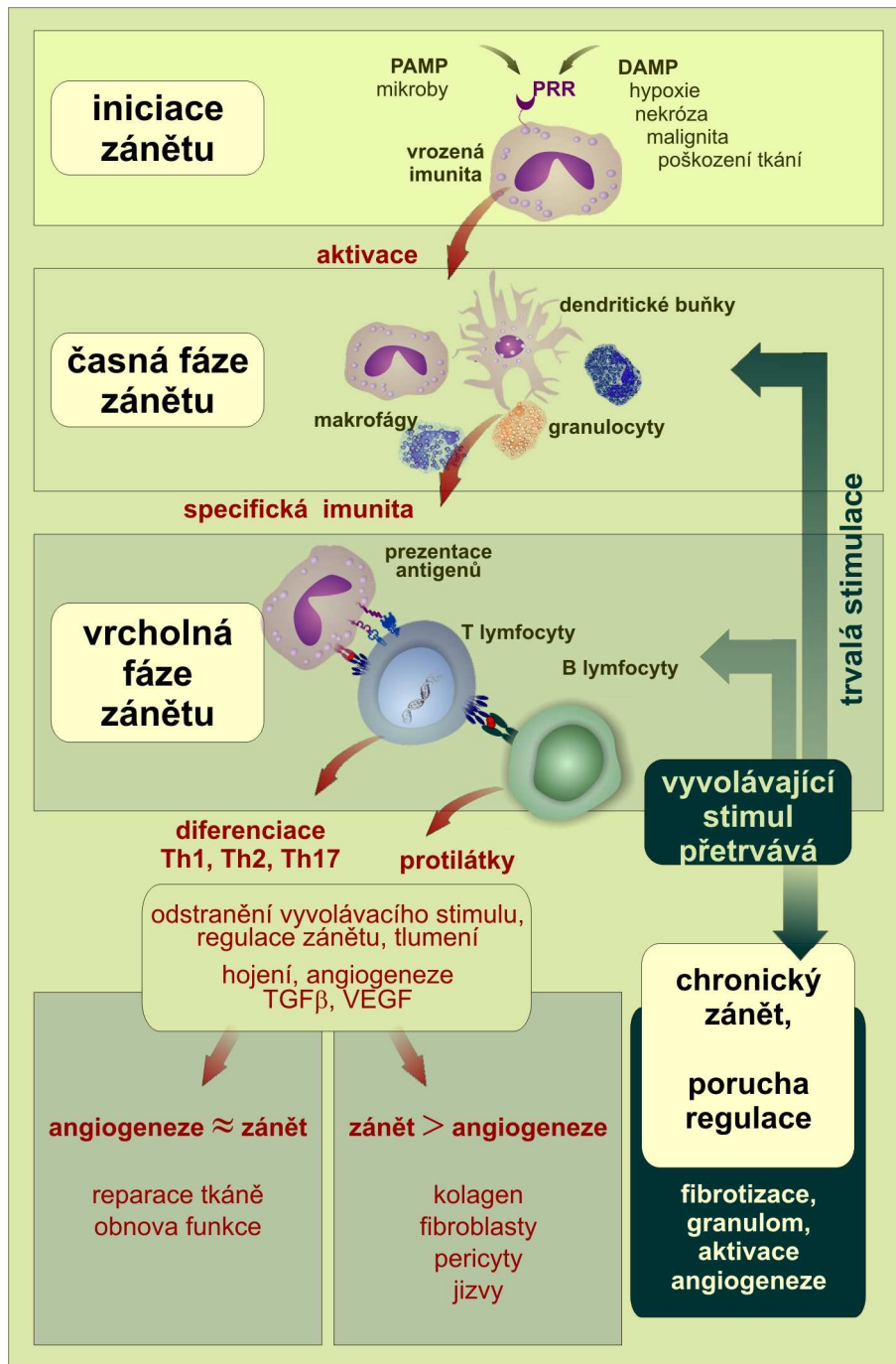
Za fyziologických okolností končí oba procesy restitucí struktury a funkce postižené tkáně. Pak následuje jejich zpětnovazebný útlum. Angiogeneze je úzce propojena se zánětem ve všech fázích jeho rozvoje. Iniclace zánětu je rychlá a univerzální. Stojí za ní aktivace přirozené imunity. Prvním krokem je překlad signálů nebezpečí do řeči vlastního organismu. K tomu slouží celá řada receptorů pro nebezpečné vzory. Rozlišujeme cizorodé signály (především mikrobiální, PAMP) a signály vysílané vlastními buňkami a tkáněmi při stresu nebo poškození, tzv. DAMP. Receptory identifikující tyto signály patří do několika skupin. Nejvýznamnější jsou TLR receptory rozeznávající PAMP i DAMP (173,174). Už v takto rané fázi byla prokázána aktivace angiogeneze. Aktivací TLR byla zvýšena produkce VEGF (173,175). Nabízí se vysvětlení, že oprava a obnova tkáně začíná už ve fázi iniciace obranného zánětu. Ve stadiu rozvinutého zánětu angiogenně aktivované cévy vykazují zvýšenou permeabilitu a umožňují přesun leukocytů a makromolekul do místa zánětu (176). Zvýšení permeability může být vnímáno jako první krok k navrácení homeostázy zvýšeným přísunem nutrice, kyslíku a zánětlivých buněk do tkáně postižené patologickým procesem. Při přetrvávání proangiogenních impulsů je dalším krokem samotné zahájení růstu nových cév. V této fázi se tedy oba procesy vzájemně zesilují. V konečné fázi zánětu potom stabilizace a maturace novotvořených cév probíhá ve spíše protizánětlivém mikroprostředí za pomoci regulačních cytokinů. Obrana ustupuje regeneraci a úpravě funkce tkáně (177). Poslední fáze je klíčová pro další osud tkáně. Postupný útlum adaptačních mechanismů, následná reparace a restituce závisí na rovnováze mezi angiogenezí a zánětem. Zvýšená intenzita zánětu vede k oslabení angiogeneze a projevuje se ukládáním kolagenu a tvorbou jizvy. Nižší intenzita dovolující

dostatečnou angiogenezi umožňuje cévní zásobení dostatečné k regeneraci (178). Zdá se, že obraz této funkční závislosti se opakuje v ontogenezi i fylogenezi (179,180). Podle tohoto předpokladu je relativně malá schopnost regenerace u vyšších savců (tedy i člověka) oproti nižším obratlovcům (ještěrka, mlok) daní za vysoce účinný imunitní systém, za schopnost rozvinout silnou zánětlivou odpověď (180).

V případě chronického zánětu přestane angiogeneze plnit svou pozitivní funkci reparace/regenerace. Místo toho se stane patofyziologickým mechanismem udržujícím *circulus vitiosus* dané nemoci. Odpovídá tomu tzv. venulární fenotyp novotvořených cév nalezených v biopsiích získaných ze zánětlivě změněných tkání. Jde o nezralé cévy s permeabilní stěnou, zvýšenou expresí adhezních molekul (E-selektin, P-selektin, EphrinB, ICAM-1) umožňující stálý transport leukocytů do chronicky změněné tkáně a dodávku kyslíku a substrátů pokrývajících zvýšenou energetickou potřebu aktivního zánětu. Patologická angiogeneze tak podporuje patologický zánět a společně uzavírají (udržují) *circulus vitiosus* chronického zánětu (181,176).

Souhra (dialog) mezi mechanismy zánětu a angiogeneze byl prokázán u mnoha nemocí i s velmi rozdílnou patogenezí, jako jsou srpkovitá anemie, roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, artróza, neovaskularizace retiny (182,183). Rozetnutí bludného kruhu angiogeneze - zánět by mohlo představovat terapeutické východisko k léčbě těchto nemocí. Jedním přístupem by mohlo být zasažení společných cílů obou procesů, druhým prostřednictvím jednoho systému ovlivňovat druhý. V teoretických modelech byl prokázán útlum angiogeneze pomocí látek blokujících transkripční faktory AP1, NFκB, pomocí COX2 inhibitorů nebo prostřednictvím deplece makrofágů. Deplece makrofágů, které stojí na spojnici zánětlivé a angiogenní odpovědi prostřednictvím clodronátu v liposomovém obalu vedla k signifikatnímu snížení metastáz u plicního tumoru (184).

Vzájemná provázanost angiogeneze a zánětu ve fyziologických i patologických procesech ukazuje na komplexní děj. Jeho lepší pochopení a objasnění, jakou roli hraje u konkrétních nemocí, může potenciálně sloužit k jejich terapeutickému ovlivnění. Nabízí se otázka, zda nepopisujeme jen dílčí části obecného, složitějšího mechanismu, kterým organismus reaguje na porušení vlastní integrity a homeostázy (Obr.č.11).



Obr.č.11. Vztah akutního a chronického zánětu k angiogenezi

Pro optimální ukončení zánětového procesu související s reparací tkáně a obnovou její funkce je důležitá rovnováha mezi intenzitou zánětu a angiogeneze. Při vhodné rovnováze dojde k úplnému zahojení a plné obnově funkce tkáně. Převažující aktivita zánětu vede k aktivitě fibroblastů spojené s ukládáním kolagenu a tvorbou jizvy.

1.8. Angiogeneze a chemokiny

Chemokiny jsou strukturálně spřízněná rodina chemotaktických cytokinů, které jsou považovány za nejdůležitější stimuly pro leukocytární diapedézu (185,186). Obecně lze říci, že se jedná o proteiny produkované jedním typem buněk, které působí na taxi jiných buněčných typů. Jejich hlavní funkcí je cílená migrace leukocytů do zánětlivých tkání (187,188). Schopnost produkovat chemokiny byla prokázána u téměř všech buněk těla. Z nich jmenujme pro tuto práci relevantní keratinocyty a endotelové buňky.

Jejich produkce je indukovatelná celou řadou faktorů, nejčastěji obecně prozánětlivými cytokiny rychlé odpovědi TNF α a IL-1, dále interferony, C5a složkou komplementu a stimuly bakteriální povahy přes TLR receptory (189). Pro molekulovou rodinu chemokinů je charakteristická přítomnost dvou konzervovaných cysteinových zbytků v primární struktuře. Podle uspořádání těchto cysteinových zbytků se chemokiny dělí na CXC, CC, C a CX3C chemokiny (6,190).

Z funkčního hlediska CXC chemokiny atrahují neutrofilů, zatímco CC chemokiny působí na širší spektrum leukocytů, na monocyty, basofily, eosinofily a lymfocyty.

Chemokinový systém je, podobně jako jiné cytokinové sítě v imunologii, systémem redundantním. Jednotlivé chemokiny nejsou přísně specifické pro konkrétní typy leukocytů (15). Chemokiny se podílejí na mnoha dějích, při kterých je nutný usměrněný a regulovaný pohyb leukocytárních populací do místa zánětu, určité zastoupení jednotlivých populací v zánětlivém infiltrátu a koordinace spolupráce různých druhů leukocytů (monocytů a T lymfocytů, T a B lymfocytů). Byl prokázán významný vliv chemokinů v protektivní funkci zánětu i v zesíleném poškození vlastních struktur při nadměrném deregulovaném zánětu. Mají i jiné než chemotaktické účinky, aktivují leukocyty, polarizují fenotyp Th CD4⁺ T-lymfocytů, ovlivňují mikrobicidní aktivitu, mají protektivní vliv u infekce HIV a zasahují do angiogeneze.

Infiltrace tkáně leukocyty je charakteristická pro patofyziologii mnoha nemocí. Byla prokázána významná role chemokinů na procesech ischemie a reperfuze u infarktu myokardu a mozkové mrtvice (191,192). Důležitou úlohu hrají v rozvoji predisponujících kardiovaskulárních onemocnění, jako je ateroskleróza, kde mají vliv na rozvoj plátů i na jejich rupturu (193,194,195,196). Účastní se rejekce transplantátu (197). U autoimunitních

chorob, jako revmatoidní artritida (198,199), glomerulonefritida či artróza (200) přispívají k charakteru a udržování chronického zánětu (201). Byly identifikovány jako součást akutní zánětlivé odpovědi proti bakteriálním i virovým agens (202). Zajímavý je vztah chemokinového systému k přenosu viru HIV-1, kde se subpopulace pacientů s defektní alelou pro receptor CCR5 ukázala jako imunní vůči virové transmisi, protože CCR5 slouží jako koreceptor pro vstup HIV do buňky (203,204, 205).

Terapeutické využití chemokinů ztěžuje již zmíněná pleiotropnost a redundance tohoto cytokinového systému a z toho plynoucí nejednoznačné vyhranění jasného terapeutického cíle. Dále ještě plně neznáme možné důsledky tlumení tak důležitého a v organismu rozšířeného cytokinového systému. Dokládá to zvýšená mortalita pneumonie u zvířecího modelu (206). A nakonec je nejasný význam chemokinů v již rozvinutém chronickém zánětu a možná reakce na jejich blokování, což je okamžik, kdy začínáme s terapeutickou intervencí (207).

CXC chemokiny jsou molekulovou rodinou cytokinů se schopností regulovat angiogenezi pozitivním nebo negativním směrem. Pro jejich primární strukturu je charakteristická sestava čtyř cysteinových zbytků seřazených po dvou párech, které jsou odděleny jednou libovolnou aminokyselinou. Angiogenní účinek závisí na další sekvenci aminokyselin v primární struktuře, tzv. ELR motivu (Glu-Leu-Arg). Chemokiny, které mají ve své struktuře motiv ELR, jsou proangiogenní a chemokiny bez ELR mají antiangiogenní účinek (208).

K chemokinům nesoucím motiv ELR patří IL-8, ENA-78, GCP-2, GRO alfa. Naproti tomu chemokiny IP10, MIG, SDF-1 tento motiv postrádají.

Záhy byly objeveny chemokinové receptory na endotelových buňkách, díky kterým mohou chemokiny svůj angiogenní vliv uplatňovat. Jako první receptor byl izolován proangiogenní CXCR4 (209). Následovaly další proangiogenní receptory CXCR1,2. Hlavním receptorem zprostředkujícím antiangiogenní účinek chemokinů je CXCR3 (B) (210).

Z dosavadních výzkumů se zdá, že vlastní mechanismus proangiogenního působení CXCR4 spočívá převážně v pozitivní zpětné regulaci CXCR4 (CXCL12) – VEGFA (211). Na důležitost proangiogenních chemokinových regulačních sítí ukazují knock-outované myší modely. Myši negativní pro receptor CXCR4 vykazovaly vývojové anomálie cév,

zvláště cév GIT, i dalších cév a anomálie srdce (212). Velmi podobný byl fenotyp myši s knock-outovaným ligandem pro tento receptor, CXCL12 (213).

Antiangiogenní receptor CXCR je exprimován především v cévách kapilár (HUMVEC) (214) a to ve větší míře především v zánětlivých a neoplastických tkáních (215). Jeho exprese na endotelových buňkách je vázána na buněčný cyklus, konkrétně na S fázi (215). Tato selektivní exprese na proliferujícím endotelu zřejmě slouží jako negativní zpětná vazba kontrolující míru angiogeneze při zánětu. Ligandy pro CXCR3 vykazují rozdílný účinek na endotelových buňkách (zastavení proliferace) a buňkách pericytů (posílení proliferace). To má pravděpodobně za cíl podporu stabilizace a maturace cév (216). Klinická pozorování tyto funkce potvrzují. U NSCL byla prokázána negativní korelace mezi expresí CXCR3 mRNA a stagingem nádoru a metastazováním do lymfatických uzlin (217). To by potvrzovalo zpětnovazebný tlumící efekt antiangiogenních chemokinů, vliv angiogeneze na progresi a metastazování nádorů. Negativní korelace mezi CXCR3 (mRNA) a angiogenezí (mRNA pro endotelově specifický vWf) u NSCL existuje jen u lokalizovaných tumorů bez vzdálených metastáz, bez metastáz v lymfatických uzlinách (217). Zdá se tedy, že k agresivnímu fenotypu NSCL je třeba “prolomit“ obranu zajišťovanou pomocí uvedené zpětnovazebné regulace.

Chemokinové systémy mají významnou úlohu jak v zánětu, tak v angiogenezi, a navíc hrají důležitou roli ve vzájemné koordinaci a regulaci těchto procesů. Význam nutnosti pečlivé regulace zánětu a angiogeneze u savců byl krátce zmíněn v kapitole o zánětu. Svědčí pro něj i fakt, že systém CXC chemokinů, který má tuto koordinaci na starost, je podle všeho evolučně relativně mladý, společný právě pouze savcům (218). Narušení těchto regulačních funkcí má odraz v mnoha patologiích, jako je porucha embryonálního vývoje a progresu a metastazování tumorů.

1.9. Angiogeneze a kůže

Proces angiogeneze, přestože ho můžeme označit za univerzální v celém organismu, má svá specifika lišící se tkáň od tkáně. Každá tkáň má jiné metabolické nároky a svou funkci, čemuž se musí přizpůsobit i její cévní řečiště. Tento fakt dokládá velmi odlišné uspořádání

cév například u cév mozkové hematoencefalické bariéry (219) a fenestrované řečiště v tkáních s endokrinní funkcí.

Specifická lokálního, orgánového endotelu má svůj odraz i na molekulární úrovni (220,221). Předpokládá se exprese endotelových buněčných ukazatelů a regulačních molekul či jejich kombinací (tzv. zip codes) charakteristických pro cévní řečiště dané tkáně (222,223). Konkrétní poznatky tento předpoklad potvrzují, přestože je jich zatím relativně málo. Jsou popsány příklady konkrétních molekul zapojených v určitém endotelu (224,205), např. průkaz specifického mitogenu pro endotelové buňky endokrinních orgánů (224).

Vysokoúčinné multiplexové analytické metody hodnotící desítky až tisíce parametrů současně umožňují komplexní zhodnocení celkové genové i proteinové exprese v dané tkáni. Při analýze celkové genové exprese endotelu několika typů tumorů původem z odlišných tkání byly mezi nalezenými skupinami genů větší rozdíly podle orgánu původu, než mezi skupinami genů zdravé a tumorové tkáně (225). Dalším příkladem jsou rozdíly v transkriptomu (mRNA) glomerulárního a aortálního endotelu zjištěných metodou SAGE (Serial Analysis of Gene Expression).

Velmi specifickým příkladem specializovaného cévního řečiště jsou tkáně bez cévního zásobení, avaskulární, jako chrupavka, rohovka či epidermis kůže.

Kůže je bariérový orgán s četnými funkcemi ať mechanickými či metabolickými. Tyto její funkce mají svůj odraz v jejím histologickém uspořádání. Skládá se z epidermis tvořené keratinocyty, dermis tvořené vazivem a buňkami a z podkožního vaziva, kterým se pojí k hlubším strukturám. Z hlediska angiogeneze je pro kůži specifické, že se skládá z vrstvy avaskulární, epidermis a vrstvy vaskularizované, dermis. Angiogenní bariéra mezi těmito dvěma vrstvami je dána nejen fyzickou přítomností dermoepidermální membrány, ale i funkčně, byla zde prokázána přítomnost inhibitorů angiogeneze thrombospondinu (TSP) (226,227,228).

Epidermis je vyživována difúzí z cévního řečiště dermis. Konkrétně se jedná o povrchový a hluboký vaskulární plexus. Povrchový plexus leží na hranici papilární a retikulární dermis a vysílá do kožních papil kapilární kličky vyživující epidermis. Hluboký plexus se nachází na hranici dermis a podkoží. Oba plexy jsou vzájemně propojeny a plní kromě výživy další fyziologické funkce jako termoregulaci, regulaci zánětu aj.

Normální kožní cévní systém u dospělých jedinců je z hlediska angiogeneze za obvyklých podmínek v klidovém stavu. Výměna endotelových buněk probíhá v řádech roků. Angiogeneze je zde vyhrazena pro růstovou fázi cyklu vlasového folikulu (227,229). Ke spuštění tzv. angiogenního přepínače v kůži, tedy změně rovnováhy směrem k novotvorbě cév dochází pod vlivem zevních či vnitřních podnětů.

K vnějším podnětům spouštějícím angiogenezi v kůži patří UVB záření, které již při jednorázové expozici zesiluje tvorbu proangiogenních působků v kůži. Také u opakované expozice UVB byla prokázána zvýšená exprese VEGF.

K endogenním stimulům produkce VEGF patří procesy spojené s hyperproliferací keratinocytů, jež je pozitivní autoregulační smyčkou ovlivňována růstovými faktory, a hypoxií, která indukuje transkripční faktory. K dalším endogenním stimulům angiogeneze v kůži můžeme zařadit působení prozánětlivých cytokinů produkovaných aktivovanými T lymfocyty: TNF α , INF γ , IL-1 α .

Samotný proces angiogeneze v kůži je v zásadě jako obecný model popsán v této práci dříve. Zahrnuje všechna stadia obecné angiogenní kaskády, hyperpermeabilitu, degradaci bazální membrány, migraci endotelových buněk, vytvoření lumen a maturaci nové cévy. K specifikům angiogeneze v kůži patří přítomnost angiogenní bariéry epidermis-dermis, význam vlivu keratinocytů na angiogenezi, fyziologická angiogeneze u vlasového folikulu a hojení ran.

Klíčovou pro start a rozvoj angiogeneze v kůži je populace keratinocytů. Byla u nich prokázána produkce řady cytokinů. Jsou hlavním zdrojem angiogenních faktorů, zvláště pak VEGF. Z fyziologického hlediska dává smysl, že v řízení angiogeneze má regulační úlohu buněčná populace z avaskulární části tkáně, tedy buňky nejvíce závislé na dodávce kyslíku a živin (226,230).

Vliv angiogeneze v patofyziologii nejrůznějších kožních nemocí byl prokázán u benigních a maligních nádorových onemocnění, vrozených vad i zánětlivých onemocnění jako je psoriáza. Ze zánětlivých onemocnění je právě psoriáza nemocí, u níž je angiogeneze nejvíce zkoumána .

1.10. Psoriáza

Psoriáza je chronické zánětlivé onemocnění kůže s chronicky stacionárním nebo akutně exantematickým průběhem. Postihuje asi 2% evropské populace a představuje tak jednu z nejčastěji se vyskytujících dermatóz (231,232). První projevy se nejčastěji objevují buď v pubertě, nebo okolo 50. roku věku, ale vznik je možný v jakémkoliv věku (233).

Charakteristickým projevem jsou psoriatické léze, ploché červené papuly se snadno odlučitelnou bělavou šupinou.

1.10.1. Projevy a formy psoriázy

Rozlišuje se několik forem dle klinického obrazu. Základní členění dělí psoriázu na chronickou ložiskovou a akutní exantémovou formu.

Chronická ložisková forma představuje asi 80% případů. Probíhá lokalizovaně na predilekčních místech, kterými jsou extenzorové plochy loketních a kolenních kloubů, vlasatá část hlavy a oblast sakra.

Akutní exantémová forma představuje asi 15% případů psoriázy. Je charakteristická náhlým výsevem bodových či kapkovitých lézí. Nejčastěji se objevuje v mladším věku, často následuje po streptokokové infekci a odeznívá během několika týdnů. U asi 60-70% pacientů se ovšem v pozdějším věku rozvine chronická ložisková forma.

K vzácnějším, ale závažnějším klinickým formám patří psoriasis erythrodermica, která zasahuje skoro celý kožní povrch a může představovat až život ohrožující stav. Další formou psoriázy se závažnými následky je artropatická forma s postižením kloubů. Podle současných údajů vzniká až u 30% psoriaticků.

Bylo prokázáno spojení psoriázy s dalšími imunopatologickými onemocněními. Mezi choroby častěji se vyskytující v populaci psoriaticků patří např. roztroušená skleróza, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida a revmatoidní artritida, stejně jako vyšší výskyt kardiovaskulárních onemocnění a diabetu. To vše podporuje pohled na psoriázu jako systémové onemocnění s projevy systémového zánětu.

1.10.2. Patofyziologie psoriázy

Typický průběh nemoci je chronicky exacerbující s typickým střídáním remisí a exacerbací. Je to choroba léčitelná, ale nevléčitelná.

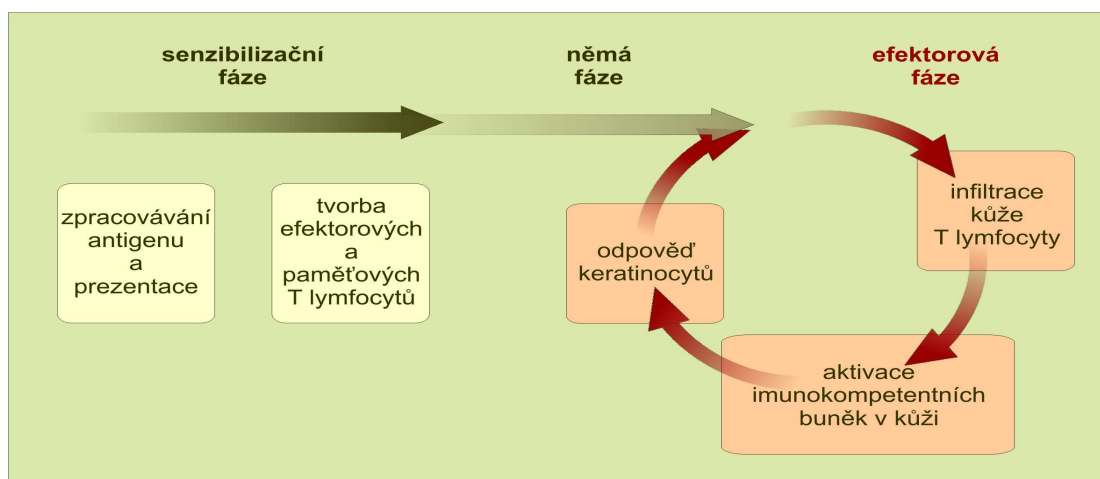
Histologicky můžeme kůži psoriatického plaku charakterizovat čtyřmi specifickými znaky (234):

1. parakeratóza, porucha diferenciací keratinocytů
2. hyperkeratóza
3. zánět, infiltrace zánětlivých buněk do epidermis
4. zmnožení kapilár papilární dermis procesem angiogeneze

Jak bylo uvedeno výše, dá se psoriáza považovat za systémové onemocnění s nejčastěji kožními projevy. Etiopatogeneze je komplexní. Neexistuje jeden konkrétní faktor, ať už by to byl cytokin, buněčný typ či druh imunitní odpovědi, který by byl sám odpovědný za rozvoj a udržování psoriázy. Podle nejnovějších představ je vhodnější definovat psoriázu jako důsledek interakcí mezi infiltrujícími leukocyty, keratinocyty a dalšími buněčnými populacemi kůže a specifickým cytokinovým mikroprostředím (235,236).

Přes značnou komplikovanost těchto interakcí se zdá být stále zřejmější, že zásadní úlohu má specifická imunita, konkrétně T lymfocyty (237,238).

Současný model imunopatogeneze psoriázy vychází z těchto předpokladů. Přirozený vývoj nemoci lze rozdělit do několika fází. Tento model vysvětluje patofyziologické mechanismy spojené s přechodem od predispozic k plně rozvinutému obrazu psoriázy. Po prvotní senzitivaci imunitního systému, která se nejčastěji projevuje jako výsev akutní exantémové formy, dochází k různě dlouhému období klidu. Vlivem vnějších i vnitřních faktorů nastává efektorová fáze. Dochází při ní k rozvoji charakteristických psoriatických ložisek na kůži. Úspěšná léčba psoriázy je zatím jen symptomatická, spočívá v převedení efektorové fáze do klidové. Ke kauzálnímu řešení by byla potřeba důkladnější poznání předchozích fází rozvoje, zvláště senzitivace (Obr.č.12).



Obr.č.12. Schéma jednotlivých fází patofyziologického modelu psoriázy

Iniciace psoriázy je souhrou vnitřních a vnějších vlivů. K těm vnitřním patří genetická predispozice. Již první epidemiologické studie psoriázy provedené v 60. letech prokázaly až 25% prevalenci u příbuzných v první linii (239,240). Klasické mendelovské modely dědičnosti však u psoriázy neplatí. V úvahu přichází spíše současný vliv více genů (241,242). Známa je asociace psoriázy s HLA alelou Cw602 (243). Byly vytipovány některé kandidátní geny či genové polymorfismy. Jedná se o geny, jejichž proteinové produkty mají v organismu řadu funkcí v zánětlivé odpovědi, hojení ran, buněčné proliferaci a cytokinových signalizačních kaskádách. Metodou DNA microarray, kdy byla zkoumána celková exprese mRNA ve zdravé a psoriatické kůži, bylo nalezeno 1338 potenciálních genů susceptibility (244).

Přítomnost rodinné zátěže a susceptibilních genů ještě automaticky nemusí znamenat rozvoj psoriázy, jak bylo dokázáno při studii na dvojčatech, kde byla konkordance asi 60-70% (241).

Nejpravděpodobnější model dědičnosti psoriázy je tedy polygenní dědičnost s neúplnou penetrancí závislou na přítomnosti či nepřítomnosti vyvolávajících faktorů.

Při úvaze o vyvolávacích faktorech musíme rozlišit faktory nemoci jako patofyziologického procesu a vyvolávající faktory jednotlivých exacerbací. Zatímco ty druhé jsou známé, patří sem stres, mechanické trauma kůže, léky a stav po některých

infekcích, samotná iniciace psoriázy je jeden z nejméně objasněných momentů v celém patologickém procesu (Tab.č.1).

Vyvolávající faktor	Doložené příklady
Bakterie	<i>Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus</i>
Houby	<i>Candida albicans, Malassezia (Pityrosporum)</i>
Viry	HIV, retroviry, papillomaviry
Trauma	Fyzikální, chemické, chirurgické aj.
Endokrinní faktory	Těhotenství, terapie estrogyeny, stres
Léky	Lithium, antimalarika, beta-blokátory, přerušení systémové léčby kortikosteroidy
Metabolické faktory	Hypokalcémie
Alkohol	Nadměrné užívání

Tabulka č. 1. Vnější faktory provokující exacerbace psoriázy

Podle nejnovějších představ je zásadním krokem v rozvoji psoriázy aktivace T lymfocytů (245). Předpokládá se existence antigenu či autoantigenu, které tuto aktivaci spouštějí. Povaha těchto antigenů není jistá, zvažují se antigeny *S. pyogenes*, z vlastních struktur organismu molekuly keratinu (246,247). Zajímavé je, že byla prokázána sekvenční homologie streptokokových M proteinů a cytoskeletu keratinocytů (248). Nicméně příspěvek specifického antigenu k rozvoji psoriázy, dokonce to, zdali je vůbec nezbytný pro rozvoj onemocnění, je nejasný. Možný je i vliv nespecifické aktivace T lymfocytů superantigeny (249). Jde o působky streptokoků a stafylokoků, které se váží nespecificky na β řetězec TcR receptoru a způsobují aktivaci významné části populace T lymfocytů (až 10%). To dále může vést k masivnímu uvolnění cytokinů s až systémovými následky. Tento mechanismus je předpokládán hlavně u akutní exantémové psoriázy.

K aktivaci T lymfocytů dochází ve spojení s buňkami prezentujícími antigen na tzv. imunologické synapsi. Ta zahrnuje spojení TcR a HLA s vázaným antigenem za přítomnosti dalších kostimulačních signálů. Teprve po překročení určité kvantitativní míry signálu dochází k aktivaci T lymfocytu.

U psoriázy jako buňky prezentující antigen jsou nejčastěji uváděny Langerhansovy buňky kůže, dále dermální dendritické buňky a plazmocytoidní dendritické buňky. Prezentovat antigen mohou i aktivované keratinocyty.

Efaktorová fáze je sledem koordinovaných dějů, které vedou k exacerbaci psoriázy. Na jejím konci je rozvoj typických lézí. Právě konec efektorové fáze je chvíle, kdy proti nemoci terapeuticky zasahujeme. V případě úspěchu léčby se efektorová fáze vrací zpět do fáze klidové s různě dlouhým intervalem do další exacerbace.

Rozvoj psoriatického ložiska zahrnuje tři posloupné mechanismy:

1. infiltraci kůže leukocyty
2. aktivaci leukocytů
3. odpověď keratinocytů

Infiltrace kůže zánětlivými buňkami je v patogenezi nemoci po angiogenezi jednou z prvních histologických změn v procesu rozvoje plaku (78). V psoriatických lézích byly prokázány zvýšené počty neutrofilů, T lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk. Tzv. trafficking leukocytů, tj. uspořádaný přesun na místo určení zprostředkují chemokiny (6). U psoriatiků byly zjištěny zvýšené hladiny určitých chemokinů jak lokálně v lézích, tak systémově (v séru). Různé leukocytární populace dominují v různých fázích rozvoje psoriázy a tomu odpovídají různá chemokinová spektra.

Ukazuje se, že zásadní pro rozvoj psoriázy je aktivace T lymfocytů (5,4). U T lymfocytů v lézích byl prokázán aktivovaný fenotyp (exprese CD69, HLADR, CD25) (7,8). Mechanismus aktivace se pravděpodobně liší při iniciaci psoriázy a při exacerbaci a udržování chronického plaku. V prvním případě probíhá celý proces aktivace imunitního systému kůže od aktivace Langerhansových buněk antigenem přes jejich migraci do uzlin, prezentaci antigenu T lymfocytům, aktivaci, proliferaci a vcestování T lymfocytů do kůže.

V druhém případě probíhá aktivace T lymfocytů jen v kůži. Prezentace antigenu (ať už vlastního či cizího původu) podle této představy probíhá v jednom místě, v psoriatické lézi, která získává u chronické psoriázy částečný charakter, a to buněčný i cytokinový, lymfoidní tkáň. Zde byla skutečně prokázána lymfoidní neogeneze, *de novo* vzniklá ektopická ložiska lymfoidní tkáň s buněčným i cytokinovým profilem lymfatické uzliny a obdobnými funkcemi.

CD4⁺ T lymfocyty se u psoriázy diferencují směrem k Th1 a Tc1 fenotypu. U psoriázy je popsána převaha subsetů nejen Th1, ale především Th17 a snížená činnost regulačních subsetů Treg a Th2 (22). Th1 produkují především IL-2 a INF γ , zatímco Th17 hlavně IL-17a a IL-22 (18,20).

INF γ produkovaný T lymfocyty hraje zásadní roli v aktivaci dalších leukocytárních populací, k nimž patří monocyty – makrofágové elementy a dendritické buňky. Aktivované T lymfocyty, vcestovalé do kůže, aktivují i keratinocyty.

Zvláště v počátečních fázích rozvoje jsou to právě cytokiny Th1 lymfocytů tj. INF γ a IL-22, které vedou k aktivaci keratinocytů. V pozdějších fázích, u chronického plaku, se na udržování ložiska podílí svými cytokiny i další buněčné typy, makrofágy, dendritické buňky, stromální buňky i samotné keratinocyty.

Keratinocyty psoriaticků vykazují některé odlišné vlastnosti proti zdravé populaci. Patří k nim rezistence k interferonu γ , produkce některých cytokinů, rezistence k apoptóze (250). To se týká i keratinocytů z nepostížené kůže, což dokládá pravdivost představy o geneticky kódované vnitřní abnormalitě metabolismu nebo nitrobuněčného přenosu signálu.

Po aktivaci získávají keratinocyty ještě některé další vlastnosti jako např. zvýšenou proliferaci, poruchy maturace, schopnost předkládat antigen T lymfocytům a zvýšenou produkci cytokinů (251,252,253).

Zvýšená proliferace keratinocytů se odhaduje se až na 50-ti násobek normální rychlosti dělení (254). Nebyl zatím nalezen žádný konkrétní cytokinový mediátor zprostředkující hyperproliferaci těchto buněk, zvažují se cytokiny Th1 lymfocytů v kombinaci s dalšími faktory (255). Vliv na proliferaci keratinocytů byl prokázán u elastáz granulocytů (256), dále pak u malého cytokinu, *nerve growth factor* (NGF) (267) a TGF produkovaných keratinocyty (258,259). TNF α produkovaný makrofágy zvyšuje produkci TGF (260). Výrazný účinek anti TNF α terapie u psoriázy společně s některými zvířecími modely naznačuje významný vliv TNF α a aktivovaných makrofágů na kožní změny v psoriatickém ložisku (261).

V normální kůži trvá maturace keratinocytů 28 dní a keratinocyt projde za tuto dobu ze *stratum bazale* do vrchní *stratum corneum*, kde v závěrečném kroku terminální diference vy tvoří keratinovou svrchní vrstvu kůže.

V psoriatickém ložisku je tento proces zkrácen na pouhých 5 dní, terminální diference je porušena, což je reprezentováno parakeratózou (262). Pravděpodobným kandidátem na mediátor poruchy maturace se zdá být IL-22 produkovaný Th1 a Th17 lymfocyty (263). K dalším patří strukturálně podobné IL-20 a IL-23. K další účinkům IL-22 patří podpora produkce antimikrobiálních peptidů keratinocyty (264). Mohl by tak být

vysvětlen zdánlivý paradox, kdy při porušené normální bariérové struktuře kůže není nijak zvýšená incidence kožních infekcí u psoriatiků (265).

Zvýšená produkce cytokinů keratinocyty vede k facilitaci dějů charakteristických pro psoriázu, jako jsou chemotaxe leukocytů nebo angiogeneze (13).

Tyto vzájemné interakce vedou k vytvoření chronického psoriatického histologického obrazu. Ukazuje se, že rozdílné buněčné typy a cytokiny hrají hlavní roli v různých fázích rozvoje nemoci. Lymfocyty a jejich působky hlavně při iniciaci nemoci a v efektorové fázi již přebírají vedení monocyty a keratinocyty (266). Tuto představu dokládá relativně nízká účinnost léčby zaměřené na T lymfocyty a naopak vysoké procento úspěšnosti terapie blokadou TNF α (267). Dá se to vysvětlit tak, že se k terapii přistupuje ve fázi rozvinutého ložiska, tedy v pozdní efektorové fázi, kdy sebeudržující mechanismy zprostředkují převážně makrofágy a keratinocyty (268).

1.10.3. Terapie psoriázy

Obecně je terapie psoriázy koncipována jako snaha o potlačení exacerbací a dosažení remise. Úplné vyléčení psoriázy není u konkrétního pacienta v současné době možné. Brání tomu právě nedostatečné poznání mechanismů iniciace a udržování choroby.

Ať už klasická či moderní biologická léčba se zaměřuje na ovlivnění známých patofyziologických procesů psoriázy, jako je imunopatologický zánět, hyperproliferace a porucha diferenciaci a apoptózy keratinocytů.

Tyto terapeutické principy se uplatňují u klasických terapií i u biologické léčby. Ke klasickým terapiím (lokálním, i celkovým) patří podávání kortikoidů, imunospupresivní látky, analogy vitamínu D, retinoidy, fyzikální léčba UVB, či kombinovaná PUVA.

Moderní biologická léčba se zaměřuje převážně na ovlivnění jednotlivých kroků rozvoje zánětu v psoriatické kůži. Je cílena na imunologickou synapsi při interakci antigen prezentujících buněk a T lymfocytů, na aktivaci T lymfocytů a jejich přesmyk do Th1 subtypu, a na produkci cytokinů v psoriatickém ložisku.

Terapií první volby a také nejužívanější je v ČR Goeckermanova terapie. Historie této léčby sahá do roku 1925, kdy William H. Goeckerman popsal terapeutické využití fototoxických vlastností kamenouhelného dehtu v kombinaci s UV zářením při léčbě psoriázy (269,270). Vzhledem k nízké ceně a významné účinnosti se dodnes tento léčebný

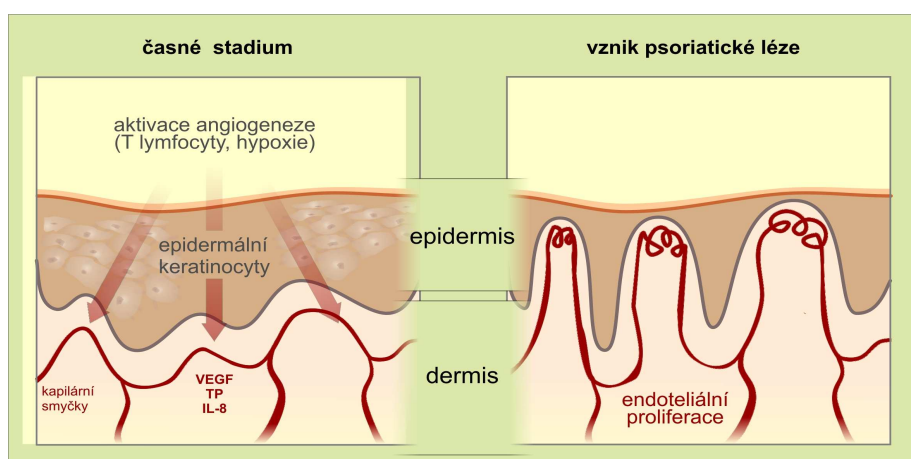
postup využívá v celé řadě modifikací (271). Terapie působí ve většině případů velmi rychle a s vysokou účinností. Co do efektivity snese srovnání s jinými typy léčby psoriázy, s použitím cyklosporinu, metotrexátu nebo fotochemoterapií PUVA. Existují práce srovnávající účinek Goeckermanovy terapie s moderními postupy biologické léčby (272). Soares and Davis v roce 2007 popsali úspěšnou terapii u dvou pacientů s psoriázou, nereagujících na biologickou léčbu (273). Širšímu použití Goeckermanovy metody brání především obavy z možných mutagenních/karcinogenních účinků kamenouhelného dehtu s vysokým obsahem polyaromatických uhlovodíků. V současné době je Goeckermannova terapie v řadě zemí používána hlavně pro léčbu chronické stabilní, či refrakterní formu psoriázy. Stejně tomu je i v České republice, kde tato terapie zůstává stále metodou první volby pro dospělé i děti (269) (**Tab.č.2.**).

Léčba	Lokální/systémové	Cíle léčby
kortikosteroidy	Lokální	T-lymfocyty
analogy vitamínu D	Lokální	T-lymfocyty + keratinocyty
analogy vitamínu A	lokální + systémová	T-lymfocyty + keratinocyty
cyklosporin	Systémová	T-lymfocyty
tacrolimus	Systémová	T-lymfocyty
metotrexát	Systémová	T-lymfocyty + keratinocyty
PUVA/UVB	Systémová	T-lymfocyty
dithranol	Lokální	T-lymfocyty + keratinocyty
Estery kys. Fumarové	Systémová	T-lymfocyty + keratinocyty
Goeckermanova metoda	Lokální	???

Tabulka č. 2. Přehled používaných základních metod léčby psoriázy

1.10.4. Angiogeneze u psoriázy

Psoriáza byla jedna z prvních nenádorových chorob, u které se předpokládala patologická angiogeneze (274). Přestože hlavní poznané mechanismy psoriázy spočívají ve spojení aktivace imunitního systému a abnormální epidermální diferenciaci a proliferaci, zdá se, že i angiogenezi zde náleží důležitá role. Histologicky byly prokázány dilatované a pokroucené kapiláry v papilární dermis (275). Kvantitativní analýza mikrovaskulární denzity pomocí značených protilátek proti endotelovým markerům ukázala až čtyřnásobné zmnožení endotelia v povrchovém vaskulárním plexu v kůži psoriatických lézí. Hluboký plexus se cévní denzitou od zdravé kontroly nelišil (276). Právě povrchový vaskulární plexus a kapiláry jsou tou částí cévního řečiště kůže, která slouží k zásobování epidermis výživou a samozřejmě i leukocyty v případě zánětu (Obr.č.13).



Obr.č.13. Angiogeneze v kůži psoriatických lézí

Kůže psoriatických lézí je, stejně jako zdravá kůže, vyživována superficiálním vaskulárním plexem z dermis. V papilách dermis vybíhajících do epidermis je u psoriatiků popsán větší průřez kapilár. To je způsobeno jejich zmnožením, prodloužením a tvorbou spirál ve vrcholku kapilární kličky. Iniciační impuls k angiogenezi v psoriatické kůži je spuštěný T-lymfocyty a vede k aktivaci keratinocytů. Ty potom produkují angiogenní faktory (VEGF, TP, IL8) působící na kapilární kličky superficiálního plexu. Jejich endotel je rovněž aktivován a exprimuje znaky angiogenní vaskulatury (integrin $\alpha V\beta 3$, Tek receptory, ang-2).

Časově jsou mikrovaskulární změny jedny z prvních změn v posloupnosti vývoje plaku. Zmnožení vaskulatury nastává před změnami epidermis i infiltrací leukocyty. Zvýšení cévního průtoku bylo pozorováno ve zdravé kůži při okrajích plaků, kde předznamenávalo budoucí rozšiřování ložiska (277,278).

Jak bylo uvedeno v kapitole o obecné angiogenezi, je ke spuštění angiogenního přepínače nutná relativní převaha angiogenních signálů. U psoriázy byla skutečně nalezena řada důkazů podporujících tento mechanismus, většinou šlo o zvýšené hladiny proangiogenních cytokinů (VEGF, endoglin) a snížené koncentrace inhibitoru angiogeneze, thrombospondinu 1 (TSP) v kůži lézí nebo v séru pacientů.

Imunohistochemicky byla prokázána exprese angiogenu 1 (Ang-1) stromálními buňkami papilární dermis psoriatické kůže, kde pravděpodobně v souladu s jejími výše popsanými funkcemi reguluje stabilizaci nově tvořených cév. Angiogenin 2 (Ang-2) je též exprimován v papilách dermis, ale pouze endotelovými buňkami (279).

Z proangiogenních působků byly v séru naměřeny zvýšené hodnoty VEGF, Ang-1, Ang-2 a jejich receptoru Tek. U hladin antiangiogenního thrombospondinu 1 se jednalo o sedminásobné snížení (280). Nejdůležitější pro novotvorbu cév se zdá být produkce VEGF.

Zdá se, že tento proangiogenní potenciál je spojen s epidermis lézí a to konkrétně s keratinocyty (281). Aktivované psoriatické keratinocyty produkují mnoho cytokinů s angiogenním potenciálem včetně právě VEGF (282).

Tento cytokin má nezastupitelnou roli v patogenezi rozvoje lézí. U laboratorních myší s transgenní nadprodukcí VEGF v kůži se rozvinuly kožní příznaky velmi podobné psoriáze (283).

U lidí byla prokázána korelace mezi hladinami VEGF v séru a systémovými projevy nemoci při těžších formách psoriázy. A to zejména u pacientů s generalizovanou erythrodermickou formou a generalizovanou pustulární psoriázou. Vliv VEGF na hyperpermeabilitu bazálních membrán cév byl u generalizované pustulární formy dáván do souvislosti s mimokožními komplikacemi, jako jsou proteinurie nebo plicní edém a u erythrodermické formy s celkovým systémovým rozvratem a zvýšenou mortalitou (284).

Pravděpodobné je propojení procesů zánětu a angiogeneze, kdy nadprodukce prozánětlivých cytokinů daná dysfunkcí Th1 větve specifické imunity vede k produkci

VEGF keratinocyty a uzavírá tak zpětnovazebnou smyčku chronický zánět ↔ angiogeneze.

1.10.5. Terapie psoriázy a angiogeneze

U mnoha klasických terapií psoriázy bylo prokázáno i sekundární antiangiogenní působení. Dokazuje to nález snížené exprese VEGF, Ang-1,2 v psoriatické kůži po terapii PUVA a tazarotenem (285). Byly popsány antiangiogenní účinky retinolů a kalcitriolu (286,287). Z mnoha složek terapeutického dehtu byl izolován karbazol jako látka s protizánětlivým a antiangiogenním působením (288). Terapie zaměřená jen na samotnou blokádu angiogeneze je na začátku zkoumání. Neovastat, extrakt ze žraločích chrupavek, je ve fázi II. klinických pokusů, kde vykazuje slibné výsledky (289,290). Byly publikovány ojedinělé kasuistické práce. Použití inhibitoru proteinové kinázy VEGF receptoru, sunitinib u současné malignity vedl k zlepšení příznaků psoriázy (299). Topická aplikace FGF inhibitoru vedla k zmenšení lézí (292).

Jako účinnou modalitou léčby se ukazuje možnost kombinace obou přístupů, tedy antiangiogenní a klasické. Sirolimus byl účinný jen v kombinaci s klasickým cyklosporinem, kdy vedl ke zvýšení účinnosti terapie a možnosti snížení dávky nefrotoxického cyklosporinu.

Vliv Goeckermanovy terapie na angiogenezi zatím studován nebyl.

2. Cíle práce

Předkládaná práce je zaměřena na zhodnocení vybraných ukazatelů souvisejících s vybranými etiopatologickými ději psoriázy se zvláštním důrazem na posouzení proangiogenní aktivity a jejich dynamiku v souvislosti s Goeckermanovou terapií psoriázy.

Hlavní cíle práce:

1. Stanovení sérové koncentrace vybraných proangiogenních faktorů před zahájením terapie a po jejím ukončení ve skupině dospělých i dětských pacientů s psoriázou.
2. Posouzení vlivu Goeckermanovy terapie na angiogenní aktivitu psoriázy pomocí změn hladin angiogenních faktorů bFGF, VEGF a solubilní formy endoglinu v průběhu terapie
3. Porovnat užitečnost a vhodnost dvou různých metodických přístupů (ELISA technika a technika proteinových array) pro stanovení angiogenních faktorů
4. Monitorovat účinnost Goeckermanovy terapie pomocí dvou ukazatelů zánětu ze skupiny pentraxinů CRP a pentraxinu 3
5. Na základě výsledků navrhnout ukazatele vhodné pro monitorování úspěšnosti terapie psoriázy.

3. Soubor pacientů a použítá metodika

3.1. Soubor pacientů

3.1.1. Sestava dospělých pacientů s psoriázou pro analýzu angiogenních faktorů bFGF a VEGF

Do studie bylo zařazeno celkem 44 dospělých pacientů z ambulance Kliniky nemocí kožních a pohlavních FN Hradec Králové. Soubor se skládal z 18 žen a 26 mužů, průměrný věk byl 38,5 roku a věkový rozsah sahal od 18 do 75 let. 32 % pacientů byli kuřáci.

Jako kontrolní soubor sloužila skupina dobrovolných dárců krve o průměrném věku 39,6 let (rozsah 18 – 65 let). Kontrolní skupina obsahovala 40% kuřáků

Všichni podepsali informovaný souhlas a studie byla povolena Etickou komisí FN Hradec Králové.

3.1.2. Sestava dětských pacientů s psoriázou pro analýzu angiogenních faktorů a chemokinů pomocí metody proteinových array

Do studované skupiny bylo zařazeno 22 dětských pacientů s psoriázou. 15 z nich byly dívky a 7 chlapci. Průměrný věk se pohyboval okolo 13,6 let s rozsahem od 8 do 18 let.

Kontrolní skupinu tvořilo 22 zdravých dětí (13 dívek a 9 chlapců, průměrný věk 15,4 roku s rozsahem od 7 do 17 let). Kontrolní skupina byla vybrána v dětské dermatologické ambulanci po negativním klinickém vyšetření.

Všichni podepsali informovaný souhlas a studie byla povolena Etickou komisí FN Hradec Králové.

3.1.3. Sestava dospělých pacientů s psoriázou pro analýzu pentraxinů CRP a pentraxinu 3

Hladiny pentraxinů byly analyzovány ve skupině 49 dospělých pacientů s psoriázou. Z nich bylo 23 žen a 26 mužů. Průměrný věk byl 37,5 roku s rozsahem od 18 do 75 let.

Kontrolní skupinu tvořilo 48 zdravých dobrovolníků, dárců krve. Jejich průměrný věk byl 29,6 let s rozsahem od 19 do 65 let. V kontrolní skupině bylo 29 mužů a 19 žen.

Všichni podepsali informovaný souhlas a studie byla povolena Etickou komisí FN Hradec Králové.

3.1.4. Sestava dospělých pacientů s psoriázou pro analýzu solubilní formy endoglinu (sCD105)

Solubilní formy endoglinu (sCD105) byla stanovena v séru 38 dospělých pacientů s psoriázou. Z nich bylo 18 žen a 20 mužů. Průměrný věk byl 43,4 roku s rozsahem od 18 do 76 let.

Kontrolní skupinu tvořilo 63 zdravých dobrovolníků, dárců krve. Jejich průměrný věk byl 34,4 let s rozsahem od 19 do 56 let. V kontrolní skupině bylo 32 mužů a 31 žen.

Všichni podepsali informovaný souhlas a studie byla povolena Etickou komisí FN Hradec Králové.

3.2. Goeckermanova terapie psoriázy

Goeckermanova terapie je kombinací fototerapie s lokální aplikací dehtu. Nemocnému je večer aplikována dehtová mast obsahující 5% dehtu (pix anthracis) na postižená místa kůže. Mast působí přes noc a ráno je odstraněna pomocí olejové lázně. Následně je pacient ozářen UV zářením a zbytky dehtové masti jsou odstraněny koupelí.

K základním kritériím pro zařazení osob do skupiny pacientů je nepřítomnost interagujících faktorů expozice (např. souběžná či předcházející sekundární expozice

dehtu, PAU, UV záření, RTG záření) a stav onemocnění, vylučující Goeckermanovu metodu léčby psoriázy (nesnášenlivost UV záření či dehtových preparátů). Tyto údaje byly zjišťovány pomocí dotazníků a odborným dermatologickým vyšetřením.

Průměrná doba terapie se pohybovala okolo 17 dní (8 - 30 dnů). Pro objektivizaci rozsahu postižení byl použit výpočet PASI skóre (Psoriasis Area and Severity Index) vyhodnocované před a po skončení léčby.

Byla provedena i objektivizace dávky UV záření, kterou pacienti obdrželi při terapii. Dle spektrometrické analýzy použitého UV zářiče je intervalová hustota zářivého toku ve vzdálenosti 100 cm před zářičem $134,45 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (pro vlnovou délku 280 – 315 nm) a $245,6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (pro vlnovou délku 315,5 - 400 nm). K dispozici byla i podrobná spektra hustot zářivého toku, ze kterých bylo možno odečíst hodnoty intenzit pro užší spektrální oblasti. Účinná intenzita záření (W/cm^2 vztažená k vlnové délce 270 nm) byla průběžně počítána jako součet součinů intenzit záření v dílčích spektrálních oblastech od 180 do 400 nm ($\text{W} \times \text{cm}^{-2} \times \text{nm}^{-1}$), relativních spektrálních účinností a šířek dílčích spektrálních oblastí (nm). Dávky záření byly vypočítány vynásobením účinné intenzity záření ($1,478 \text{ E}^{-5} \text{ W}/\text{cm}^2$) dobou expozice. Doby expozice UV záření byly individuální a byly ordinovány vzestupně podle vývoje onemocnění během léčby. Doba ozáření se pohybovala od 1 do 20 minut/den. Denní dávka ozáření se u sledovaných pacientů pohybovala mezi hodnotami $0,8868 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (1 minuta) a $17,736 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (20 minut). Pro kvantifikaci rizika byla použita limitní hodnota pro pracovní prostředí $3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, doporučovaná jako ochrana před akutními účinky vedoucími ke vzniku erythému a fotokeratitidy. Delší doby expozice tento limit překračovaly zhruba šestinásobně, nejkratší dosahovaly 30% limitu. Pro dané podmínky Goeckermanovy metody dávkový limit naplňovaly zhruba 3,4 minuty expozice.

3.3. Odběry biologického materiálu

Vzorky srážlivé krve byly od pacientů léčených Goeckermanovou terapií odebrány před začátkem léčby a v den propuštění z nemocniční péče. Srážlivá krev byla odstředěna po 1 hodině při 3000 rpm po dobu 10 minut a sérum bylo zmrazeno na -80°C . Stejným

způsobem byly zpracovány a uchovány kontrolní vzorky dárců krve. Před vlastním zpracováním byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě.

3.4. Laboratorní metody stanovení angiogenních faktorů a pentraxinů

3.4.1 Metoda proteinových array

Metody proteinových array patří mezi tzv. multiplexové techniky, které umožňují simultánní stanovení většího množství sledovaných parametrů (analytů). Pro stanovení chemokinů a dalších angiogenních faktorů v séru pacientů s psoriázou byla použita metoda tzv. membránových array od firmy RayBiotech (Norcross, Georgia, USA). Na povrchu vhodné membrány o rozměrech cca 1x1cm byly do určitých předem definovaných míst, spotů, navázány protilátky proti jednotlivým stanovovaným chemokinům. Membrána byla následně inkubována se vzorkem séra pacienta a po promytí byl na povrch membrány aplikován koktejl sekundárních protilátek proti zmíněným chemokinům. Tyto protilátky jsou namířeny proti jiným epitopům na povrchu molekul chemokinů než primární, na membránu fixované protilátky. Sekundární protilátky byly značeny biotinem. V dalším kroku byl přidán konjugát streptavidin-křenová peroxidáza a nakonec substrát, který po transformaci na barevný produkt vizualizoval navázané stanovované chemokiny. Vyhodnocení bylo provedeno densitometricky z digitálního fotografického záznamu membrány. Pro analýzu byl použit software ARES (ARray Evaluation System, Baria, ČR).

Metoda byla použita na stanovení chemokinů s angiogenními účinky: ENA-78, GRO alfa, MCP-1, RANTES, IL-8.

3.4.2. ELISA technika

Metodou ELISA byla stanovena většina solubilních markerů použitých při hodnocení imunomodulačního efektu Goeckermanovy terapie psoriázy. Metoda ELISA je založena na detekci solubilních faktorů imunochemickou cestou pomocí dvojice specifických protilátek namířených proti různým místům (epitopům) na stanovované molekule proteinu. První protilátka je zpravidla navázána na povrchu jamky mikrotitrační destičky. Stanovovaný protein ze vzorku je potom navázán na tuto protilátku a vizualizován pomocí druhé protilátky značené enzymaticky. Enzym potom transformuje vhodný substrát z vzniku zbarvení, které je úměrné koncentraci stanovovaného proteinu. Vzniklé zbarvení je měřeno spektrofotometricky. Pro stanovení proteinů ELISA technikou byly použity komerční kity. Spektrofotometrická měření byla realizována pomocí ELISA readeru Multiskan RC (Thermo Scientific).

Pomocí ELISA techniky byly stanoveny hladiny bFGF, VEGF, pentraxinu3 a solubilní formy endoglinu (sCD105). Koncentrace PTX 3 byly měřeny pomocí soupravy pro sendvičovou ELISA metodu (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland).

Hladiny VEGF, bFGF a solubilní formy endoglinu v séru byly změřeny ELISA metodou s použitím komerčních diagnostických kitů vyrobených firmou R&D Systems (USA).

3.4.3. Imunonefelometrie

Imunonefelometrická metoda je založena na měření rozptýleného světla na částech precipitátu, imunokomplexu, vzniklého reakcí antigenu (v tomto případě lidského CRP ze vzorku) a specifické zvířecí protilátky. CRP byl měřen touto metodou za použití nefelometrického analyzátoru IMAGE 800 firmy Beckman Coulter a reagensů téže firmy.

3.5. Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení naměřených dat byly použity statistický software MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgie). Normalita dat byla kontrolována pomocí

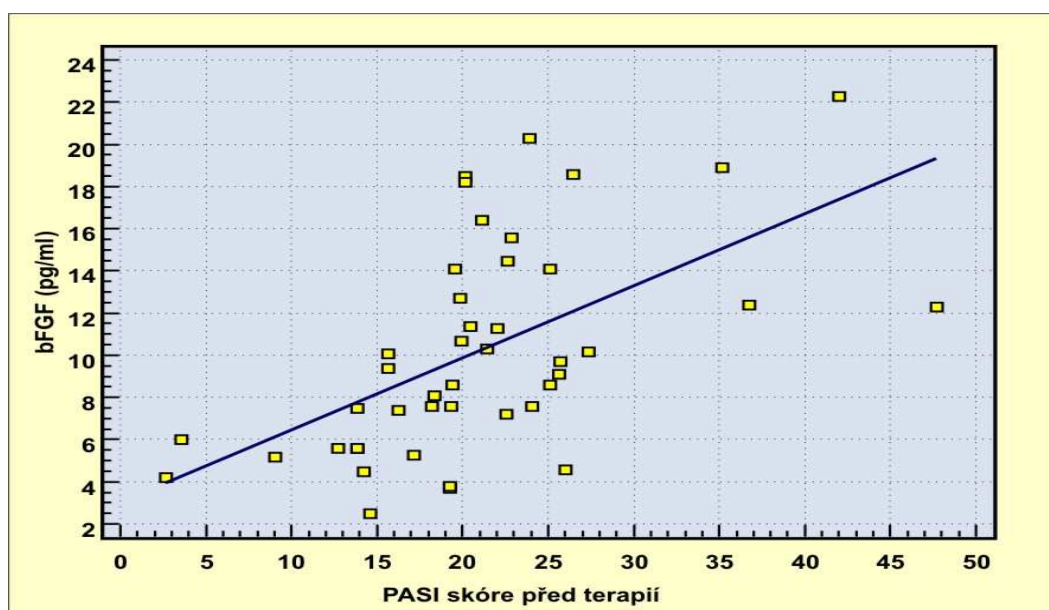
Kolmogorov-Smirnovova testu. Pro srovnání skupin pacientů a pro zhodnocení změn jednotlivých parametrů během terapie byl použit nepárový nebo párový t-test, případně neparametrický Wilcoxonův nebo Mann-Whitneyův test. Korelační analýza byla provedena pomocí Pearsonova nebo Spearmanova korelačního koeficientu. Hodnota $p < 0,05$ je považována za statisticky významnou.

4. Výsledky

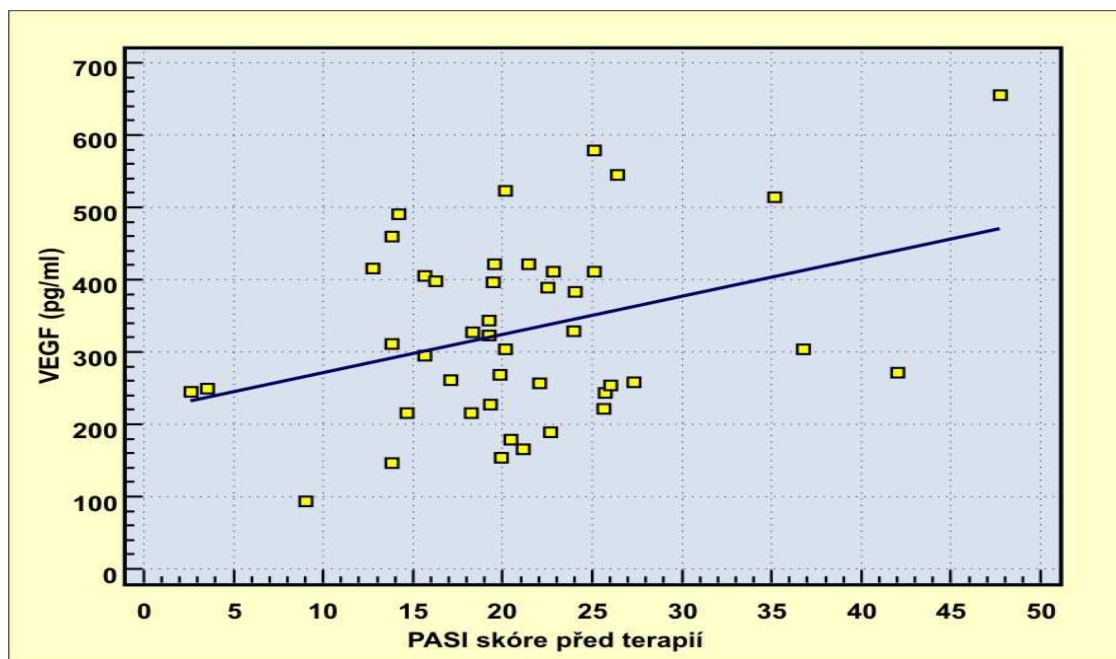
4.1. Stanovení hladin růstových faktorů VEGF a bFGF u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií

Ve skupině 44 dospělých pacientů s psoriázou bylo dosaženo významné klinické odpovědi na terapii. Hodnoty PASI před terapií $20,9 \pm 8,4$ klesly na úroveň $5,7 \pm 3,9$ po terapii ($p < 0,001$).

Sérové hladiny obou angiogenních cytokinů VEGF a bFGF korelovaly s aktivitou choroby měřenou pomocí PASI skóre. Korelační koeficienty měly hodnotu 0,5688 u bFGF ($p < 0,001$) a 0,352 ($p = 0,019$) pro VEGF. Výsledky korelační analýzy jsou znázorněny v grafech č. 1 a 2..

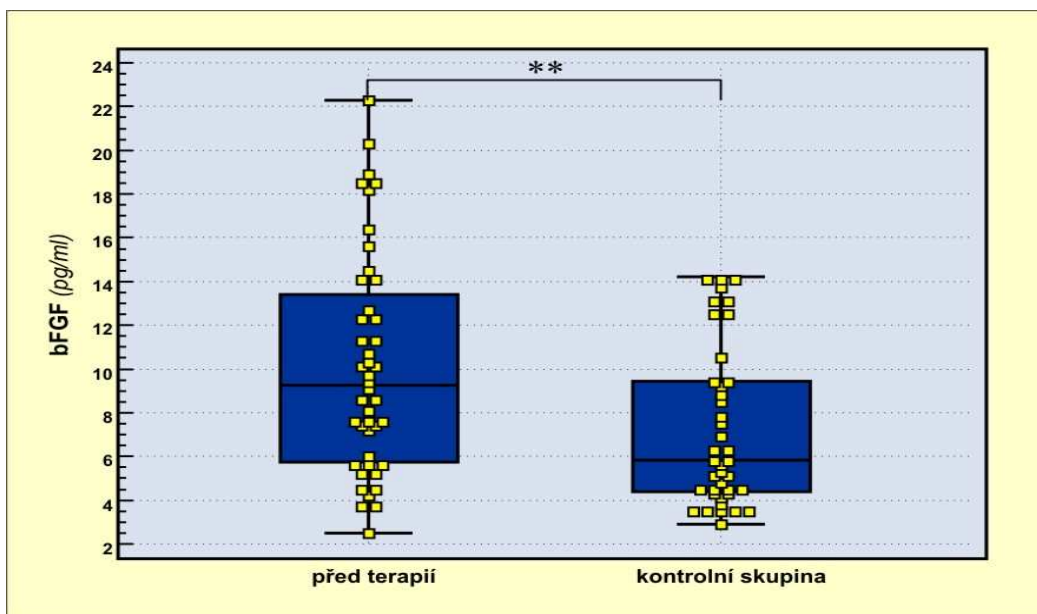


Graf č. 1. Korelace mezi sérovými hladinami bFGF a hodnotami PASI skóre ve skupině pacientů s psoriázou před Goeckermanovou terapií. Zjištěný korelační koeficient má hodnotu 0,5688 ($p < 0,001$).

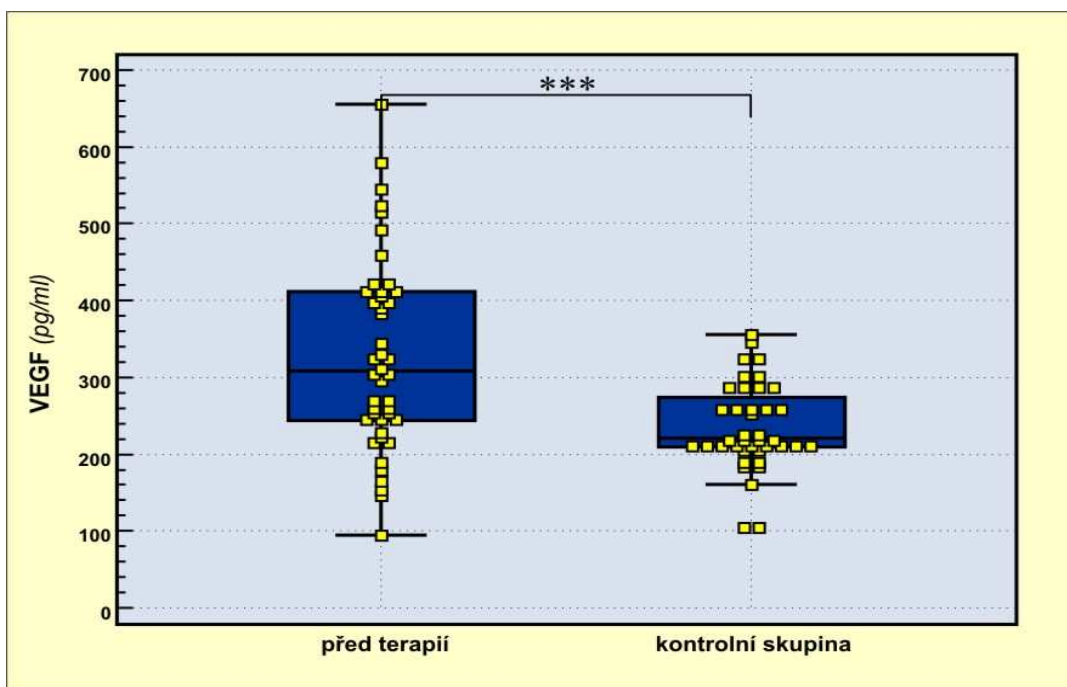


Graf č. 2. Korelace mezi sérovými hladinami VEGF a hodnotami PASI skóre ve skupině pacientů s psoriázou před zahájením Goeckermanovy terapie. Korelační koeficient má hodnotu 0,352 ($p = 0,019$).

V porovnání s hladinami těchto cytokinů v séru zdravých osob (bFGF $7,3 \pm 3,7$ pg/ml, VEGF $236,4 \pm 55,9$ pg/ml) byly hladiny u psoriatiků před léčbou významně vyšší (bFGF $10,2 \pm 5,04$ pg/ml, $p=0,0036$ a VEGF $329,4 \pm 125,5$ pg/ml, $p < 0,001$). **Viz grafy č. 3. a 4..**

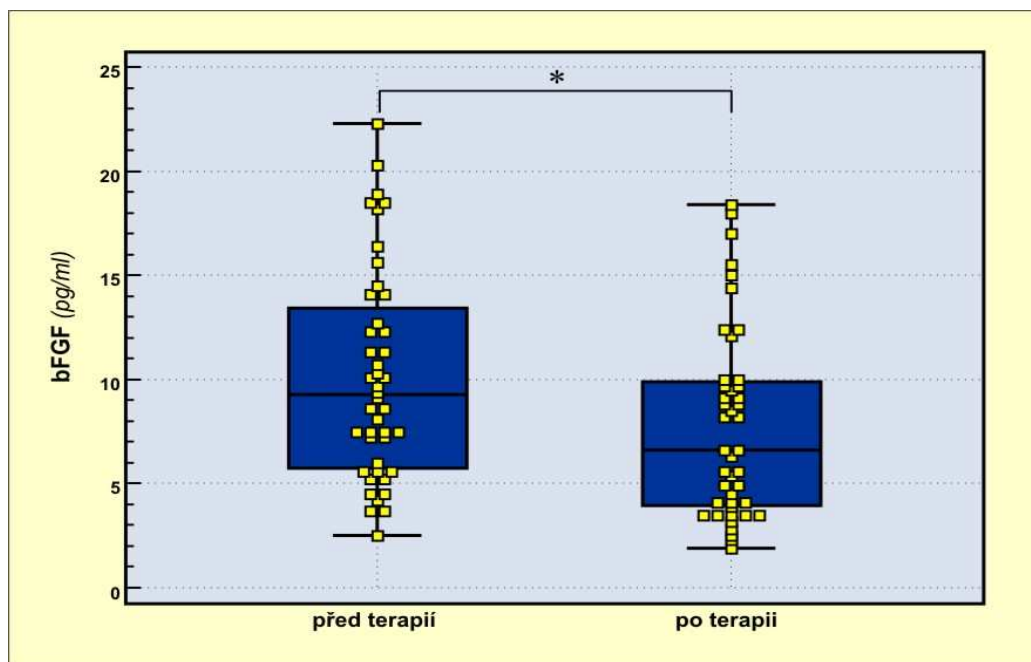


Graf č. 3. Srovnání sérových hodnot bFGF u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ($p = 0,0036$).

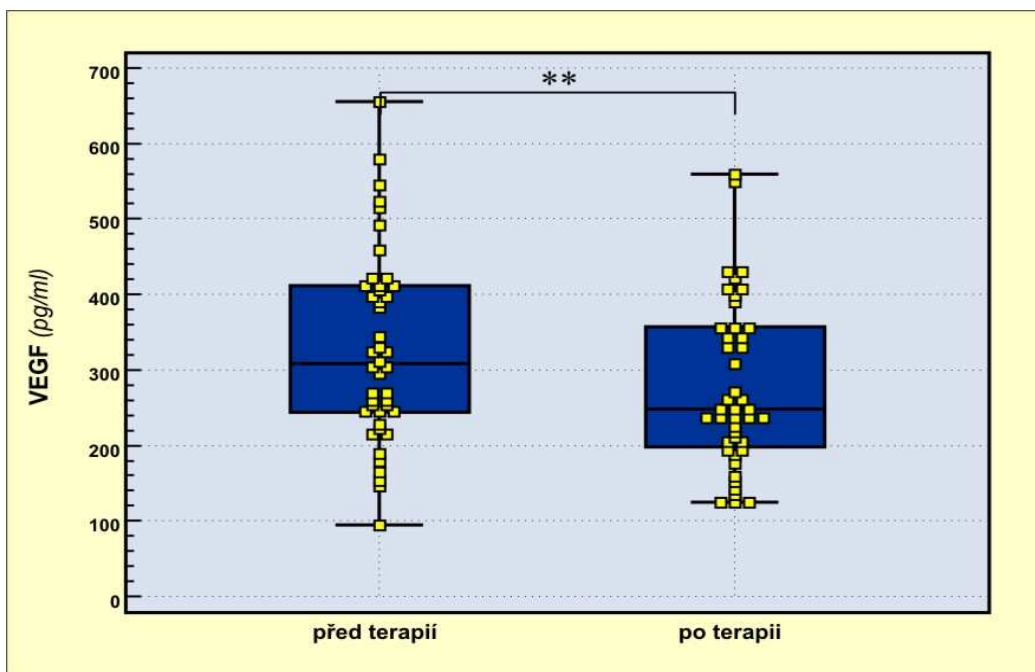


Graf č. 4. Srovnání sérových hodnot VEGF u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ($p < 0,001$).

Sérové hladiny obou cytokinů se po terapii významně snížily. Hladiny bFGF poklesly z $10,2 \pm 5,04$ pg/ml na $7,78 \pm 4,5$ pg/ml ($p = 0,019$) a hodnoty VEGF se snížily z $329,4 \pm 125,5$ pg/ml na $278,5 \pm 109,9$ pg/ml ($p = 0,0042$) (**Grafy č. 5. a 6.**). Koncentrace VEGF zůstala po terapii stále vyšší než u zdravých kontrol. Naopak bFGF se po terapii normalizovala ($p = 0,5723$).



Graf č. 5. Pokles hladin bFGF v průběhu Goeckermanovy terapie psoriázy ($p = 0,0191$).



Graf č. 6. Pokles hladin VEGF v průběhu Goeckermanovy terapie psoriázy ($p = 0,0042$).

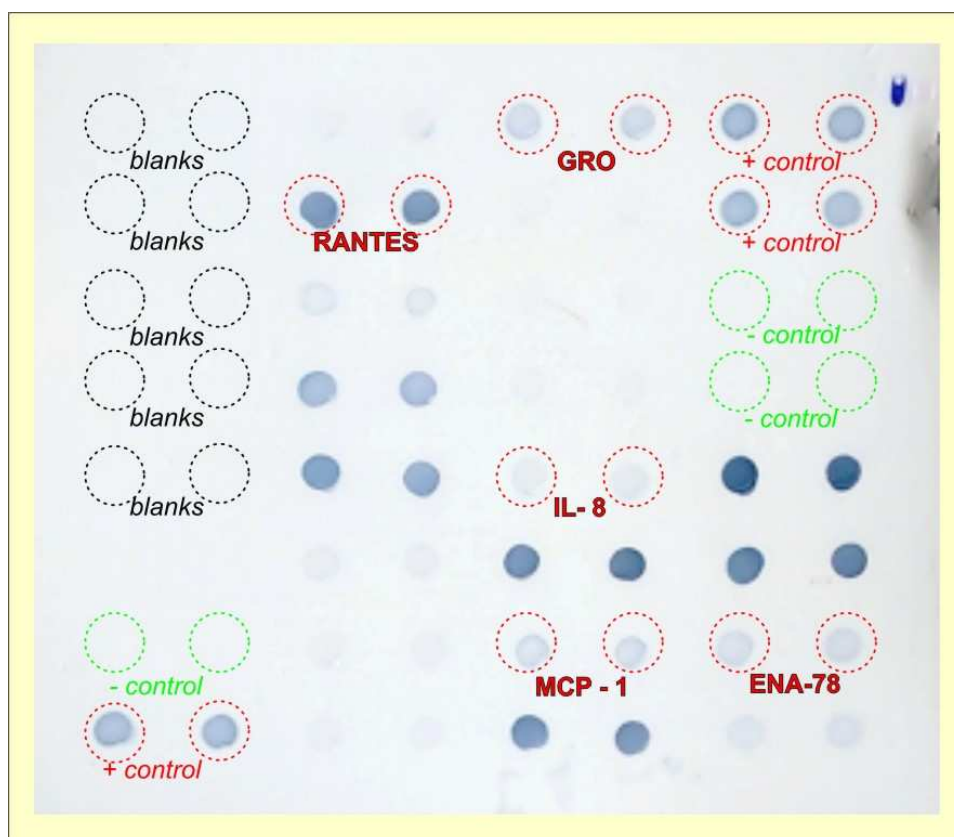
4.2. Stanovení hladin angiogenních faktorů u pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií metodou proteinových array.

Angiogenní faktory byly vyšetřeny ve skupině 22 dětí s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií. Ve všech případech bylo dosaženo významné klinické odpovědi na terapii. Hodnoty PASI před terapií $20,33 \pm 9,86$ klesly na $7,7 \pm 5,22$ po terapii ($p < 0,001$). Metodou proteinových array byly měřeny chemokiny GRO alfa, ENA 78, MCP-1, RANTES a IL-8. Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami měřených parametrů a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

Sestava parametrů na použitých membránách je na **obrázku č. 14.** Jednotlivé proteiny se na každé membráně vyšetřují duplicitně. Typická ukázka membrány se spoty odpovídajícími měřeným chemokinům je na **obrázku č. 15.**

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
2	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
3	GRO	IFN- γ	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
4	GRO	IFN- γ	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
5	PIGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
6	PIGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
7	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS
8	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS

Obr. č. 14. Sestava vyšetřovaných parametrů na membráně při stanovení angiogenních faktorů metodou proteinových array.



Obr. č. 15. Ukázka výsledného zbarvení spotů na membráně při stanovení angiogenních faktorů metodou proteinových array. Spoty odpovídající faktorům zmiňovaným v práci jsou vyznačeny kruhy.

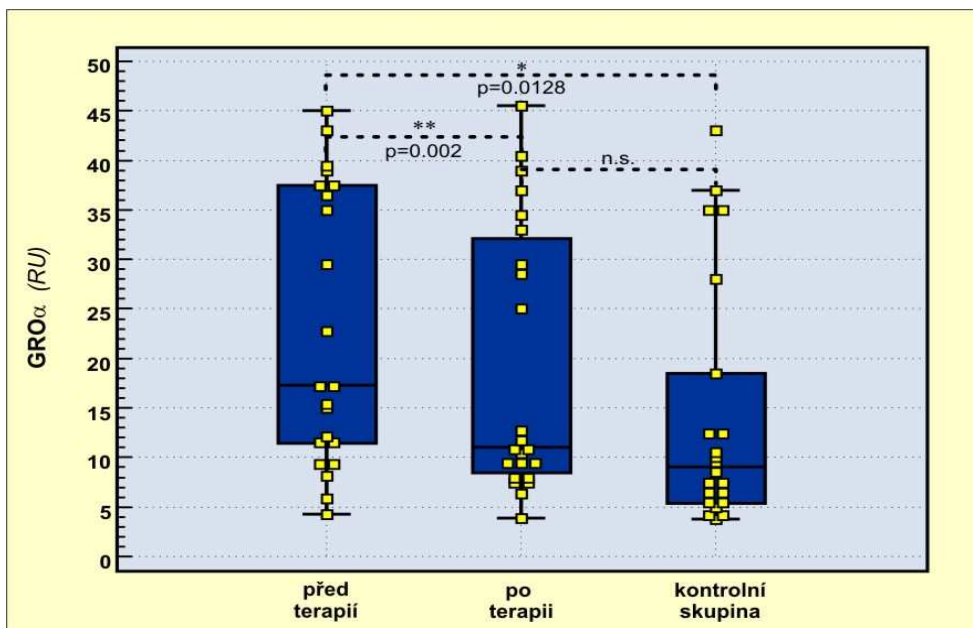
Po vyhodnocení membrán pomocí speciálního software byly koncentrace jednotlivých chemokinů vyjádřeny v podobě relativních jednotek. Hodnoty jednotlivých faktorů jsou uvedeny v **tabulce č. 3**

Chemokin	Před terapií			Po terapii			Kontrolní skupina		
	Průměr	SD	Medián	Průměr	SD	Medián	Průměr	SD	Medián
ENA-78	11,33	9,39	8,5	12,75	11,62	7,2	12,44	7,02	11,25
GRO α	22,85	13,79	17,25	19,10	13,5	11,0	14,38	12,46	9,0
IL-8	14,17	19,73	5,40	10,70	12,07	5,0	7,14	10,83	4,75
MCP-1	8,69	7,27	7,2	6,47	3,77	6,80	2,43	1,49	2,0
RANTES	49,02	15,91	52,0	39,76	13,07	37,5	39,97	16,97	44,0

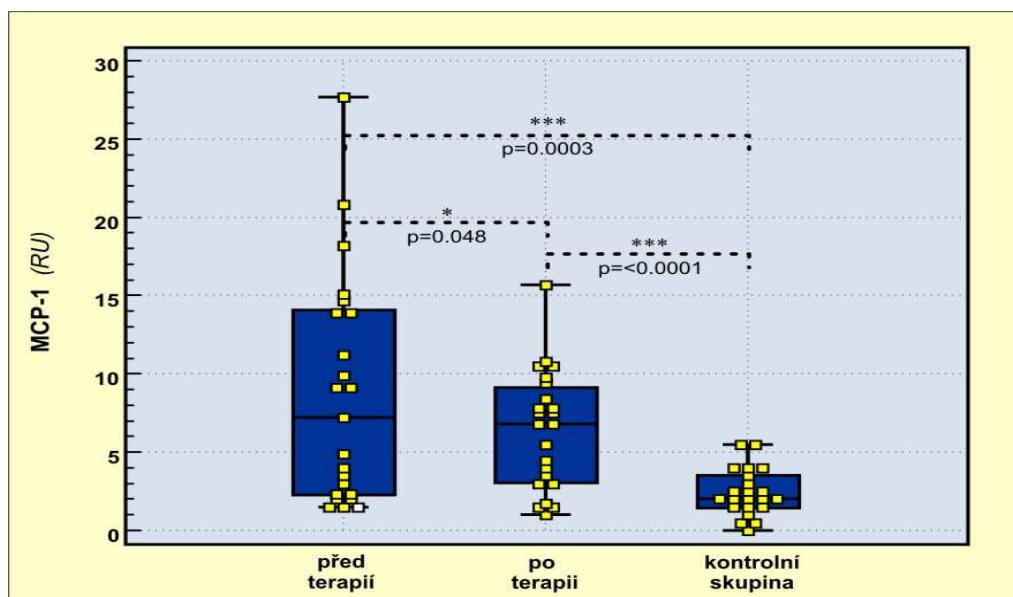
Tabulka č. 3. Koncentrace chemokinů (relativní jednotky)

Při srovnání hladin chemokinů mezi dětskými pacienty a skupinou zdravých dětských dobrovolníků byly nalezeny zvýšené hladiny GRO alfa ($p = 0,0128$) a MCP-1 ($p = 0,0003$) před terapií oproti zdravým kontrolám. Naproti tomu hladiny RANTES, ENA-78 a IL-8 před terapií nebyly významně zvýšeny oproti kontrolní skupině.

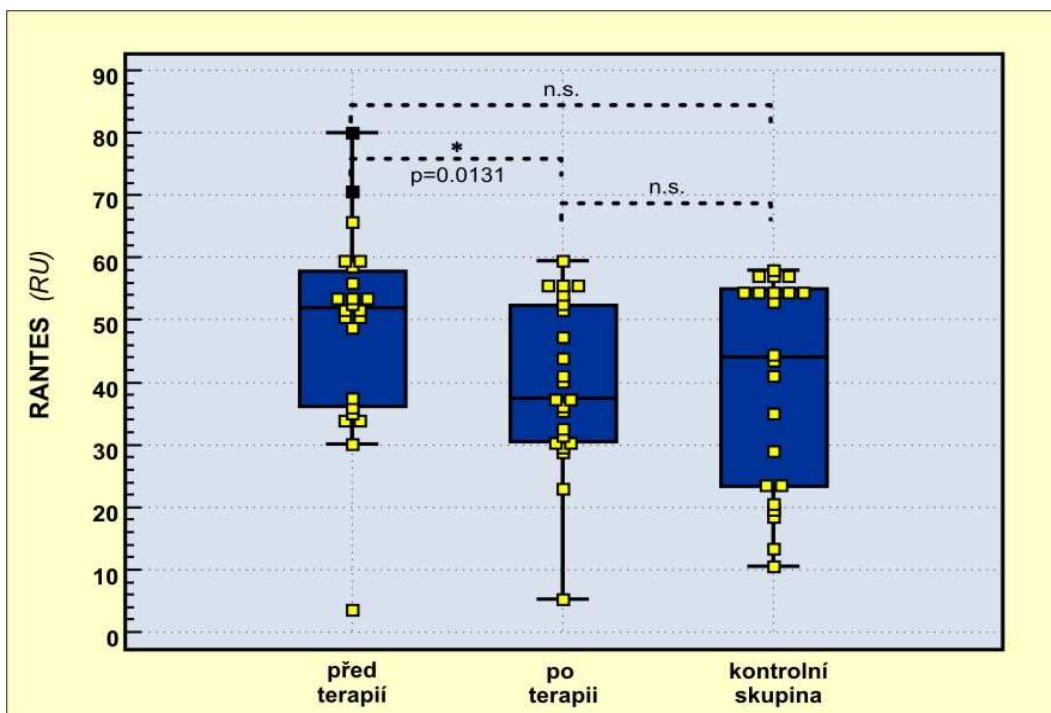
Dále byl zkoumán vliv Goeckermanovy terapie na hladiny zmíněných chemokinů. U pacientů významně poklesly po Goeckermanově terapii koncentrace MCP-1 ($p = 0,002$), GRO alfa ($p = 0,048$) a RANTES ($p = 0,0131$). Hodnoty MCP-1 byly i po terapii významně zvýšeny oproti zdravým kontrolám ($p < 0,0001$). Změny hladin GRO alfa, MCP-1 a RANTES během terapie a jejich vztah k hodnotám u zdravé populace jsou zobrazeny v **grafech č. 7, 8 a 9**.



Graf č. 7. Rozdíly v sérových hodnotách GRO ve skupinách pacientů s psoriázou před zahájením terapie a po ukončení terapie a v kontrolní skupině. Koncentrace GRO jsou uvedeny v relativních jednotkách.



Graf č. 8. Změny v sérových hladinách chemokinu MCP-1 ve skupině pacientů s psoriázou před zahájením terapie a po ukončení terapie a v kontrolní skupině. Koncentrace MCP-1 jsou uvedeny v relativních jednotkách.

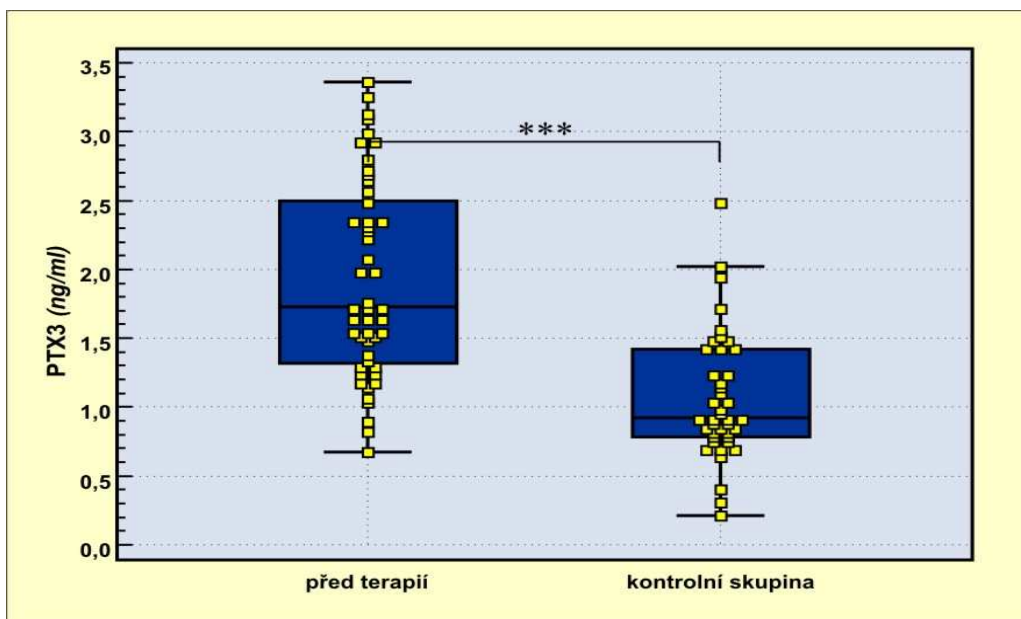


Graf č. 9. Rozdíly v sérových hodnotách chemokinu RANTES ve skupinách pacientů s psoriázou před zahájením terapie a po ukončení terapie a v kontrolní skupině. Koncentrace RANTES jsou uvedeny v relativních jednotkách.

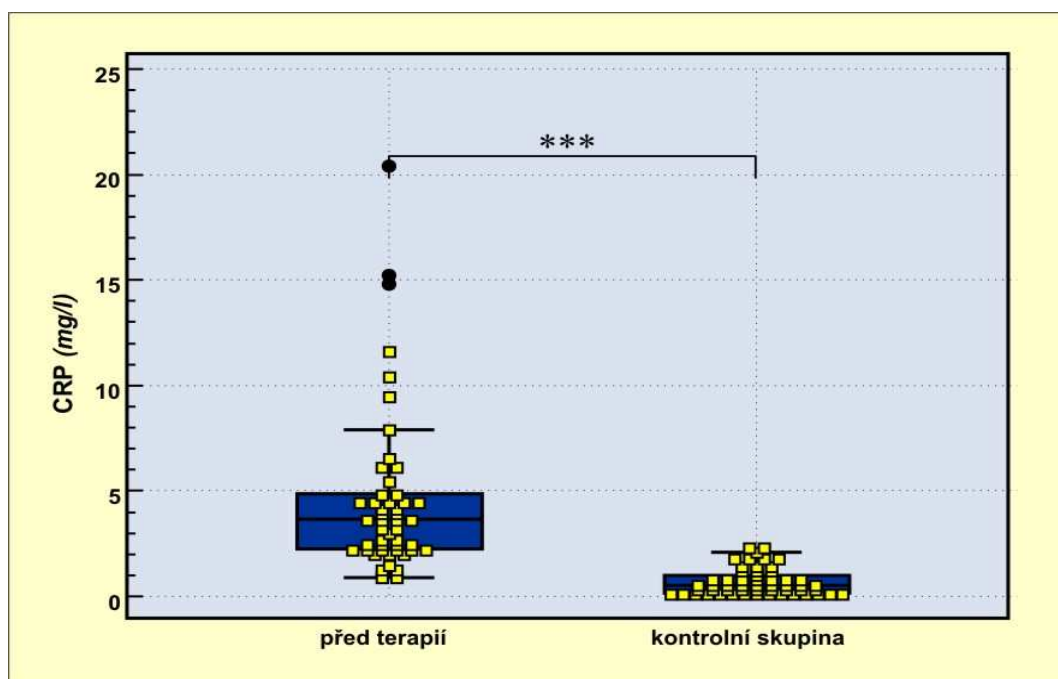
4.3. Stanovení koncentrací pentraxinů PTX3 a CRP v sérech pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.

Parametry byly stanoveny ve skupině 49 pacientů s psoriázou. Bylo dosaženo významné klinické odpovědi na Goeckermanovu terapii. Hodnoty PASI před terapií $20,9 \pm 8,4$ klesly na $7,7 \pm 5,22$ po terapii ($p < 0,0001$). Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami CRP a PTX3 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre.

Ve srovnání s hodnotami v kontrolní skupině zdravých dárců krve byla hodnota PTX3 a CRP před léčbou významně vyšší ($p < 0,0001$) (**Grafy č. 10 a 11**). Hodnoty ve skupině zdravých dobrovolníků pro PTX3 byly $1,05 \pm 0,45$ ng/ml a pro CRP $0,73 \pm 0,64$ mg/l.

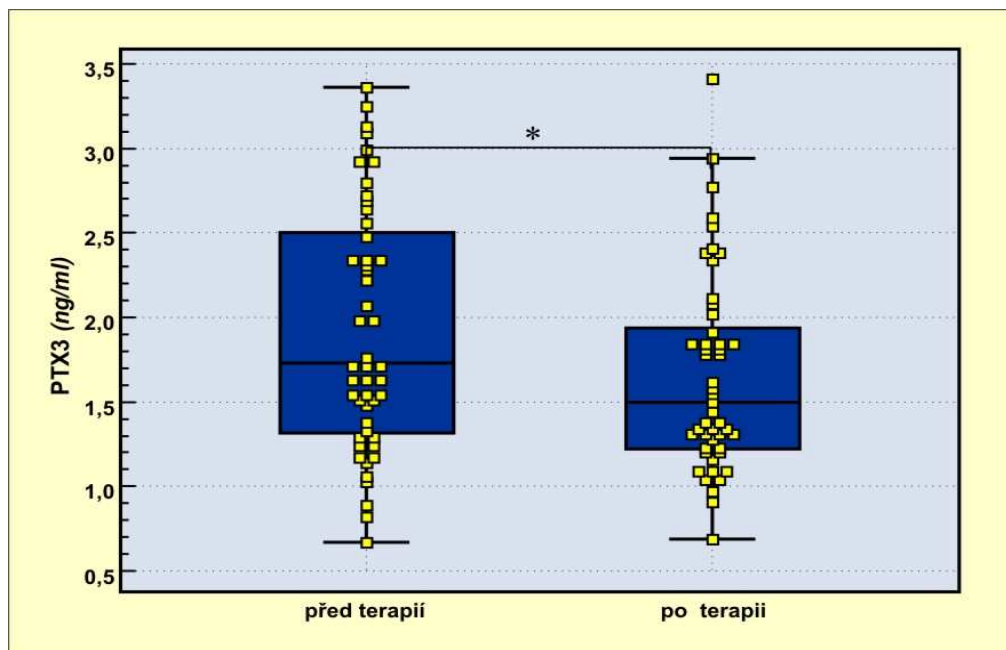


Graf č. 10. Srovnání sérových hodnot pentraxinu 3 (PTX3) u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ($p < 0,001$).



Graf č. 11. Srovnání sérových hodnot CRP u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ($p < 0,001$).

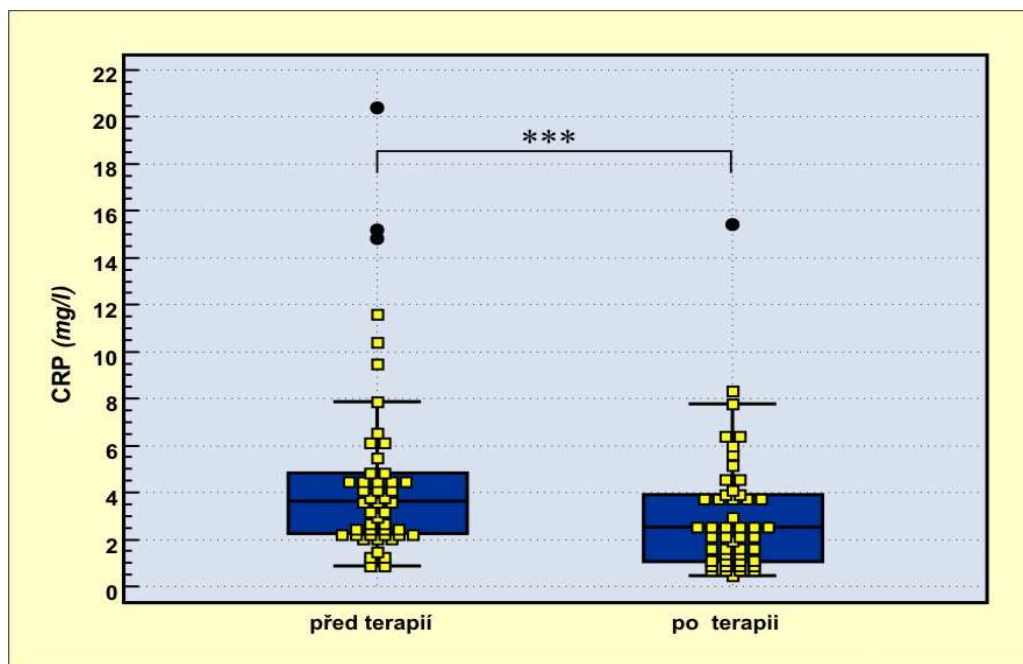
Hladina PTX před léčbou $1,92 \pm 0,72$ ng/ml klesla významně na $1,66 \pm 0,58$ po léčbě ($p < 0,00396$) (**Graf č. 12**).



Graf č. 12. Pokles hladin pentraxinu 3 v průběhu Goeckermanovy terapie psoriázy ($p = 0,0396$).

I po skončení léčby zůstaly koncentrace PTX3 významně vyšší oproti kontrolní skupině ($p < 0,0001$).

Hladina CRP klesla z $4,64 \pm 3,96$ mg/l během léčby na $1,66 \pm 0,58$ mg/l ($p < 0,001$) (**Graf č. 13**).



Graf č. 13. Pokles hladin CRP v průběhu Goeckermanovy terapie psoriázy ($p < 0,001$).

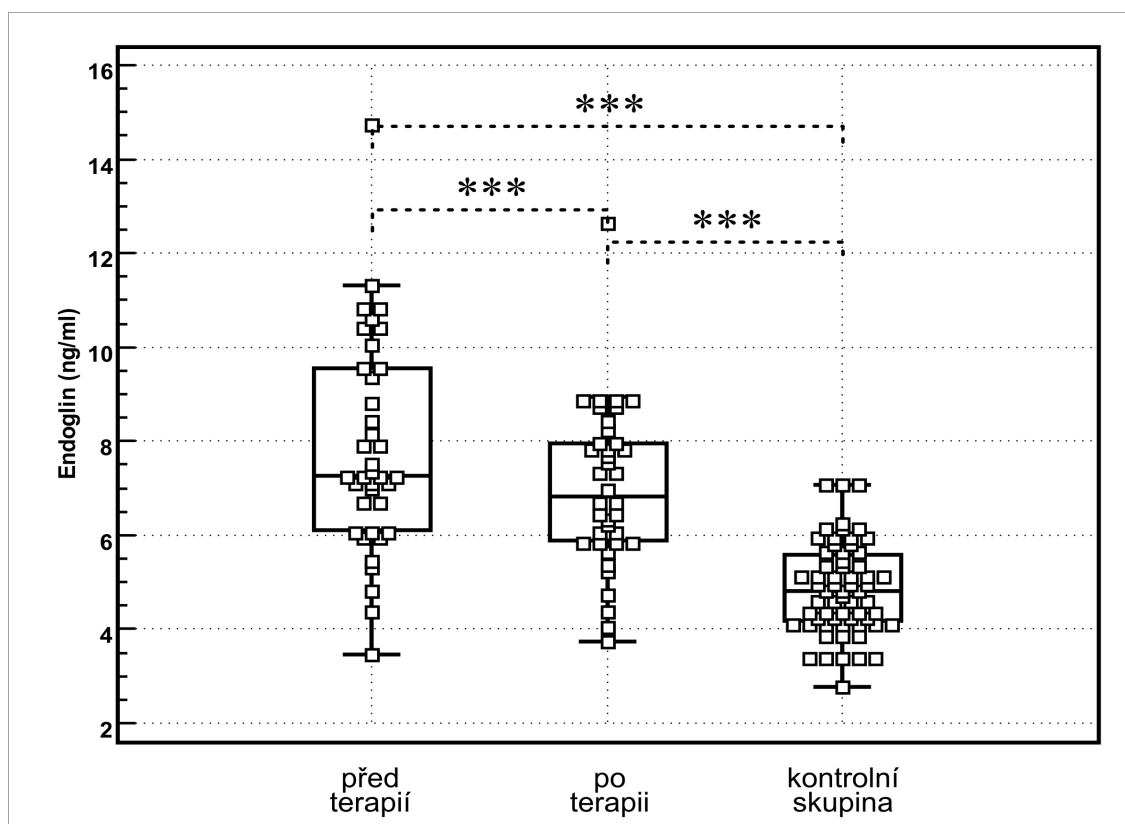
4.4. Stanovení hladin solubilní formy endoglinu (CD105) v sérech pacientů s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií.

Solubilní forma endoglinu (CD105) byla stanovena v sérech 38 dospělých pacientů s psoriázou. Všichni měli pozitivní odezvu na léčbu. Hodnoty PASI skóre poklesly z počáteční hodnoty $19,22 \pm 7,49$ na $8,85 \pm 6,29$ během terapie ($p < 0,001$). Nebyla nalezena významná korelace mezi hodnotami endoglinu a závažností onemocnění vyjádřenou jako PASI skóre před terapií ani po ní.

Goeckermanova terapie vyvolala významný pokles hladin solubilního endoglinu z $7,85 \pm 2,26$ ng/ml před léčbou na $7,01 \pm 1,71$ ng/ml po léčbě ($p = 0,0002$) (**graf č.14.**).

V kontrolní skupině čítající 63 zdravých dobrovolníků byly naměřeny hodnoty endoglinu $4,88 \pm 0,95$ ng/ml. Nebyly nalezeny žádné rozdíly v koncentraci solubilního endoglinu mezi pohlavími ($p = 0,7022$). Ve srovnání s touto kontrolní skupinou byly

hladiny solubilního endoglinu vyšší před léčbou i po léčbě (před terapií i po terapii $p < 0,001$).



Graf č. 14. Pokles hladin solubilní formy endoglinu v průběhu Goeckermanovy terapie psoriázy ($p = 0,0002$).

5. Diskuse

5.1. Úvod

Ve čtyřech prezentovaných pracích jsme hodnotili vybrané ukazatele zánětu a angiogeneze. Ve všech pokusech jsme hodnotili vliv terapeutického působení na pacienty s psoriázou. S ústupem exacerbace choroby byl zjištěn pokles některých parametrů. Všichni pacienti byli léčeni Goeckermannovou terapií. Je to poměrně stará, ale účinná metoda léčby psoriázy, která se užívá již déle než 90 let (293). Její provádění spočívá v kombinaci fototerapie s lokální aplikací dehtu. Obecně vedou obě tyto složky terapie k imunosupresi. Za mechanismus jejich účinnosti při navození remise u psoriázy se obecně považuje útlum efektorových mechanismů zánětu (294). Změna proangiogenního fenotypu k normální vaskulatuře při remisi psoriatické léze vede k otázce, zda Goeckermannova terapie nemá i sekundární antiangiogenní působení.

5.2. Diskuse k práci: *Andrys, C., Borska, L., Pohl, D., Fiala, Z., Hamakova, K., Krejsek, J. Angiogenic activity in patients with psoriasis is significantly decreased by Goeckerman's therapy. Arch Dermatol Res, 2007, 298, s. 479–483*

Práce je zaměřena na vliv Goeckermanovy terapie na hladiny proangiogenních faktorů VEGF a bFGF. VEGF představuje obecnou spouštěcí molekulu angiogenní kaskády společnou pro většinu tkání a modelů angiogeneze (295,296). Růstový faktor bFGF je molekula s výrazným proangiogenním účinkem, byl ale prokázán i její vliv na buněčnou proliferaci a sekreci proteáz. U nádorových modelů podporuje jejich růst a invazivitu. Jeho funkce angiogenní je významně provázána s VEGF. Bylo prokázáno jejich synergické působení. Samotná blokáda bFGF vede k menšímu ústupu neovaskularizace než VEGF (297). Zdá se, že VEGF je klíčový pro iniciaci angiogeneze, zatímco bFGF má vliv spíše na její udržování. V pozdějších udržovacích fázích angiogenního procesu je jejich role možná zastupitelná, jelikož existují důkazy pro kompenzatorní zvýšení bFGF při terapii blokátorem VEGF, která vedla k reaktivaci tumorové angiogeneze (298). Výhodná pro terapii by tedy byla preventivní strategie cílící na obě molekuly.

Zvýšené plazmatické hladiny VEGF byly nalezeny u některých nádorů a jsou ukazatelem špatné klinické předpovědi u nemoci (35). Podobně v případě chronického zánětu u JRA byla nalezena korelace mezi hladinou sérového VEGF a aktivitou onemocnění (80).

U psoriatických pacientů byla prokázána zvýšená sérová hladina VEGF, a to zejména u pacientů s těžšími formami nemoci, jako jsou generalizovaná erythrodermická forma a generalizovaná pustulární psoriáza (296). Vliv VEGF na hyperpermeabilitu bazálních membrán cév byl u těžké generalizované pustulární formy dáván do souvislosti se závažnými mimokožními komplikacemi, jako proteinurie nebo plicní edém (299). Zvýšená exprese VEGF v kůži pokusných myší vede k výsevu psoriasiformních lézí (283). Představa VEGF jako ukazatele angiogeneze u psoriázy, jehož hladina koreluje se závažností nemoci, má tedy svůj teoretický základ. Role FGF u psoriázy není zatím podrobněji prozkoumána. Jsou popisovány jednotlivé případové studie, kdy topická aplikace FGF inhibitoru vedla k zmenšení psoriatických lézí (292).

V naší práci jsme prokázali zvýšené hladiny VEGF u psoriatiků a jejich snížení po úspěšné léčbě. Hladiny VEGF navíc korelovaly s PASI hodnocením tíže nemoci. Dalším měřeným angiogenním působkem byl bFGF. Byly prokázány vyšší hladiny před léčbou a jejich normalizace po terapii. Hladiny korelovaly s PASI. Metoda hodnocení angiogeneze, která by představovala zlatý standard, tedy dokázala dostatečně senzitivně a specificky rozlišit a kvantifikovat míru angiogeneze nebo její regrese in vivo u člověka, dosud nebyla stanovena. Jsou využívány tři hlavní skupiny metod, zobrazovací metody (CT, MRI, PET), stanovování hladin angiogenních molekul (ELISA, imunoblot, PCR, ISH) a počet cirkulujících endotelových buněk či endotelových prekurzorů a jejich subpopulací (průtoková cytometrie) (300). Ke zhodnocení míry angiogeneze bude zřejmě třeba sestavit panel márků a parametrů, který poskytne charakteristický vzor angiogeneze (300). Samostatné hodnocení plazmatických hladin angiogenních faktorů tedy umožňuje jen kvalitativní, hrubé zhodnocení probíhající angiogeneze.

Goeckermanova terapie vede k významnému utlumení angiogeneze. Zajímavá je zvýšená hodnota hladin VEGF u psoriatiků i po terapii. Může znamenat pomalejší dynamiku regrese novotvořených kapilár, které by tak byly první a poslední patologickou změnou. Nebo reprezentovat změněné vlastnosti psoriatických keratinocytů, které si mohou udržovat vyšší bazální sekreci VEGF a tak být stále připraveny k angiogenní

odpovědi.

5.3. Diskuse k práci: Pohl, D., Andrys, C., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. Serum level of a soluble form of endoglin (CD105) is decreased after Goeckerman's therapy of psoriasis. Acta Medica (Hradec Králové), 2011, 54, s. 59–62.

TGF β je pleiotropní cytokin s účastí mnoha informačních sítí organismu. Účinek TGF β na angiogenezi je nejednoznačný. Signalizace TGF β má v různých modelech pro i proti angiogenní působení. Zdá se, že rozhodující je kontext této signalizace zprostředkovaný dalšími zatím ne úplně objasněnými pomocnými signály. Nejznámějším z nich je právě endoglin (CD105), transmembránový pomocný receptor pro TGF β , který je exprimován převážně na aktivovaných a proliferujících endotelových buňkách. Je považován za ukazatel neoangiogeneze. Na subcelulární úrovni moduluje signální cesty TGF β kaskády. Existuje i jeho solubilní forma, pravděpodobně produkovaná enzymatickým štěpením membránové molekuly, která má antagonistickou funkci (301). Endoglin hraje významnou roli v procesech spojených s angiogenezí, v embryogenezi, tumorigenezi, při zánětu a hojení ran (302). Porucha signalizace cestou TGF β se spoluúčastí endoglinu je součástí patofyziologie HHT neboli Rendu-Osler-Weberově nemoci (303,304), kde u jednoho podtypu HHT1 byla nalezena mutace v genu pro endoglin (305).

Zvýšené hladiny solubilní formy endoglinu (sCD105) interferují s TGF β signalizací a vedou k rozvoji endotelové dysfunkce u preeklampsie (306).

Třetí skupinou nemocí jsou nádorová onemocnění, u kterých byla prokázána exprese endoglinu jak na nově tvořené vaskulatuře, tak na samotných nádorových buňkách (307). Vysoká míra jeho exprese v nádorovém cévním řečišti je spojena s horší prognózou u určitých typů nádorů, např. prostaty nebo prsu (307,308,309). Endoglin proto představuje i lákavý terapeutický cíl (310).

Role solubilní formy endoglinu (sCD105) byla zkoumána především u preeklampsie, v jejíž patogenezi hraje zásadní roli. Na základě těchto poznatků se zdá, že sCD105 působí

jako vychytávač pro TGF β a podobné molekuly, a tak interferuje s jeho signalizací. V procesu angiogeneze to znamená tlumivý účinek (311). Antiangiogenního působení sEND by bylo možné využít v terapii.

Endoglin hraje roli i v patogenezi psoriázy. V myším modelu byla řízená zvýšená exprese TGF β v kůži spojena s výskytem lézí podobných psoriatickým (312). Exprese endoglinu v cévách psoriatických lézí u lidí byla již v jiných pracích také zkoumána a byla zvýšena v lézích a snižena v kůži psoriatiků mimo léze (313). Model endoglinu jako angiogenního ukazatele by odpovídal současné představě o podílu novotvorby cév na rozvoji psoriázy.

Hladinami solubilní formy molekuly endoglinu (sCD105) u psoriázy se ještě žádná práce nezabývala.

Goeckermanova terapie psoriázy (GT) v naší práci výrazně zmírnila tíži probíhající exacerbace nemoci, jak bylo demonstrováno na PASI skóre. Sérové hladiny solubilního endoglinu se u pacientů s chronickou psoriázou po terapii výrazně snížily. U nemocných psoriatiků byly hladiny sCD105 před terapií významně vyšší než u zdravých kontrol ($p < 0,001$) a zůstaly vyšší i po léčbě ($p < 0,001$). Nebyla nalezena žádná korelace mezi hladinami endoglinu (před a po terapii) a tíží nemoci vyjádřené pomocí PASI skóre. Zvýšené hladiny sCD105 ukazují na aktivovaný angiogenetický proces v kůži psoriatických lézí. Vyšší exprese endoglinu na novotvořených cévách může znamenat i jeho větší odštěpování na solubilní formu. Z funkčního hlediska představují vyšší hladiny sCD105 v krvi pro angiogenezi tlumivý signál především pro signalizační cestu TGF β a VEGF. Tento mechanismus by mohl představovat kompenzaci pro biologicky velmi aktivní proangiogenní molekuly a jejich systémové účinky (314). Ve světle známé asociace hladin sCD105 a endotelové dysfunkce u preeklampsie se nabízí otázka, zda nemá sCD105 podobný účinek i u psoriázy? U preeklampsie je ale etiologie multifaktorová, jsou prokázány zvýšené hladiny i jiných solubilních scavengerů. Navíc jsou popisované hladiny výrazně vyšší.

5.4. Diskuse k práci: Pohl, D., Andrys, C., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. CC and CXC chemokines patterns in psoriasis determined by protein array method

were influenced by Goeckerman´s therapy. Acta Medica (Hradec Králové), 2009, 52, s. 9–13.

Chemokiny jsou chemotaktické cytokiny s atraktorickou funkcí na různé leukocytární populace. Jedná se o sekundární prozánětlivé mediátory. Jejich produkce je indukovaná identifikací signálů nebezpečí pomocí příslušných receptorů (TLR aj.) následovanou tvorbou prozáněťových faktorů rychlé odpovědi, TNF α , IL-1, IFN γ aj. (315).

U psoriázy byla prokázána produkce řady chemokinů. V akutní fázi přispívají k atrakci leukocytů a rozvoji charakteristických zánětlivých změn v dermis a epidermis. V patogenezi nemoci je infiltrace zánětlivými buňkami po angiogenezi jednou z prvních histologických změn v procesu rozvoje plaku. Z funkčního pohledu předchází infiltrace leukocytů jejich aktivaci a následné fázi odpovědi keratinocytů (316). Uspořádaný proces přesunu zánětlivých buněk do tkání zahrnuje několik fází a je cíleně řízen. Chemokiny toto řízení zprostředkují s vysokou specificitou pro jednotlivé leukocytární populace (317). Různé leukocytární populace dominují v různých fázích rozvoje psoriázy a tomu odpovídají různá chemokinová spektra (318).

V naší práci jsme monitorovali hladiny pěti chemokinů, GRO α (CXCL1), MCP1 (CCL2), RANTES (CCL5), ENA-78 (CXCL5), IL-8 (CXCL8). GRO α , ENA-78 a IL-8 ovlivňují především neutrofilní granulocyty, RANTES působí na T lymfocyty a MCP-1 přitahuje monocyty - makrofágové elementy. V naší práci jsme našli zvýšené hladiny GRO α a MCP-1 před terapií oproti zdravým kontrolám. Naproti tomu hladiny RANTES, ENA-78 a IL-8 před terapií nebyly významně zvýšeny oproti zdravým kontrolám. Během léčby Goeckermanovou terapií významně poklesly hladiny chemokinů MCP-1, GRO α a RANTES. Hodnoty MCP-1 byly i po terapii významně zvýšeny oproti zdravým kontrolám.

Rozvinutá psoriatická léze produkuje velké množství chemokinů v souladu s naší představou o roli traffickingu v patogenezi nemoci. Zvýšené hladiny GRO α a MCP-1 jako chemokinů klíčových pro atrakci populací neutrofilů a makrofágů této představě odpovídají. Zajímavá je nepřítomnost zvýšených hladin IL-8, který je považován za hlavní chemokin odpovědný za přísun neutrofilů a který podle některých prací koreluje s aktivitou nemoci. Je možné, že jsme pacienty zastihli ve fázi pokročilého rozvoje plaku, kdy je veškerý přesun neutrofilů již ukončen. Vzhledem k redundanci cytokinových sítí je možné, že IL-8 v této fázi zastoupí chemokin GRO α . Naše měření bylo navíc provedeno v

populaci dětských pacientů, takže chemokinová spektra by mohla být ovlivněna věkem. Po Goeckermannově terapii nastalo snížení hladin některých chemokinů, což by odpovídalo i klinicky snížení intenzity choroby reprezentované PASI skóre. Snížily se hladiny předtím zvýšených GRO α , MCP-1 a RANTES. To by odpovídalo snížení chemotaktických signálů pro neutrofilů a makrofágů. I po terapii zůstaly stále zvýšeny hladiny MCP-1. Vzhledem ke klíčovému postavení makrofágů v patogenezi a udržování pozdní fáze plaku tato skutečnost možná představuje zbytkovou aktivitu nemoci, která možná v dalším časovém horizontu vymizí a dojde ke snížení hladin MCP-1, nebo ukazuje na stálou subklinickou zánětlivou aktivaci v kůži psoriatických pacientů.

Podobně jsme v první práci zjistili i po terapii zvýšené hladiny VEGF. Jak už bylo uvedeno, makrofágy plní významnou regulační roli v psoriatickém plaku. Jednou z předpokládaných funkcí je i tzv. VRL (vascular regulatory leukocytes) tedy produkce VEGF a příspěvek k angiogennímu fenotypu. Podle této představy by zvýšené hladiny MCP-1 a následně i VEGF ukazovaly na trvalé i když subklinické udržování angiogenního přepínače v zapnuté poloze a tedy zvýšenou tendenci k angiogenní odpovědi v kůži psoriatických pacientů.

5.5. Diskuse k práci: Andrys, C., Borska, L., Pohl, D., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. Goeckerman's therapy for psoriasis with special reference to serum pentraxin 3 level. *Int J Dermatol*, 2008, 47, s. 1011–1014

Pentraxin 3 (PTX3) je nově objeveným proteinem akutní fáze, který sdílí částečnou homologii s krátkým, tzv. klasickým pentraxinem, C-reaktivním proteinem (CRP) (319,320). Zatímco v průběhu reakce akutní fáze je CRP vytvářen v játrech a působí na úrovni celého organismu, PTX3 vzniká přímo v zánětlivém ložisku a jeho působení je lokalizované do postižené tkáně (321). Společnou vlastností obou pentraxinů je aktivace komplementu klasickou cestou. Důraz na lokální milieu vykazuje i funkčně. Zdá se, že PTX3 vykazuje odlišný vliv na komplementový systém v zánětlivé tkáni, kde působí aktivačně (322). Naproti tomu v cirkulaci komplementovou kaskádu inhibuje (323).

PTX3 se uplatňuje také jako solubilní receptor pro nebezpečné vzory. Podílí se na

opsonizaci některých infekčních agens (324). Byla prokázána jeho vysoká afinita k angiogennímu působku FGF2. PTX3 tak působí antiangiogenně a podílí se na jemné regulaci spolupráce angiogeneze a zánětu (325).

Hlavními buněčnými elementy, které produkují PTX3 jsou populace aktivovaných buněk, zejména monocyty, dendritické a endotelové buňky. Syntéza PTX3 je v nich indukována působením prozáněťových cytokinů TNF α a IL-1b a mikrobiálních komponent (LPS) (324). Synergisticky s účinkem LPS se na zvýšené produkci PTX3 podílí také IL-10. IFN γ , stejně jako IL-4 mají z hlediska produkce PTX3 efekt inhibiční (324). Naopak malý vliv na produkci PTX3 je popisován v případě IL-6, hlavního induktoru syntézy hepatálních proteinů včetně CRP (326). Vysoké hladiny PTX3 byly prokázány u pacientů se systémovými autoimunitními chorobami (327), u pacientů s celkovou aktivací imunitního systému (SIRS až septický šok). Zvýšené hladiny s rychlou kinetikou se velmi rychle objevují i po infarktu myokardu (328). Zvýšené hladiny PTX3 se tedy objevují u stavů s akutní či chronickou aktivací imunitního systému a byla prokázána jejich korelace s tíží a prognostickou závažností nemoci (329).

Byly popsány významně zvýšené hladiny PTX3 v plazmě psoriatických pacientů. Odráží tak pravděpodobně výraznou aktivaci zánětlivou, ale i endotelového systému (330). V naší studii provedené u pacientů léčených Goeckermanovou terapií bylo dosaženo významné klinické odpovědi na terapii. Hodnoty PASI po terapii významně poklesly. Nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami CRP a PTX3 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre. Ve srovnání s hodnotami v kontrolní skupině zdravých dárců krve byly hodnoty PTX3 a CRP před léčbou významně vyšší a během léčby poklesly. I po skončení léčby zůstaly koncentrace PTX3 významně vyšší oproti kontrolní skupině. Po Goeckermannově terapii dochází obecně k imunosupresi a stejně tak PTX3 a CRP klesá. Zajímavá je zvýšená hladina PTX3 po terapii. Opět se nabízí možnost stále vyšší úrovně lokální zánětlivé aktivity v kůži psoriatiků i bez exprese lézí. CRP je po terapii snížen na normální hodnoty. Celková reakce organismu na lokální zánět tedy po léčbě odeznívá.

6. Souhrn

Úvod:

Psoriáza je jedna z nejčastějších kožních nemocí, která postihuje okolo 2-3% evropské populace. Její hlavní klinický projev je tvorba charakteristických červených makulózních lézí na kůži. Klíčové patologické znaky psoriatického plaku jsou infiltrace buňkami zánětu, poruchy proliferace a maturace keratinocytů a angiogeneze.

Současné strategie léčby psoriázy se soustředí na navození remise. Jeden z historicky nejstarších, účinných, ačkoliv dodnes pouze empirických léčebných přístupů je Goeckermanova terapie (GT). Ta spočívá v kombinaci topické aplikace uhelného dehtu s následným ozářením UV světlem.

Cílem této práce bylo zkoumat vliv GT na různé ukazatele zánětu a angiogeneze a tak pomoci rozšířit a prohloubit poznatky o jejích mechanismech účinku a terapeutických terčích. Pro monitorování zánětu byly vybrány pentraxiny CRP a PTX3, jako ukazatele angiogeneze pak VEGF, bFGF a endoglin (CD105).

Nemocní a metodiky:

Klinická část práce probíhala na Klinice nemocí kožních a pohlavních FN Hradec Králové. Do souboru pacientů byli zahrnuti jak dospělí, tak dětští psoriatictí pacienti. Aktivita nemoci a účinnost léčby byla hodnocena vyšetřujícím dermatologem pomocí PASI skóre. Vzorky venózní krve byly odebrány před terapií a po jejím ukončení při propuštění z oddělení.

Výsledky:

PTX3 a CRP: Cílem první práce bylo zhodnotit vliv GT na hladiny dvou pentraxinů: dlouhého pentraxinu PTX3 a krátkého pentraxinu CRP. Oba pentraxiny jsou považovány za parametry aktivace zánětlivé odpovědi a to jak lokální (PTX3), tak celkové (CRP). Do práce bylo zahrnuto 49 pacientů s chronickou psoriázou. CRP bylo měřeno imunonefelometrií a PTX3 metodou ELISA. Sérové hladiny obou parametrů se po GT významně snížily. Hladiny PTX3 se snížily z $1,92 \pm 0,72$ ng/ml před GT na $1,66 \pm 0,58$ ng/ml po GT ($p = 0,0396$) a hladiny CRP z $4,64 \pm 3,93$ mg/l na $1,66 \pm 0,58$ ($p < 0,0001$). Ve srovnání se zdravými dobrovolníky byly hladiny obou parametrů před GT zvýšené a zůstaly zvýšené i po ukončení terapie. U nemocných psoriázou léčených GT dochází k významnému snížení hodnot PTX3 a CRP.

Chemokiny: Cílem této práce bylo zhodnotit vliv GT na hladiny vybraných proangiogenních chemokinů ENA-78, GRO alfa, IL-8, MCP-1 a RANTES v periferní krvi 22 dětských psoriatických pacientů. Jako kontrolní skupina sloužilo 22 zdravých dětí. Sérové hladiny chemokinů byly stanoveny pomocí techniky membránových proteinových array. Účinnost GT byla vyjádřena jako PASI skóre. GT významně zmenšila aktivitu nemoci ($p < 0,001$). Sérové hladiny GRO alfa a MCP1 u psoriatiků před GT byly významně vyšší než u kontrol. (GRO alfa $p = 0,0128$, MCP1 $p = 0,0003$). Sérové hladiny GRO alfa, MCP1 a RANTES se po GT významně snížily (GRO alfa $p = 0,002$, MCP1 $p = 0,048$, RANTES $p = 0,0131$). Ve srovnání se zdravými dobrovolníky zůstaly hladiny MCP1 zvýšené i po dokončené terapii ($p < 0,0001$). Nalezli jsme tedy významný pokles v některých prozánětlivých, proangiogenních chemokinech po proběhlé GT, zvláště pak MCP1, GRO alfa a RANTES. Tento pokles plazmatických hladin může být odrazem poklesu angiogenní aktivity u psoriázy po GT.

VEGF, bFGF: Cílem této práce bylo zhodnotit vliv GT na angiogenní aktivitu srovnáním sérových hladin VEGF a FGF před a po terapii. VEGF je zásadní proangiogenní faktor. Představuje první krok kaskády angiogenní regulace, je odpovědný za zahájení růstu cév v do té doby klidové tkáni, tedy zapnutí „angiogenic switch“. bFGF vykazuje synergický účinek s VEGF. Jeho role je však spíše v pozdější fázi již iniciované angiogeneze. Do studie bylo zařazeno 44 pacientů s psoriázou a 40 zdravých dárců krve jako kontrolní skupina. Účinnost GT na aktivitu nemoci byla zhodnocena pomocí PASI skóre. Po terapii došlo k významnému snížení intenzity projevů psoriázy ($p < 0,001$). U pacientů před léčbou byla nalezena významná korelace hladin VEGF a bFGF s PASI skóre. Sérové hladiny VEGF ($329,4 \pm 125,5$ pg/ml) a bFGF ($10,2 \pm 5,04$ pg/ml) u pacientů před léčbou byly významně vyšší než u zdravých dobrovolníků (VEGF $236,4 \pm 55,9$ pg/ml, bFGF $7,3 \pm 3,7$ pg/ml). Sérové hladiny VEGF a bFGF se po GT významně snížily. (VEGF $278,5 \pm 109,9$ pg/ml, FGF $7,78 \pm 4,5$ pg/ml). Hladiny bFGF po terapii se normalizovaly ($p = 0,5723$), naproti tomu hodnoty VEGF zůstaly i po GT vyšší než v kontrolní skupině ($p = 0,0319$). Můžeme říci, že proangiogenní aktivita, která je u angiogeneze výrazná, je významně utlumena po GT terapii.

Endoglin: Cílem poslední práce bylo zhodnotit vliv GT na hladiny solubilního endoglinu (sCD105). Endoglin (CD105) je transmembránový pomocný receptor pro TGF beta, který je exprimován převážně na aktivovaných a proliferujících endotelových

buňkách. Je považován za ukazatel neoangiogeneze. Solubilní forma endoglinu, pravděpodobně produkována enzymatickým štěpením membránové molekuly, má antagonistickou funkci a její zvýšené hladiny jsou spojeny s rozvojem eklampsie, nemoci těhotných s potenciálně závažnými následky. U psoriatických lézí byla oproti zdravým kontrolám zjištěna zvýšená exprese endoglinu v psoriatických lézích a snižena v kůži psoriatických mimo léze. Hladinami sCD105 u psoriázy se zatím žádná práce nezabývala.

GT výrazně zmírila tíži probíhající exacerbace nemoci (významný pokles PASI skóre, $p < 0,001$). Sérové hladiny solubilního endoglinu se u pacientů s chronickou psoriázou výrazně snížily po GT. Ze $7,85 \pm 2,26$ ng/ml před GT klesly na $7,01 \pm 1,71$ ng/ml ($p = 0,0002$). U nemocných psoriatických byly hladiny sCD105 před GT významně vyšší než u zdravých dobrovolníků ($4,85 \pm 0,95$ ng/ml), ($p < 0,001$) a zůstaly vyšší i po léčbě ($p < 0,001$). Nebyla nalezena žádná korelace mezi hladinami endoglinu (před a po GT) a tíží nemoci (vyjádřené jako PASI skóre).

Závěr:

Ze souhrnu výsledků výše uvedených prací lze dovést, že GT ovlivňuje patofyziologické mechanismy zapojené v rozvoji psoriázy. Zaznamenali jsme významné změny jak v ukazatelích zánětu, tak angiogeneze. Specifická léčebná modalita, která by cíleně působila na iniciační mechanismy psoriázy a vedla k vyléčení choroby, zatím není známa. Současné terapeutické strategie včetně GT jsou zaměřeny na ovlivnění efektorových mechanismů nemoci, tedy na navození remise a/nebo prevence dalších exacerbací. Zhodnocení vlivu těchto klasických terapií na nově objevené patofyziologické mechanismy může pomoci objasnit společné cesty působení klasických, klinicky účinných terapií a vytipovat možné terapeutické cíle pro vývoj budoucích léčiv.

6. Summary

Psoriasis is one of the most common skin diseases affecting about 2-3% of the caucasian population. Its clinical presentation is the formation of red scaled plaques on the skin. The main pathological features of psoriatic plaque comprise the skin inflammation, disturbances of keratinocyte proliferation and maturation and angiogenesis. Although the precise precipitating mechanism of psoriasis has not been discovered yet, the key element in psoriasis initiation is T- lymphocyte population. Nevertheless, other inflammatory cells (e.g. neutrophils, macrophages) as well as activated endothelium play a role in its pathogenesis. Indeed, one of the first histological changes in the affected skin is leukocyte infiltration. The so called trafficking of inflammatory cells to the skin is tightly regulated process guided by cytokines especially by chemokines. Angiogenesis is a process of new blood vessel growth from preexisted vessel bed. Vessels in the most of the tissues of adult individual remain in a state of quiescence. The rate of endothelial cell turnover is relatively slow (1-2 years). However in cases of physiological or pathological requirements, a new vessel formation can be initiated by the mechanism called angiogenic switch. One of the pathological conditions associated with angiogenesis is formation of psoriatic plaques. Treatment for psoriasis that would cure the disease once and for all is presently not known. Current therapeutic strategies are focused on instigating remission. One of the oldest effective albeit empirical treatments is Goeckerman's therapy (GT). It is a combination of topical application of coal tar ointment with subsequent UV irradiation. Although its mechanisms of action are not fully elucidated as of yet, one of its hallmarks is marked immunosuppression. The aim of this study was to elucidate the effect of GT on various markers of inflammation and angiogenesis in the patients with psoriasis and thus help to further extend understanding of its mechanisms and targets of action. Both adult and pediatric psoriasis patients in whom psoriasis was diagnosed and who were treated by GT at the Department of Dermatology and Venereology, University Hospital in Hradec Kralove, were enrolled to our investigation which was approved by the Ethics Committee of University Hospital. Disease activity and treatment efficacy were justified by standardized PASI score as assessed by referring dermatologist. Samples of venous blood were taken from patients before therapy and at the date of dismissal from the hospital ward.

PTX3 and CRP: The aim of the first study was to evaluate the influence of Goeckerman's therapy of psoriasis on levels of two pentraxins: long pentraxin PTX3 and C reactive protein in 49 patients with chronic plaque psoriasis. Both pentraxins are presumed to be markers of activated local (PTX3) and systemic (CRP) inflammatory response. CRP was assessed by immunonephelometry on IMMAGE 800 (Beckman, USA). PTX3 was detected using sandwich ELISA detection set (Alexis Biochemicals, Switzerland). The serum levels of both parameters (expressed as average \pm 1 SD) were significantly diminished after GT. The level of PTX3 dropped from 1.92 ± 0.72 ng/ml before GT to 1.66 ± 0.58 ng/ml after GT ($p = 0.0396$) and the level of CRP fell from 4.64 ± 3.93 mg/l to 1.66 ± 0.58 mg/l ($p < 0.0001$). Compared to healthy controls, the serum levels of both parameters before GT were significantly higher than those found in healthy blood donors and remained significantly increased after GT. Increased serum concentrations of pentraxin 3 and CRP are alleviated by GT in patients with psoriasis.

Chemokines: Chemokines in psoriasis are considered to reflect increased inflammatory cell trafficking to the site of developing psoriasis plaque that contributes to histological feature of lesional leukocyte infiltration. In addition, either antiangiogenic or proangiogenic properties were observed in some chemokines. The aim of this study was to evaluate the influence of Goeckerman's therapy of psoriasis on the levels of proangiogenic chemokines ENA-78 (CXCL5, Epithelial Cell Derived Neutrophil Attractant-78), GRO alpha (CXCL1, Growth-Related Oncogene), IL-8 (CXCL8, Interleukin-8), MCP-1 (CCL2, Monocyte Chemotactic (Chemoattractant) Protein 1) and RANTES (CCL5, Regulated on Activation of Normal T Cell Expressed and Secreted) in peripheral blood of 22 children's patients with psoriasis. 22 otherwise healthy children serve as a control group. The serum levels of chemokines were determined by commercial membrane protein array technique (RayBiotech, USA). Efficacy of Goeckerman's therapy was delineated by PASI score. Disease activity was significantly diminished by Goeckerman's therapy ($p < 0.001$). Serum levels of GRO alpha and MCP-1 in patients before GT were significantly higher than those measured in healthy blood donors (GRO alpha: $p = 0.0128$ and MCP-1: $p = 0.0003$). Serum levels of GRO alpha, MCP-1 and RANTES were significantly diminished by GT (GRO alpha: $p = 0.002$, MCP-1: $p = 0.048$ and RANTES: $p = 0.0131$). Compared to the healthy controls, serum level of MCP-1 remained significantly increased in psoriasis patients after GT ($p < 0.0001$). In conclusion, we found that the GT of psoriasis influenced

the serum levels of proinflammatory and proangiogenic chemokines, especially GRO alpha, MCP-1 and RANTES. It could be the cause for decreased proangiogenic activity which is described after GT of psoriasis.

VEGF, bFGF: VEGF is a principal angiogenic factor responsible for angiogenesis initiation thus representing the turning on of the angiogenic switch. bFGF has a synergistic effect with VEGF, but its main role seems to maintain angiogenic process once it is initiated. The aim of this study was to evaluate the influence of GT of psoriasis on angiogenic activity by comparing serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in 44 patients with psoriasis in peripheral blood samples collected before and after therapy. Forty otherwise healthy blood donors serve as a control group. The efficacy of GT was delineated by psoriasis area and severity index (PASI). The disease activity was significantly diminished by GT ($p < 0.001$). The serum levels of both VEGF and bFGF were significantly correlated to PASI value in patients before the treatment by GT. The serum levels of VEGF (329.4 ± 125.5 pg/ml) and bFGF (10.2 ± 5.04 pg/ml) in patients before GT were significantly higher than those measured in healthy blood donors (VEGF 236.4 ± 55.9 pg/ml, bFGF 7.3 ± 3.7 pg/ml). The serum levels of both VEGF and bFGF were significantly diminished by GT. The level of VEGF dropped from 329.4 ± 125.5 pg/ml before GT to 278.5 ± 109.9 pg/ml after GT ($p = 0.0042$) and the level of bFGF fell from 10.2 ± 5.04 to 7.78 ± 4.5 pg/ml ($p = 0.019$). Comparing to healthy controls, the serum level of bFGF in psoriasis patients was normalized ($p = 0.5723$) after GT. In contrast, the serum level of VEGF remained significantly increased in psoriasis patients after GT in comparison to healthy blood donors ($p = 0.0319$). In conclusion, we found that the angiogenic potential which is abnormally increased in patients with psoriasis is significantly alleviated by GT.

Endoglin: The aim of the last study was to evaluate the influence of GT of psoriasis on serum levels of soluble endoglin (sCD105). Endoglin (CD105) is a transmembrane co-receptor for TGF beta that is preferentially expressed on activated and proliferating endothelial cells. It is considered as a marker of angiogenesis. The soluble form of endoglin is considered to be shed by enzymatic splicing of the surface molecule. It is thought to play an antagonistic role in angiogenic signaling as shown in pathophysiology of preeclampsia where its elevated levels precede the onset of the disease and are correlated with its severity. A higher lesional expression of endoglin and lower expression

in non lesional skin was demonstrated in psoriatic patients when compared to the skin of control normal population. As of yet there was no study on the levels of soluble endoglin in psoriasis. The disease activity was significantly alleviated by GT (PASI score of 19.22 ± 7.49 before therapy lowered to 8.85 ± 6.29 after therapy; $p < 0.001$). Serum levels of soluble endoglin (sCD105) in patients with chronic psoriasis were significantly lowered after GT. From 7.85 ± 2.26 ng/ml to 7.01 ± 1.71 ng/ml ($p = 0.0002$). The levels of sCD105 before GT were significantly higher than those of healthy controls (4.85 ± 0.95 ng/ml) ($p < 0.001$) and remained higher even after therapy ($p < 0.001$). However, there was no correlation found between levels of sCD105 (be it before or after therapy) and disease activity (as expressed by PASI scoring).

Conclusion: We can conclude that GT influences pathophysiological processes involved in psoriasis progression. Changes in markers of both inflammation and angiogenesis were observed. Finding of a specific treatment focused on psoriasis initiation mechanisms and leading to the complete cure (without further exacerbation) might not be achieved in the near future. Current therapeutic strategies are targeting effector mechanisms of psoriasis with the goal to achieve remission and/or to prevent new exacerbation. Reassessing the effect of these classical therapies on various (newly discovered) pathophysiological disease mechanisms can elucidate disease pathways and help to find possible targets for future drug development. Our findings with GT and inflammation and angiogenesis markers represent such effort.

7. Závěr

Cílem této práce bylo zhodnotit vybrané ukazatele jednotlivých etiopatologických dějů psoriázy a jejich dynamiku v souvislosti s Goeckermanovou terapií. Protože je psoriáza chronické zánětlivé onemocnění, na jejímž rozvoji se podílí i angiogeneze, byly vybrány parametry účastnící se jednoho i druhého procesu.

Spíše než mechanismy spojenými s iniciací psoriatické exacerbace, které jsou stále relativně neobjasněné, se naše práce zabývala mediátory pozdní, udržovací fáze rozvoje plaku. V této fázi převažují již efektorové mechanismy související s chronickým průběhem nemoci. Hlavní je zde působení aktivovaných makrofágů, keratinocytů a samozřejmě endotelu. Naopak vliv paměťových T lymfocytů ustupuje do pozadí.

Je to právě tato fáze plně vyjádřené kožní aktivity, kdy se zahajuje léčba. A právě efekt terapie na tyto mechanismy determinuje její účinnost. Účinná léčba by teoreticky měla zasahovat zástupné faktory patofyziologických dějů psoriázy jako své cíle.

Byly vybrány následující skupiny ukazatelů: chemokiny, odpovědné za usměrněný pohyb leukocytů, které u psoriázy též souvisejí s udržováním prozánětlivého prostředí vhodného k aktivaci paměťových T lymfocytů. Další skupinou jsou parametry prozánětlivé signalizace, která je podkladem sebeudržování chronického zánětu (PTX3). A nakonec proangiogenní molekuly (VEGF, bFGF) jako indikátory setrvalé přemrštěné aktivity angiogeneze

Do výzkumné sestavy byli zařazeni dospělí i děti s prokázanou diagnózou psoriázy, u kterých byla na Klinice nemocí kožních a pohlavních FN Hradec Králové indikována Goeckermanova terapie. Terapie probíhala dle standardních protokolů a závažnost onemocnění i léčebný účinek GT byl verifikován pomocí změny PASI skóre.

Vzorky krve a moči byly od pacientů léčených Goeckermanovou terapií odebírány před začátkem léčby a v den propuštění z nemocniční péče. Ve skupině dětských pacientů s psoriázou, kteří byli indikováni ke Goeckermanově terapii, byla sledována angiogenní aktivita pomocí měření sérových hladin angiogenních faktorů. Ke stanovení angiogenních faktorů byl zvolen dvojitý metodický přístup. Hladiny bFGF a VEGF byly měřeny ELISA technikou a koncentrace chemokinů IL-8, RANTES, GRO alfa, MCP-1 a ENA-78 byly stanoveny multiplexovou metodou proteinových arrays. Během terapie došlo k významnému poklesu chemokinů MCP-1, GRO alfa, RANTES, bFGF a VEGF.

Hladiny VEGF i bFGF významně korelovaly s hodnotami PASI skóre před léčbou.

Byla provedena pilotní studie změn hladin pentraxinu 3 u pacientů s psoriázou ve srovnání se zdravými dobrovolníky a bylo zjišťováno možné ovlivnění pentraxinu 3 léčbou psoriázy Goeckermanovou terapií. Ve srovnání s hodnotami v kontrolní skupině zdravých dárců krve byla hodnota PTX3 před léčbou významně vyšší a v průběhu terapie došlo k signifikantnímu poklesu. I po skončení léčby zůstaly koncentrace PTX3 významně vyšší oproti kontrolní skupině.

Podarilo se nám prokázat významné změny cytokinových profilů v závislosti na Goeckermanově terapii. Převedení pacientů do remise je tedy spojeno s útlumem chronického zánětu a angiogeneze. Zda je antiangiogenní účinek GT primárním dějem či sekundární složkou závislou na ústupu zánětu, zůstává nejasné.

Přes účinnost léčby exacerbací zůstává psoriáza stále nevyлéčitelnou nemocí. Terapií jsou potlačeny efektorové mechanismy a nikoliv iniciální děj, který pravděpodobně souvisí s aktivací T-lymfocytárního systému. Nemoc pak tedy přetrvává v dormantní formě bez klinických příznaků. Tomu odpovídají zjištění popsána v literatuře, že jak imunitní systém, tak nepostižená kůže psoriatiků vykazuje abnormální vlastnosti i v období bez exacerbací.

Jisté bazální aktivity choroby, třebaže klinicky nevyjádřené, by mohly odpovídat i námi zjištěné vyšší hladiny VEGF, PTX3 a MCP-1 po skončené léčbě.

K možným strategiím ovlivnění efektorových mechanismů psoriázy patří i útlum angiogeneze. Samotná myšlenka je stará více než 40 let, kdy byla vyslovena samotným pionýrem výzkumu angiogeneze Judou Folkmannem. Od myšlenky k praxi je dost dlouhá cesta. I teď je výzkum v této oblasti ve svých počátcích. Zhodnocení terapeutických možností ovlivnění angiogeneze u psoriázy vyžaduje jednak dokonalejší poznání angiogenních mechanismů, jednak pochopení patofyziologie psoriázy. V této práci jsme ukázali, že klasická Goeckermanova terapie vedoucí k objektivnímu zmírnění příznaků, vede k snížení aktivity v angiogenních regulačních sítích.

Jedním z budoucích prospektů angiogenní terapie je koncept dlouhodobé, chronické antiangiogenní terapie. Ta předpokládá nízkou toxicitu (je navrženo využití endogenních angiostatických molekul, např. endostatínu) a vhodný model aplikace jako je využití genové terapie. Tento koncept by byl ideální pro udržovací léčbu psoriázy.

Ačkoliv specifické léčby vyvolávajících iniciačních mechanismů a tak *de facto* vyléčení psoriázy se nemusíme v dohledné době dočkat, může se stále věnovat úsilí zdokonalování

terapie exacerbací či jejich prevence, tedy terapie cílená na efektorové mechanismy. K těm patří prozánětlivé mikroprostředí aktivující paměťové T-lymfocyty, chronický zánět i trvalá aktivace angiogeneze. K vývoji takových léků bude jistě zapotřebí vhodný panel ukazatelů, které potvrdí na modelech možný budoucí léčebný efekt. Zhodnocení míst zásahu jednotlivých současných účinných terapií, i těch klasických, jako je Goeckermanova terapie, pomůže najít společné mechanismy účinku, a tedy i cíle budoucí léčby. Přestože ke všem možným budoucím terapeutickým implikacím výzkumu psoriázy vede ještě dlouhá cesta, nelze polevit v úsilí zlepšovat léčebné postupy s cílem pomoci nemocným s psoriázou.

8. Literatura

1. Hall, A.P., The role of angiogenesis in cancer. *Comp Clin Patol*, 2005, 3, s. 95-99.
2. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, 285, s. 1182–1186.
3. Folkman, J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol*, 2001, 28, s. 536-542.
4. Djonov, V.G., Kurz, H., Burri, P.H. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn*, 2002, 224, s. 391-402
5. Carmeliet, P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Int Med*, 2004, 255, s. 538–561.
6. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, 380, s. 435–439.
7. Ferrarra, N., Carver Moore, K., Chen, H. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 1996, 380, s. 435–439.
8. Gale, N.W., Dominguez, M.G., Noguera, I. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, s. 15949-15954.
9. Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, 1999, 284, s. 1534-1537.
10. Bourdeau, A., Dumont, D.J., Letarte, M. A murine model of hereditary hemorrhagic telenagiectasia. *J Clin Invest*, 1999, 104, s.1343-51.

11. Abdalla, S.A., Letarte, M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*, 2005, 43, s. 97–110.
12. Ploplis, V.A., Carmeliet, P., Vazirzadeh, S., Van Vlaenderen, I., Moons, L., Plow, E.F., Collen, D. Effect of disruption of plasminogen gene on thrombosis, growth and health in mice. *Circulation*, 1995, 92, s. 2585-2593.
13. Kyriakides, T.R., Zhu, Y.H., Smith, L.T. Mice That Lack Thrombospondin 2 Display Connective Tissue Abnormalities That Are Associated with Disordered Collagen Fibrillogenesis, an Increased Vascular Density, and a Bleeding Diathesis. *JCB Home*, 1998, 140, s. 419.
14. Colwell, A.S., Beanes, S.R., Soo, C., Dang, C., Ting, K., Longaker, M.T., Atkinson, J.B., Lorenz, H.P. Increased angiogenesis and expression of VEGF during scarless repair, *Colwell, Plast Reconstr Surg*, 2005, 115, s. 204-212.
15. Pola, R., Ling, L.E., Aprahamian, T.R., Barban, E., Bosch-Marce, M., Curry, C., Corbley, M., Kearney, M., Isner, J.M., Losordo, D.W. Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation*, 2003, 108, s. 479–485
16. Hobson, B., Denekamp, J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer*, 1984, 49, s. 405–413.
17. Kamba, T., Tam, B.Y., Hashizume, H. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290, s. 560-576.
18. Kamba, T., McDonald, D.M. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer*, 2007, 96, s. 1788-1795.
19. Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 2007, 127, s. 514-525.
20. Falanga, V., Eaglstein, W.H. The "trap" hypothesis of venous ulceration. *Lancet*, 1993, 341, s. 1006-1008.
21. Falanga, V., Eaglstein, W.H. The "trap" hypothesis of venous ulceration. *Lancet*, 1993, 341, s. 1006-1008.
22. Steed, D. Clinical Evaluation of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor for the Treatment of Lower Extremity Ulcers. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 2006, 117, s. 143S-149S.
23. Roeckl-Wieedman, I., Roeckl-Wiedmann, B.M., Kranke, P. Systematic review of hyperbaric oxygen in the management of chronic wounds. *British Journal of Surgery*, 2005, 92, s. 24–32.

24. Folkman, J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, 285, s. 1182-1186.
25. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma, *N Engl J Med*, 1991, 324, s. 1-8.
26. Weidner N. Intramural microvessel density a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*, 1995, 147, s. 9–19.
27. Rajkumar, V., Leong, T., Roche, P. Prognostic Value of Bone Marrow Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*, 2000, 6, s. 3111.
28. Perez-Atayde, A.R., Sallan, S.E., Tedrow, U. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*, 1997, 150, s. 815-821.
29. Smolej, L., Benesova, P. Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2006, 107, s. 2742–2743.
30. Folkman, J. 2001, Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol*, 2001, 28, s. 536-542.
31. Wipff, J., Avouac, J., Borderie, D. Disturbed angiogenesis in systemic sclerosis: high levels of soluble endoglin. *Rheumatology*, 2008, 47, s. 972-975.
32. Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S., Wang J.M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 1994, 25, s.1794-1798.
33. Chang, E., Yang, J., Nagavarapu, U. Aging and survival of cutaneous microvasculature. *J Invest Dermatol*, 2002, 118, s. 752-758.
34. Kang, D.H., Anderson, S., Kim, Y.G. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37, s. 601-611.
35. Martinez, P., Esbrit, P., Rodrigo, A. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporos Int*. 2002, 13, s. 874-881.
36. Abdalla, S.A., Letarte, M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia:current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*, 2006, 43, s. 97–110.
37. ten Dijke, P., Arthur, H.M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8, s. 857-869.
38. Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F. CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 2006, 355, s. 992–1005.

39. White, C.W., Sondheimer, H.M., Crouch, E.C. Treatment of pulmonary hemangiomas with recombinant interferon alpha. *N Engl J Med*, 1989, 320, s. 1197-1200.
40. Folkman, J. Successful treatment of an angiogenic disease. *N Engl J Med*, 1989, 320, s. 1211-1212.
41. Folkman, J. Angiogenesis : an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6, s. 273-286.
42. Savage, D.G., Antman, K.H. Imatinib mesylate: a new oral targeted therapy, *N Engl J Med*, 2002, 347, s. 67-68.
43. Koike, N., Fukumura, D., Gralla, O. Tissue engineering: creation of long lasting blood vessels. *Nature*, 2004, 428, s. 138-139.
44. Denekamp, J. Endothelial cell proliferation. *Br J Cancer*, 1984, 49, s. 405-413.
45. Nanda, A., St. Croix B. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy, *Curr Opin Oncol*. 2004, 16, s. 44-49.
46. Kerbel, R.S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioassays*, 1991, 13, s. 31-36.
47. Thorpe, P.E., Chaplin, D.J., Blakey, D.C. The first international conference on vascular targeting: Meeting overview. *Cancer Res*, 2003, 63, s. 1144-1147.
48. Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol*, 2004, 165, s. 35-52.
49. Jain, R.K., Normalizing tumor vasculature with anti angiogenic therapy :a new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine*, 2001, 7, s. 987-989.
50. Casanovas, O., Hicklin D.J., Bergers G., Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*, 2005, 8, s. 299-309.
51. Tille, J.C., Wood, J., Mandriota, S.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299, s. 1073-1085.
52. Teicher, B.A., Dupuis, N.P., Robinson, M.F. Antiangiogenic treatment (TNP-470/minocycline) increases tissue levels of anticancer drugs in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Oncol Res*, 1995, 7, s. 237-243.

53. Jain, R.K. Normalizing tumor vasculature with anti angiogenic therapy :a new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine*, 2001, 7, s. 987–989.
54. Slaton, J.W., Perrotte, P., Inoue, K. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res*, 1999, 5, s. 2726-2734.
55. Gupta, K., Zhang, J. Angiogenesis: A curse or cure? *Postgrad Med J*, 2005, 81, s. 236–242.
56. Teicher B, Holden SA, Gulshan A, , Potentiation of cytotoxic cancer therapies TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents, 1994, *International Journal of Cancer*, Volume 57, Issue 6, s.920–925
57. Gasparini, G., Longo, R., Fanelli, M. Combination of Antiangiogenic Therapy With Other Anticancer Therapies: Results, Challenges, and Open Questions. *J Clin Oncol*, 2005, 23, s. 1295-1311.
58. Ferrara, N., Kenneth, J.H., Gerber, H.P. Discovery and development of Bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer, *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3, s. 391–400.
59. Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non small lung cancer. *N Engl J Med*, 2006, 355, s. 2542-2550.
60. Traina, T.A., Rugo, H.S., Dickler, M. Bevacizumab for advanced breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007, 21, s. 303-319.
61. Li, H., Fu, X., Zhang, L., Huang, Q., Wu, Z., Sun, T. Research of. PDGF-BB gel on the wound healing of diabetic rats and its pharmacodynamics. *J Surg Res*, 2008, 145, s. 41–48.
62. White, C.W., Sondheimer, H.M., Rouch, E.C. Treatment of pulmonary hemangiomas with recombinant interferon alpha. *N Engl J Med*, 1989, 320, s. 1197-1200.
63. Folkman, J. Successful treatment of an angiogenic disease. *N Engl J Med*, 1989, 320, s. 1211-1212.
64. D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., Folkman, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, s. 4082-4085.
65. D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., Folkman, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, s. 4082-4085.
66. Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R. Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 1999, 341, s.1565-1571.

67. Enjolras, O., Mulliken, J.B. The current management of vascular birthmarks. *Pediatr Dermatol*, 1993, 10, s. 311–333.
68. Hanahan, D., Bergers, G., Bergsland, E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*, 2000, 105, s. 1045-1047.
69. Bocci, G., Francia, G., Man, S. Thrombospondin-1, a mediator of antiangiogenic effects of low dose metronomic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, s. 12917-12922.
70. Kerbel, R.S., Kamen, B.A. The anti angiogenic basis of metronomic chemotherapy, *Nat Rev Cancer*, 2004, 4, s. 423-436.
71. Folkman, J., Haudenschild, C., Zetter, B.R. Long term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76, s. 5217–5221.
72. Jackson, C.J., Nguyen, M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29, s. 1167-1177.
73. Folkman, J., Haudenschild, C. Angiogenesis in vitro. *Nature*, 1980, 288, s. 551 – 556.
74. Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B. Angiogenesis assays: A critical overview, *Clin Chem*, 2003, 49, s. 32-40.
75. Muthukkaruppan, V.R., Shinnars, B.L., Lewis, R., Park, S.J., Baechler, B.J., Auerbach, R. The chick embryo aortic arch assay: a new, rapid, quantifiable in vitro method for testing the efficacy of angiogenic and anti-angiogenic factors in a three-dimensional, serum-free organ culture system. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 2000, 41, s. 65.
76. Plunkett, M.L., Hailey, J.A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab Invest*, 1990, 62, s. 510-517.
77. Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 1996, II R9-1197.
78. Gimbrone, M.A., Cotran, R.S., Leapman, S.B., Folkman, J. Tumor growth and neovascularization : an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst*, 1974, 52, s. 413-427.
79. Jain, R.K., Schlenger K., Höckel M., Yuan F. 1997, Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med*, 1997, 3, s. 1203-1208.
80. Jain, R.K., Schlenger, K.M. Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems, *Nature Medicine*, 1997, 3, s. 1203 – 1208.

81. Chaplain, M.A., McDougall, S.R., Anderson, A.R. Mathematical modeling of tumor induced angiogenesis. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8, s. 233-257.
82. Rubinstein, A.L. Zebrafish: from disease modelling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2003, 6, s. 218-223.
83. Lawson, N.D., Weinstein, B.M. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*, 2002, 248, s. 307.
84. Dvorak, H.F. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy. *J Clin Oncol*, 2002, 20, s. 4368-4380.
85. Ferrara, N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factor. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2, s.795-803.
86. Bellamy, W.T. VEGF as a target opportunity in hematological malignancies. *Curr Opin Oncol*, 2002, 14, s. 649-656.
87. Maeno, N., Takei, S., Imanaka, H., Takasaki I., Kitjima, I., Maruyama I., Matsuo K., Miyata, K. Increased circulating vascular endothelial growth factor is correlated with disease activity in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1999, 26, s. 2244-2248.
88. Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F. CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 2006, 355, s. 992-1005.
89. Rudge, J.S., Holash, J., Hylton, D. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, s. 18363-18370.
90. Hladovec, J., Rossmann, P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb Res*, 1973, 3, s. 665-674.
91. Asahara, T., Sullivan, A., Murohara, T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275, s. 964-966.
92. Mancuso, X. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*, 2001, 97, s. 3658-3661.
93. Vasa, M., Fichtlscherer, F., Aicher, A. Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circ Res*, 2001, 89, s. e1-e7.
94. Schatteman, G.C., Hanlon, H., Jiao, Ch. Blood derived angioblasts accelerate blood flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest*, 2000, 106, s. 571-578.

95. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Ped Transpl*, 2003, 7, Supplement s3, s. 86–88.
96. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 2002, 8, s. 403-409.
97. Ruzinova, M.B., Schoer, R.A., Gerald, W. Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell*, 2003, 4, s. 277-289.
98. Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P. The multifaceted circulating endothelial cells in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6, s. 835-845.
99. Sinusas, A.J. Imaging of angiogenesis. *J Nucl Cardiol*, 2004, 11, s. 617.
100. Herbst, R.S., Mullani, N.A., Davis, D.W. Development of biological markers of response and assessment of antiangiogenic activity in a clinical trial of human recombinant endostatin. *J Clin Oncol*, 2002, 20, s. 3804-3814.
101. Lee, L., Sharma, S., Morgan, B. Biomarkers for assessment of pharmacologic activity for a vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor inhibitor, PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK): translation of biological activity in a mouse melanoma metastasis model to phase I studies in patients with advanced colorectal cancer with liver metastases. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57, s. 761-771.
102. Egginton, S., Zhou, A.L., Brown, M.D. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res*, 2001, 49, s. 634-646.
103. Djonov, V.G., Kurz, H., Burri, P.H. Optimality in the developing vascular system: Branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn*, 2002, 224, s. 391–402.
104. Burns, P.A., Wilson, D.J. Angiogenesis mediated by metabolites is dependent on vascular endothelial growth factor (VEGF). *Angiogenesis*, 2003, 6, s. 73-77.
105. Murray, B., Wilson, D.J. A study of metabolites as intermediate effectors in angiogenesis. *Angiogenesis*, 2001 4, s. 71-77.
106. Trabold, O., Wagner, S., Wicke, C. Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2003, 11, s. 504–509.
107. Semena, G.L., Wang, G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1992, 12, s. 5447-5454.

108. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V. Activation of VEGF gene transcription by HIF1. *Mol Cell Biol*, 1996, 16, s. 4604-4613.
109. Hunt, T.K., Aslam, R.S., Beckert, S. Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9, s. 1115-1124.
110. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science*, 1956, 123, s. 309-314.
111. Gladden, L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the millenium. *J Physiol*, 2004, 558, s. 5-30.
112. Gallagher, S.M., Castorino, J.J. Monocarboxylate Transporter 4 Regulates Maturation and Trafficking of CD147 to the Plasma Membrane in the Metastatic Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231. *Cancer Res*, 2007, 67, s. 4182.
113. Tepper, O.M., Sealove, B.A., Murayama, T. Newly emerging concepts in blood vessel growth: recent discovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration. *J Invest Med*, 2003, 51, s. 353-359.
114. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275, s. 964-967.
115. Helish, A., Shaper, W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*, 2003,10, s. 83-97.
116. Buschmann, I.R., Hoefer, I.E., van Royen, N. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte fiction. *Atherosclerosis*, 2001, 159, s. 343-356.
117. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000, 6, s. 389-395.
118. Saigo, E.P., Rose, P.P. The application of immunohistochemical stains to identify endothelial-lined channels in mammary carcinoma. *Cancer*, 1987, 59, s. 51-54.
119. Little, D., Said, J.W., Siegel, R.J. Endothelial cell markers in vascular neoplasms: An immunohistochemical study comparing factor VIII-related antigen, blood group specific antigens, 6-keto-PGF1 alpha, and Ulex europaeus 1 lectin. *J Pathol*, 1986, 149, s. 89-95.
120. Gumkowski, F., Kaminska, G., Kaminski, M. Heterogeneity of mouse vascular endothelium. In vitro studies of lymphatic, large blood vessels and microvascular endothelial cells. *Blood Vessels*, 1987, 24, s. 11-23.
121. Rajotte, D., Arap, W., Hagedorn, M. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phase display. *J Clin Invest*, 1998, 102, s. 430-437.

122. Jackson, C.J., Nguyen, M. Human microvasculature endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29, s.1167-1177.
123. Ruoslahti, E., Rajotte, D. An address system in vasculature of tumors and normal tissues. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18, s. 813-827.
124. Risau, W. Differentiation of endothelium. *FASEB J*, 1995, 9, s. 926-933.
125. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 14, 275, s. 964-967.
126. Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95, s. 952-958.
127. Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M. Peripheral blood endothelial progenitor cells are derived from macrophages/monocytes and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003, 107, s. 1164-1169.
128. DePalma, M., Veneri, M.A., Roca, C. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2003, 9, s. 789 – 795.
129. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 41, s. 701-705.
130. Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *Engl J Med*, 2003, 348, s. 593-600.
131. Carmeliet, P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Int Med*, 2004, 255, s. 538–561.
132. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000, 6, s. 389-395.
133. Ferrara, N. Role of VEGF in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280, s. C1358-1366.
134. Stalmans, I., Ng, Y.S., Rohan, R. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*, 2002, 109, s. 327-336.
135. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *FASEB J*, 1999, 13, s. 9-22.
136. Ferrara, N. VEGF: An update on biological and therapeutical aspects. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11, s. 617-624.

137. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, 380, s. 435 – 439.
138. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., O’Shea K.S., Powell-Braxton L., Hillan K.J., Moore M.W. Heterozygous embryonal lethality induced by targeted inactivation of VEGF gene. *Nature*, 1996, 380, s. 439 – 442.
139. Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, 2001, 28, s. 131-138.
140. Stalmans, I., Ng, Y.S., Rohan, R. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*, 2002, 109, s. 327–336.
141. Carmeliet, P., Ng, Y.S. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, 1999, 5, s. 495-502.
142. Mattot, V., Moons, L., Lupu, F. Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13, s. 1548–1560.
143. Luttmun, A., Carmeliet, P. Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered? *J Clin Invest*, 2003, 111, s. 600–602.
144. Dor, Y., Djonov, V., Abramovitch, R. Conditional switching of vegf provides new insights into adult neovascularization and pro angiogenic therapy. *EMBO Journal*, 2002, 21, s. 1939 – 1947.
145. Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 1994, 269, s. 25646-25654.
146. Luttmun, A., Tiwa, M., Moons, L. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt-1. *Nat Med*, 2002, 8, s. 831-840.
147. Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res*, 2002, 51, s. 464–470.
148. Junker, L., Artur, H.M. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev*, 2002, 110, s.193–196.
149. Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Nat Med*, 1999, 5, s. 1534-1537.
150. Bouredeau, A., Dumont, D.J., Letarte, M. A murine model of hereditary

- hemorrhagic telangiectasia, *J Clin Invest*, 1999,104, s. 1343-1351.
151. Abdalla, S.A., Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*, 2006, 43, s. 97–110.
 152. Levine, R.J., Lam, C., CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 2006, 355, s. 992–1005.
 153. Wikstrom, P., Lissbrant, I.F., Stattin, P. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate*, 2002, 51, s. 268–275.
 154. Beresford, M.J., Hartus, A.L., Ah-See, M. The relationship of the neo-angiogenic marker, endoglin, with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Br J Cancer*, 2006, 95, s. 1683–1688.
 155. El-Gohary, Y.M., Silverman, J.F., Olson, P.R. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*, 2007, 127, s. 572–579.
 156. Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M.R. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene*, 2003, 22, s. 6557–6563.
 157. Ten Dijke, P., Artur, H.M. Extracellular CONTROL of TGF beta signalling in vascular development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8, s. 857-869.
 158. Javerzat, S., Auguste, P., Bikfalvi, A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med*, 2002, 8, s. 483-489.
 159. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. , 2000, 407, s. 242-248.
 160. Laufler, M.A., Handlsey, M.M., Edwards, D.R. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev Mol Med*, 2003, 5, s. 1-39.
 161. Strieter, R.M., Kukel, S.L, Exner, V.M. Interleukin 8: a corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol*, 1992, 141, s. 1279-1284.
 162. Banda, M.J., Knighton, D.R., Hunt, T.K. Isolation of nonmitogenic angiogenic factor from wound fluid. *Proc Natl AcadSci*, 1992, 79, s. 7773-7777.
 163. Knighton, D.R., Hunt, T.K., Scheuenstuhl, H. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 1983, 221, s.1283-1285.
 164. Ploplis, V.A., Carmeliet, P., Vazirzadeh, S. Effect of disruption of plasminogen

- gene on thrombosis, growth and health in mice. *Circulation*, 1995, 92, s. 2585-2593.
165. Kyriakides, T.R., Zhu, Y.H., Smith, L.T. Mice That Lack Thrombospondin 2 Display Connective Tissue Abnormalities That Are Associated with Disordered Collagen Fibrillogenesis, an Increased Vascular Density, and a Bleeding Diathesis. *J Cell Biol*, 1998, 140, s. 419-430.
166. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shin, Y. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 2, s. 315-328.
167. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88, s. 277-85.
168. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance, *Nature*, 1997, 390, s. 404-407.
169. Kolata, G. A special report. A Cautious Awe Greets Drugs That Eradicate Tumors in Mice, *New York Times*, May 3, 1998.
170. Coussens, L.M., DePalma, M. Immune cells and inflammatory mediators as regulators of angiogenesis. In: Figg, W.D., Folkman, J. *Angiogenesis*. New York: Springer, 2008. 601 s. ISBN 978-0-387-71517-9.
171. Schmidt, M.C., Verner, J.A. Myeloid cell trafficking and tumor angiogenesis. *Cancer Lett*, 2007, 250, s. 1-8.
172. Buschmann, I.R., Hofer, I.E., van Royen, N. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*, 2001, 159, s. 343-56.
173. Takeda, K., Akira, S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 2004, 16, s. 3-9.
174. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002, 296, s. 301-305.
175. Montesinos, M.C., Desai, A., Chen, J.F. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *Am J Pathol* 2002, 160, s. 2009-2018.
176. Thurston, G., Baluk, P., McDonald, D.M. Determinants of endothelial cell phenotype in venules. *Microcirculation*, 2000, 7, s. 67-80.
177. Imhof, B.A., Aurrand-Lions, M. Angiogenesis and inflammation face-off. *Nat Med*, 2006, 12, s. 235-239.
178. Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms, *J Invest Dermatol*, 2007, 127, s. 514-25.

179. Colwell, S.A., Nesnes, R.S., Chia, S. Increased angiogenesis and expression of VEGF during scarless repair, *Plast Reconstr Surg*, 2005, 115, s. 204-212.
180. Huising, M.O. et al. Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS. *Trends Immunol*, 2003, 24, s. 306–313.
181. Rzali, T., Baluk, P., Thurston, G., La Barbara, A., Woo, C., Macdonald, D.M. Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation. *Am J Pathol*, 2001, 158, s. 2043–2055.
182. Koch, A.E., Harlow, L.A., Haines, G.K. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 1994, 152, s. 4149-4156.
183. Fava, R.A., Olsen, N.J., Spenser-Gree, n G. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med*, 1994, 180, s. 341–346.
184. Hiraoka, K., Zenmyo, M., Watari, K. et al. Inhibition of bone and muscle metastasis of lung cancer cells by decrease in the number of monocytes/macrophages. *Cancer Sci*, 2008, 99, s. 1595-1602.
185. Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9, s. 617-648.
186. Gepard, C., Roklina, B.J. Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2001, 2, s. 108-115.
187. Achalo, T.J., Beacon, K.B., Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6, s. 865-873.
188. Rot, A., von Adrian, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells, *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, s. 891-928.
189. Baggiolini, M. Chemotactic and inflammatory cytokines: CXC and CC proteins. In: Westwick, J., Kukel, S., Lindley, I.J.D. *The Chemokines: Biology of the Inflammatory Peptide Supergene Family II*. New York: Hrsg. Adv. – Exp. – Med. Biol. Plenum Press, 1994. 285 s. ISBN 9780306447105.
190. Zlotnik, A., Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, 12, s. 121–127.
191. Colleti, L.M., Kukel, S.L., Walz, A. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest*, 1995, 95, s. 134–141.

192. van Royen, N., Hoefler, I., Buschmann, I. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovasc Res*, 2003, 57, s. 178-85.
193. Yla Herttuala, S., Lipton, B.A., Rosenfeld, M.E. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991,, 88, s. 5252-5256.
194. Cushing, S.D., Fogelman, A.M., Monocytes may amplify their recruitment into inflammatory lesions by inducing monocyte chemotactic protein. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1992, 12, s. 78-82.
195. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective fo the 1990s. *Nature*, 1993, 362, s. 801-809.
196. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis, *Nature*, 2002, 420, s. 868-74.
197. Adams, D.H., Hubscher, S., Fear, J. Hepatic expression of MIP 1b after liver transplantation. *Transplantation*, 1996, 61, s. 817-825.
198. Villiger, P.M., Terkelaub, R., Lotz, M. Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. *J Immunol*, 1992, 149, s. 722-727.
199. Seitz, M., Dewald, B., Gerber, N. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Incest*, 1991, 87, s. 463-469.
200. Kukel, S.L., Lukacs, N., Kasama, T. The role of chemokines in inlammatory joint disease. *J Leukoc Biol*, 1996, 59, s. 6-12.
201. Furie, M.B., Randolph, G.J. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol*, 1995, 146, s. 1287-1301.
202. Alcami, A., Smith, L.G. Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol Today*, 1995, 16, s. 474-478.
203. Liu R, Paxton, W.A.,Choe, S. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 1996, 86, s. 367-377.
204. Samson, M., Libert, F. Doranz BJ Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 1996, 382, s. 722-725.
205. Smith, M.W., Dean, M., Carrington, M. Contrasting Genetic Influence of CCR2 and CCR5 Variants on HIV-1 Infection and Disease Progression. *Science*, 1997, 277, s. 959-965.

206. Strieter, J.M., Standiford, G.M., Huffnagle, G.B. The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease, *J Immunol*, 1996, 156, s. 3583-3586.
207. Adams, D.H., Louda, A.R. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokinem. *Lancet*, 1997, 349, s. 490-495.
208. Strieter, R.M., Polverini, P.J., Arenberg, D.A., Kunkel, S.L. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock*, 1995, 4, s. 155-160.
209. Salcedo, R. Oppenheim, J.J. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation*, 2003, 10, s. 359–370.
210. Lasagni, L. et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the IP-10, Mig and I-TAC induced-inhibition of endothelial cell growth and acts as functional receptor for PF-4. *J. Exp. Med*, 2003, 197, s.1537–1549.
211. Salcedo, R. et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α . *Am. J. Pathol*, 1999, 154, s. 1125–1135.
212. Tachibana, K. et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 1998, 393, s. 591–594.
213. Nagasawa, T. et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bonemarrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996, 382, s. 635–638.
214. Salcedo, R. et al. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*, 2000, 14, s.2055–2064.
215. Romagnani, P. et al. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest*, 2001, 107, s. 53–63.
216. Bonacchi, A. et al. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem*, 2001, 276, s. 9945–9954.
217. Romagnani, P., Lasagni, L., Annunziato F. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol*, 2004, 25, s. 201-209.
218. Huisin, M.O. et al. Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS. *Trends Immunol*, 2003, 24, s. 306–313.
219. Abbot, N.J. Glial endothelial communication in physiology and pathology. *Journal*

- of Neurochemistry, 2003, 85, s. 2.
220. Ruoslahti, E., Rajotte, D. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors, *Annu Rev Immunol*, 2000, 18, s.813-827.
 221. Rybak, N., Ettore, A., Kaissling, B. In vivo protein biotinylation for identification of organ specific antigens accessible from the vasculature. *Nature Methods*, 2005, 2, s. 291-298.
 222. Jacobson, B.S., Stolz, D.B., Schnitzer, J.E. Identification of endothelial cell-surface proteins as targets for diagnosis and treatment of disease. *Nature Medicine*, 1996, 2, s. 482 – 484.
 223. Risku, W. Differentiation of endothelium, *The FASEB Journal*, 1995, 9, s. 10 926-933.
 224. LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, 2001, 412, s. 877-884.
 225. St.Croix, B., Rago, C., Velculescu, V. Genes expressed in human tumor endothelium, *Science*, 2000, 289, s.1197-1202.
 226. Malhotra, R., Stenn, K.S., Fernandez, L.A. Angiogenic properties of normal and psoriatic skin associate with epidermis not dermis. *Lab Invest*, 1989, 61, s. 162-165.
 227. Yano, K., Brown, F.L., Detmar, M. Control of hair growth and follicle size by VEGF mediated angiogenesis. *J Clin Invest*, 2001, 107, s. 409–417.
 228. Wight, T.N., Rautu, G.J., Mumby, S.M. Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissue. *J Histochem Cytochem*, 1985, 33, s.295-302.
 229. Mecklenburg, L., Tobin, D.J., Miller-Rover, S. Active hair (anagen) is associated with angiogenesis. *J Invest Dermatol*, 2000, 114, s.909-916.
 230. Ansel, J.C., Tiesman, J.P. Olerud Human keratinocytes are a major source of cutaneous PDGF. *J Clin Invest*, 1993, 92, s. 671–678.
 231. Ferrandiz, C., Bordas, X., Garcia-Patos, V. Prevalence of psoriasis in Spain (epiderma project: phase I). *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2001, 15, s. 20–23.
 232. Nevitt, G. J., Hutchinson, P.E. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *BrJ Dermatol*, 1996, 135, s. 533–537.
 233. Henseler, T., Christophers, E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 1985, 13, s. 450–456.
 234. Ragaz, A., Ackerman, A B. Evolution, maturation and regression of lesions of psoriasis. New observations and correlation of clinical and histologic findings. *Am J*

- Dermatopathol, 1979, 1, s. 199–214.
235. Nickoloff, B.J., Xin, H. Cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clin Dermatol*, 2007, 25, s. 568-73.
236. Bos, J.D., Hulsebosch, H.J. Krieg S R, Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res*, 1983, 275, s. 181–189.
237. Barker, J.N. Psoriasis as a T cell-mediated autoimmune disease. *Hosp Med*, 1998, 59, s. 530–533.
238. Ozawa, M., Aiba S. Immunopathogenesis of psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2004, 3, s. 137–144.
239. Lomholt, G. Psoriasis: Prevalence, spontaneous course and genetics. *American Journal of the Medical Science*, 1964, 247, s. 246.
240. Kavli, G., Forde, O.H., Arnesen, E., Stenvold, S.E. Psoriasis: familial predisposition and environmental factors. *Br Med J*, 1985, 291, s. 999-1000.
241. Watson, W., Cann, H.M., Farber, E.M., Nal,l M.L. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol*, 1972, 105, s. 197–207.
242. Bowcock A.M., Krueger, J.G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5, s. 699–711.
243. Gudjonsson, E., Karason A., Antonsdottir A.A. HLA-Cw6-Positive and HLA-Cw6-Negative Patients With Psoriasis Vulgaris Have Distinct Clinical Features. *J Invest Dermatol*, 2002, 118, s.362-365.
244. Zhou, X., Krueger, J.G. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics*, 2003, 13, s.69-78.
245. Baker, J.N. Psoriasis as a T cell-mediated autoimmune disease. *Hosp Med*, 1998, 59, s. 530–533.
246. Baker, B.S., Bokth, S., Powles, A. et al. Group A streptococcal antigenspecific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. *Br J Dermatol*, 1993, 12, s. 493–499.
247. Bockelmann, R., Horn, T., Gollnick, H., Bonnekoh, B. Interferongamma-dependent in vitro model for the putative keratin 17 autoimmune loop in psoriasis: exploration of pharmaco- and gene-therapeutic effects. *Skin Pharmacol Physiol*, 2005, 18, s. 42–54.
248. McFadden, J., Valdimarsson, H., Fry, L. Cross-reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin. *Br J Dermatol* 199, 125, s. 443–447.

249. Travers, J.B., Hamid, Q.A., Norris, D.A. et al. Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis. *J Clin Invest*, 1999, 104, s. 1181–1189.
250. Jackson, M., Howie, S.E., Keller, R., Sabin, E., Hunter, J.A., McKenzie, R.C. Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1alpha activation in response to gamma-IFN. *FASEB J*, 1999, 13, s. 495–502.
251. Hodge, L., Comaish, J.S. Psoriasis: current concepts in management. *Druha*, 1977, 13, s. 288–296.
252. Voorhees, J.J. Pathophysiology of psoriasis. *Annu Rev Med*, 1977, 28, s. 467–473.
253. Griffiths, C.E., Voorhees, J.J., Nickoloff, B.J. Gamma interferon induces different keratinocyte cellular patterns of expression of HLA-DR and DQ and intercellular adhesion molecule-I (ICAM-1) antigens. *Br J Dermatol*, 1989, 120, s. 1–8.
254. Bata-Csorgo, Z., Hammerberg, C., Voorhees, J.J. Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis. *J Exp Med*, 1993, 178, s. 1271–1281.
255. Olaniran, A.K., Baker, B.S., Barišić, J.J. A comparison of the stimulatory effects of cytokines on normal and psoriatic keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol Res*, 1995, 287, s. 231–236.
256. Rogalski, C., Meyer-Hoffert, U., Proksch, E. Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*, 2002, 118, s. 49–54.
257. Di Marco, E., Mathor, M., Bondanaza S. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol Chem*, 1993, 268, s. 22838–22846.
258. Doder, J.T., Fischer, G.J., Lindquist, P.B. et al. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science*, 1989, 243, s. 811–814.
259. Higashiyama, M., Matsumoto, K., Hashimoto, K. Increased production of transforming growth factor-alpha in psoriatic epidermis. *J Dermatol*, 1991, 18, s. 117–119.
260. Valyi-Nagy, I., Jensen, P.J., Albelda, S.M. Cytokine-induced expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. *J Invest Dermatol*, 1992, 99, s. 350–356.
261. Wang, H., Peters, T., Kess, D. et al. Activated macrophages are Essentials in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest*, 2006, 116, s. 2105–2114.

262. Ghadially, R., Reed, R.T., Elias, P.M. Stratum corneum structure and function correlates with phenotype in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1996, 107, s. 558-564.
263. Wolk, K., Witte, E., Wallace, E. et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*, 2006, 36, s. 1309–1323.
264. Wolk, K., Kunz, S., Witte, E. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004, 21, s. 241–254.
265. Henseler, T. The genetics of psoriasis. *J. Am Acad Dermatol*, 1997, 37, s. S1–S11.
266. Ragaz, A., Ackerman, A.B. Evolution, maturation and regression of lesions of psoriasis. New observations and correlation of clinical and histologic findings. *Am J Dermatopathol*, 1979, 1, s. 199–214.
267. Philips, S., Wolk, K., Kreutzer, S. et al. The evaluation of psoriasis therapy with biologics leads to a revision of the current view of the pathogenesis of this disorder. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, 10, s. 817–831.
268. Sabat, R., Philips, S., Hofflich, C. Immunopathogenesis of psoriasis. *Experimental Dermatology*, 2007, 10, s. 779–798
269. Hamáková, K., et al. Použití kamenouhelného dehtu v léčbě psoriázy. Referátový výběr z dermatovenerologie, 2008, 50, s. 29-32.
270. Davis, M.D., et al. Goeckerman treatment : neglected in the consensus approach for critically challenging case scenarios in moderate to severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 2010, 62, s. 508.
271. Roelofzen, J.H., et al. No increased risk of cancer after coal tar treatment in patients with psoriasis or eczema. *J Invest Dermatol*, 2010, 130, s. 953-961.
272. Menter, A. Goeckerman therapy versus biologics in the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 2010, 62, s. 516-517.
273. Soares, T.F., Davis, M.D. Success of Goeckerman treatment in 2 patients with psoriasis not responding to biological drugs. *Arch Dermatol*, 2007, 143, s. 950-951.
274. Folkman, J. Angiogenesis in psoriasis: Therapeutic implications. *J Invest Dermatol*, 1972, 59, s. 40–43.
275. Bull, R.H., Bates, D.O., Mortimer, P.S. Intravital video-capillaroscopy for the study of the microcirculation in psoriasis. *Br J Dermatol*, 1992, 126, s. 436–445.
276. Creamer, D., Allen, M.H., Sousa, A. et al. Localisation of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br J Dermatol*, 1997, 136, s. 859–865.

277. Pinkus, H., Mehregan, A.H. The primary histologic lesion of seborrhoeic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1966, 46, s. 109–116.
278. Goodfield, M., Macdonald Hull, S., Holland, D. et al. Investigations of the ‘active’ edge of plaque psoriasis: Vascular proliferation precedes changes in epidermal keratin. *Br J Dermatol*, 1994, 131, s. 808–813.
279. Kurda, K., Zapadán, A., Shoji, T. Altered expression of angiopoietins and Tie2 endothelium receptor in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2001, 116, s. 713-720.
280. Nickoloff, B.J., Mitra, R.S., Varani, J. Aberrant production of interleukin 8 and thrombospondin 1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis, *Am J Pathol*, 1994, 144, s. 820-828.
281. Wolf, J.E., Harrison, R.G. Demonstration and characterisation of an epidermal and angiogenic factor, *J Invest Dermatol*, 1973, 61, s. 130-141.
282. Bhushan, M., McLaughlin, B., Weiss, J.B. Levels of endothelial cell stimulating and VEGF are elevated in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 1999, 141, s. 1054–1060.
283. Xia, Y.P., Li, B., Hylton, D. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood*, 2003, 102, s.161-168.
284. Creamer, D., Allen, M., Jaggar, R. Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating vascular endothelial growth factor. *Arch Dermatol*, 2002, 138, s. 791-796
285. Kurda, K., Sappadin, A., Shoji, T. Altered Expression of Angiopoietins and Tie2 Endothelium Receptor in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001, 116, s. 713–720.
286. Oikawa, T., Hirotsani, K., Ogasawara, H. Inhibition of angiogenesis by vitamin D3 analogues. *Eur J Pharmacol*, 1990, 178, s. 247-50.
287. Diaz, V.B., Lenoir, M.C., Ladou, A. Regulation of VEGF expression in human keratinocytes by retinoids. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, s. 642-650.
288. Arbiter, J.L., Govindarajan, B., Battle, T. Carbazol is naturally occurring inhibitor of angiogenesis and inflammation isolated from antipsoriatic coal tar. *J Invest Dermatol*, 2006, 126, s. 1396-1402.
289. Sander, D.N., Dekoven, J., Champagne, P., Crouteau, D., Dupont, E. Neovastat (AE-941), an inhibitor of angiogenesis: Randomized phase I/II clinical trial results in patients with plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 47, s. 535-541.
290. Dupont, E., Savard, P.E., Jourdain, C. Antiangiogenic properties of a novel shark cartilage extract: potential role in the treatment of psoriasis. *J Cutan Med Surg*, 1998, 2,

- s. 146–152.
291. Keshtgarpour, M., Dudek, A. SU-011248, a vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, controls chronic psoriasis. *Transl Res*, 2007, 149, s. 103-106.
 292. Cuevas, P., Arrazola, J.M., Dobesilate in treatment of plaque psoriasis. *Eur J Med Res*, 2005, 12, 10, s.373-376.
 293. Goeckerman, W.H. (1925) Treatment of psoriasis. *Northwest Med*, 1925, 24, s. 229–231.
 294. Lebwohl, M., Ali, S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *J Am Acad Dermatol*, 2001, 45, s. 487–498.
 295. Shibuya, M., Cleisson-Welsch, L. Signal transduction by VEGFr in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research*, 2006, 312, s. 549-560.
 296. Creamer, D., Allen, M. Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating VEGF. *Arch Dermatol*, 2002,138, s. 791-796.
 297. Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., Rusnati, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16, s. 159-178.
 298. Casanovas, O., Hicklin, D.J., Begers, G., Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*, 2005, 8, s. 299-309.
 299. McGregor, J.M., Barker, J.N. Pulmonary capillary leak syndrome in complicating generalised pustular psoriasis: possible role of cytokines. *Br J Dermatol*, 1991, 125, s. 472-474.
 300. Ng, S., Chi, K. Surrogates for clinical development. In: Figg, W.D., Folkman, J. *Angiogenesis*. New York: Springer, 2008.601 s. ISBN 978-0-387-71517-9.
 301. Torsney, E., Charlton, R. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res*, 2002, 51, s. 464–470.
 302. Jonker, L., Arthur, H.M. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev*, 2002, 110, s.193–196
 303. Li, D.Y., Sorensen, L.K. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, 1999, 284, s. 1534-1537.
 304. Bouredeau, A., Dumont, D.J. A murine model of hereditary hemorrhagic telenagiectasia, *J Clin Invest*, 1999, 104, s. 1343-1351.

305. Abdalla, S.A., Letarte, M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*, 2006, 43, s.97–110.
306. Levine, R.J., Lam, C., Qian, C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 2006, 355, s. 992–1005.
307. Wikström, P., Lissbrant ,I.F., Stattin, P. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate*, 2002, 51, s.268–275.
308. El-Gohary, Y.M, Silverman, J.F., Olson, P.R. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*, 2007, 127, s.572–579.
309. Beresford, M.J., Harris, A.L., Ah-See, M. The relationship of the neo-angiogenic marker, endoglin, with response to neoadjuvant chemotherapy in Brest cancer. *Br J Cancer*, 2006, 95, s.1683–1688.
310. Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M.R. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene*, 2003, 22, s. 6557–6563.
311. ten Dijke, P., Arthur, H.M. Extracellular CONTROL of TGF beta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8, s. 857-869.
312. Li, A.G., Wan, D. Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *The EMBO Journal*, 2004, 23, s. 1770-1781.
313. Rulo, H.F., Westphal, J.R. Expression of endoglin in psoriatic involved and uninvolved skin. *J Dermatol Sci*, 1995,10, s. 103-109.
314. ten Dijke, P., Goumans, M.J.: Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*, 2008, s. 79-89.
315. Laing, K.J., Secombes, C.J. Chemokines, *Dev Comp Immunol*, 2004, 28, s. 443-460.
316. Homey, B., Meller, S. Chemokines and other mediators as therapeutic targets in psoriasis vulgaris. *Clin Dermatol*, 2008, 26, 539-545.
317. Olson, T., Ley, K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol*, 2002, 283, s. R7-28.
318. Zollner, M.T., Assadulah, K. Targeting leukocyte trafficking to inflamed skin – still an attractive therapeutic approach? *Exp Dermatol*, 2007, 16, s. 1-12.

319. Wisniewski, H.G., Vilcek J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 15, 129-146, 2004.
320. Lee, G.W., Lee, T.H. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J Immunol*, 1993, 150, s. 1804-1812.
321. Introna, M., Alles, W. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*, 1996, 87, s. 1862-1872.
322. Baruah, P., Dumitriu, I.A. The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 80, s. 87-95.
323. Doni, A., Michela, M. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol*, 2006, 79, s. 797-802.
324. Vouret-Craviari, V., Matteucci, C. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun*, 1997, 65, s. 1345-1350.
325. Rusnati, M., Camozzi, M. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*, 2004, 104, s. 92-99.
326. Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994, 79, s. 1157-1164.
327. Luchetti, M. M., Piccinini, G. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*, 2000, 119, s. 196-202.
328. Latini, R. Maggioni, Aldo P. Prognostic Significance of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 2004, 110, s. 2349-2354.
329. Muller, B., Peri, G. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med*, 2001, 29, s. 1404-1407.
330. Bevelacqua, V., Libra, M. Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients. *Int J Mol Med*, 2006, 18, s. 415-423.

9. Přílohy

9.1. Seznam použitých zkratk

Ang-1	angiogenin 1
CEC	cirkulující endotelové buňky
COX2	cyklooxygenáza 2
DAMP	vnitřní signály nebezpečí
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
ENA-78	chemokin „Epithelial Neutrophil – Activating protein 78“ (CXCL5)
EPC	cirkulující endotelové prekurzorové buňky
FDA	„Federal Drug Agency“, Národní úřad pro léčiva USA
FGF	fibroblastový růstový faktor
GIT	gastrointestinální trakt
GM-CSF	růstový faktor pro granulocyty/monocyty
GRO	chemokin „Growth Regulated Oncogene“ (CXCL1)
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
HIF	„Hypoxia-Inducible Factor“
HUDMEC	lidské endotelové buňky z kožního vaskulárního řečiště
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula 1
ICHS	ischemická choroba srdeční
ICHDKK	ischemická choroba dolních končetin
ISH	<i>in situ</i> hybridizace
JRA	juvenilní revmatoidní artritída
MCP-1	chemokin „Monocyte Chemoattractant Protein-1“ (CCL2)
MMP	matrixová metaloproteináza
MRI	zobrazení magnetickou rezonancí
MTD	maximální tolerovaná dávka
MVD	průměrná vaskulární denzita
NSCLC	nemalobuněčný plicní karcinom

PAMP	s patogenem asociované molekulární vzory
PASI skóre	„Psoriasis Area and Severity Index“
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	z destiček odvozený růstový faktor
PET	pozitronová emisní tomografie
PGF	růstový faktor odvozený z placenty
PECAM-1	„Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1“
PTX3	pentraxin 3
RANTES	chemokin „Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted“ (CCL5)
SAGE	“serial analysis of gene expression”
SMC	buňky hladké svaloviny
sVEGFR	solubilní forma receptoru pro VEGF
TGF	transformující růstový faktor
TLR	„Toll like“ receptory
TNF	tumor nekrotizující faktor
TSP	trombospondin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

9.2. Přehled vlastních publikací

1. Andrys, C., Borska, L., **Pohl, D.**, Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. Goeckerman's therapy for psoriasis with special reference to serum pentraxin 3 level. *Int J Dermatol*, 2008, 47, s. 1011–1014 (**IF 1,13**).
2. Andrys, C., Borska, L., **Pohl, D.**, Fiala, Z., Hamakova, K., Krejsek, J. Angiogenic activity in patients with psoriasis is significantly decreased by Goeckerman's therapy. *Arch Dermatol Res*, 2007, 298, s. 479–483 (**IF 1,33**).
3. **Pohl, D.**, Andrys, C., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. CC and CXC chemokines patterns in psoriasis determined by protein array method

were influenced by Goeckerman's therapy. Acta Medica (Hradec Králové), 2009, 52, s. 9–13.

4. **Pohl, D.**, Andrys, C., Borska, L., Fiala, Z., Hamakova, K., Ettler, K., Krejsek, J. Serum level of a soluble form of endoglin (CD105) is decreased after Goeckerman's therapy of psoriasis. Acta Medica (Hradec Králové), 2011, 54, s. 59–62.
5. **Pohl, D.**, Andrys, C., Borska, L., Hamakova, K. Změny hladin vybraných chemokinů s angiogenním účinkem u pacientů s psoriázou před a po terapii kamenouhelným dehtem měřených metodou proteinových array. Alergie, 2006, Supplementum2, s. 60. (poster)