Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové

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

MUDr. David Pohl

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Lékařská imunologie

Hradec Králové

2011

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906 a výzkumným projektem IGA MZ ČR: NR/8154-3

Student: MUDr. David Pohl
Ústav klinické imunologie a alergologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

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

Konzultant: Doc. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.
Ústav patologické fyziologie, Univerzita Karlova v Praze,
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponenti: Doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.,
Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví,
Univerzita obrany v Brně.

Ing. Jela Petrisková, Ph.D.,
Martinské centrum imunológie, Martin

Obhajoba se bude konat dne XX.9.2011 před Komisí pro obhajobu disertačních prací OR Lékařská imunologie, Ústav klinické imunologie a alergologie, budova č. 17, Fakultní nemocnice Hradec Králové

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

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

Obsah

1. Souhrn 4
2. Summary 6
3. Úvod do problematiky 9
   1.1. Zánět a psoriáza 10
   1.2. Angiogeneze a psoriáza 11
4. Cíle disertační práce 14
5. Soubory nemocných a metodika 15
   5.1. Soubory pacientů 15
   5.2. Goeckermanova terapie psoriázy 16
   5.3. Odběry biologického materiálu 17
   5.4. Laboratorní metody stanovení angiogenních faktorů a pentraxinů 17
   5.5. Statistické vyhodnocení 18
6. Výsledky: 19
   6.1. Stanovení hladin růstových faktorů VEGF a bFGF 19
   6.2. Stanovení hladin angiogenních faktorů metodou proteinových array 22
   6.3. Stanovení koncentrací pentraxinů PTX3 a CRP 26
   6.4. Stanovení hladin solubilní formy endoglinu (CD105) 28
7. Diskuse 29
   7.1. Úvod 29
   7.2. Diskuse ke změním hladin VEGF, FGF po Goeckermanově terapii psoriázy 30
   7.3. Diskuse k hladinám solubilní formy endoglinu po Goeckermanově terapii 31
   7.4. Diskuse ke stanovení chemokinů metodou proteinových array 33
   7.5. Diskuse k hladinám pentraxinu 3 a CRP 34
8. Závěr 35
9. Použitá literatura 37
10. Vlastní publikace 43

1. 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 psoriatičtí 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 měřen imunonefelometrií a PTX3 metodou ELISA. Sérové hladiny obou parametrů se po GT významně snížily. Hladiny PTX3 se snížily z 1,92 ± 0,72 ng/ml před GT na 1,66 ± 0,58 ng/ml po GT ($p = 0,0396$) a hladiny CRP z 4,64 ± 3,93 mg/l na 1,66 ± 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 ± 125,5 pg/ml) a bFGF (10,2 ± 5,04 pg/ml) u pacientů před léčbou byly významně vyšší než u zdravých dobrovolníků (VEGF 236,4 ± 55,9 pg/ml, bFGF 7,3 ± 3,7 pg/ml). Sérové hladiny VEGF a bFGF se po GT významně snížily. (VEGF 278,5 ± 109,9 pg/ml, FGF 7,78 ± 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 psoriatiků byla oproti zdravým kontrolám zjištěna zvýšená exprese endoglinu v psoriatických lézích a snížená v kůži psoriatiků mimo léze. Hladinami sCD105 u psoriázy se zatím žádná práce nezabývala.

GT výrazně zmírnila 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. Z 7,85 ± 2,26 ng/ml před GT klesly na 7,01 ± 1,71 ng/ml ($p = 0,0002$). U nemocných psoriatiků byly hladiny sCD105 před GT významně vyšší než u zdravých dobrovolníků (4,85 ± 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 dovodit, 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.

2. 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 of 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 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 dismission 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 ± 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 antiangiogeneic 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 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 preeklampsia 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 paper 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.

3. Úvod do problematiky

Psoriáza je jedna z nejčastějších kožních nemocí, která postihuje okolo 2-3% evropské populace. Je to chronické zánětlivé onemocnění, jehož charakteristickým projevem je výsev psoriatických lézí, plochých červených papul se snadno odlučitelnou bělavou šupinou (1,2). První projevy se nejčastěji objevují buď v pubertě, nebo okolo 50. roku, ale vznik je možný v jakémkoliv věku (3). Typický průběh nemoci je chronicky exacerbující s typickým střídáním remisí a exacerbací psoriázy. Je to choroba léčitelná, ale nevyléčitelná.

Etiopatogeneze je komplexní. Psoriáza se dá považovat za systémové onemocnění s nejčastěji kožními projevy. 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.

Tuto teoretickou představu odráží i histopatologické změny v kůži psoriatického plaku. Tyto lze charakterizovat čtyřmi specifickými znaky (4):

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

Tyto mikroskopické změny mají svůj odraz ve změnách signalizačních sítí lokálních i systémových působků. To označuje termín **specifické cytokinové mikroprostředí.** Prostředí psoriatického plaku vykazuje změněné hladiny cytokinů, které se podílejí na řízení iniciace a udržování psoriázy. Zprostředkují komunikaci mezi buňkami a zajišťují časoprostorovou koordinaci jednotlivých dějů (5). Jsou to zejména mediátory zánětu a angiogeneze.

1.1. Zánět a psoriáza

Psoriáza je nemoc spojená s chronickým zánětem v kožní lézí. Obecnými kroky v rozvoji léze jsou:

1. infiltrace kůže leukocyty

2. aktivace leukocytů po imigraci do kůže

3. odpověď keratinocytů.

Z leukocytárních populací mají zásadní úlohu T-lymfocyty (6,7). Vcestování a aktivace těchto buněk je pro psoriázu klíčové. V dalším průběhu rozvoje nemoci získávají na důležitosti i další buněčné populace leukocytárního infiltrátu, jako neutrofily a makrofágy (4,8). Aktivace těchto buněk a následná produkce cytokinů vede k funkčním změnám (odpovědi) keratinocytů, jako je hyperproliferace a poruchy maturace a v závěru ke klinickému obrazu psoriatického plaku (9,10). Cytokinové mikroprostředí zajišťuje rozvoj a podporuje udržování zánětu. Jednotlivým krokům rozvoje zánětu odpovídá určité spektrum regulačních cytokinů. Mluvíme obecně o tzv. prozánětovém kontextu nebo prozánětovém fenotypu. Udržování prozánětového fenotypu na různých úrovních organismu zastávají proteiny akutní fáze, ke kterým patří mj. i pentraxiny (CRP, pentraxin3).

Uspořádaný přesun leukocytů na místo určení, tzv. trafficking, zprostředkují chemokiny. Jsou to chemotaktické cytokiny, které selektivně řídí pohyb leukocytů (11). 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.

T-lymfocyty v lézích vykazují aktivovaný fenotyp, exprimují povrchové molekuly CD69, HLA-DR, CD25 (12,13). Aktivace T-lymfocytárního systému je pro rozvoj psoriázy zásadní (6,7). V obecném modelu je k ní zapotřebí prezentovaný antigen rozpoznaný specificky TcR a sekundární signály charakteru prozánětového kontextu. Tento model je pokládán za platný i u psoriázy s několika specifiky. Konkrétní antigen odpovědný za aktivaci T-lymfocytů nebyl dosud nalezen. Předpokládá se role xenoantigenu (streptokokové proteiny) (14,15) či autoantigenu, jako např. lidských keratinů, K1 (16) při možném prolomení autotolerance zkříženou reaktivitou s některým streptokokovým proteinem (M proteiny) (17). Možná je i aktivace lymfocytární populace

streptokokovými superantigeny (18). Jako další signály působí řada interakcí kostimulačních a adhezních molekul spolu se solubilními působky typu cytokinů (IL-2). Aktivace T-lymfocytů vede k jejich proliferaci a k diferenciaci do funkčních subsetů. Tyto se liší produkcí cytokinů a rozdílnými regulačními funkcemi. U psoriázy je popsána převaha populací Th1 a Th17 (19,20) a omezené zastoupení Treg a Th2 (21). Buňky funkčního subsetu Th1 produkují především IL-2, IFN gamma, zatímco T-lymfocyty patřící k subsetu Th17 jsou typické tvorbou IL-17 a IL-22 (22,23). IFN gamma produkovaný T-lymfocyty hraje zásadní roli v aktivaci dalších leukocytárních populací, ke kterým patří monocyto – makrofágové elementy a dendritické buňky (DC). Tyto po aktivaci dále produkují např. IL-6, IL-18, IL-19, IL-20, IL-23 a TNF alfa. Hlavním producentem TNF alfa u psoriázy je populace makrofágů (24). Terapeutická blokáda TNF alfa vede k dobré léčebné odpovědi u velkého procenta pacientů (25).

V poslední fázi rozvoje psoriatického plaku reagují keratinocyty na výše popsané stimuly aktivací, dochází k urychlení jejich proliferace a poruchám maturace, což vede k samotnému charakteristickému makroskopickému obrazu psoriatické léze.

Za aktivaci keratinocytů jsou odpovědné především prozánětové cytokiny, ke kterým patří IFN gamma, IL-22, IL-6, TNF alfa aj.) a faktory uvolňované fibroblasty a samotnými keratinocyty, které působí autokrinně (TGFalfa, KGF, NGF, FGF). Není zatím znám žádný faktor, který by specificky ovlivňoval hyperproliferaci keratinocytů, ale je předpoklad že se na ni podílejí aktivované T-lymfocyty (26). Při poruchách maturace keratinocytů hrají zřejmě klíčovou roli interleukiny IL-22, IL-20 a IL-23 (27).

Na význam zánětu v rozvoji psoriázy ukazuje účinnost protizánětlivých léků v terapii exacerbací. Velmi účinná je biologická léčba cílená na konkrétní cytokinové mechanismy, zvláště TNF alfa (25). Výrazný protizánětlivý účinek má i klasická Goeckermanova terapie (28).

1.2. Angiogeneze a psoriáza

Histologicky byly prokázány dilatované a vinuté kapiláry v papilární dermis (29). Kvantitativní analýza mikrovaskulární denzity pomocí značených protilátek proti endotelovým markerům ukázala až čtyřnásobné zmnožení endotelu v povrchovém vaskulárním plexu v kůži psoriatických lézí. Hluboký plexus se cévní denzitou od zdravé tkáně nelišil (30). Právě povrchový vaskulární plexus a kapiláry je ta část cévního řečiště kůže, která slouží k zásobování epidermis výživou a samozřejmě i leukocyty v případě zánětu.

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 (31,32).

Psoriáza byla jedna z prvních nenádorových chorob, u které se předpokládala patologická angiogeneze (33). Samotné zkoumání molekulových základů angiogeneze odstartovalo před více než 40 lety. V současné době existuje poměrně podrobná představa o tomto specifickém mechanismu růstu cév.

Angiogeneze je novotvorba cév z již preexistujícího cévního řečiště. Jedná se o děj probíhající za fyziologických podmínek v endotelu různých tkání, hlavně těch, kde dochází k epizodám rychlého růstu (cyklus děložní sliznice, růst vlasového foliklu, mikroklky ve střevě), při obnově integrity tkání při poškození (hojení ran), ale i v patologických procesech, jako jsou růst a metastazování nádorů nebo u nemocí spojených s chronickým zánětem (psoriáza, diabetes, makulární degenerace). Pro nenádorová onemocnění spojená s angiogenezí se v literatuře ustálil termín „angiogenesis dependent diseases“.

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 John Hunter v roce 1787 (34). Konkrétní a experimentálně ověřené molekulárně biologické základy popisu angiogeneze byly položeny až začátkem 70. let 20. století zvláště díky úsilí skupiny Dr. Judah Folkmana (35).

Prvním zkoumaným modelem 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 mm^3) nemůže pokračovat v růstu ani metastazovat, pokud nezíská schopnost iniciovat angiogenezi. Tento krok v progresi tumoru byl nazván angiogenní přepínač (angiogenic switch) a představuje univerzální princip platný pro zkoumané nádory (36). Nádory se podle typu se liší průměrnou dobou dosažení angiogenního přepínače a procentem mikroskopických nádorů, které se aktivují angiogenezí (37).

Koncept angiogenního přepínače byl přejat i pro nenádorovou angiogenezi. Za normálních okolností je endotel většiny tkání v klidovém stavu s dlouhým intervalem mezi dělením endotelové buňky, v průměru asi 2-3 roky. Proangiogenní a antiangiogenní signály jsou v takovéto tkáni v rovnováze. Přepnutí tohoto přepínače tedy obecně představuje přechod této angiogenně klidné tkáně (quiescent) k proangiogennímu fenotypu. K jeho přepnutí do aktivovaného stavu je zapotřebí vhodný stimul, fyzikální (UV aj.) (38), chemicko-metabolický (hypoxie, laktát) nebo biologický (mutace, zánět). Společným jmenovatelem iniciačních stimulů je stav metabolické potřeby dané hypoxií a produkcí laktátu (39,40). Laktát je nejen meziprodukt energetického metabolismu, ale má i klíčovou signalizační funkci (41). Je mediátorem spojujícím chronický zánět, nádorový růst, hojení po poškození a angiogenezi.

Výsledkem iniciace je aktivace endotelu, jeho dělení a růst cévních pupenů ze stávajících cév. Podkladem je lokálně vzniklá převaha proangiogenních signálů (42). Dodnes byly charakterizovány

asi dvě desítky pro- a anti-angiogenních molekul (43). Zásadní a nezbytnou molekulou v prvních fázích angiogeneze je VEGF. Má výrazný vliv na permeabilitu bazální membrány a aktivaci a dělení endotelu (44). Postupně se do řízení jednotlivých fází angiogeneze zapojují další molekuly jako např. bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF), angiogenin aj. Hovoříme o tzv. angiogenní kaskádě (43). 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 regresí a zánikem cév v případě nedostatečné signalizace a přítomnosti převahy inhibitorů angiogeneze (45).

Zasáhnout právě v tomto okamžiku je teoretickým východiskem anti- či pro-angiogenní terapie (46). Využívá se znalostí signalizační kaskády, ve které se blokuje jeden nebo více kroků. Jako výsledný efekt se předpokládá omezení růstu nádorů, jejich regrese, popř. udržení v dormantním stavu, zabránění metastázám, snížení rozsahu chronického zánětu a patologické neovaskularizace (47).

První dokumentovanou úspěšnou léčbou pomocí látky s antiangiogenním účinkem bylo užití interferonu alfa u pacienta s plicním hemangiomem Dr. Carlem Whitem v roce 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 (48,49).

Prvním lékem s antiangiogenním účinkem schváleným FDA byl bevacizumab v roce 2004, monoklonální protilátka určená k terapii kolorektálního karcinomu. Podávaný současně s chemoterapií vedlo k prodloužení střední doby přežití (50). V současné době je v běhu několik desítek klinických studií antiangiogenní protinádorové léčby.

U nenádorových onemocnění byl schválen pegaptanib pro léčbu makulární degenerace sítnice (51). Vedle nově vyvinutých léků cílících na angiogenezi je zkoumán případný sekundární antiangiogenní efekt u známých terapeutik.Tyto látky jsou v literatuře popisovány jako inkluzivní angiogenní inhibitory. Známým zástupcem této skupiny je thalidomid, inhibitory cyklooxygenázy (celecoxib), některá antibiotika, inhibitory mTOR (sirolimus) (46). Antiangiogenní účinek klasických léčiv může být vyvolán i jen odlišným režimem dávkování, tzv. metronomická aplikace chemoterapeutik, kdy jsou v kratších intervalech podávány menší dávky než podle klasického schématu odvozeného z maximální tolerované dávky (52).

Již před více než 40 lety byla navržena teorie, že za zmnožení cév v psoriatických ložiscích je odpovědný proces angiogeneze (33). Od té doby byla nalezena řada důkazů na podporu této představy, většinou v podobě zvýšených hladin proangiogenních cytokinů (VEGF, endoglin) a snížených koncentrací inhibitorů angiogeneze (trombospondin, TSP) (53) v kůži lézí nebo i v séru pacientů (54). Cílená zesílená exprese VEGF v kůži pokusných myší vede k výsevu psoariasiformních lézí (55).

U mnoha klasických terapií psoriázy bylo prokázáno i sekundární antiangiogenní působení. Dokazuje to nález snížené exprese VEGF a angiogeninů 1,2 v psoriatické kůži po terapii PUVA a tazarotenem (56). Byly popsány antiangiogenní účinky retinolu a kalcitriolu (57,58). Z terapeutického dehtu byl izolován karbazol jako látka s protizánětlivým a antiangiogenním působením (59).

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 (60,61). Jinak jsou známy ojedinělé studie typu *„case reports“*. Léčba VEGFRtk inhibitorem (sunitinib) malignity vedla k zlepšení příznaků psoriázy (62,63), topická aplikace FGF inhibitoru vedla ke zmenšení lézí (64).

Vliv Goeckermanovy terapie psoriázy na angiogenní aktivitu zatím ještě studován nebyl.

4. Cíle disertační práce

Předkládaná práce je zaměřena na zhodnocení vybraných ukazatelů souvisejících s vybranými etiopatogenetickými 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.

5. Soubory nemocných a metodika

5.1. Soubory pacientů

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

Do studie bylo zařazeno celkem 44 dospělých pacientů s poraden z 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 dospělí pacienti a rodiče dětských pacientů podepsali informovaný souhlas a studie byla povolena Etickou komisí FN Hradec Králové.

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.

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

Hladiny pentraxinů byly analyzovány ve skupině dospělých pacientů s psoriázou čítající celkem 49 členů. 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.

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

Hladina solubilní formy endoglinu (sCD105) byla stanovena v séru dospělých pacientů s psoriázou v počtu 38 členů. 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.

5.2. 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 spektroradiometrické analýzy použitého UV zářiče je intervalová hustota zářivého toku ve vzdálenosti 100 cm před zářičem 134,45 $\mu W/cm^2$ (pro vlnovou délku 280 – 315 nm) a 245,6 $\mu W/cm^2$ (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 ($W \times cm^{-2} \times nm^{-1}$), relativních spektrálních účinností a šířek dílčích spektrálních oblastí (nm). Dávky záření byly vypočítány vynásobením účinné intenzity záření (1,478 E^{-5} W/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 mJ/cm^2 (1 minuta) a 17,736 mJ/cm^2 (20 minut). Pro kvantifikaci rizika byla použita limitní hodnota pro pracovní prostředí 3 mJ/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.

5.3. Odběry biologického materiálu

Vzorky srážlivé krve byly od pacientů léčených Goeckermanovou terapií odebrány před začátkem léčby a v den propuštění z nemocniční péče do standardních odběrových zkumavek pro srážlivou krev. Srážlivá krev byla odstředěna po 1 hodině při 3000 rpm po dobu 10 minut a sérum bylo zmraženo na -80°C. Stejným způsobem byly zpracovány a uchovány kontrolní vzorky dárců krve. Před vlastním zpracováním byly vzorky rozmraženy při pokojové teplotě.

5.4. Laboratorní metody stanovení angiogenních faktorů a pentraxinů

5.4.1 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 se kterými reagují 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 angiogenních faktorů: ENA-78, GRO alfa, MCP-1, RANTES, IL-8.

5.4.2. 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).

5.4.3. Imunonefelometrie

Imunonefelometrická metoda je založena na měření rozptýleného světla na částečkách 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 IMMAGE 800 firmy Beckman Coulter a reagencií téže firmy.

5.5. Statistické vyhodnocení

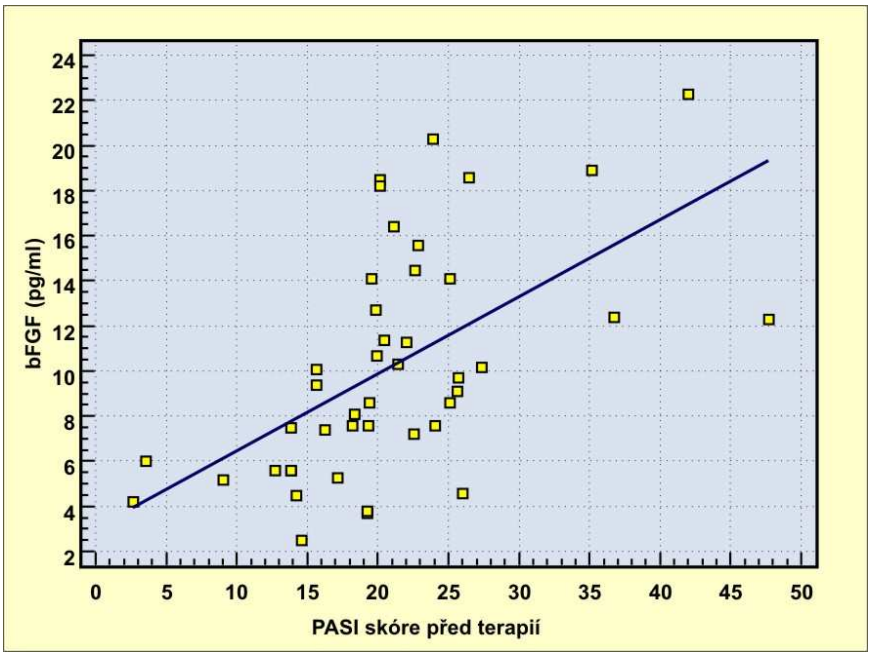
Pro statistické vyhodnocení naměřených dat byly použit statistický software MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgie). Normalita dat byla kontrolována pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. Pro srovnání skupin pacientů a pro zhodnocení změn jednotlivých parametrů během terapie byl použit nepárový nebo párový t-test, případně neparametrický Wilcoxonův nebo Mann-Whitneyův test. Korelační analýza byla provedena pomocí Pearsonova nebo Spearmanova korelačního koeficientu.

6. Výsledky:

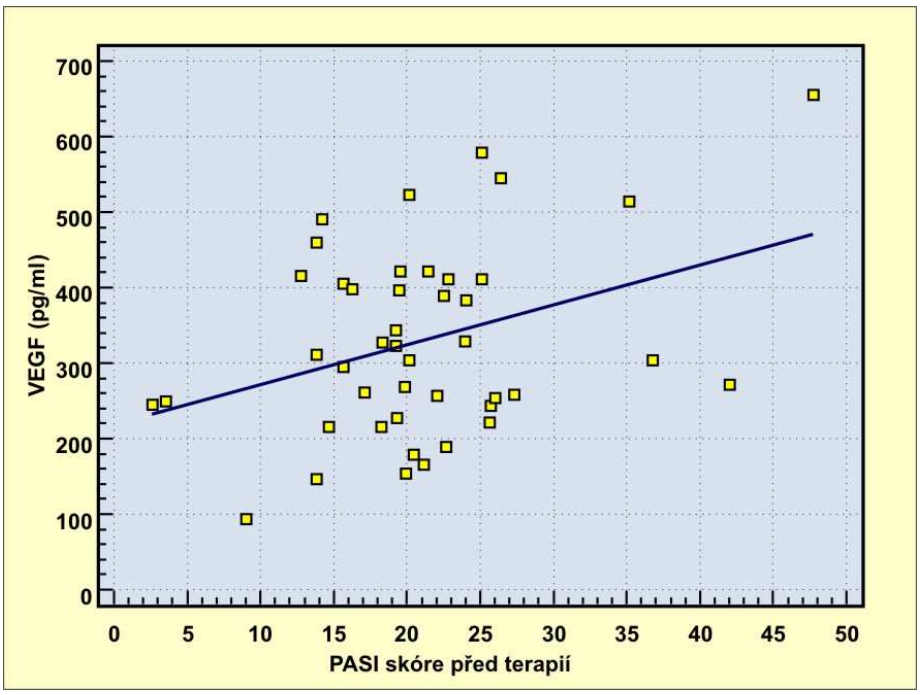
6.1. Stanovení hladin růstových faktorů VEGF a bFGF

Ve skupině 44 dospělých pacientů s psoriázou bylo dosaženo významné klinické odpovědi na terapii. Hodnoty PASI před terapií 20,9 ± 8,4 klesly na úroveň 5,7 ± 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 **obrázcích č. 1 a 2.**.

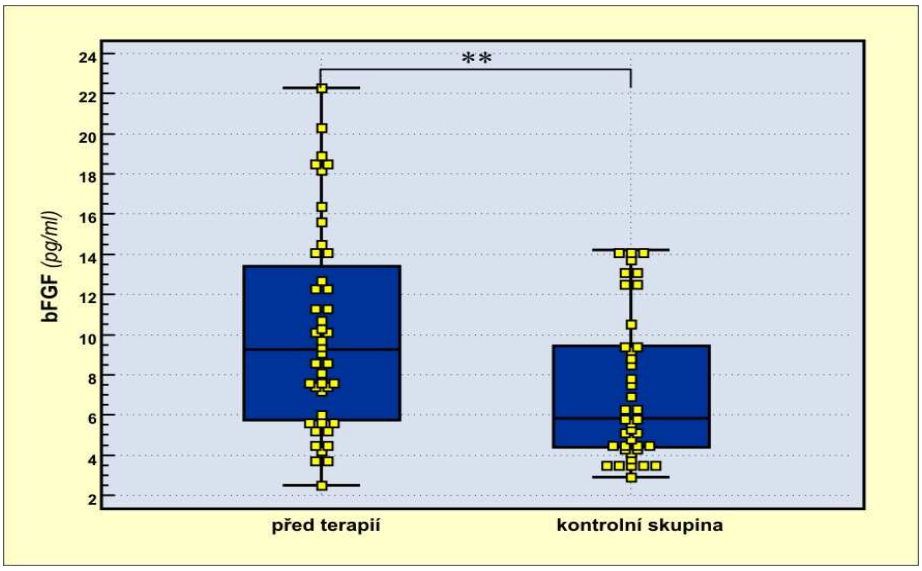


Obrázek č. 1. Korelace mezi sérovými hladinami bFGF a hodnotami PASI skóre ve skupině pacientů s psoriázou před Goeckermanovou terapií. Zjištěný korelační koeficient má hodnotu 0,5688 ($p < 0,001$).

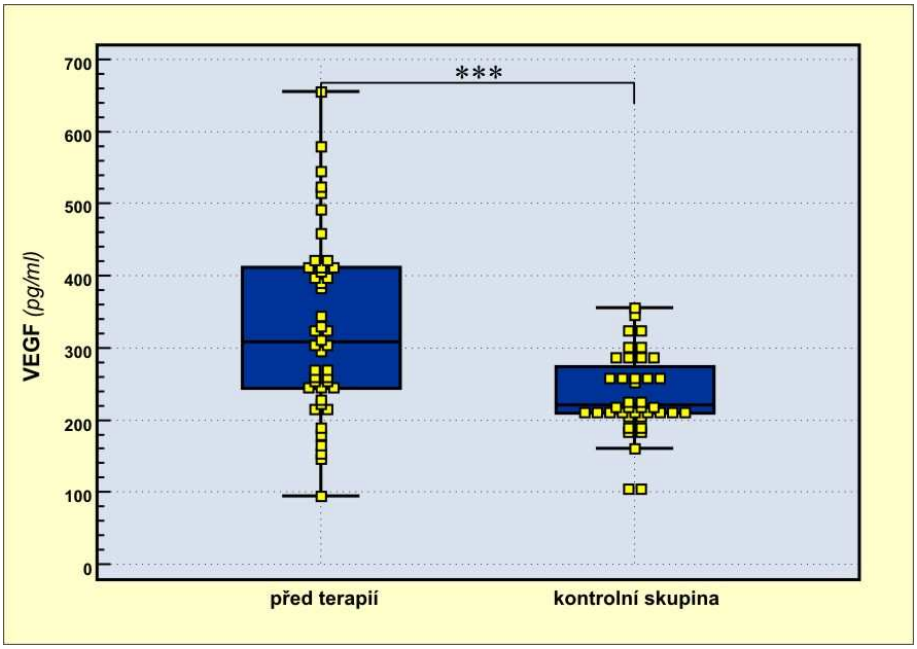


Obrázek č. 2. Korelace mezi sérovými hladinami VEGF a hodnotami PASI skóre ve skupině pacientů s psoriázou před zahájením Goeckermanovy terapie. Korelační koeficient má hodnotu 0,352 (p = 0,019).

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

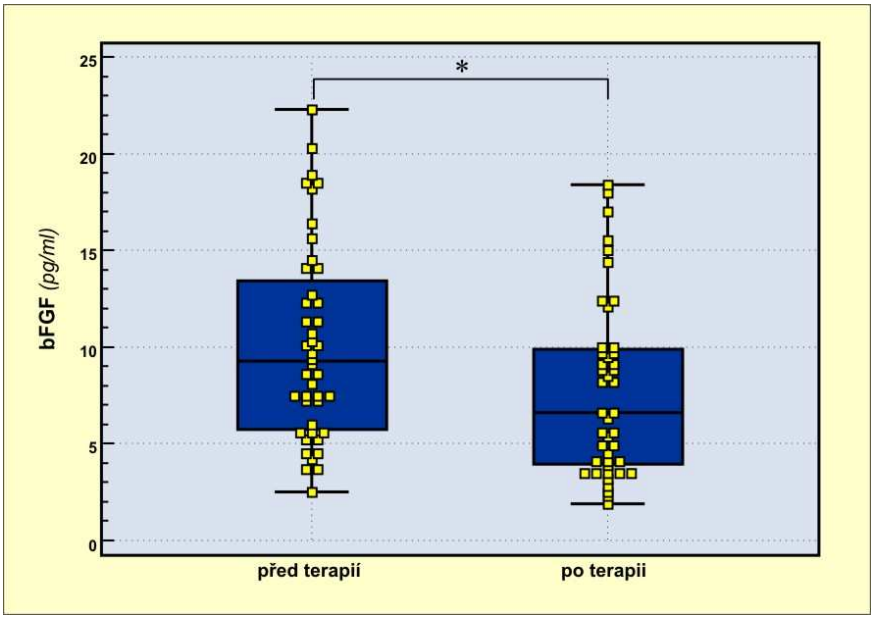


Obrázek č. 3. Srovnání sérových hodnot bFGF u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků (p = 0,0036).

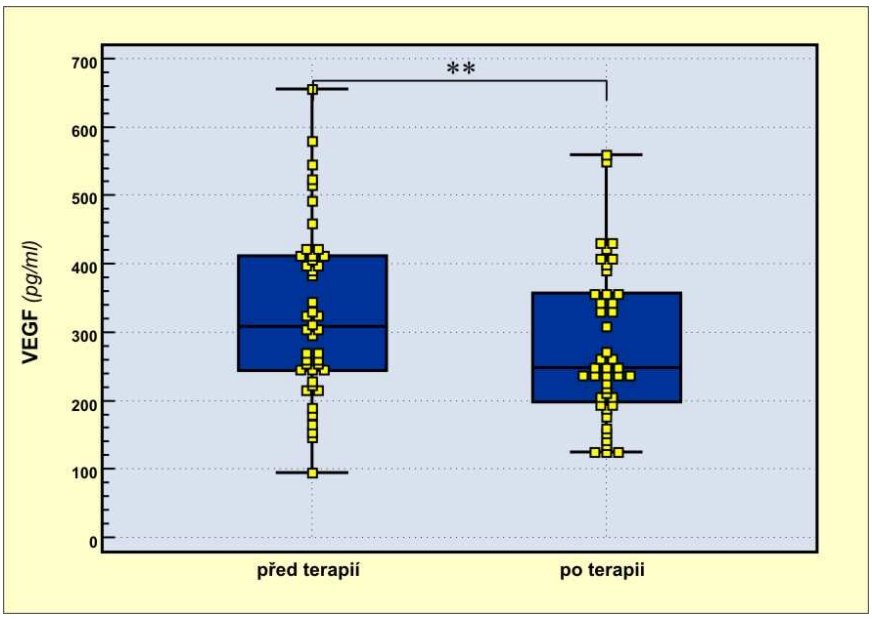


Obrázek č. 4. Srovnání sérových hodnot VEGF u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ($p < 0,001$).

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



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



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

6.2. Stanovení hladin angiogenních faktorů metodou proteinových array.

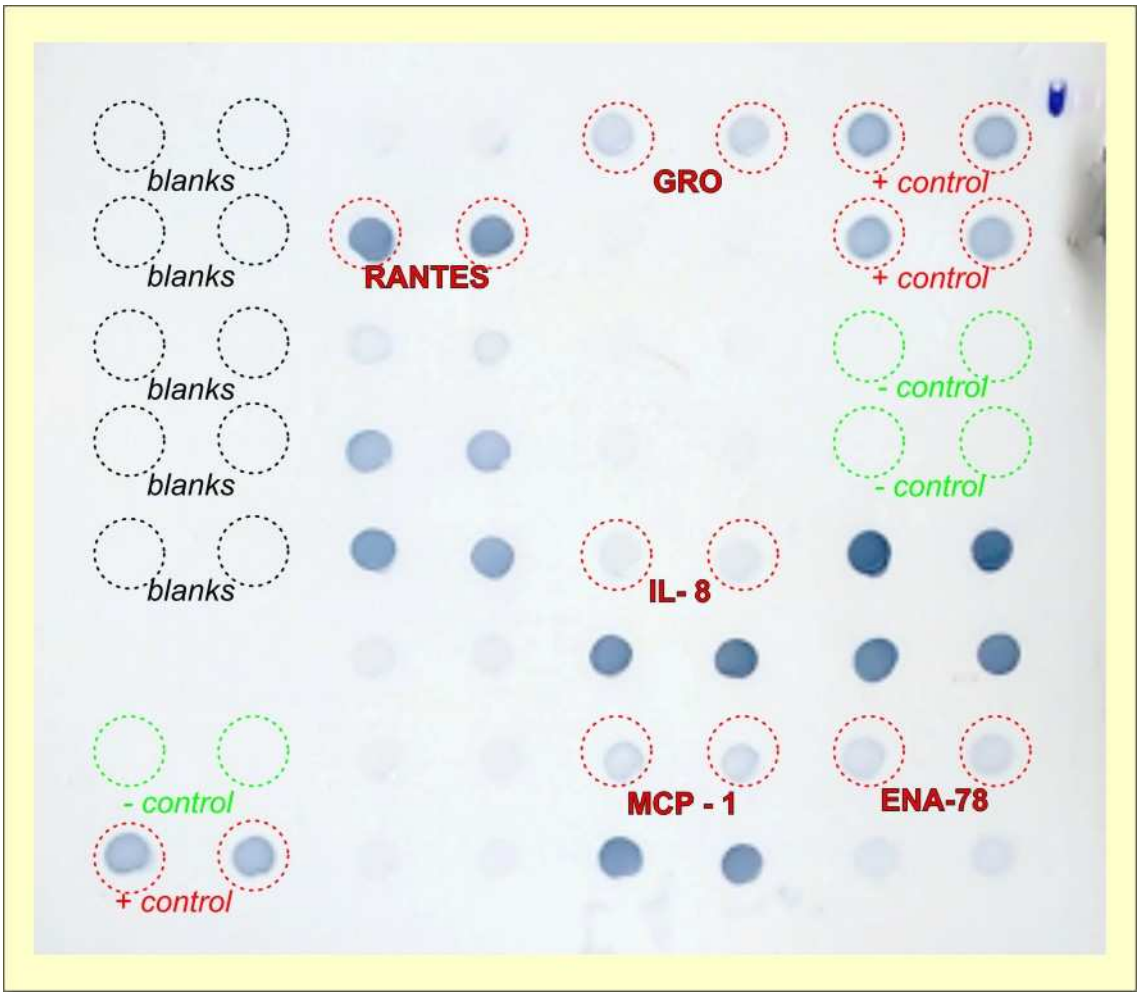
Angiogenní faktory byly vyšetřeny ve skupině 22 dětí s psoriázou léčených Goeckermanovou terapií. Ve všech případech bylo dosaženo významné klinické odpovědi na terapii. Hodnoty PASI před terapií 20,33 ± 9,86 klesly na 7,7 ± 5,22 po terapii ($p < 0,001$). Metodou proteinových arraz byly měřeny chemokiny 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. 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-β1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
6	PIGF	RANTES	TGF-β1	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

Obrázek č. 15. Sestava parametrů na membráně použité v práci. Jednotlivé proteiny se na každé membráně vyšetřují duplicitně.

Typická ukázka membrány se spoty odpovídajícími měřeným chemokinům u konkrétního pacienta je na **obrázku č. 7**.



Obrázek č. 7. Ukázka výsledného zbarvení spotů na membráně při stanovení angiogenních faktorů metodou proteinových array. Spoty odpovídající faktorům zmiňovaným v práci jsou vyznačeny kruhy.

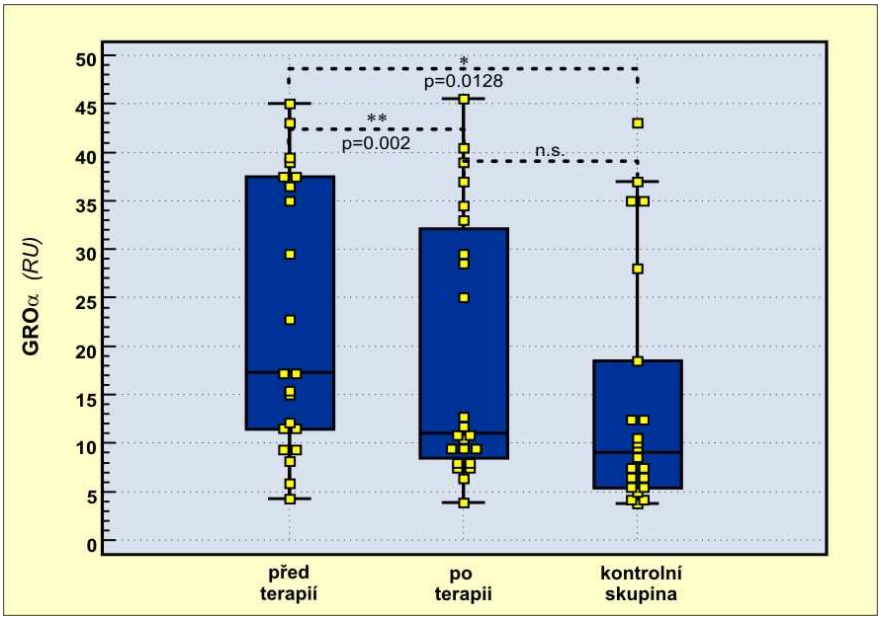
Po vyhodnocení membrán pomocí speciálního software byly koncentrace jednotlivých chemokinů vyjádřeny v podobě relativních jednotek. Hodnoty jednotlivých faktorů jsou uvedeny v **tabulce č. 1**

Tabulka č. 1. Koncentrace chemokinů (relativní jednotky)

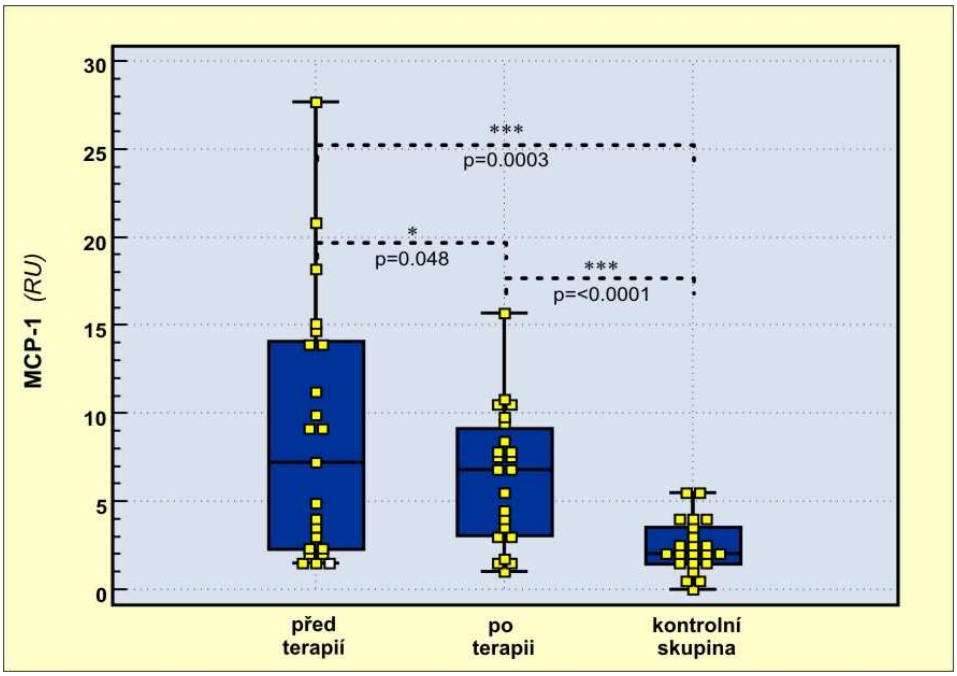
Chemokin	Před terapií			Po terapii			Kontrolní skupina		
	Průměr	SD	Medián	Průměr	SD	Medián	Průměr	SD	Medián
ENA-78	11.33	9.39	8.5	12.75	11.62	7.2	12.44	7.02	11.25
GRO α	22.85	13.79	17.25	19.10	13.5	11.0	14.38	12.46	9.0
IL-8	14.17	19.73	5.40	10.70	12.07	5.0	7.14	10.83	4.75
MCP-1	8.69	7.27	7.2	6.47	3.77	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

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.

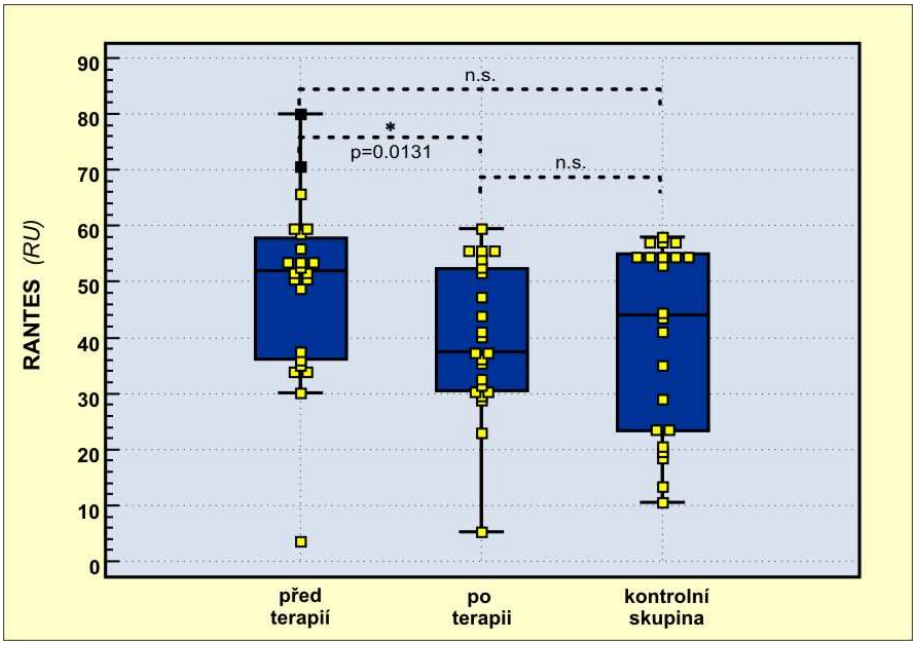
Dále byl zkoumán vliv Goeckermanovy terapie na hladiny zmíněných chemokinů. U pacientů významně poklesly po Goeckermanově terapii koncentrace MCP-1 (p = 0,002), GRO alfa (p = 0,048) a RANTES (p = 0,0131). Hodnoty MCP-1 byly i po terapii významně zvýšeny oproti zdravým kontrolám (p < 0,0001). Změny hladin GRO alfa, MCP-1 a RANTES během terapie a jejich vztah k hodnotám u zdravé populace jsou zobrazeny na **obrázcích 8., 9. a 10.**.



Obrázek č. 8. Rozdíly v sérových hodnotách chemokinu GRO ve skupinách pacientů s psoriázou před zahájením terapie a po ukončení terapie a v kontrolní skupině. Koncentrace GRO jsou uvedeny v relativních jednotkách.



Obrázek č. 9. Změny v sérových hladinách chemokinu MCP-1 ve pacientů s psoriázou před zahájením terapie a po ukončení terapie a v kontrolní skupině. Koncentrace MCP-1 jsou uvedeny v relativních jednotkách.

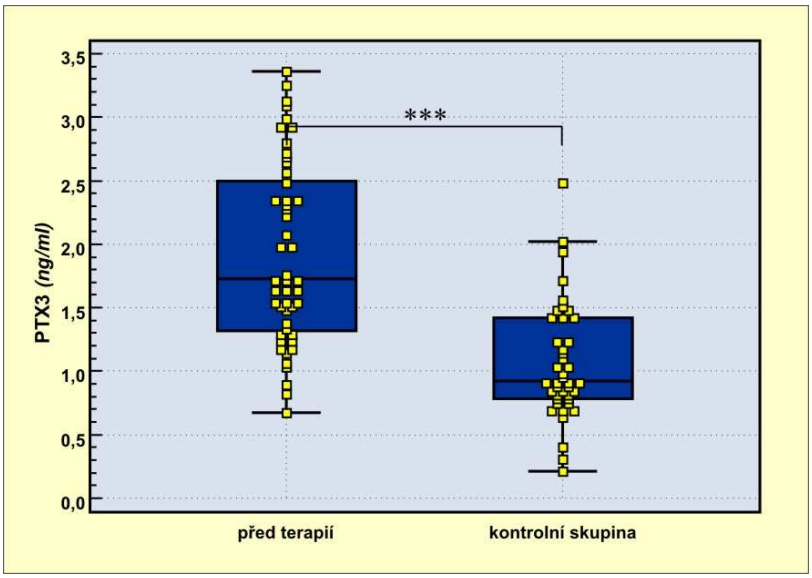


Obrázek č. 10. Rozdíly v sérových hodnotách chemokinu RANTES ve skupinách pacientů s psoriázou před zahájením terapie a po ukončení terapie a v kontrolní skupině. Koncentrace RANTES jsou uvedeny v relativních jednotkách.

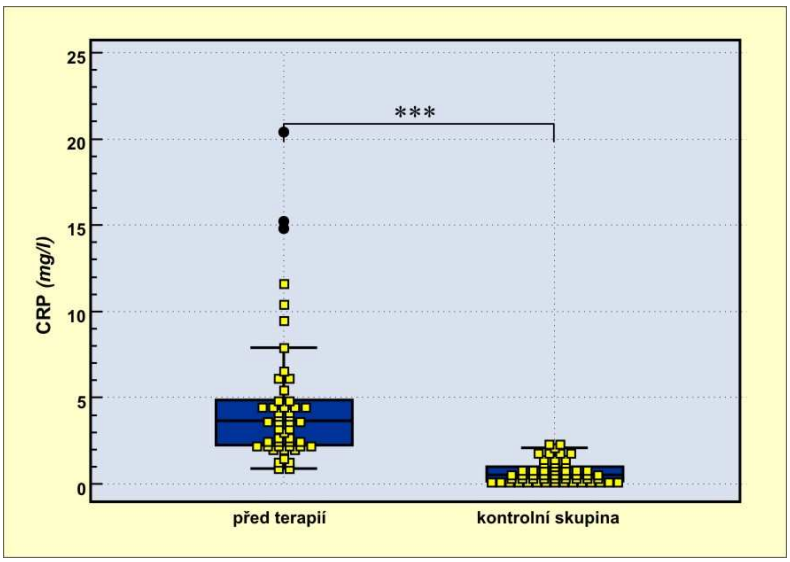
6.3. Stanovení koncentrací pentraxinů PTX3 a CRP

Parametry byly stanoveny ve skupině 49 pacientů s psoriázou. Bylo dosaženo významné klinické odpovědi na Goeckermanovu terapii. Hodnoty PASI před terapií 20,9 ± 8,4 klesly na 7,7 ± 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 ($p < 0,0001$) (**Obrázky č. 11 a 12**). Hodnoty ve skupině zdravých dobrovolníků pro PTX3 byly 1,05 ± 0,45 ng/ml a pro CRP 0,73 ± 0,64 mg/l.

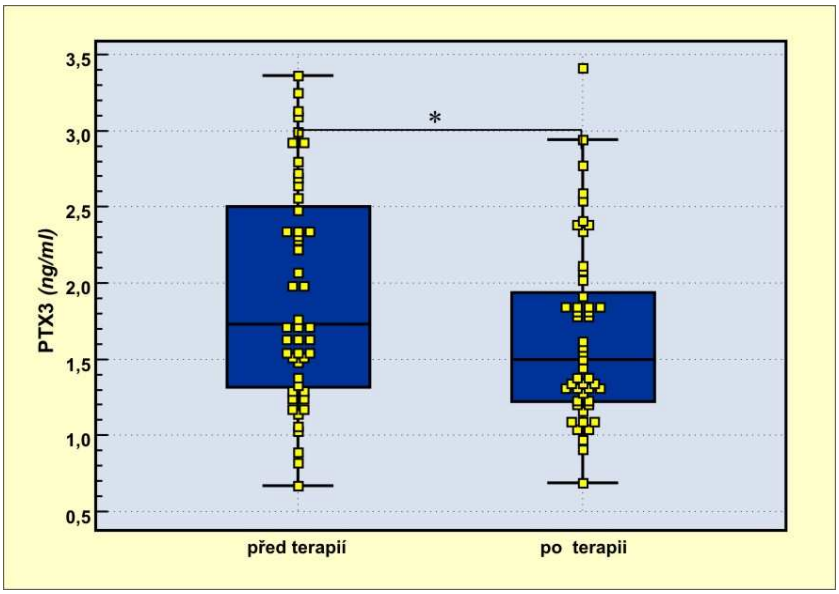


Obrázek č. 11. Srovnání sérových hodnot pentraxinu 3 (PTX3) u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků ($p < 0,001$).



Obrázek č. 12. Srovnání sérových hodnot CRP u pacientů s psoriázou před zahájením terapie s hodnotami u zdravých dobrovolníků (p < 0,001)

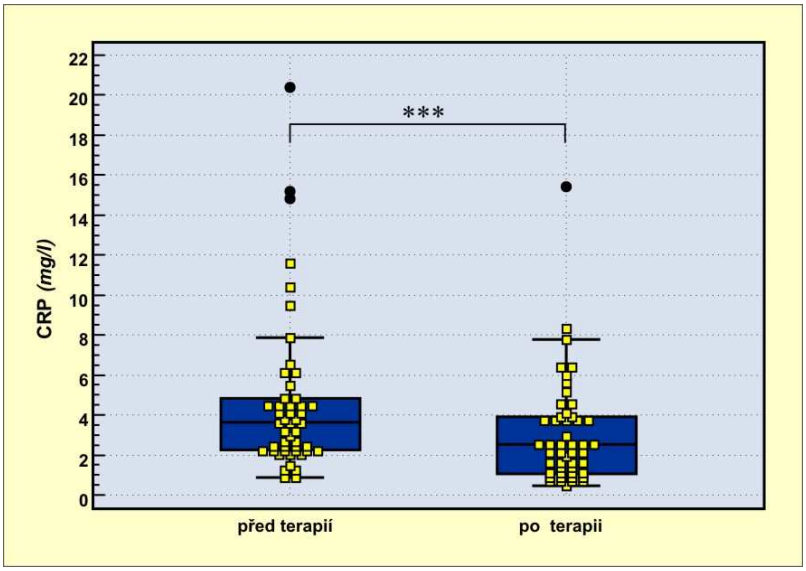
Hladina PTX před léčbou 1,92 ± 0,72 ng/ml klesla významně na 1,66 ± 0,58 po léčbě (p < 0,00396) (**Obrázek č. 13**).



Obrázek č. 13. 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 ± 3,96 mg/l během léčby na 1,66 ± 0,58 mg/l (p < 0,001) (**Obrázek č. 14**).

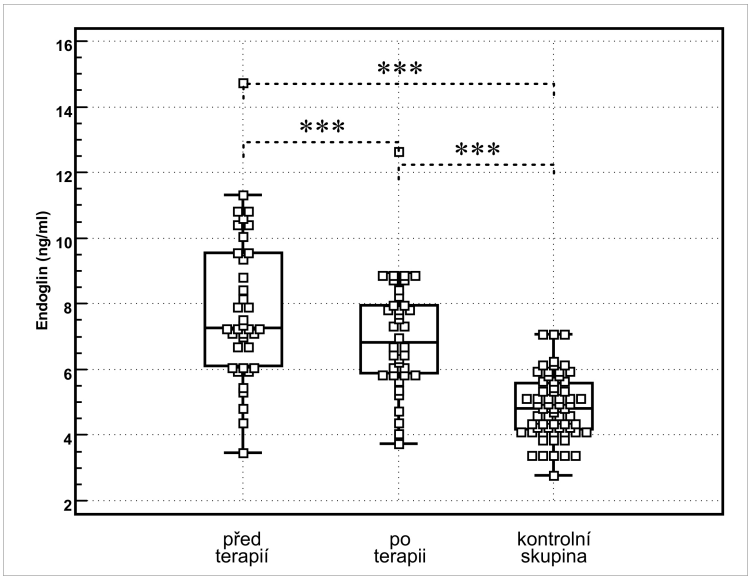


Obrázek č. 14. Pokles hladin CRP v průběhu Goeckermanovy terapie psoriázy (p < 0,001).

6.4. Stanovení hladin solubilní formy endoglinu (CD105)

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 ± 7,49 na 8,85 ± 6,29 po ukončení 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 ± 2,26 ng/ml před léčbou na 7,01 ± 1,71 ng/ml po léčbě (p = 0,0002) (**Obrázek č.16.**).



Obrázek č. 16. Pokles hladin solubilní formy endoglinu v průběhu Goeckermanovy terapie psoriázy (p = 0,0002).

V kontrolní skupině čítající 63 zdravých dobrovolníků byly naměřeny hodnoty endoglinu 4,88 ± 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).

7. Diskuse

7.1. Úvod

Ve čtyřech prezentovaných pracích jsme hodnotili vybrané parametry 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 Goeckermanovou terapií. Je to poměrně stará, ale účinná metoda léčby psoriázy, která se užívá již déle než 90 let (65). Její provádění spočívá v kombinaci fototerapie s lokální aplikací dehtu. Obecně vedou obě tyto složky terapie k imunosupresi. Za patofyziologický mechanismus jejich účinnosti při navození remise u psoriázy se obecně považuje útlum efektorových mechanismů imunitního systému (66). Změna proangiogenního fenotypu k normální vaskulatuře při remisi psoriatické léze vede k otázce, zda Goeckermanova terapie nemá i sekundární antiangiogenní působení.

7.2. Diskuse ke změním hladin VEGF, FGF po Goeckermanově terapii psoriázy

V práci byly analyzovány dvě proangiogenní molekuly, VEGF a bFGF v séru pacientů před a po ukončení Goeckermanovy terapie. VEGF představuje obecnou spouštěcí molekulu angiogenní kaskády společnou pro většinu tkání a modelů angiogeneze (67). 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 proangiogenní funkce je významně provázána s VEGF. Bylo prokázáno jejich synergické působení. Samotná blokáda bFGF vede k menšímu ústupu neovaskularizace než blokování VEGF (68).

Zdá se, že VEGF je klíčový pro iniciaci angiogeneze, zatímco bFGF ovlivňuje její udržování. V pozdějších udržovacích fázích angiogenního procesu je jejich role možná zastupitelná, protože existují důkazy pro kompenzatorní zvýšení bFGF při terapii blokátorem VEGF, která vedla k reaktivaci tumorové angiogeneze (69). Výhodná pro terapii by tedy byla zřejmě preventivní strategie cílící na obě molekuly. Zvýšené plazmatické hladiny samotného VEGF jako proangiogenního faktoru byly nalezeny u řady nádorů a jsou ukazatelem špatné klinické předpovědi u nemoci. (36). Korelace mezi hladinou sérového VEGF a aktivitou onemocnění byla nalezena u některých imunopatologických chorob spojených s chronickým zánětem, jako je např. juvenilní revmatoidní artritida (JRA) (70).

U psoriatických pacientů byla rovněž prokázána zvýšená sérová hladina VEGF, a to zejména u pacientů s těžšími formami nemoci, jako jsou generalizovaná erytrodermická forma a generalizovaná pustulární psoriáza (71). Patofyziologicky byl vliv VEGF na hyperpermeabilitu bazálních membrán cév u těžké generalizované pustulární formy dáván do souvislosti se závažnými mimokožními komplikacemi, jako proteinurie a plicní edém (72). Zvýšená exprese VEGF v kůži pokusných myší vede k výsevu psoariasiformních lézí (55). Představa VEGF jako ukazatele angiogeneze u psoriázy, kde jeho hladina koreluje se závažností nemoci, má tedy svůj teoretický základ. Role bFGF u psoriázy není zatím podrobněji prozkoumána. Jsou popisovány jednotlivé případové studie, kdy topická aplikace FGF inhibitoru vedla k zmenšení psoriatických lézí (64).

V naší práci jsme prokázali zvýšené sérové hladiny VEGF u psoriatiků a jejich snížení po úspěšné léčbě. Hladiny VEGF navíc korelovaly s PASI skóre charakterizujícím závažnost onemocnění. Dalším měřeným angiogenním působkem byl bFGF. Byly rovněž prokázány vyšší hladiny před léčbou a normalizace po léčbě. Hladiny podobně jako u VEGF korelovaly s PASI skóre.

Metoda, 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 mobilizovaných cirkulujících endotelových buněk či endotelových prekurzorů a jejich subpopulací. (průtoková cytometrie). Spíš než jeden samostatný ukazatel nebo metoda bude ke zhodnocení míry angiogeneze potřeba sestavit panel parametrů, který poskytne charakteristický obraz angiogeneze (73). Samostatné hodnocení plazmatických hladin angiogenních faktorů tedy umožňuje jen kvalitativní, hrubé zhodnocení probíhající angiogeneze.

Zvýšená hodnota hladin VEGF u psoriatiků přetrvávala i po terapii. To může ukazovat na pomalejší dynamiku regrese novotvořených kapilár nebo reprezentovat změněné vlastnosti keratinocytů z psoriatických lézí, které si mohou udržovat vyšší bazální sekreci VEGF a tak být stále připraveny k angiogenní odpovědi.

7.3. Diskuse k hladinám solubilní formy endoglinu po Goeckermanově terapii

TGF beta je pleiotropní cytokin s účastí v mnoha informačních sítích organismu. Účinek TGF beta na angiogenezi je nejednoznačný. Signalizace TGF beta 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 beta, který je exprimován převážně na aktivovaných a proliferujících endotelových buňkách. Je považován za ukazatel aktivace endotelu a neoangiogeneze. Na subcelulární úrovni moduluje signální cesty TGF beta kaskády. Existuje i jeho solubilní forma, pravděpodobně produkována enzymatickým štěpením membránové molekuly, která může mít antagonistickou funkci (74). Endoglin hraje významnou roli v procesech spojených s angiogenezí, embryogenezí, tumorigenezí a obecně se zánětem a hojením ran (75). V myším modelu vedla delece obou alel endoglinu k prenatální letalitě v 10. den gestace a byla spojena s kardiálními defekty a špatnou vaskularizací žloutkového váčku. 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) (76,77).

ROW je autosomálně dominantní porucha s incidencí 1:10000 charakterizovaná právě teleangiektáziemi, AVM v plicích, játrech a ledvinách. U lidí trpících touto chorobou byly nalezeny poruchy signalizace cestou TGF beta a u jednoho podtypu HHT1 i samotná mutace v genu pro endoglin (78).

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

solubilní formy endoglinu (sCD105) a receptoru pro VEGF (sVEGFR1) zde sekvestrují své volné ligandy a tím pravděpodobně interferují s TGF beta signalizací a produkcí oxidu dusnatého (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 pro své uplatnění jako časných ukazatelů rozvoje nemoci (79).

Třetí skupinou nemocí jsou nádorová onemocnění, u kterých byla prokázána exprese endoglinu jak na nově tvořené vaskulatuře, tak na samotných nádorových buňkách. Vysoká míra jeho exprese v nádorovém cévním řečišti je spojena s horší prognózou u určitých typů nádorů (80), např. prsu a prostaty (81,82). Endoglin proto představuje lákavý terapeutický cíl. První pokusy na myších modelech využívající protilátky proti endoglinu a dokonce DNA vakcinace proti této molekule vedly k příznivým závěrům (83). Role solubilního endoglinu byla zkoumána především u preeklampsie, v jejíž patogenezi hraje zásadní roli. Na základě těchto poznatků se zdá, že sCD105 působí jako vychytávací receptor pro TGF beta a podobné molekuly a tak interferuje s jeho signalizací. V procesu angiogeneze to znamená tlumivý účinek (84). Antiangiogenního působení sCD105 by bylo možné využít v terapii.

Endoglin hraje konkrétní roli v patogenezi psoriázy. V myším modelu byla řízená zesílená exprese TGF beta v kůži spojena s výskytem lézí podobných psoriatickým (85). Exprese endoglinu v cévách psoriatických lézí u lidí byla již v jiných pracích také zkoumána a zjištěna jeho zvýšená exprese oproti zdravým kontrolám a naopak snížená exprese mimo léze (70). Model endoglinu jako angiogenního parametru by odpovídal současné představě o podílu novotvorby cév na rozvoji psoriázy. Hladinami solubilní molekuly endoglinu (sCD105) u psoriázy se ještě žádná práce nezabývala. V naší práci se sérové hladiny solubilního endoglinu u pacientů s chronickou psoriázou výrazně snížily po terapii. U nemocných byly hladiny sCD105 před terapií významně vyšší než u zdravých dobrovolníků a zůstaly vyšší i po léčbě. Současně nebyla nalezena žádná korelace mezi hladinami endoglinu před i po terapii a tíží nemoci vyjádřené pomocí PASI skóre. Zvýšené hladiny sCD105 ukazují na aktivovaný angiogenní proces v kůži psoriatických lézí. Vyšší exprese endoglinu na novotvořených cévách by znamenala i jeho větší štěpení na solubilní formu.

Z funkčního hlediska představují vyšší hladiny sCD105 v krvi pro angiogenezi tlumivý signál zvláště pak signalizace kaskádou TGF beta. (a VEGF). Tento mechanismus by mohl představovat kompenzaci k biologicky velmi aktivním proangiogenním molekulám a jejich systémovým účinkům (86). 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 *scavenger* receptorů. Navíc jsou popisované hladiny výrazně vyšší.

7.4. Diskuse ke stanovení chemokinů metodou proteinových array

Chemokiny jsou sekundární prozánětlivé mediátory. Jejich produkce je indukovaná celou řadou faktorů, obecně prozánětlivými cytokiny rychlé odpovědi, ke kterým patří TNF alfa, IL-1, IFN gama, složka komplementu C5a, bakteriální stimuly fungující přes TLR receptory aj. (87).

U psoriázy byla prokázána produkce řady chemokinů. V akutní fázi přispívají k akumulaci leukocytů a rozvoji charakteristických zánětlivých změn v dermis a epidermis. V patogenezi nemoci je infiltrace zánětlivými buňkami spolu s angiogenezí jednou z prvních histologických změn v procesu rozvoje plaku. Z funkčního pohledu předchází infiltrace leukocytů jejich aktivaci a následné fázi odpovědi keratinocytů (88).

Usměrněný pohyb leukocytů je uspořádaný proces, který zahrnuje několik fází a je cíleně řízen. Chemokiny toto řízení zprostředkují s vysokou specificitou pro jednotlivé leukocytární populace (89). Různé leukocytární populace dominují v různých fázích rozvoje psoriázy a tomu odpovídají různá chemokinová spektra (90).

V naší práci jsme stanovovali hladiny pěti chemokinů: GRO alfa (CXCL1), MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), ENA78 (CXCL5) a IL8 (CXCL8). Přes velký překryv funkcí můžeme těmto chemokinům přiřadit buněčnou populaci, na kterou převážně působí. RANTES ovlivňuje T-lymfocytární systém a MCP-1 převážně monocyto-makrofágové buňky. IL-8 společně s GRO alfa a ENA78 působí na neutrofilní elementy. Nalezli jsme zvýšené hladiny GRO alfa, MCP-1 před terapií ve srovnání se zdravými dobrovolníky. Naproti tomu hladiny RANTES, ENA-78 a IL-8 před terapií nebyly významně zvýšeny oproti kontrolám. Ve skupině pacientů s psoriázou významně poklesly po terapii hladiny chemokinů MCP-1, GRO alfa a RANTES. Hodnoty MCP-1 byly i po GT významně zvýšeny oproti zdravým kontrolám.

Rozvinutá psoriatická léze produkuje velké množství chemokinů v souladu s naší představou o roli usměrněném pohybu leukocytů v patogenezi nemoci. Zvýšené hladiny GRO alfa 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 alfa. Naše měření bylo navíc provedeno v populaci dětských pacientů, takže chemokinová spektra by mohla být ovlivněna věkem. Po Goeckermanově terapie nastalo snížení hladin některých chemokinů, což by odpovídalo i klinicky snížení intenzity choroby reprezentované PASI skóre. Snížily se hladiny zprvu zvýšených GRO alfa a MCP-1. To by odpovídalo snížení chemotaktických signálů pro neutrofily a makrofágy. I po terapii zůstaly stále zvýšeny hladiny

MCP-1. Vzhledem ke klíčovému postavení makrofágů v patogenezi a udržování pozdní fáze plaku toto zjištění možná představuje projev zbytkové aktivity nemoci, která snad v delším časovém horizontu vymizí a dojde ke snížení hladin MCP-1 nebo ukazuje na stálou subklinickou zánětlivou aktivaci v kůži psoriatiků.

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 funkce tzv. VRL (vascular regulatory leukocytes), tedy buněk s produkcí VEGF, které přispívají 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 aktivní podobě a tedy zvýšenou tendenci k angiogenní odpovědi v kůži psoriatiků.

7.5. Diskuse k hladinám pentraxinu 3 a CRP

Pentraxin 3 (PTX3) je nově objeveným členem skupiny pentraxinů, strukturně podobných proteinů, ke kterým patří i nejznámější protein akutní fáze zánětu, CRP. PTX3 patří k tzv. dlouhým pentraxinům (91,92). 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 působeni je lokalizované do postižené tkáně (93). Společnou vlastností obou pentraxinů je aktivace komplementu klasickou cestou. Důraz na lokální milieu vykazuje i funkčně .Zdá se, že PTX3 má odlišný vliv na aktivaci komplementu v zánětlivé tkání, kde působí aktivačně (94), na rozdíl od cirkulace, kde komplementovou kaskádu inhibuje (95). PTX3 se uplatňuje také jako solubilní receptor pro nebezpečné vzory . Podílí se na opsonizaci některých infekčních agens (96). Byla prokázána jeho vysoká afinita k angiogennímu působku FGF-2. PTX3 tak působí antiangiogenně a podílí se tak na jemné regulaci spolupráce angigogeneze a zánětu (97). Hlavními buněčnými elementy, které produkují PTX3, jsou populace aktivovaných buněk, zejména monocyty, dendritické a endotelové buňky. Syntéza PTX3 je v nich indukovaná po působeni prozánětových cytokinů (TNF-alfa, IL-1b) a mikrobiálních komponent, jako např. LPS (96). Synergisticky s účinkem LPS se na zvýšené produkci PTX3 podílí také IL-10. IFN-gama, stejně jako IL-4 mají z hlediska produkce PTX3 efekt inhibiční (96). Naopak malý vliv na produkci PTX3 je popisován v případě IL-6, hlavního induktoru syntézy hepatálních proteinů (96), včetně CRP.

Zvýšení PTX3 bylo prokázáno u pacientů se systémovými autoimunitními chorobami a u pacientů s celkovou aktivací imunitního systému (SIRS, septickým šokem) (98). Zvýšené hladiny s rychlou kinetikou se objevují i po infarktu myokardu (99). Vysoké hladiny PTX3 lze očekávat u stavů s akutní či chronickou aktivací imunitního systému a jejich hodnoty korelují s tíží a prognostickou závažnosti nemocí (100).

Bylo popsáno významné zvýšení hladin PTX3 v plazmě psoriatických pacientů (101). V naší práci jsme studovali pohyb hladin PTX3 a CRP během Goeckermanovy terapie psoriázy. Bylo dosaženo významné klinické odpovědi na terapii. Hodnoty obou parametrů, které byly ve srovnání se zdravými dobrovolníky výrazně vyšší, během terapie významně poklesly. Zároveň nebyly prokázány žádné statisticky významné korelace mezi sérovými hladinami CRP a PTX3 a aktivitou nemoci vyjádřenou jako PASI skóre. Po Goeckermanově terapii dochází obecně k imunosupresi, což se projevuje poklesem reaktantů akutní fáze zánětu, ke kterým patří CRP a PTX3. Zajímavá je zvýšená hladina PTX3 po terapii. Opět se nabízí možnost stálé vyšší úrovně lokální zánětlivé aktivace, tedy v kůži psoriatiků i bez exprese lézí. CRP je po terapii sníženo na normální hodnoty. Celková reakce organismu na lokální zánět tedy po léčbě odeznívá.

8. Závěr

Cílem této práce bylo zhodnotit vybrané ukazatele jednotlivých etiopatogenetických 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 iniciaci 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 je zahájena 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 milieu 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 excesivní aktivace 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 dvojí 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 .

Podařilo 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-li je antiangiogenní účinek GT primárním dějem či sekundární složkou závislou na ústupu zánětu, zůstává nejasné.

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

Jisté bazální aktivitě 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, tak patofyziologie psoriázy. V této práci jsme ukázali, že i klasická Goeckermanova terapie vedoucí k objektivnímu zmírnění příznaků, vede k snížení aktivity v angiogenních regulačních sítích.

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

I když specifické léčby vyvolávajících iniciačních mechanismů a tak *de facto* vyléčení psoriázy se nemusíme v dohledné době dočkat, může se pořád ještě zdokonalovat terapie exacerbací či jejich

prevence, tedy terapie cílená na efektorové mechanismy. K těm patří prozánětlivé milieu aktivující paměťové T-lymfocyty, chronický zánět, i trvalá aktivace angiogeneze. K vývoji takovýchto léků bude jistě zapotřebí vhodný panel zástupných 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.

9. Použitá literatura

1. Ferrandiz, C., Bordas, X., Garcia-Patos, V., Puig, S., Pujol, R. Prevalence of psoriasis in Spain (epiderma project: phase I). J EurAcad Dermatol Venereol, 2001, 15, s. 20–23.

2. Nevitt, G. J., Hutchinson, P.E. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients beliefs and attitudes towards the disease. Br J Dermatol, 1996, 135, s. 533–537.

3. 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.

4. 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.

6. Nickoloff, B.J., Xin, H. Cytokine and chemokine network in psoriasis, Clin Dermatol, 2007, 25, s. 568 – 573.

7. Barker, J. N. Psoriasis as a T cell-mediated autoimmune disease. Hosp Med, 1998, 59, s. 530–533.

7. Ozawa, M., Aiba, S. Immunopathogenesis of psoriasis. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2004, 3, s. 137–144.

8. Bos, J. D., Hulsebosch, H. J., Krieg, S. R., Bakker, P. M., Cormane, R. H. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. Arch Dermatol Res, 1983, 275, s. 181–189.

9. Hodge, L., Comaish, J. S. Psoriasis: current concepts in management. Drugs, 1977, 13, s. 288–296.

10. Voorhees, J. J. Pathophysiology of psoriasis. Annu Rev Med, 1977, 28, s. 467–473.

11. Kakinuma, T., Hwang, S.T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. J Leukoc Biol, 2006, 79, s. 639-51.

12. Servitje, O., Bordas, X., Seron, D. et al. Changes in T-cell phenotype and adhesion molecules expression in psoriatic lesions after low dose cyclosporin therapy. J Cutan Pathol, 1996, 23, s. 431–436.

13. Ferenczi, K., Burack, L., Pope, M., Krueger, J. G., Austin, L. M. CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin

comparisons by flow cytometry. J Autoimmun, 2000, 14, s. 63–78.

14. Baker, B. S., Bokth, S., Powles, A. et al. Group A streptococcal antigen specific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. Br J Dermatol, 1993, 128, s. 493–499.

15. Brown, D. W., Baker, B. S., Ovigne, J. M., Hardman, C., Powles, A. V., Fry, L. Skin CD4+ T cells produce interferon-gamma in vitro in response to streptococcal antigens in chronic plaque psoriasis. J Invest Dermatol, 2000, 114, s. 576–580.

16. McFadden, J., Valdimarsson, H., Fry, L. Cross-reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin. Br J Dermatol, 1991, 125, s. 443–447.

17. Gudmundsdottir, A. S., Sigmundsdottir, H., Sigurgeirsson, B., Good, M.F, Valdimarsson, H., Jonsdottir, I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? Clin Exp Immunol, 1999, 117, s. 580–586.

18. 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.

19. Schlaak, J. F., Buslau, M., Jochum, W. et al. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. J Invest Dermatol, 1994, 102, s. 145–149.

20. Austin, L. M., Ozawa, M., Kikuchi, T., Walters, I. B., Krueger, J, G. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. J Invest Dermatol, 1999, 113, s. 752–759.

21. Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E. et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. J Immunol, 2005, 174, s. 164–173.

22. Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., Sabat, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? J Immunol, 2002, 168, s. 5397–5402.

23. Chung, Y., Yang, X., Chang, S. H., Ma, L., Tian, Q., Dong, C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. Cell Res, 2006, 16, s. 902–907.

24. Nickoloff, B. J., Karabin, G. D., Barker, J. N. et al. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. Am J Pathol, 1991, 138, s. 129–140.

25. Philipp, 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.

26. Hancock, G. E., Kaplan, G., Cohn, Z. A. Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. J Exp Med, 1988, 168, s. 1395–1402.

27. Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W.F. et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification and role in epidermal function. Cell, 2001, 104, s. 9-19.

28. Lebwohl, M., Ali, S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. J Am Acad Dermatol, 2001, 45, s. 487–498.

29. 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.

30. 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.

31. Pinkus, H., Mehregan, A.H. The primary histologic lesion of seborrhoeic dermatitis and psoriasis. J Invest Dermatol, 1966, 46, s.109–116.

32. 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.

33. Folkman, J. Angiogenesis in psoriasis: Therapeutic implications. J Invest Dermatol, 1972, 59, s. 40–43.

34. Hall, A.P. The role of angiogenesis in cancer. Comp Clin Pathol, 2005, 13, s. 95-99.

35. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971, 285, s. 1182-1186.

36. George, N., Naumov, E. B. A model of human tumor dormancy: An angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. J Natl Cancer Inst, 2006, 98, s. 316-325.

37. Udagawa, T., Fernandez, A. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. FASEB J, 2002, 16, s. 1361-1370.

38. Resnick, N., Yahav, H. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81, s.177-199.

39. Burns, P.A., Wilson, D.J. Angiogenesis mediated by metabolites is dependent on vascular endothelial growth factor. Angiogenesis, 2003, 6, s. 73-77.

41. Murray, B., Wilson, D.J. A study of metabolites as intermediate effectors in angiogenesis. Angiogenesis, 2001, 4, s. 71-77.

41. Trabold, O., Wagner, S. Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. Wound Repair Regen, 2003, 11, s. 504-509.

42. Bouck, N. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor supressor genes. Cancer Cells, 1990, 2, s. 179-185.

43. Adams, R.H., Alitalo, K. Molecular regulations of angiogenesis and lymfangiogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8, s. 464-478.

44. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. Angiogenesis, 2006, 9, s. 225-230.

45. Davis, G.E., Saunders, W.B. Molecular balance of capillary tube formation versus regression in wound repair: role of matrix MMP and their inhibitors. J Invest Dermatol Symp Proc, 2006, 11, s. 44-56.

46. Folkman, J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? Nate Rev Drug Discovery, 2007, 6, s. 273-286.

47. Holmgren, L., O´Reilly, M.S., Folkman, J. Dormancy of micrometastases. Nature Medicine, 1995, 1, s. 149 – 153.

48. White, C.W., Sondheimer, H.M. Treatment of pulmonary hemangiomatosis with recombinant interferon alpha. N Engl J Med, 1989, 320, s. 1197-1200.

49. Folkman, J. Successful treatment of an angiogenic disease. N Engl J Med, 1989, 320, s. 1211-1212.

50. Panares, R.L., Garcia, A.A. Bevacizumab in the management of solid tumors. Exp Rev Anticancer Ther, 2007, 7, s. 433-445.

51. Gragoudas, E.S., Adamis, A.P. Pegaptanib for neovascular age related macular degeneration, N Engl J Med, 2004, 351, s. 2805-2816.

52. Hanahan, D., Bergers, G. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. J Clin Invest, 2000, 105, s.1045-1047.

53. Nickoloff, B. J., Mitra, R. S. Aberrant production of interleukin 8 and thrombospondin 1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis. Am J Pathol, 1994, 144, s. 820–828.

54. Creamer, D., Allen, M. Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating vascular endothelial growth factor. Arch Dermatol, 2002, 138, s. 791-796.

55. Yu-Ping, X., Baosheng, Li. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. Blood, 2003, 102, s. 161-168.

56. Kuroda, K., Sapadin, A. Altered expression of angiopoietins and Tie2 endothelium receptor in psoriasis, J Invest Dermatol, 2001, 116, s.713-720.

57. Oikawa, T., Hirotani, K. Inhibition of angiogenesis by vitamin D3 analogues. Eur J Pharmacol, 1990, , s. 247-250.

58. Diaz, V., Lenoir, M.C. Regulation of VEGF expression in human keratinocytes by retinoids, J Biol Chem, 2000, 275, s. 642-650.

59. Arbiser, J.L., Govindarajan, B. Carbazol is naturaly occuring inhibitor of angiogenesis and inflammation isolated from antipsoriatic coal tar. J Invest Dermatol, 2006, 126, s. 1396-1402.

60. Annonymous. Neovastat (AE-941), an inhibitor of angiogenesis: Randomized phase I/II clinical trial results in patients with plaque psoriasis. J Am Acad Dermartol, 2002, 47, s. 535-541.

61. Dupont, E., Savard, P.E. Evaluation of novel shark cartilage extract for anti-angiogenic properties: a potential role in the treatment of psoriasis. J Cut Med Surg, 1998, 2, s.146-152.

62. Keshtgarpour, M. SU-011248, a vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, controls chronic psoriasis. Translat Res, 2007, 149, s. 103-106.

63. Narayanan, S. Improvement of psoriasis during sunitib therapy for renal cell carcinoma. Am J Med Sci, 2010, 339, s. 580-581.

64. Cuevas, P., Arrazola, J.M. Dobesilate in treatment of plaque psoriasis. Eur J Med Res, 2005, 10, s. 373-376.

65. Goeckerman, W.H. Treatment of psoriasis. Northwest Med, 1925, 24, s.229–231.

66. Lebwohl, M., Ali, S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. J Am Acad Dermatol, 2001, 45, s.487–498.

67. Shibuya, M., Cleisson-Welsch, L. Signal transduction by VEGFR in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp Cell Res, 2006, 312, s. 549-560.

68. Presta, M., Dell´Era. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16, s.159-178.

69. Casanovas, O. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. Cancer Cell, 2005, 8, s. 299-309.

70. Rulo, H.F., Westphal, J.R. Expression of endoglin in psoriatic involved and uninvolved skin. J Dermatol Sci, 1995, 10, s. 103-109.

71. Creamer, D., Allen, M. Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating VEGF. Arch Dermatol, 2002, 138, s. 791-796.

72. 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.

73. Sylvia, S.W., Chi, K.N. Surrogates for clinical development. In: Figg, W.D., Folkman, J. Angiogenesis: An integrative approach from science to medicine. New Yor, Springer, 2008, s. 313 – 320.

74. Torsney, E., Charlton, R. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. Inflamm Res, 2002, 51, s. 464–470.

75. Jonker, L., Arthur, H.M. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. Mech Dev, 2002, 110, s. 193–196.

76. Li, D.Y., Sorensen, L.K. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. Science, 1999, 284, s. 1534-1537.

77. Bouredeau, A., Dumont, D.J. A murine model of hereditary hemorrhagic telenagiectasia. J Clin Invest, 1999, 104, s. 1343-1351.

78. Abdalla, S.A., Letarte, M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia:current views on genetics and mechanisms of disease. J Med Genet, 2006, 43, s. 97–110.

79. Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F., Maynard, S.E., Sachs, B.P., Sibai, B.M., Epstein, F.H., Romero, R., Thadhani, R., Karumanchi, S.A. CPEP Study Group Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. N Engl J Med, 2006, 355, s. 992–1005.

80. Wikström, P., Lissbrant, I.F., Stattin, P., Egevad, L., Bergh, A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. Prostate, 2002, 51, s. 268–275.

81. Beresford, M.J., Harris, A.L., Ah-See M., Daley, F., Padhani, A.R., Makris, A. The relationship of the neo-angiogenic marker, endoglin, with response to neoadjuvant chemotherapy in Brest cancer. Br J Cancer, 2006, 95, s.1683–1688.

82. El-Gohary, Y.M., Silverman, J.F., Olson, P.R., Liu, Y.L., Cohen, J.K., Miller, R., Saad, R.S. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. Am J Clin Pathol, 2007, 27, s. 572–579.

83. Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, MR., Natali, P.G., Maio, M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. Oncogene, 2003, 22, s. 6557–6563.

84. Ten Dijke, P., Arthur, H.M. Extracellular control of TGF beta signaling in vascular development and disease, Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8, s. 857-869.

85. Li, A.G., Wan, D. Latent TGF beta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. EMBO J , 2004, 23, s. 1770–1781.

86. ten Dijke, P., Goumans, M.J. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. Angiogenesis, 2008, 11, s. 79-89.

87. Laing, K.J., Secombes, C.J. Chemokines. Dev Comp Immunol, 2004, 28, s. 443-460.

88. Homey, B., Meller, S. Chemokines and other mediators as therapeutic targets in psoriasis vulgaris. Clin Dermatol, 2008, 26, s. 539-545.

89. Olson, T., Ley, K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol, 2002, 283, s.R7-28.

90. Zollner, M.T., Assadulah, K. Targeting leukocyte trafficking to inflamed skin – still an attractive therapeutic approach? Exp Dermatol, 2007, 16, s. 1-12.

91. 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 Growth Factor Rev, 2004, 15, s. 129-146.

92. Lee, G.W., Lee, T.H. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentraxin family of acute phase proteins. J Immunol, 1993, 150, s. 1804-1812.

93. 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.

94. Baruah, P., Dumitriu, I.A. The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. J Leuk Biol, 2006, 80, s. 87-95.

95. 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.

96. 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.

97. Rusnati, M., Camozzi, M. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. Blood, 2004, 104, s. 92-99.

98. Luchetti, M., Piccinini, G. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). Clin Exp Immunol, 2001, s. 96-202.

99. Latini, R., Maggioni, A.P. Prognostic Significance of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. Circulation, 2004, 110, s. 2349-2354.

100. 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.

101. Bevelacqua, V., Libra, M. Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients. Int J Mol Med, 2006, 18, s. 415-423.

10. Publikační aktivita

10.1. Původní práce v časopisech s IF a v recenzovaných časopisech

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.

10.2. Abstrakta v recenzovaných časopisech

1. **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)