

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**Nové biomarkery v diagnostice a monitorování imunopatologického
zánětu u pacientů s psoriázou**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ctirad Andrýs
Hradec Králové 2008**

Bc. Volencová Soňa

Při této příležitosti bych ráda poděkovala panu RNDr. Ctiradu Andryšovi za odborné vedení, ochotu a pomoc při sestavování této diplomové práce, dále pak celému kolektivu pracovníků Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové za vstřícnost.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Abstrakt

Psoriáza je jedna z nejčastějších kožních onemocnění, postihuje 2-3% populace. Diagnóza se opírá o typický obraz, anamnézu a histopatologické vyšetření. Závažnost choroby se hodnotí na základě rozsahu kožních projevů, lokalizace a průběhu. Je pro ni typický výskyt polokruhových červených papulí, které jsou kryty stříbřitými drolicími se šupinkami. Klíčovou roli v imunopatogenezi hrají T-lymfocyty. Nacházíme převahu Th1 lymfocytů. Genetické vlivy jsou predispozičními faktory pro rozvoj onemocnění. Největší vazbu má choroba na lokus, který se nachází v oblasti kódující HLA molekuly. Léčba psoriázy je celoživotní, nejvíce se používá lokální terapie, dále fototerapie, celková terapie. Díky metodám molekulární genetiky je dnes možné využít i léčbu biologiky. Metodou ELISA jsme stanovovali koncentrace sCD28, sCD30, endoglinu, MCP-1, Apo-1/fas a Fas ligandu na souboru 38 pacientů s psoriázou. Na základě výsledků jsme hodnotili význam těchto parametrů pro diagnózu a monitoring onemocnění. Zjistili jsme, že markery Apo-1/fas a sCD28 jsou vhodné pro určení diagnózy, zatímco Fas ligand, sCD30 a endoglin se mohou použít pro sledování průběhu onemocnění a hodnocení úspěšnosti léčby

Summary

Psoriasis is one of the most frequent cutaneous diseases, the prevalence of psoriasis in population is around 2-3%. Diagnosis is based on typical manifestation, anamnesis and histopathological examination. Effectality is assessed by localization, course and measure of the disease. Plaque psoriasis appears as raised areas covered with silvery white scaly skin. T-lymphocytes play the most important role in immunopathogenesis of psoriasis. There is a prevalence of Th1 lymphocytes. Genetics factors have a role in predisposition to disease. Psoriasis is associated with the alleles from the MHC. In the treatment of psoriasis is usually used topical and systemic therapy and phototherapy. Biologic treatment of psoriasis is now possible due to the method of molecular genetic. We determine concentrations of sCD28, sCD30, endoglin, MCP-1, Apo-1/fas and Fas ligand by ELISA. Follow-up file was made by 38 patients. We investigated importance of these markers for the diagnosis and monitoring of psoriasis. We detected that Apo-1/fas and sCD28 are suitable markers for assignment of diagnosis, while Fas ligand, sCD30 and endoglin may be used for monitoring of disease and evaluation the effectivity of therapy.

Obsah:

Seznam použitých zkratk.....	2
1 Úvod a cíl práce:.....	3
2 Charakteristika psoriázy	5
3 Etiopatogeneze psoriázy:	6
4 Genetické vlivy u onemocnění psoriázou	12
5 Terapie psoriázy.....	14
5.1 Lokální terapie.....	15
5.2 Celková terapie	16
5.3 Fototerapie	17
5.4 Biologika.....	18
6 Charakteristika vybraných markerů	20
6.1 CD30	20
6.2 Fas ligand.....	20
6.3 Endoglin	21
6.4 CD28	22
6.5 MCP-1	23
6.6 Apo-1/fas.....	24
7 ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.....	25
8 Experimentální část:	27
8.1 Charakteristika souboru:	27
8.2 Laboratorní metodika stanovení:.....	27
8.2.1 Kvantitativní stanovení sAPO-1/fas.....	27
8.2.2 Kvantitativní stanovení sCD28	30
8.2.3 Kvantitativní stanovení sCD30	33
8.2.4 Kvantitativní stanovení sFas ligandu.....	35
8.2.5 Kvantitativní stanovení endoglinu.....	38
8.2.6 Kvantitativní stanovení MCP-1	40
8.3 Statistické zpracování výsledků:.....	43
8.3.1 Základní statistika	43
8.3.2 Testovací statistika.....	43
8.4 Výsledky	44
8.4.1 Přehled naměřených hodnot	44
8.4.2 Statistické zpracování výsledků	48
8.4.3 Grafické zpracování výsledků	49
9 Diskuze.....	53
10 Závěr	56
Seznam literatury:.....	57

Seznam použitých zkratk

Ab	protilátka
Ag	antigen
APC	antigen prezentující buňky
BSA	hovězí sérový albumin
CD4	znak pomocných lymfocytů T
CD8	znak cytotoxických lymfocytů T
CLA	antigen exprimovaný na kožních lymfocytech
CTACK	chemokin aktivovaných T-lymfocytů
CTLA-4	antigen cytotoxických T-lymfocytů
DAG	diacylglycerol
DB	dendritické buňky
EDC	epidermální diferenciační komplex
ELISA	enzymoimunoanalýza
GM-CSF	růstový faktor granulocytů-makrofágů
HLA	molekuly histokompatibilního komplexu
HRP	křenová peroxidáza
ICAM-1	imunoglobulinová adhezivní molekula
Ig	imunoglobulin
IL-2	interleukin 2
INF- γ	interferon γ
IP-3	inositoltrifosfát
LFA-1	adhezivní molekula T-lymfocytů
MCP-1	monocytární chemotaktický protein
MIP-1	chemokin uvolňovaný makrofágy
NFAT	jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů
PAI-1	inhibitor aktivátorů plasminogenu
PASI	index hodnotící rozsah a závažnost psoriázy
pDC	plasmocytoidní dendritické buňky
PDGF	destičkový růstový faktor
PI-3	fosfatidylinositol 3-kináza
PUVA	fototerapie psoralenem a UV-A zářením
RANTES	cytokin uvolňovaný cytotoxickými T-lymfocyty
sApo-1/fas	solubilní forma Apo-1/fas
sCD28	solubilní forma CD28

sCD30	solubilní forma CD30
sFas ligand	solubilní forma Fas ligandu
SLE	systémový lupus erytematodes
TACE	TNF- α konvertující enzym
TGF- β	transformující růstový faktor
Tc1	subset cytotoxických T-lymfocytů
Th1	subset pomocných T lymfocytů
Th2	subset pomocných T lymfocytů
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TRANCE	cytokin T-lymfocytů
VCAM-1	adhezivní molekula cévních buněk
VLA-4	leukocytární antigen

1 Úvod a cíl práce:

Psoriáza patří mezi nejčastější kožní choroby, postihuje zhruba 2-3% celosvětové populace. V České republice je počet pacientů kolem 200 000. Přichází

prakticky v každém věku, vzácně začíná již v útlém dětství, nejčastěji spadá její počátek do pozdního dětství nebo mladšího dospělého věku. Většinou trvá choroba nepřetržitě nebo s kratšími i delšími remisemi dlouhou řadu let. V pozdějším věku se projevy mírní nebo dokonce mizí. Avšak i ve stáří je možný vznik lupénky. Obě pohlaví jsou v případě tohoto onemocnění postižena stejně.

Příčina lupénky není známa. Faktory, které mohou způsobit vznik psoriatických lézí jsou například fyzické poranění kůže (Knoebnerův fenomén), náhlé vysazení imunosupresiv (např. kortikosteroidů), bakteriální či virová infekce a snad i vlivy psychické. Svou roli hraje ovšem i genetika. Hereditární výskyt se zjišťuje ve 30-40% případů.

Až na výjimky nepatří k život ohrožujícím nemocím, ovšem je hendikepující a to jak z hlediska psychosomatického, tak i ekonomického a sociálního.

Vzhledem k vysokému výskytu v populaci, chronickému průběhu a značnému procentu těžkých forem patří mezi farmakoekonomicky náročná onemocnění a v poslední době se řadí mezi nejvíce zkoumané autoimunitní choroby.

Cílem této práce je :

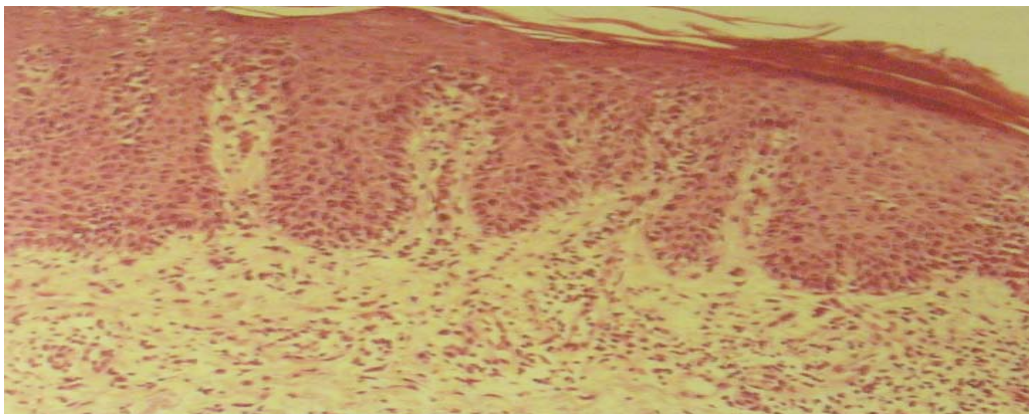
- popis imunopatologických procesů probíhajících v dermis a epidermis postižené kůže
- objasnění genetických vlivů jako predispozičních faktorů
- možnosti současné terapie psoriázy
- analýza vybraných markerů a zhodnocení jejich přínosu pro diagnózu a monitoring onemocnění

2 Charakteristika psoriázy

Psoriáza je charakterizována jako orgánově specifické, geneticky podmíněné onemocnění zprostředkované T-lymfocyty. Diagnostika se opírá o typický klinický obraz, anamnézu a histopatologické vyšetření.

Psoriáza, ostatně jako kožní choroby obecně, je dosud veřejností považována za méně závažnou nemoc, než jsou choroby jiné¹³. Ovšem to, jak lupénka snižuje kvalitu života a jaké má psychosomatické a psychosociální důsledky, může být srovnatelné i jinými onemocněními. Závažnost choroby se hodnotí na základě rozsahu kožních projevů, lokalizace a průběhu.

Lupénka se projevuje typickou morfologií-šupinatý povrch s ostrým ohraničením, dále pak nálezy na nehtech, ve vlasech či v oblasti kožních řas. Při histologickém vyšetření nacházíme při akutním výsevu necharakteristický perivaskulární lymfocytární infiltrát a dilataci kapilár. U pokročilejších forem se vyskytuje ložisková parakeratóza a exocytóza neutrofilů. U plně vyvinuté psoriázy můžeme na histologickém řezu pozorovat pravidelné protažení epidermálních čepů, protažení papil koria nad kterými je epidermis ztenčelá, hyperkeratóza s parakeratózou s redukcí až vymizením stratum granulosum, pod ní přítomnost mikroabscesů z polymorfonukleárů a intraepidermálních spongiformních pustul tvořených okrsky spongiotické epidermis prostoupené neutrofilly¹³.



Obr. č. 1 :Histologický řez psoriatickou kůží¹³

U většiny nemocných má psoriáza chronický průběh s obdobím remisí a novými exacerbacemi. U některých jedinců trvají remise i roky, u jiných se jedná řádově o měsíce. Relapsy se vyskytují u 2/3 nemocných. K léčbě je dnes k dispozici řada léků, ale psoriáza není nemocí vyléčitelnou. Většinou se vykytuje jako mírná nebo středně těžká (v 70-80 % případů).

3 Etiopatogeneze psoriázy:



Obr. č. 2 Psoriasis vulgaris⁵¹

Psoriáza je charakterizována jako genetická, imunologická a systémová choroba⁴². Nadměrné dělení keratinocytů v bazální vrstvě epidermis a jejich rychlá proliferace s nedostatečným rohověním (v histologii nacházíme ztlustění epidermis s parakeratotickou rohovou vrstvou, která se rychle olupuje) je dnes považováno spíš za odezvu primární imunologické poruchy, která probíhá v horním koriu. Pro psoriázu je typický výskyt polokruhových růžových až červených papulí, ostře ohraničených, které jsou na povrchu kryty stříbřitými drolícími se šupinkami. Při akutním výsevu jsou téměř všechny papuly stejné, při chronickém se zvětšují a splývají buď do terčů nebo do rozsáhlých ložisek. Predilekčními místy jsou oblasti loktů, kolen, křížová krajina, ale také vlasatá část hlavy a nehty.

Tabulka č. 1 Základní typy psoriázy

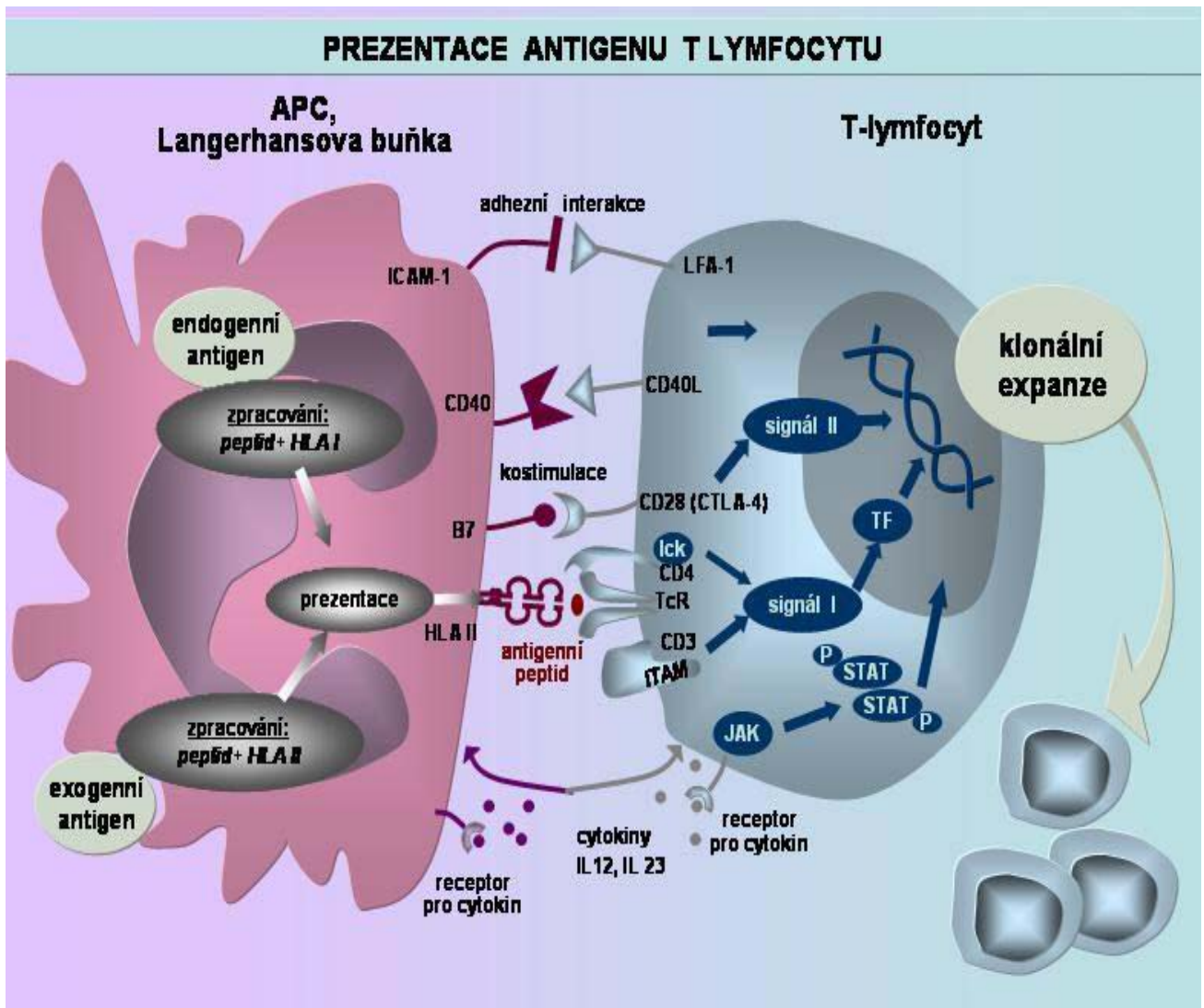
Kapková forma	Nejpříjemnější forma postihující především děti. Červené skvrny s povrchní šupinou mizí během několika týdnů
Chronická plaková forma	Projevuje se u dospělých kdekoliv na těle málokdy v obličeji Velká splývající ložiska, průběh trvá celá léta, 10% nemocných mívá několikaleté remise
Pustulózní forma	Nasedá na jinou formu psoriázy, spouštěcími faktory jsou např. . těhotenství, léčba kortikosteroidy. Ložisková nebo generalizovaná
Erythrodermická forma	Nejzávažnější forma, porušena regulace tělesné teploty, epidermální bariéra rovnováha voda-NaCl, riziko vzniku renální a srdeční insuficience

Tabulka č. 2 Nejčastější provokační faktory

Vlivy	Typ
Infekce a záněty	bakteriální i virové (ORL, zubní, gynekologické, urologické, GIT)
Psychoneuroimunologické	stres duševní či tělesný
Fyzikální a chemické	úrazy a operace, střídavý tlak a tření, exsikace, UV záření, změny teploty a klimatu, poleptání aj. iritativní vlivy
Léky	betablokátory, lithium, antimalarika, inhibitory ACE, zlato, interferony, někdy NSAR a blokátory kalciového kanálu
Zánětlivé dermatózy	infekce kožní (bakterie, kvasinky, herpes viry), seborrhoická dermatitida, ekzémy, polékové exantémy aj. alergické vlivy
Interní choroby	diabetes mellitus, hepatopatie, tyreopatie, hypokalcémie, dna, hormonální dysbalance, obezita, alkohol, kouření

Spíše než pohled na psoriázu, jako chorobu vyvolanou jedním buněčným typem, jednou cestou imunitní odpovědi nebo jedním prozánětlivým cytokinem, je vhodnější koncepce této nemoci jako důsledek interakcí mezi leukocyty infiltrujícími kůži, stálými populacemi různých buněčných typů v kůži a uspořádáním prozánětlivých cytokinů, chemokinů a různých mediátorů v kůži produkovaných a regulovaných buněčnou složkou imunitního systému¹³.

Psoriáza je zprostředkovaná T-lymfocyty, především CD4 a CD8 lymfocyty. Tyto aktivované lymfocyty v kůži způsobují změny, které nakonec vyústí v klinický projev psoriázy. V imunopatogenezi se uplatňují i NK buňky, které působí přímým cytotoxickým efektem a produkují INF- γ . Kožní buňky dozrávají a odlupují se zhruba po 28 dnech, u psoriázy je tento proces daleko rychlejší a trvá asi 3-4 dny. Dříve se předpokládalo, že hyperproliferace keratinocytů souvisí s abnormální epidermální diferenciací. Dnes již víme, že tato hyperplazie je odpovědí na aktivaci imunitního systému, která způsobí hromadění právě CD4 a CD8 lymfocytů v kůži. Oba typy leukocytů jsou schopné produkovat zánětlivé cytokiny a to především INF- γ a TNF- α a diferencují se v Th1 nebo Tc1 buněčné typy. Dalším typickým rysem pro psoriázu je inhibice apoptózy dendritických buněk. To je způsobeno cytokinem TRANCE, patřícím do rodiny TNF, a jeho vazbou na receptory dendritických buněk.



Obr. č. 3: Prezentace antigenu T-lymfocytů

Proces imunitní odpovědi probíhá v několika krocích. Nejprve dojde k aktivaci nezralých dendritických buněk v epidermis po setkání s antigenem. Existuje několik typů DB: Langerhansovy buňky, nezralé dermální DB, zánětlivé epidermální DB a buňky plasmocytoidní. V centru pozornosti jsou především Langerhansovy buňky, které mají v epidermis kontakt ještě s dalšími cca 20-ti okolními keratinocyty a tak aktivace jedné buňky vede k rozsáhlé stimulaci ostatních. U lupénky pDC pronikají do postižené i nepostižené dermis a produkují IFN- α , dále pak ovlivňují efektorové T-lymfocyty, které posléze začínají tvořit TNF- α a INF- γ , stimulují další dendritické buňky k aktivaci, maturaci a migraci. Dermální dendritické buňky vykazují zvýšenou expresi faktoru XIIIa. Ten představuje v aktivní formě enzym, který se podílí na řadě biologických procesů, ale zároveň může vést k formování kryptogenních epitopů a k následnému rozvoji autoimunitní reakce nebo může zasáhnout do procesu

apoptózy¹¹. Langerhansovy buňky patří mezi antigen-prezentující buňky. Ty mají na svém povrchu skupinu bílkovinných molekul, obecně nazývaných jako histokompatibilní komplex HLA. Vazba antigenu na HLA molekuly vede dále k aktivaci maturace a migrace buněk do lymfatických uzlin. Langerhansovy buňky jsou většinou přítomny v nezralé formě a takto nejsou schopny aktivovat lymfocyty. Reakce s antigenem vede k rostoucí schopnosti stimulovat T-buněčnou aktivitu. Zároveň je maturace doprovázena vzrůstající syntézou povrchových znaků zahrnujících především CD80(B7-1), CD86(B7-2), CD40 a adhezivní molekulu (ICAM)-1, která usnadňuje vazbu buněk prezentujících antigen a keratinocytů na receptor LFA-1 T-buněk a poskytuje signál pro aktivaci T-lymfocytů. Zároveň je příčinou neustálé recirkulace T-lymfocytů mezi lymfatickými uzlinami, tkání a krví. Inhibice této adhezivní molekuly by proto mohla přispívat ke zlepšení průběhu onemocnění. Aktivované Langerhansovy buňky migrují lymfatickými cestami do uzlin, kde jsou přítomny T-lymfocyty.

T-lymfocyty normálně cirkulují mezi krví a lymfatickou tkání. Tento pohyb je umožňován díky adhezivním molekulám na povrchu buňky. Jedná se například o glykoprotein CLA, který způsobí přilnutí cirkulujících T-lymfocytů na endotel kožních postkapilárních venul a následné proniknutí do okolních tkání. Vstup do kůže i bez zánětlivého procesu umožňuje chemokin CTACK. Rozvoje psoriázy je tedy způsoben přechodem Th1 a Tc1 lymfocytů z dermální cirkulace do dermis.

K aktivaci nezralých T-lymfocytů dojde až po následné interakci mezi antigenem prezentovaným na molekulách HLA a TCR. Tento receptor je tvořen dvěma řetězci α a β (v menší míře se ovšem vyskytují i řetězce γ a δ) K dozrávání lymfocytů, při kterém vznikají náhodným způsobem geny pro TCR, dochází v tymu. Zde jsou vyřazeny lymfocyty, které se vážou s vlastními HLA molekulami. K tomu, aby byla imunitní odpověď funkční, je zapotřebí, aby v blízkosti TCR byly přítomny další molekuly, a to především CD3, který se skládá z 5 peptidových řetězců a jeho hlavním úkolem je přenášení signálu do nitra buňky. Samotná vazba TCR a antigenu na HLA molekulách by nestačila k uskutečnění imunitní odpovědi, a proto je dále nutné kontakt doplnit dalšími vazbami. Ty jsou zprostředkovány CD4, které se váží na HLA molekuly II. třídy a CD8 reagující s HLA I. třídy. Na povrchu lymfocytů se nacházejí i molekuly CD28, které reagují s CD80 a CD86 na aktivovaných Langerhansových buňkách. Koordinovaná stimulace TCR a CD28 vyústuje v produkci TNF- α , INF- γ , IL-2 a GM-CSF. První dva jmenované cytokiny jsou také

zodpovědné za aktivace transkripce genů, kódujících adhezivní molekuly a chemokiny keratinocytů. Regulační signál pro deaktivaci lymfocytů je zprostředkován vazbou molekuly CD80 a CTLA4.

Buňky překládající antigen prodělávají diferenciaci a maturaci během jejich aktivace. Maturace je kontrolována cytokiny jako je GM-CSF, IL-4 a TNF- α , diferenciace je pak regulována T-buňkami.

T-lymfocyty se diferencují na dva typy - CD4, pomocné lymfocyty a CD8, cytotoxické lymfocyty. Psoriáza je charakterizovaná zvýšenou koncentrací CD8 lymfocytů v epidermis a CD4 buněk v dermis. Oba typy buněk produkují řadu cytokinů, které jsou zodpovědné za expresi zánětlivých proteinů keratinocytů. Typickým produktem Th1 buněk je IL-2 a interferon γ , zatímco pro Th2 je charakteristická tvorba IL-4, IL5, IL-6, IL-13. O tom, jakou skupinu cytokinů bude daná buňka tvořit, se rozhoduje během její aktivace po kontaktu s antigenem. Pokud je v tomto rozhodujícím období pod vlivem Th1 cytokinů, stane se také Th1 buňkou, na druhé straně vlivem cytokinů Th2 se lymfocyty mění na buňky Th2³⁶. Další cytokiny jako je například endoteliální růstový faktor, destičkový růstový faktor jsou důležitým aktivátorem pro endoteliální buňky a fibroblasty. Na druhou stranu faktory produkované buňkami stromatu jsou chemokiny ovlivňující epidermální keratinocyty.

Pro T-lymfocyty je dále typické, že během období maturace dochází na jejich povrchu k expresi důležitého transportního proteinu, nazývaného CLA. Je to charakteristický marker pro psoriázu, T-buňky u jiných než kožních zánětů jsou CLA negativní. CLA glykoprotein interaguje s E-selektinem a P-selektinem, (které se v menším množství nacházejí na endoteliích v kůži, ale při zánětu jsou exprimovány ve zvýšené míře). Chemokiny produkované endoteliálními buňkami a keratinocyty způsobují změnu exprese integrinů LFA-1 a VLA-4 na T –buňkách, které se pak mohou vázat na ICAM-1 a VCAM-1 a dochází k přestupu T-lymfocytů z krve do kůže. U zdravých lidí dochází k eliminaci antigenu právě aktivovanými lymfocyty, zatímco u pacientů s psoriázou infiltrace T-lymfocyty a uvolňování INF- γ a TNF- α přetrvává a proces se stává chronickým.

V patogenezi onemocnění najdeme i porušenou funkci bazální membrány, která za normálních okolností hraje důležitou roli v regulaci základních biologických funkcí keratinocytů (ovlivňuje jejich adhezi, diferenciaci, morfogenezi) a porucha její integrity usnadňuje průchod buněk z koria do epidermis a naopak. Změna její

struktury vede ke narušení proliferace a diferenciaci keratinocytů a může být tedy i příčinou různých vrozených onemocnění, jejichž představitelem je i psoriáza.

Psoriáza je autoimunitní onemocnění, které můžeme také označit jako systémové. Na chromozomu 19 můžeme identifikovat geny, které jsou spojené s výskytem psoriázy, ale i dalších onemocnění jako jsou ulcerózní kolitida, revmatoidní artritida. Dále se zde vyskytují i geny pro intracelulární adhezivní molekulu 1 (ICAM1) a tyrosin kinázu 2, které jsou spojovány s diabetem I. typu a SLE.

Související onemocnění můžeme rozdělit na skupinu s podobnou patogenezi a choroby, které vznikají v důsledku chronických závažných zánětlivých procesů. Podobnou imunopatogenezi s lupénkou nacházíme u Crohnovy choroby, psoriatické artritidy nebo u Bechtěrově choroby a roztroušené sklerózy. U vážnějších forem psoriázy je asociace s diabetem II. typu, hyperlipoproteinémií, ischemickou chorobou srdeční, hypertenzí nebo hepatopatií.

4 Genetické vlivy u onemocnění psoriázou

U pacientů s psoriázou či jinými autoimunitními onemocněními byla identifikována řada odlišností u genů, které za normálních okolností produkují negativní regulátory aktivace buněk imunitního systému nebo ovlivňují tvorbu imunologické synapse. Ovlivnění aktivace T-lymfocytů je cílem léčby pacientů s lupénkou. Pouze u 30% pacientů nacházíme pozitivní rodinnou anamnézu. Dědičnost je polygenní nebo se jedná o polymorfismus genů. U psoriázy dochází ke změně exprese asi 1300 genů, je zvýšená i exprese chemokinů, která normálně probíhá v lymfatických uzlinách a lymfoidních tkáních.

Pravděpodobnost výskytu onemocnění psoriázou je u jednovaječných dvojčat kolem 72%, a nacházíme u nich i shodu co se týče prvního výsevu či závažnosti onemocnění, u dvojvaječných dvojčat je pravděpodobnost 15-23%. Z toho jasně vyplývá, že genetické faktory jsou jistými predispozičními vlivy. Studie prováděné právě na dvojčatech ovšem ukazují, že shoda není nikdy 100%, protože například geny pro vznik receptorů lymfocytů TCR se formují náhodně, stejně tak jako vznikají geny, kódující tvorbu imunoglobulinů. Dědičnost choroby se neřídí Mendelovými zákony, ale díky metodám molekulární genetiky bylo během posledních deseti let, kdy se testovaly vzorky DNA pacientů s psoriázou, objeveno 19 různých lokusů na molekule DNA, jejichž přítomnost značí pro jeho nositele vyšší pravděpodobnost vzniku onemocnění.

Rozlišujeme dva typy psoriázy. Do kategorie I. patří pacienti, u nichž došlo k projevu onemocnění před 40. rokem a je silná vazba s HLA-antigeny (Cw6, A30, B13, B57/17) a rodinná anamnéza bývá pozitivní. Lidé nad 40 let pak patří do kategorie II a mají vyšší frekvenci výskytu artritidy, ale není u nich vazba na HLA antigeny.

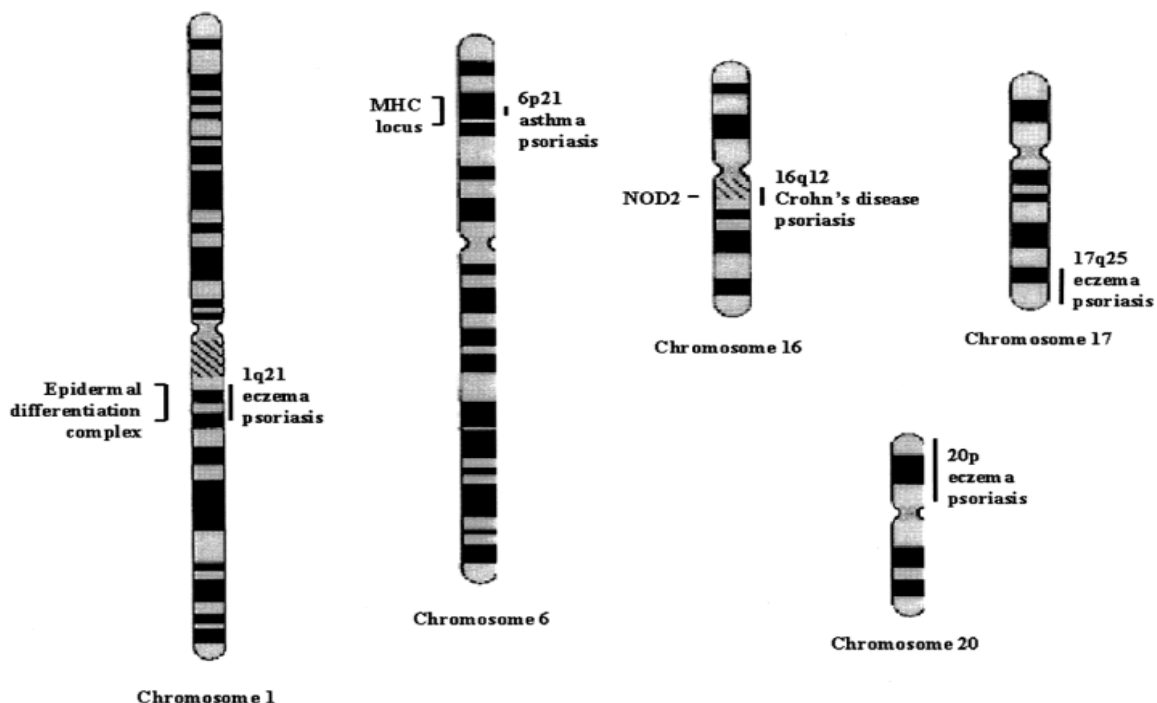
Na krátkém raménku 6. chromozomu se nachází lokus označovaný jako MHC. Jsou zde přítomny geny pro molekuly HLA I. třídy (HLA-A, HLA-B, HLA-C) i II. třídy (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ). HLA komplex I. třídy předkládá antigen lymfocytům se znaky CD8 a NK buňkám, zatímco HLA II. třídy lymfocytům CD4. Tato oblast se začala studovat zejména proto, že u pacientů, kteří prodělali streptokokovou infekci, došlo ke výsevu psoriatických lézí. Některé geny v této oblasti jsou spojeny i s jinými autoimunitními onemocněními, včetně diabetes mellitus

I. typu, revmatoidní artritidy nebo SLE či Crohnovy choroby. V oblasti MHC se nacházejí dva důležité geny, kódující α -helikázu, a corneodesmosin. Oproti zdravému jedinci jsou u pacienta s lupénkou oba geny exprimovány rozdílně. Helikáza se nachází v jádře a cytoplasmě keratinocytů, které jsou přítomny na vrcholu kožní papily, ale chybí v oblasti dermis a epidermis, kde je proliferace nejvýraznější. Tento protein proto zřejmě negativně ovlivňuje diferenciaci a proliferaci keratinocytů.

Penetrance, pravděpodobnost, s jakou se daná varianta genu projeví ve fenotypu, je zhruba 10-15% a záleží teda i na vlivech prostředí.

Na chromozomu 17 byly nalezeny dva geny, které jsou spojené s psoriázou. Na místo mezi těmito geny se za normálních okolností váže regulační protein. Porucha regulace pak vede ke zvýšené aktivaci T-lymfocytů a zároveň k nadměrné proliferaci keratinocytů.

Epidermální diferenciací komplex je skupina asi 70 genů, která se nachází na chromozomu 1. Je důležitý pro zachování funkce kožní bariéry. Bylo prokázáno, že mutace EDC genu hraje roli v patogenezi kožních onemocnění-psoriázy a atopické dermatitidy.



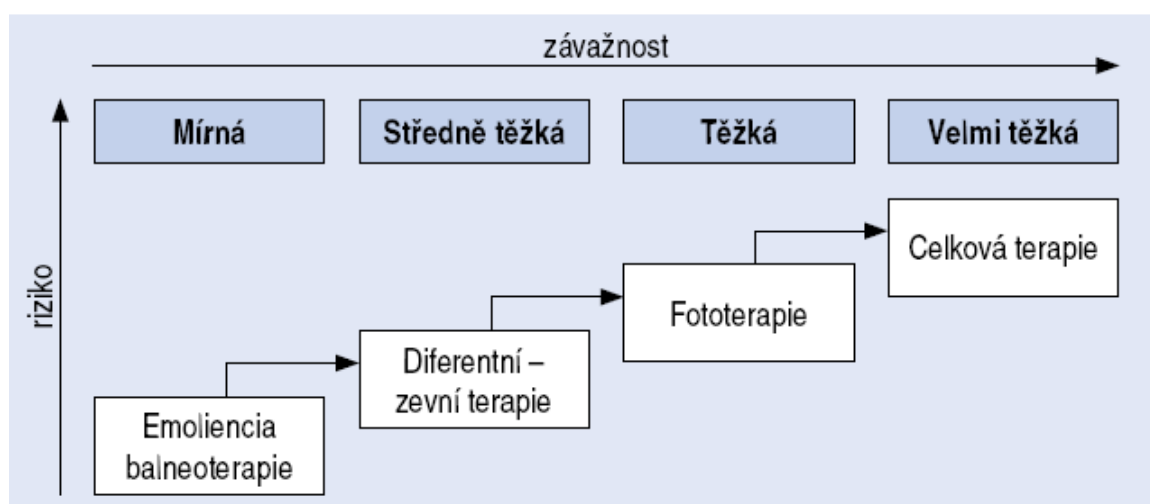
Obr. č. 4 Lokalizace genů spojených s autoimunitními chorobami¹⁵. Na pravé straně chromozomu jsou černou čarou vyznačeny přibližné délky mapovaných oblastí. Hranatou závorkou jsou označeny geny pro epidermální diferenciací komplex, MHC a NOD2 (geny pro Crohnovu chorobu)

5 Terapie psoriázy

Psoriáza až na výjimky nepatří mezi život ohrožující onemocnění, avšak její léčba je celoživotním údělem. Vzhledem k vysokému výskytu v populaci a chronickému průběhu patří mezi farmakoekonomicky náročnou nemoc. Při léčbě se podle vzrůstající závažnosti nejvíce používá lokální terapie, dále fototerapie a nakonec celková terapie. Samozřejmě svou roli hraje i omezení či eliminace provokačních faktorů. Léčebné postupy se u každého pacienta stanovují individuálně a to podle věku, odpovědi na předchozí léčbu, subjektivních obtíží a hlavně podle případných komplikací. Dřívější léčba byla především symptomatická, dnes již díky metodám molekulární genetiky je používána i biologická léčba, zaměřená zejména na inhibici TNF- α , která zajišťuje pacientům lepší kvalitu života a zmírňuje i vývoj choroby. Jinými kandidáty na terapii jsou inhibitory cytokinů, např IL-1, 6, 12 nebo 18, které aktivují T-lymfocyty. Ke zvýšení účinnosti a snížení nežádoucích účinků se používá léčba kombinovaná.

Tabulka č. 3 Závažnost onemocnění

Závažnost	Pacienti postižení psoriázou (%)	Postižená plocha povrchu těla (%)	Skóre PASI (max=72)
Mírná	75-80	<2	<10
Střední	15-20	2-9	10-50
Vysoká	5-10	>10	50-72



Obr. č. 5 Léčba psoriázy dle závažnosti onemocnění ⁴²

5.1 Lokální terapie

Lokální terapie je indikována u mírné a středně těžké formy psoriázy, používá se v monoterapii, ale i v kombinacích a jako doplněk celkové terapie. Do lokální farmakoterapie patří emolienca, kyselina salicylová, urea a dále deriváty vitamínu D, retinoidy a dehet.

Emolienca a koupele mají u pacientů význam především proto, že je u psoriázy porušena kožní bariéra. Jedná se o podpůrnou péči o psoriatickou kůži (zlepšují penetraci, odšupinují, zmírňují svědění, napomáhají regeneraci), snižují i případné nežádoucí účinky. Existují emolienca přímá, která na sebe váží vodu přímo, nebo nepřímá, která obsahují ve vhodném poměru ceramidy a nenasycené mastné kyseliny, jejichž obsah je u psoriatické kůže snížen.

Kyselina salicylová a urea se využívá hlavně pro své keratolytické účinky a to v koncentraci nejčastěji 3-10%. Existuje zde ale možnost vstřebání a následné intoxikace hlavně u dětí a pacientů s renální insuficiencí. Nevhodná je kyselina salicylová před fototerapií, neboť blokuje UVB.

Kortikoidy jsou v léčbě psoriázy používány nejčastěji. Aplikují se pro své antiproliferativní, protizánětlivé účinky. Kortikoidy se váží na cytoplazmatické kortikosteroidní receptory, komplex pak proniká do buněčného jádra, kde se váže na specifické části DNA, a tak dochází k ovlivnění transkripce a tím k syntéze, ale i inhibici syntézy biologicky aktivních proteinů např. IL-1, IL-2, IL-6, INF- γ a TNF- α ¹³. Mají ale i řadu nežádoucích účinků (ztenčení kůže, jizvení, ulcerace, zpoždění hojení ran, imunosuprese, katarakta, glaukom, cushingoidní reakce,) a pro systémovou terapii se nehodí vůbec. Nejsou ani aplikovány v monoterapii, ale například v kombinaci s vitamínem D nebo tazarotenem, který patří do nové generace retinoidů a je pro něj charakteristická afinita k receptorům kyseliny retinové.

Vitamin D a jeho deriváty mají nejen antiproliferační a diferenciační účinek na úrovni keratinocytů, ale i protizánětlivý a imunosupresivní účinek. Analoga vitamínu D působí selektivně antiproliferativně na rychle se dělící buňky, na normálně diferencující se keratinocyty působí naopak proliferačně. K nástupu účinku dochází pozvolna, nejdříve se snižuje infiltrace ložisek a pak ustupuje erytém.

Retinoidy jsou deriváty kyseliny retinové. Interakcí s jadernými receptory ovlivňují transkripci genů. Na keratinocyty a lymfocyty mají antiproliferativní a diferenciační a imunomodulační účinek. Nejužívanějším derivátem je tazaroten, který snižuje expresi adhezivní molekuly ICAM-1 a IL-6.

Dehet se v dermatologii využívá pro své antiproliferativní, protizánětlivé a mírně antibakteriální a antimykotické účinky. U nás jsou používány 2% preparáty. V terapii psoriázy patří kombinace dehtu a UV záření ke klasickým metodám. Kamenouhelný dehet je vyráběn destilací černého uhlí, používá se u chronické ložiskové psoriázy ve formě pasty nebo masti. Pro domácí léčbu nejsou dehty vhodné, mají nepříjemný zápach, špiní prádlo i kůži. I přes obsah polycyklických aromatických uhlovodíků nebyla prokázána vyšší karcinogeneze při užívání moderních dehtových preparátů než při léčbě bez nich. Ovšem dehet se doporučuje používat pouze asi na 1/5 povrchu těla. Podle Goeckermanovy metody se u pacientů využívá fotosenzibilizační potenciál kamenouhelného dehtu. Jedná se o kombinaci UV-B záření s dehtem.

5.2 Celková terapie

Celková terapie je indikována u pacientů, kteří nereagují dostatečně na lokální terapii nebo fototerapii a nedochází u nich ke zlepšení projevů onemocnění. Nevýhodou je řada nežádoucích účinků, takže při volbě terapie musí převládat prospěch nad komplikacemi. V současné době se v České republice používá metotrexát, cyklosporin A a orálně podávané retinoidy.

Metotrexát byl původně vyvinut pro léčbu rakovin. Mechanismus jeho účinku spočívá v reverzibilní inhibici enzymu dihydrofolátreduktázy, který přeměňuje kyselinu listovou na tetrahydrolistovou kyselinu. Dochází k poruše syntézy DNA a tím i k zpomalení růstu buněk. Metotrexát ovlivňuje ovšem i normální buňky a zvláště aktivně proliferující tkáně jsou vůči jeho působení citlivější. Proto by neměl být používán dlouhodobě a jeho aplikace je spojena s pravidelným monitorováním především jaterních testů a krevního obrazu. K vylučování dochází močí, proto je zapotřebí, zvláště u starších pacientů, kontrolovat i ledvinné funkce.

Cyklosporin A je cyklický lipofilní polypeptid produkovaný vláknitými houbami *Trichoderma reesei*, *Cylindrocarpon lucidum*. Nejprve byl používán při transplantacích, kdy výrazně zlepšoval přežívání pacientů i orgánů. Po objevení protizánětlivých účinků je využíván při léčbě autoimunitních chorob. Hlavním účinkem je potlačení aktivity T-lymfocytů, ale i B lymfocytů, Langerhansových buněk, makrofágů a potlačení sekrece především IL-2. Biotransformací jaterními enzymy vzniká množství metabolitů, které mají jak imunosupresivní, tak toxické účinky.

Nezbytná je opět rutinní kontrola krevního tlaku a ledvinných funkcí kvůli hrozící nefrotoxicitě. Vede k rychlému navození remise, ale. doba podávání by neměla překročit 2 roky. Kvůli riziku vzniku kožních karcinomů se nepoužívá v kombinaci s fototerapií.

Acitretin patří mezi monoaromatické retinoidy druhé generace. Má protizánětlivý efekt a ovlivňuje proliferaci a diferenciaci epitelálních buněk. Působí tak, že se naváže na nukleární steroidní receptory a dojde k ovlivnění exprese genů. Je vhodný pro léčbu pustulózní formy psoriázy a používá se i v kombinaci s fototerapií. Pro své nežádoucí účinky je prováděna kontrola jaterních testů, sérových triglyceridů a cholesterolu.

5.3 Fototerapie

Při léčbě psoriázy je nejčastěji používána fototerapie. Pod pojmem fototerapie rozumíme léčbu pomocí ultrafialového záření na kůži. S rostoucí vlnovou délkou pronikají paprsky hlouběji do kůže. V terapii se využívá UV-A (320-400 nm) a UV-B (280-320 nm). Jako první se uplatnila tzv. Goeckermanova metoda. Jedná se o kombinovanou expozici dehtu a UV-B záření, uplatňuje se u mladých jedinců. Obdobnou metodou je Ingramova terapie, kdy se dehet nahrazuje cignolinem a je určena pro pacienty středního a vyššího věku s chronickou psoriázou.

V roce 1974 Parrish a spol. popsali metodu PUVA¹². Léčba spočívá v aplikaci psoralenů a UV záření, které způsobí změnu buněčných funkcí. Psoraleny patří do skupiny furokumarinů, při současném ozáření vytváří příčné můstky mezi pyrimidinovými bazemi dvoušroubovice DNA. Tímto způsobí sníženou syntézu DNA a omezení dělení buněk. Další technický pokrok přispěl k vytvoření téměř monochromatických zářivek TL 01 311 nm, které zvýšily selektivitu antipsoriatického účinku ve srovnání s klasickou širokospektrou UVB fototerapií a zároveň dovolily agresivnější léčebné schéma se zkrácením doby ozařování¹³. Před zahájením vlastní léčby fototerapií je nezbytné stanovit fototyp pacienta, minimální erytémové či fototoxické dávky. Pro určení fototypu se provádí kožní fototest v oblasti křížové a hodnotí se nástup erytému a pigmentační odpovědi. Je nutné i stanovení jaterních enzymů (lék je mírně hepatotoxický) a vyloučení katarakty. Ozařuje se zhruba 4x týdně, průměrná doba léčení je asi 25 dnů. Aby nedošlo k recidivě onemocnění, jednou týdně či jednou za 14 dnů se aplikuje udržovací dávka. Kumulativní fototoxická dávka by celoživotně neměla přesáhnout 1000J/cm². Dlouhodobá léčba

PUVA vede k předčasnému stárnutí kůže a zvyšuje riziko vzniku karcinomu bazálních buněk a povrchových buněk. Je ale lékem volby u těžkých případů. Druhou možností je využití koupelové PUVA, kdy je fotosenzibilizace 100x vyšší než u p. o. podání psoralenu, ale odpadá riziko z p. o. aplikace. Jedná se o lázeň v roztoku 8-methoxypsoralenu po dobu 20 minut a poté je pacient ozářen UVA.

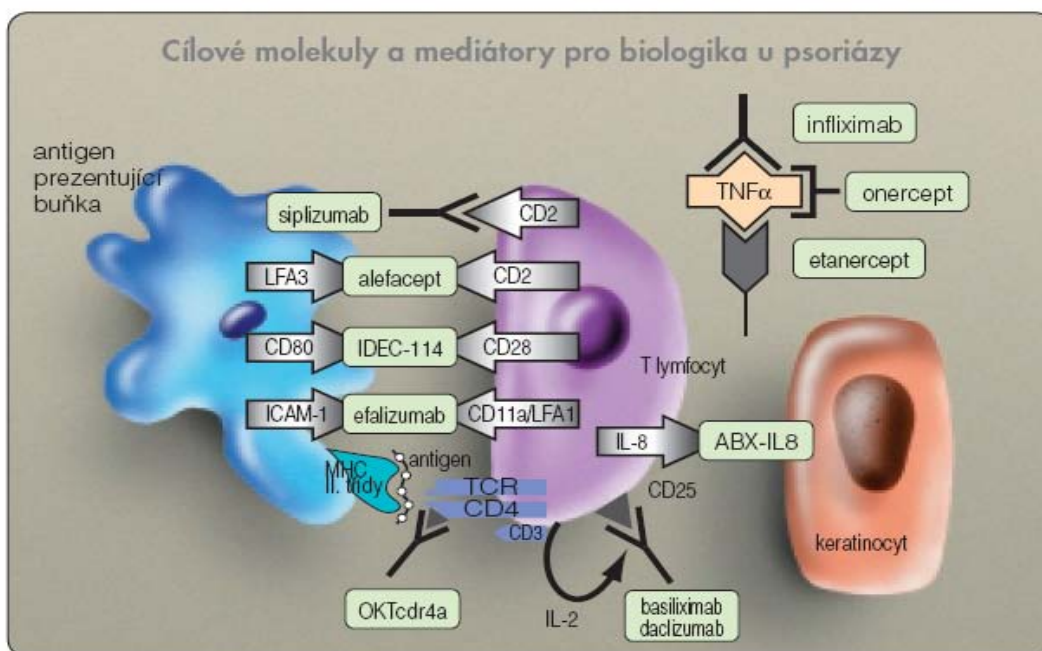
Mechanismus účinku spočívá v navození apoptózy keratinocytů, T-lymfocytů, dendritických buněk a makrofágů. UVB indukuje smrt buňky jednak díky fotoproduktům, vlastní apoptóze a účinkem volných radikálů. Dojde i k proliferaci T-regulačních lymfocytů a tvorbě cytokinů IL-6 nebo TGF- β , snižuje se tedy imunitní odpověď 1. typu. Účinek UVA je podmíněn vznikem singletového radikálu, který působí apopticky na Th1 lymfocyty.

5.4 **Biologika**

Biologika jsou biotechnologicky vyráběné léky zasahující cíleně na molekulární úrovni do patogenetických procesů psoriázy⁴⁴. Základem biologické léčby je inhibice aktivace lymfocytů nebo produkce a působení cytokinů a chemokinů, či ovlivnění interakce s antigen prezentujícími a endoteliálními buňkami. Podávají se pouze parenterálně. Terapie se indikuje u středně těžké až těžké ložiskové formy psoriázy. Je to ovšem léčba finančně náročná.

Tabulka č. 4: Přehled biologik pro léčbu psoriázy

Lék	Alefacept	Efalizumab	Etanercept	Infliximab	Adalimumab
Popis	Fúzní protein lidského LFA-3 a Fc fragmentu IgG1	Humanizovaná monoklonální Ab proti CD11a	Fúzní protein Fc fragmentu IgG1 a TNF-receptoru	Chimérická monoklonální Ab proti TNF- α	Lidská monoklonální Ab proti TNF- α
Mechanismus účinku	Inhibice aktivace a proliferace T-lymfocytů	Inhibice aktivace T-lymfocytů, migrace a adheze ke keratinocytům	Vazba solubilního TNF- α a β blok jeho interakce s povrchovými receptory	Vazba solubilního TNF- α a β blok jeho interakce s povrchovými receptory	Vazba solubilního TNF- α a blok jeho interakce s povrchovými receptory
Poločas eliminace	4-5 dnů	5-10 dnů	3-5 dnů	8-9 dnů	12-14 dnů



Obr. č. 6 : Cílové molekuly a mediátory pro biologika u psoriázy⁴⁵

Biotechnologie využívá metody molekulární genetiky k vytvoření efektivní a bezpečné terapie psoriázy. Biologickými agens jsou proteiny, které mohou být extrahovány z tkání, nebo častěji, jsou uměle syntetizovány použitím DNA rekombinantní technologie. Biologika buď napodobují činnost normálních lidských proteinů nebo reagují s jinými proteiny či buněčnými receptory. Existují 3 druhy biologik využívaných k léčbě psoriázy-monoklonální protilátky, fúzní proteiny a rekombinantně připravené proteiny.

Výhodou biologické léčby je minimum nežádoucích účinků, neboť jsou jednotlivá agens navržena tak, aby specificky reagovala s příslušnými typy buněk. Látky využívané v systémové terapii jsou potenciálními imunosupresivy, zatímco u biologik nebyl tento efekt prokázán. Nevykazují známky lékových interakcí ani riziko kumulativního toxického působení při dlouhodobém podávání.⁴⁰ Avšak dlouhodobé tlumení TNF- α může mít i nežádoucí důsledky jako je vznik lymfomů nebo rozvoj infekce. Díky geneticky heterogenní povaze onemocnění je působení biologik individuální. Z registru pacientů, kteří jsou léčeni právě biologiky například vyplývá, že horší odezvu na terapii mají kuřáci, konzumenti alkoholu a obezní lidé. Pokud se jeden druh biologika neosvědčí při léčbě, není vyloučeno nasazení jiného. Cílem biologické terapie je snížení počtu patologických T-lymfocytů, inhibice aktivace a migrace T-buněk, zamezení produkce cytokinů Th1 buněk a blokáce působení TNF- α

6 Charakteristika vybraných markerů

6.1 CD30

Molekula CD30 je membránový protein, patřící do skupiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor. Pro tuto rodinu molekul je charakteristická přítomnost krátkých opakujících se sekvencí bohatých na cystein. Poprvé byl objeven na buňkách Stenberd-Reedové, které jsou typické pro Hodgkinův lymfom. Byla ale také izolována na jiných lymfocytárních malignitách. CD30 je exprimován na aktivovaných lymfocytech, eosinofilech a neutrofilech po stimulaci antigenem, na některých virově transformovaných T nebo B buňkách. Jeho funkce spočívá v regulaci proliferace a zániku lymfocytů u maligních lymfomů, autoimunitních, kožních a virových chorob.

Je to membránový glykoprotein o velikosti 120 kDa, skládající se ze 595 aminokyselin. Solubilní 90 kDa varianta vzniká odštěpením membránovou TACE po aktivaci T lymfocytu. Navázání ligandu na CD30 vyústí v závislosti na typu buňky v buněčnou proliferaci, v aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B), produkci cytokinů, zvýšení intracelulárního vápníku nebo v buněčnou smrt. CD30 interaguje s TNFs, které hrajou důležitou roli právě v aktivaci nukleárního faktoru NF- κ B. Je hlavní transkripční faktor genů pro vrozenou i získanou imunitu, aktivuje promotorové oblasti protizánětlivých genů. CD30 pozitivní T-lymfocyty produkují IL-5 a zvyšují aktivitu B-buněk. Zvýšené množství solubilního CD30 bylo identifikováno u pacientů s imundeficiencí (pravděpodobně se účastní i rozvoje a progresce AIDS).

Svou roli hraje i při aktivaci Th2 buněk. V imunopatogenezi psoriázy mají klíčovou úlohu T-lymfocyty a molekula sCD30 je markerem pro sledování aktivace Th2 pomocných lymfocytů.

Pro psoriázu je typická převaha Th1 pomocných lymfocytů. Zvýšené hladiny sCD30 u onemocnění znamenají pravděpodobně snahu organismu utlumit zánět a znovu vytvořit rovnováhu mezi Th1/Th2.

6.2 Fas ligand

Apoptózu označujeme jako programovanou smrt buňky. Dochází k ní již během embryonálního života, kdy je tvořen nadbytek buněk a některé jsou cíleně likvidovány. V dospělém organismu dochází k apoptóze za účelem zničení buňky infikované virem, lymfocytu, který tvoří protilátky proti vlastním antigenům. Apoptózou jsou odstraňovány i buňky nádorové, opotřebované nebo z nějakého důvodu nefunkční.

Fas ligand je transmembránový protein patřící stejně jako CD30 do skupiny receptorů TNF. Jeho velikost je 40kDa a geny pro FasL se nacházejí na 1. chromozomu. Existuje ve formě trimeru. Je exprimován na povrchu aktivovaných T- a B-lymfocytů a NK buňkách. Interakce Fas ligandu s příslušným receptorem hraje důležitou úlohu v regulaci imunitního systému a v progresi rakoviny. Vazba FasL s receptorem způsobuje buněčnou smrt. Receptor pro Fas ligand existuje v několika isoformách a geny pro jeho expresi se nachází na 10. chromozomu.

Po navázání Fas ligandu na Fas receptor dojde k navození polymerizace receptorové molekuly a k vytvoření DISC (death inducing signalling complex), který se pomocí endocytózy zanoří do nitra buňky. Dále dochází k navázání molekuly FADD (Fas associated protein with death domain) a k aktivaci proteinu kaspáza 8, který je přítomen ve formě svého neaktivního proenzymu (kaspázy jsou cysteinové proteasy, které štěpí proteiny v místě výskytu aspartátu). Aktivovaná forma proteinu se oddělí od DISC komplexu a způsobí aktivaci kaspázy 3 rozštěpením Bcl-2. K uvolnění cytochromu c dochází díky zvýšené permeabilitě mitochondriální membrány v důsledku kolapsu transmembránového potenciálu. Cytochrom c dále váže Apaf-1 společně s dATP a aktivuje kaspázu 9. Tento protein je dále schopen štěpit proenzym kaspázy 3. Nastávají změny typické pro apoptózu jako je kondenzace chromatinu doprovázená degradací DNA, buňka zmenšuje svůj objem, dojde k rozrušení buněčné membrány. Nakonec se celá buňka změní v apoptotická tělíška, která jsou fagocytována okolními buňkami³⁷

6.3 Endoglin

Endoglin (CD105) byl poprvé popsán Harutou v r. 1986 na leukemických buňkách a byl považován za molekulu asociovanou s nádorovým bujením³¹. Jedná se o membránový glykoprotein, který patří do skupiny TGF beta receptorového komplexu (transforming growth faktor), který je neustále fosforylován. Buněčný receptor pro růstový faktor TGF- β je tvořen několika membránovými receptory-receptorem I a II, betaglykanem a endoglinem. Aminokyselinová sekvence CD105 vykazuje homologii na extracelulární doméně s betaglykanem. Liší se však v buněčné distribuci a biologické funkci. Endoglin má velikost 180kDa a je složen z homodimerů spojených disulfidickými můstky. Nacházíme ho na povrchu endoteliálních buněk, aktivovaných makrofázích, fibroblastech nebo na buňkách hladkého svalstva. Jeho přítomnost je známkou probíhající angiogeneze, regenerace

nebo vzniku zánětu či tumoru. Má schopnost vázat složky TGF- β (TGF- β 1 a TGF- β 3 váže se stejnou afinitou). TGF- β patří do skupiny proteinů, které mají řadu biologických funkcí, regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci a tvorbu extracelulární matrix. Vazba TGF- β a CD105 snižuje fosforylaci endoglinu. Je zajímavé, že inhibice exprese molekuly CD105 zvyšuje schopnost TGF- β 1 potlačit buněčný růst a migraci buněk. Množství molekuly CD105 je dále regulačním faktorem pro expresi ostatních složek extracelulární matrix, např. fibronektinu, kolagenu a PAI-1. Faktory vnějšího prostředí či cytokiny, které se uvolňují při probíhající angiogenezi jsou regulátorem exprese endoglinu. Množství CD105, mRNA a aktivita promoteru je ovlivňována hypoxií, TGF- β a TNF- α . Exprese endoglinu nebo betaglykanu je spojena s sníženou vazbou TGF- β s komplexem signálních receptorů. Na endoteliálních buňkách je endoglin exprimován ve velkém množství, více než 10^6 molekul na buňku. Ale pouze malá část váže TGF- β 1. Může to být způsobeno přítomností fyziologického ligandu nebo je důvodem fakt, že endoglin potřebuje k této vazbě expresi dalších molekul. CD105 váže TGF- β pouze ve spojení s receptorem II.

6.4 CD28

CD28 a příbuzná molekula CTLA-4 jsou důležitým regulátorem pro aktivaci T-lymfocytů. Poskytuje tzv. druhý signál pro aktivaci imunitní odpovědi, neboť vazba antigenu na TCR lymfocytů by k aktivaci nestačila. První signál je zprostředkován vazbou komplexu TCR/CD3 s antigenem prezentovaným HLA molekulami. Za druhý signál jsou zodpovědné molekuly nacházející se na povrchu APC, monocytů a aktivovaných B-lymfocytů, se kterými CD28 reaguje.

CD28 je povrchový glykoprotein exprimovaný na 95% CD4 T lymfocytů a zhruba na 50% CD8 T-buňkách. Skládá se ze dvou glykosylovaných řetězců. CD28 obsahuje 202 aminokyselin o molekulové hmotnosti 23 kDa, které jsou na 5 místech glykosylovány. Geny kódující molekulu CD28 i CTLA-4 se nacházejí na 2. chromozomu. Jak CD28, tak i CTLA-4 váží stejné ligandy, kterými jsou molekuly B7. 1 a B7. 2, ovšem CD28 má menší afinitu. B7. 1 je glykoprotein o velikosti 60 kDa, skládající se ze dvou extracelulárních domén a jedné cytoplazmatické. Nejdůležitější součástí B7. 2 je cytoplazmatická doména obsahující vazebné místo pro protein kinázu C.

Nahromadění molekuly CD28, transkripčního faktoru AP-1 a NFAT spouští v jádře expresi genů pro interleukin 2, tumor nekrotizující faktor a G1 kinázy, která je nezbytná pro správný chod buněčného cyklu.

6.5 MCP-1

Chemokiny jsou nízkomolekulární látky o molekulové hmotnosti od 8 do 15 kDa. Bylo identifikováno asi 50 různých chemokinů, které vykazují 20-50% sekvenční homologie. Jsou produkovány za patologických podmínek, uplatňují se při vzniku a regulaci zánětu. Jejich hlavní funkcí je ovlivňování migrace leukocytů. Můžeme je rozdělit do 4 skupin na základě počtu a polohy cysteinových zbytků na NH₂ terminálním konci polypeptidu. Každá skupina se liší i svou funkcí. MCP-1 náleží ke třídě β-chemokinů (cysteinové zbytky leží vedle sebe), působí chemotakticky především na lymfocyty, monocyty a makrofágy. Patří sem i chemokiny MIP-1α a β a RANTES. Receptory pro chemokiny se nacházejí na povrchu leukocytů, ale jejich přítomnost byla zjištěna i u endotelií, epitelů a svalových buněk. Podle primární aminokyselinové sekvence je můžeme rozdělit opět do 4 skupin. Receptory tvoří polypeptidový řetězec, který 7x prochází membránou a je spojen s G- proteinem. Aktivací G-proteinu se spouští kaskáda reakcí, na jejichž začátku je aktivace enzymu proteinkinázy C, která rozštěpí fosfatidylinositol(4, 5)-difosfát na inositoltrifosfát a na diacylglycerol. DAG aktivuje další enzym-proteinkinázu C a IP3 ovlivňuje uvolňování intracelulárního vápníku. Většina receptorů nerozeznává pouze jeden ligand, ale se stejnou afinitou se na stejný receptor může vázat několik různých ligandů. Zároveň platí i pravidlo opačné⁴⁶.

Zvýšená produkce chemokinu MCP-1 keratinocyty doprovází psoriázu i ostatní kožní onemocnění. Geny pro MCP-1 se nacházejí na 17. chromozomu. MCP-1 působí chemotakticky především na monocyty, které se tímto z krevního oběhu dostávají do tkání a mění se na makrofágy. Díky jeho působení na bazofily dochází k uvolňování histaminu. Je produkován, jako odpověď na probíhající zánět a reparaci tkání, řadou buněk- monocyty/makrofágy, lymfocyty, ale i epiteliálními buňkami, keratinocyty i buňkami hladkých svalů. Jelikož jsou tyto buňky součástí psoriatických lézí, je MCP-1 považován za hlavní chemotaktický faktor odpovědný za migraci monocytů/ makrofágů u psoriázy. Na jeho expresi mají vliv i IL-1, TNF-α, IFN-γ a NF-κB, který nasedá na aktivační místo chemokinového genu. Kromě svého

chemotaktického působení, stimuluje např. i produkci kolagenu a TGF- β ve fibroblastech a IL-10 v makrofázích. . Ačkoliv některé buňky produkují MCP-1 neustále, k největší expresi genů pro chemokin dochází v průběhu zánětlivého procesu. Na tvorbě MCP- se podílí i PDGF-BB, který je produkovaný keratinocyty ale i ostatními buňkami psoriatických lézí, jako jsou fibroblasty a endoteliálními buňkami.

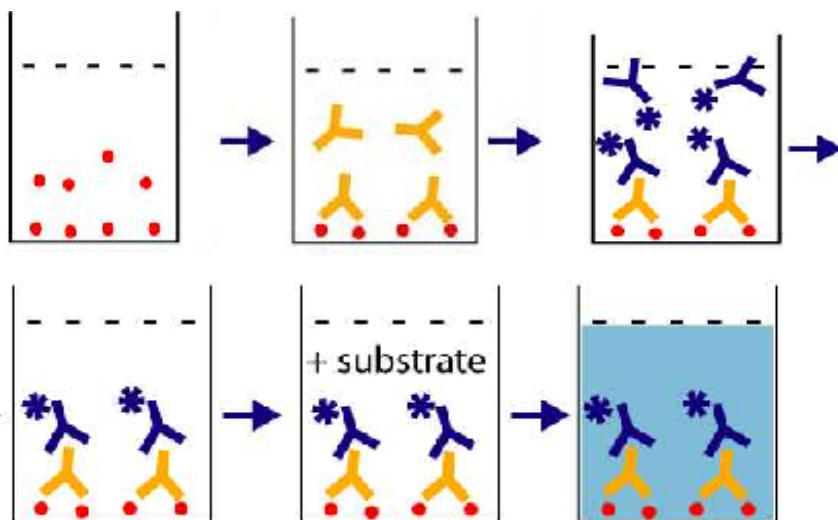
6.6 Apo-1/fas

Apo1/fas (CD95) je transmembránový protein o velikosti 36 kDa, který se také vyskytuje v solubilní formě, když se uvolní z buněčného povrchu proteolytickým štěpením působením metaloproteináz. Geny pro CD95 se nacházejí na dlouhém raménku 10. chromozomu. Apo-1/fas je exprimován na řadě buněk, včetně aktivovaných T- a B lymfocytů, střevních epitelálních buňkách, fibroblastech, jaterních buňkách a na povrchu některých nádorů (FasL je exprimován především na buňkách imunitního systému). Hlavní funkce molekuly CD95 spočívá v navození apoptózy těchto buněk po navázání ligandu či protilátky. Důležitou roli hraje CD95 i při regulaci imunitního systému, podílí se totiž na likvidaci autoreaktivních lymfocytů.

7 ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Jedná se velmi citlivou sérologickou reakci k identifikaci neznámého antigenu nebo k průkazu specifických protilátek. Je to rutinní laboratorní metoda sloužící k analýze vzorků pacientů. Využívá se pro zjištění specifických molekul, přítomného antigenu nebo protilátky, ve vzorku. Je to velmi senzitivní metoda s jednoduchým provedením. Funguje na základě imunoenzymatické reakce. Při použití metody se využívá vlastností protilátek-mohou se vázat na jakékoliv umělé povrchy a dále schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty.

Předchůdcem enzymoimunologických metod byla radioimunoanalýza, tedy technika, která využívá radioaktivně značených antigenů nebo protilátek. Jelikož práce s radioaktivním materiálem ovlivňuje zdraví lidí, hledal se bezpečnější způsob stanovení analytů. Poprvé se myšlenka použití enzymů setkala se nedůvěrou. Hlavní otázka zněla jak může tak velká a objemná molekula jako je právě enzym navázána na antigen či protilátku aniž by prostorově překážela imunologické reakci mezi Ab a Ag. Peter Perlmann a Eva Engvall poprvé popsali metodu ELISA na Stockholmské univerzitě, v roce 1971 použil Perlman enzymoimunoanalýzu ke kvantitativnímu stavení IgG v králičím séru za pomoci značení alkalickou fosfatázou.



Obr. č. 7 Princip metody ELISA ⁴⁸. Při průkazu protilátky ve vyšetřovaném séru se antigen adsorbuje na povrch jamek mikrotitrační destičky. Je-li v séru přítomna specifická protilátka, naváže se na specifický antigen. Následuje důkladné promytí, aby se odstranily všechny nežádoucí složky. Pak se protilátka proti lidské protilátce označená enzymem naváže na tento imunokomplex. Nakonec se přidá roztok substrátu, štěpeného příslušným enzymem a indikátor. Když jsou v séru přítomny protilátky substrát je štěpen enzymem a tím nastane barevná změna indikátoru. Mikrotitirační destička se

hodnotí spektrofotometricky, kdy určíme přesnou koncentraci protilátky (nebo antigenu) ve vyšetřovaném vzorku. K identifikaci neznámého antigenu je postup stejný, ale do jamek mikrotitrační destičky se naváže protilátka.

Jednou z nejpoužívanějších metod je přímá sendvičová ELISA, díky které můžeme určit přítomnost antigenu ve vzorku. Je to rychlá, přesná metoda, a pokud máme k dispozici purifikovaný antigen jako standard, lze zjistit i přesné množství antigenu ve vzorku. Citlivost sendvičové ELISY závisí na několika faktorech-množství protilátek navázaných na povrch mikrotitrační destičky, schopnost protilátky vázat antigen, avidita druhé protilátky vázat antigen a specifická aktivita této protilátky. Použité monoklonální protilátky musí specificky rozeznávat a vázat antigen, nikoli tvořit páry navzájem.

Pokud nelze použít druhou protilátku, alternativní metodou je využití kompetitivní ELISY. V tomto případě soutěží Ag navázaný na pevný nosič se stanovovaným Ag o vazebná místa na molekulách Ab.

8 Experimentální část:

8.1 Charakteristika souboru:

Vyšetřovaný soubor tvořilo celkem 38 pacientů (18 žen a 20 mužů) s chronickou psoriázou. Věkové rozmezí pacientů bylo od 18-76 let. Průměrný věk byl 43, 4 let. Sledovanými parametry byly koncentrace endoglinu, MCP-1, sCD28, sCD30, Apo-1/fas a sFas ligandu před léčbou a po léčbě Goeckermanovou metodou, která spočívá v aplikaci dehtu a následném ozařování UV světlem (intenzita UV-A byla 134. 4 μ W/cm², UV-B 245. 60 μ W/cm²) Terapie byla navržena po domluvě s dermatologem s ohledem na stav a aktivitu onemocnění jednotlivých pacientů. Průměrná doba terapie byla 24 dní. K posuzování účinnosti léčby se používalo PASI skóre. Pokles hodnoty o 80% znamenal ukončení léčby.

Pacientům byly odebrány krevní vzorky a po odstranění krevních elementů centrifugací se séra uchovávala pro analýzu při -20°C.

K porovnání průměrných hodnot vybraných parametrů u nemocných s psoriázou a zdravých lidí nám sloužila kontrolní skupina, kterou tvořilo celkem 63 jedinců, z toho 31 žen a 32 mužů. Průměrný věk byl 34, 4 let, rozmezí 19-65 let.

8.2 Laboratorní metodika stanovení:

K detekci hladin jednotlivých ukazatelů jsme využili metody ELISA

8.2.1 Kvantitativní stanovení sAPO-1/fas

1) Reagencie: 7, 5ml coatovací protilátky (100 μ g/ml)

5ng standardu sAPO-1/fas

10 μ l biotinového konjugátu

10 μ l streptavidinu-HRP

100ml ředícího roztoku

2) Pufry a ostatní pomůcky:

a) fosfátový pufr (PBS)

NaCl 8, 00g

KCl 0, 20g

Na₂HPO₄ x 12H₂O 2, 85g

KH₂PO₄ 0, 20g

rozpustíme v destilované vodě a doplníme na objem 1l.

b) assay (reakční) pufr

BSA (bovine serum albumin)	5g
Tween 20	0, 5ml

rozpustíme v zhruba 500 ml PBS a doplníme stejným roztokem na objem 1l

c) promývací pufr

0, 5 ml Tween 20 přidáme do 1l PBS

d) mikrotitrační destičky

e) substrátový roztok

H₂O₂ a tetramethylbenzidin v poměru 1:2

f) stop roztok

4N kyseliny sírové (2ml koncentrované kyseliny sírové+16 ml H₂O)

3) příprava mikrotitrační destičky:

a) 750 µl coatovací protilátky smícháme s 9, 25 ml PBS. Získáme 10 ml coatovacího roztoku. 100µl tohoto roztoku pipetujeme do každé jamky mikrotitrační destičky. Destičku zakryjeme a uložíme přes noc při teplotě 2-8°C.

Vylijeme obsah destičky a promyjeme 300 ml promývacího roztoku.

b) přidáme 250 µl assay pufru do každé jamky a necháme inkubovat při pokojové teplotě 2 hod. Poté 2x promyjeme promývacím roztokem. Takto připravené destičky můžeme uchovávat při teplotě 2-8°C jeden týden.

4) příprava standardu

250 µl destilované vody přidáme do lahvičky obsahující lyofilizovaný sApo-1/fas.

Dále přidáme 225µl Assay pufru. Získáme 250µl standardu sApo-1/fas (2ng/ml)

5) příprava biotinovaného konjugátu:

Před použitím konjugátu ho naředíme assay pufrém v poměru 1:13500. (Nejprve smícháme 1µl biotin konjugátu s 9µl assay pufru, tento roztok pak ještě rozředíme tak, že 3, 7µl smícháme s 4996, 3 µl assay pufru, tím získáme výsledné ředění 1:13500)

6) Příprava streptavidinu-HRP

Pro pipetování do jamek mikrotitrační destičky je nutné naředit HRP v poměru 1:12000 (této koncentrace docílíme smícháním 1 μ l HRP s 9 μ l assay pufru, z tohoto roztoku znovu použijeme 8, 3 μ l a přidáme 9991, 7 μ l assay pufru)

Vlastní postup:

A) Připravíme si kalibrační křivku standardů: do jamek A1 a A2 pipetujeme 100 μ l naředěného sApo-1/fas standardu. Z obou jamek pak dále přeneseme 100 μ l do jamek B1 a B2 . Postupně přenášíme 100 μ l z předešlých jamek až do řady G, z této jamky pak 100 μ l odstraníme již do odpadu.

Získáme řadu koncentrací od A1 resp. A2(1000pg/ml) do G1 resp. G2 (16pg/ml)

B) přidáme 90 μ l ředícího roztoku do jamek určených pro vzorky

C) pipetujeme 10 μ l vzorku do mikrotitrační destičky

D) do všech jamek přidáme 50 μ l biotinového konjugátu

E) přiklopíme na destičku víčko a necháme inkubovat při 37°C 1 hodinu.

F) destičku promyjeme nejméně 3x přibližně 300 μ l promývacího pufru . Po posledním promytí necháme destičku okapat na filtrační papír, ale ne déle jak 15 min., neboť destička nesmí nikdy úplně vyschnout.

G) do všech jamek přidáme 100 μ l naředěného streptavidinu-HRP.

H) přiklopíme na destičku víčko a necháme inkubovat při 37°C 1 hodinu

I) destičku opět promyjeme 3x 300 μ l promývacího roztoku.

J) přidáme 100 μ l TMB substrátového roztoku.

K) inkubujeme při pokojové teplotě 15 minut (pokud je to možné na třepačce). Průběh reakce je nutné vizuálně sledovat a zastavit v momentě kdy nejvyšší koncentrace standardu se zbarví do tmavě modré barvy

L) reakci ukončíme přidáním 100 μ l stop roztoku. Výsledky odečítáme ihned po zastavení reakce nebo do 1 hodiny při skladování ve tmě při teplotě 2-8°C.

M) Spektrofotometrem měříme absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 450nm. Z hodnot, které odpovídají standardu vypočítáme průměrné hodnoty a sestojíme kalibrační křivku, z té odečítáme výsledné koncentrace sApo-1/fas pro neznáme vzorky. Pokud jsme vzorky před použitím ředili, je nutné výsledek ještě vynásobit ředícím faktorem (ředili jsme vzorky 1:10, ředící faktor=10).

Kalibrační křivka slouží k odečítání pouze těch vzorků, které byly analyzovány společně se standardy za stejných podmínek.

8.2.2 Kvantitativní stanovení sCD28

1) Reagencie: 1, 2ml vazebné protilátky (100 μ g/ml)

1 lahvička sCD28 standardem

60 μ l biotinového konjugátu

30 μ l streptavidinu HRP

100ml ředícího roztoku

2) Pufry a ostatní pomůcky:

a) fosfátový pufr (PBS)

NaCl 8,00 g

KCl 0,20 g

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2,85 g

KH₂PO₄ 0,20 g

rozpustíme v 1 l destilované vody

b) reagenční (assay) pufr:

BSA (bovine serum albumin) 5 g

Tween 20 0,5 ml

rozpustíme v přibližně 500 ml PBS a poté doplníme na objem 1l PBS.

c) promývací roztok:

Do 1l PBS přidáme 0,5 ml Tween 20

d) mikrotitrační destička

e) substrátový roztok:

tetramethylbenzidin a H_2O_2 v poměru 1:2

f) stop roztok :

4N kyselina sírová (36N kyselina sírová + 16ml H_2O)

3) Příprava mikrotitrační destičky:

a) 110 μ l coatovací protilátky smícháme s 10, 90 ml PBS. Získáme 11 ml coatovacího roztoku. 100 μ l tohoto roztoku pipetujeme do každé jamky mikrotitrační destičky. Destičku zakryjeme a uložíme přes noc při teplotě 2-8°C.

Vylijeme obsah destičky a promyjeme 250 μ l promývacího roztoku.

b) přidáme 250 μ l assay pufru do každé jamky a necháme inkubovat při pokojové teplotě 2hod. Poté 2x promyjeme promývacím roztokem. Takto připravené destičky můžeme uchovávat při teplotě 2-8°C jeden týden.

4) Příprava standardu

250 μ l destilované vody přidáme do lahvičky obsahující lyofilizovaný sCD28. Získaný roztok dále 10x naředíme tak, že k 23 μ l přidáme 207 μ l assay pufru. Získáme 230 μ l standardu sCD28 (100ng/ml)

5) Příprava biotinového konjugátu:

Před použitím ho naředíme assay pufrům v poměru 1:1000. 5, 4945 ml assay pufru smícháme s 0, 0055 ml biotinového konjugátu.

6) Příprava streptavidinu-HRP

Pro pipetování do jamek mikrotitrační destičky je nutné naředit HRP v poměru 1:5000 (této koncentrace docílíme smícháním 2, 2 μ l HRP s 10, 9988 ml assay pufru)

Vlastní postup:

A) připravíme si kalibrační křivku: Do jamek určených pro standard (A1 a A2) pipetujeme 100 μ l ředícího roztoku, přidáme 100 μ l standardu s CD28, obsah jamky promícháme a postupně přenášíme 100 μ l do jamek B1 a B2 až do řady G. Získáme řadu koncentrací od 50ng/ml po 0, 78ng/ml.

B) přidáme 50 μ l ředícího roztoku do jamek určených pro vzorky

- C) pipetujeme 50 μ l vzorku do mikrotitrační destičky
- D) do všech jamek přidáme 50 μ l biotinového konjugátu
- E) přiklopíme na destičku víčko a necháme inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě na třepačce .
- F) destičku promyjeme nejméně 3x přibližně 300 μ l promývacího pufru. Po posledním promytí necháme destičku okapat na filtrační papír, ale ne déle jak 15 min. , neboť destička nesmí nikdy úplně vyschnout.
- G) do všech jamek přidáme 100 μ l naředěného streptavidinu.
- H) přiklopíme na destičku víčko a necháme inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě na třepačce.
- I) destičku opět promyjeme 3x 300 μ l promývacího roztoku.
- J) přidáme 100 μ l TMB substrátového roztoku.
- K) inkubujeme při pokojové teplotě 10 minut (pokud je to možné na třepačce). Průběh reakce je nutné vizuálně sledovat a zastavit v momentě kdy nejvyšší koncentrace standardu se zbarví do tmavě modré barvy
- L) reakci ukončíme přidáním 100 μ l stop roztoku. Výsledky odečítáme ihned po zastavení reakce nebo do 1 hodiny při skladování ve tmě při teplotě 2-8°C.
- M) spektrofotometrem měříme absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 450nm. Z naměřených hodnot standardu vypočítáme průměrné absorbance a sestojíme kalibrační křivku, z té odečítáme výsledné koncentrace sCD28 pro neznáme vzorky. Pokud jsme vzorky ředili, výsledné koncentrace ještě násobíme

ředícím faktorem. Kalibrační křivka slouží pro odečet pouze těch vzorků, které byly analyzovány společně se standardy.

8.2.3 Kvantitativní stanovení sCD30

1) Reagencie: 5, 5 ml vazebné protilátky (100 μ g/ml)

lahvička s lyofilizovaných sCD30

55 μ l HRP-konjugátu

100 ml ředícího roztoku

2) Pufry a ostatní pomůcky:

a) fosfátový pufr (PBS)

NaCl 8, 00 g

KCl 0, 20 g

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2, 85 g

KH₂PO₄ 0, 20 g

rozpustíme v 1 l destilované vody

b) reakční (assay) pufr:

Hovězí sérový albumin 5 g

Tween 20 0, 5 ml

rozpustíme v přibližně 500 ml PBS a poté doplníme na objem 1l PBS.

c) promývací roztok:

Do 1l PBS přidáme 0, 5 ml Tween 20

d) mikrotitrační destička

e) substrátový roztok:

tetramethylbenzidin a H₂O₂ v poměru 1:2

f) stop roztok :

4N kyselina sírová (36N kyselina sírová + 16ml H₂O)

3) Příprava mikrotitrační destičky:

a) 550 μ l coatovací protilátky smícháme s 10, 45 ml PBS. Získáme 11 ml coatovacího roztoku. 100 μ l tohoto roztoku pipetujeme do každé jamky mikrotitrační destičky. Destičku zakryjeme a uložíme přes noc při teplotě 2-8°C.

Vylijeme obsah destičky a promyjeme 300 ml promývacího roztoku.

b) přidáme 250 µl assay pufru do každé jamky a necháme inkubovat při pokojové teplotě 2hod. Poté 2x promyjeme promývacím roztokem. Takto připravené destičky můžeme uchovávat při teplotě 2-8°C jeden týden.

4) Příprava standardu

Lyofilizovaný sCD30 nejprve ředíme destilovanou vodou. Poté odebereme 25µl a přidáme 225µl assay pufru.

5) Příprava HRP konjugátu

Pro pipetování do jamek mikrotitrační destičky je nutné naředit HRP v poměru 1:1000. K 5, 4945 ml assay pufru přidáme 0, 0055 ml HRP konjugátu.

Vlastní postup:

A) připravíme si kalibrační křivku: Do jamek určených pro standard (A1 a A2) pipetujeme 100µl ředícího roztoku, přidáme 100µl naředěného sCD30, obsah jamky promícháme a postupně přenášíme 100µl do jamek B1 a B2 až do řady G. Získáme řadu koncentrací od 100ng/ml po 1, 6 ng/ml.

B) přidáme 75µl ředícího roztoku do jamek určených pro vzorky

C) pipetujeme 25µl vzorku do mikrotitrační destičky

D) do všech jamek přidáme 50µl HRP konjugátu

E) přiklopíme na destičku víčko a necháme inkubovat 3 hodiny při pokojové teplotě na třepačce .

F) destičku promyjeme nejméně 4x přibližně 400µl promývacího pufru. Po posledním promytí necháme destičku okapat na filtrační papír, ale ne déle jak 15 min. , neboť destička nesmí nikdy úplně vyschnout.

G) přidáme 100µl TMB substrátového roztoku.

H) inkubujeme při pokojové teplotě 10 minut (pokud je to možné na třepačce). Průběh reakce je nutné vizuálně sledovat a zastavit v momentě kdy nejvyšší koncentrace standardu se zbarví do tmavě modré barvy

I) reakci ukončíme přidáním 100 μ l stop roztoku. Výsledky odečítáme ihned po zastavení reakce nebo do 1 hodiny při skladování ve tmě při teplotě 2-8°C.

J) spektrofotometrem měříme absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 450nm. Z hodnot, které odpovídají standardu vypočítáme průměr a sestojíme kalibrační křivku, z té odečítáme výsledné koncentrace sCD30 pro neznáme vzorky. Pokud jsme vzorky před analýzou ředili, naměřené koncentrace násobíme ředícím faktorem(vzorky jsme ředili 1:4, ředící faktor=4).

Kalibrační křivka slouží pro odečítání těch vzorků, které byly analyzovány společně se standardy.

8.2.4 Kvantitativní stanovení sFas ligandu

1) Reagencie: 2, 75 ml vazebné protilátky (100 μ g/ml)

2 lahvičky s lyofilizovaných sFas ligandem

60 μ l biotinového konjugátu

15 μ l streptavidin HRP

50 ml ředícího roztoku

2) Pufry a ostatní pomůcky:

a) fosfátový pufr (PBS)

NaCl 8, 00 g

KCl 0, 20 g

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2, 85 g

KH₂PO₄ 0, 20 g

rozpustíme v 1 l destilované vody

b) reakční (assay) pufr:

Hovězí sérový albumin 5 g

Tween 20 0, 5 ml

rozpustíme v přibližně 500 ml PBS a poté doplníme na objem 1l PBS.

c) promývací roztok:

Do 1l PBS přidáme 0,5 ml Tween 20

d) mikrotitrační destička

e) ředící roztok (Sample diluent) naředíme v poměru 1:3 s assay pufrem, přidáme 1% myšního séra

f) substrátový roztok:

tetramethylbenzidin a H_2O_2 v poměru 1:2

g) stop roztok :

4N kyselina sírová (36N kyselina sírová + 16ml H_2O)

3) Příprava mikrotitrační destičky:

a) 275 μ l vazebné protilátky zředíme 10, 725 ml PBS. Získáme 11 ml vazebného

roztoku. 100 μ l tohoto roztoku pipetujeme do každé jamky mikrotitrační destičky.

Destičku zakryjeme a dáme přes noc uložit při teplotě 2-8°C.

Vylijeme obsah destičky a promyjeme 300 μ l promývacího roztoku.

b) přidáme 250 μ l assay pufru do každé jamky a necháme inkubovat při pokojové teplotě 2hod. Poté 2x promyjeme promývacím roztokem. Takto připravené destičky můžeme uchovávat při teplotě 2-8°C jeden týden.

4) Příprava standardu

Standard v lahvičce rekonstituujeme přidáním 200 μ l destilované vody. Dále odebereme 25 μ l a přidáme 225 μ l assay pufru.

5) Příprava biotin konjugátu:

Před použitím ho naředíme assay pufrem v poměru 1:1000. 5, 994 ml assay pufru smícháme s 0, 006 ml biotinového konjugátu.

6) Příprava streptavidinu-HRP

Pro pipetování do jamek mikrotitrační destičky je nutné naředit HRP v poměru 1:10000 (této koncentrace docílíme smícháním 1, 1 μ l HRP s 10, 9989 ml assay pufru)

Vlastní postup:

- A) připravíme si kalibrační křivku: Do jamek určených pro standard (A1 a A2) pipetujeme 100 μ l Sample diluentu, přidáme 100 μ l standardu sFas ligandu, obsah jamky promícháme a postupně přenášíme 100 μ l do jamek B1 a B2 až do řady G. Získáme řadu koncentrací od 10ng/ml po 0, 16ng/ml.
- B) přidáme 50 μ l sample diluentu do jamek určených pro vzorky
- C) pipetujeme 50 μ l vzorku do mikrotitrační destičky
- D) do všech jamek přidáme 50 μ l biotinového konjugátu
- E) přiklopíme na destičku víčko a necháme inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě.
- F) destičku promyjeme nejméně 4x přibližně 300 μ l promývacího purfu. Po posledním promytí necháme destičku okapat na filtrační papír, ale ne déle jak 15 min. , neboť destička nesmí nikdy úplně vyschnout.
- G) do všech jamek přidáme 100 μ l naředěného streptavidinu.
- H) přiklopíme na destičku víčko a necháme inkubovat při 1 hodinu při pokojové teplotě.
- I) destičku opět promyjeme 4x 300 μ l promývacího roztoku.
- J) přidáme 100 μ l TMB substrátového roztoku.
- K) inkubujeme při pokojové teplotě 15 minut (pokud je to možné na třepačce). Průběh reakce je nutné vizuálně sledovat a zastavit v momentě kdy nejvyšší koncentrace standardu se zbarví do tmavě modré barvy
- L) reakci ukončíme přidáním 100 μ l stop roztoku. Výsledky odečítáme ihned po zastavení reakce nebo do 1 hodiny při skladování ve tmě při teplotě 2-8°C.

M) spektrofotometrem měříme absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 450nm. Vypočítáme průměrné hodnoty absorbancí standardů a sestrojíme kalibrační křivku, z té odečítáme výsledné koncentrace sFas ligandu pro neznáme vzorky. Pokud jsme vzorky před analýzou ředili, naměřené koncentrace násobíme ředícím faktorem(vzorky jsme ředili 1:2, ředící faktor=2). Kalibrační křivka slouží pro odečítání pouze těch vzorků, které byly analyzovány společně se standardy.

8.2.5 Kvantitativní stanovení endoglinu

1) Reagencie:vazebná protilátka

detekční protilátka

standard -lidský rekombinantní endoglin

streptavidin-HRP

2) Purfy a ostatní materiály

a) fosfátový pufr (PBS)

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 8,1 mM

KH₂PO₄ 1,5 mM

b) promývací roztok

0,05% Tween 20 v PBS, pH 7,2-7,4

c) reakční pufr (reagent diluent)

1% BSA v PBS, pH 7,2-7,4

d) substrátový roztok

H₂O₂ a tetramethylbenzidin v poměru 1:1

e) stop roztok

2N H₂SO₄

f) mikrotitrační destička

3) Příprava reagensů

- a) vazebná protilátka: myší antihumánní endoglin (360 μ g/ml) naředíme 1, 0ml PBS. Takto lze skladovat při teplotě 2-8°C po dobu 60 dní, něco při -20-70°C 6 měsíců. Pro vlastní analýzu ředíme pomocí PBS na koncentraci 2 μ g/ml.
- b) detekční protilátka: kozí antihumánní endoglin (36 μ g/ml) naředíme 1ml reagent diluentu. Takto lze skladovat při teplotě 2-8°C po dobu 60 dní, něco při -20-70°C 6 měsíců. Pro vlastní analýzu ředíme pomocí reagent diluentu na koncentraci 200ng/ml.
- c) standard: k rekombinantnímu lidskému endoglinu (130ng/ml) přidáme 0, 5ml reagent diluentu. Skladujeme při teplotě 2-8°C nebo při -70°C po dobu maximálně 2 měsíců. Nejvyšší koncentrace pro sestavování kalibrační křivky je 8000pg/ml.

4) Příprava mikrotitrační destičky

- a) 100 μ l naředěné vazebné protilátky pipetujeme do všech jamek mikrotitrační destičky. Zakryjeme a necháme při pokojové teplotě inkubovat přes noc. Obsah vylijeme a promýváme 3x 400 μ l promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny
- b) 300 μ l reagent diluentu pipetujeme do každé jamky a necháme reagovat při pokojové teplotě 1 hodinu. Poté opět propláchneme promývacím roztokem.

Vlastní postup

- A) do jamek A1 resp. A2 až G1 resp. G2 nanášíme standardy o klesající koncentraci k sestavení kalibrační křivky
- B) do ostatních jamek pipetujeme 100 μ l vzorků, naředěných reagent diluentem. Zakryjeme a necháme inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě.
- C) obsah vylijeme a promýváme 3x 400 μ l promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny
- D) přidáme 100 μ l naředěné detekční protilátky a opět necháme reagovat 2 hod. při pokojové teplotě.
- E) obsah vylijeme a promýváme 3x 400 μ l promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny

F) přidáme 100 μ l streptavidin HRP a na 20 minut uložíme mimo přímé světlo

G) obsah vylijeme a promýváme 3x 400 μ l promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny

H) pipetujeme 100 μ l substrátového roztoku a opět 20 minut necháme reakci vyvíjet mimo přímé světlo.

I) proces ukončíme 50 μ l stop roztoku.

J) spektrofotometrem měříme absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 450nm. Z hodnot, které odpovídají standardu vypočítáme průměr a sestojíme kalibrační křivku, z té odečítáme výsledné koncentrace endoglinu pro neznáme vzorky.

Koncentrace endoglinu ve vzorcích se získají odečtením z kalibrační křivky, která slouží pouze pro analýzu těch vzorků, které jsou inkubovány společně se standardy. Ředícím faktorem násobíme výsledné koncentrace, pokud jsme vzorky před začátkem analýzy ředili. Kalibrační křivka se získá proložením mezi naměřenými hodnotami absorbancí (osa y) a příslušnými koncentracemi endoglinu ve standardech (osa x).

8.2.6 Kvantitativní stanovení MCP-1

1) Reagencie: vazebná protilátka

detekční protilátka

standard - lidský rekombinantní MCP-1

streptavidin-HRP

2) Purfy a ostatní materiály

a) fosfátový pufr (PBS)

NaCl	137mM
KCl	2, 7mM
Na ₂ HPO ₄	8, 1mM
KH ₂ PO ₄	1, 5mM

b) promývací roztok

0, 05% Tween 20 v PBS, pH 7, 2-7, 4

c) reagent diluent

1% BSA v PBS, pH 7, 2-7, 4

d) substrátový roztok

H₂O₂ a tetramethylbenzidin v poměru 1:1

e) stop roztok

2N H₂SO₄

f) mikrotitrační destička

3) Příprava reagensů

a) vazebná protilátka: myší antihumánní MCP-1 (180µg/ml) naředíme 1, 0ml PBS. Takto lze skladovat při teplotě 2-8°C po dobu 60 dní, při -20-70°C 6 měsíců. Pro vlastní analýzu ředíme pomocí PBS na koncentraci 1, 0µg/ml.

b) detekční protilátka: kozí antihumánní MCP-1 (18µg/ml) naředíme 1ml reagent diluentu. Takto lze skladovat při teplotě 2-8°C po dobu 60 dní, při -20-70°C 6 měsíců. Pro vlastní analýzu ředíme pomocí reagent diluentu na koncentraci 100ng/ml.

c) standard: k rekombinantnímu lidskému MCP-1 (130ng/ml) přidáme 0, 5ml reagent diluentu. Skladujeme při teplotě 2-8°C maximálně 60 dní (nesmí se zmrazit!). Nejvyšší koncentrace pro sestavování kalibrační křivky je 1000pg/ml.

4) Příprava mikrotitrační destičky

a) 100µl naředěné vazebné protilátky pipetujeme do všech jamek mikrotitrační destičky. Zakryjeme a necháme při pokojové teplotě inkubovat přes noc. Obsah vylijeme a promýváme 3x 400µl promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny

b) 300µl reagent diluentu pipetujeme do každé jamky a necháme reagovat při pokojové teplotě 1 hodinu. Poté opět propláchneme promývacím roztokem.

Vlastní postup

A) do jamek A1 resp. A2 až G1 resp. G2 nanášíme standardy o klesající koncentraci k sestavení kalibrační křivky

B) do ostatních jamek pipetujeme 100 μ l vzorků, naředěných reagent diluentem. Zakryjeme a necháme inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě.

C) obsah vylijeme a promýváme 3x 400 μ l promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny

D) přidáme 100 μ l naředěné detekční protilátky a opět necháme reagovat 2 hod. při pokojové teplotě.

E) obsah vylijeme a promýváme 3x 400 μ l promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny

F) přidáme 100 μ l streptavidin HRP a na 20 minut uložíme mimo přímé světlo

G) obsah vylijeme a promýváme 3x 400 μ l promývacího roztoku. Zbytek tekutiny vyklepeme do buničiny

H) pipetujeme 100 μ l substrátového roztoku a opět necháme reakci vyvíjet mimo přímé světlo.

I) proces ukončíme 50 μ l stop roztoku.

J) spektrofotometrem měříme absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 450nm. Z hodnot, které odpovídají standardu vypočítáme průměr a sestojíme kalibrační křivku, z té odečítáme výsledné koncentrace MCP-1 pro neznáme vzorky. Koncentrace MCP-1 ve vzorcích se získají odečtením z kalibrační křivky, která slouží pouze pro analýzu těch vzorků, které jsou inkubovány společně se standardy. Pokud jsme vzorky ředili je nutné odečtené koncentrace vynásobit ředícím faktorem. Kalibrační křivka se získá proložením mezi naměřenými hodnotami absorbancí (osa y) a příslušnými koncentracemi MCP-1 ve standardech (osa x).

8.3 Statistické zpracování výsledků:

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru MedCalc (Belgie).

8.3.1 Základní statistika

Pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu byla zjištěna normalita rozložení hodnot sledovaných ukazatelů v daném souboru.

Základní charakteristikou je aritmetický průměr, směrodatná odchylka, medián a normalita.

8.3.2 Testovací statistika

Po kontrole normality dat byly soubory sledovaného parametru porovnávány mezi sebou (před léčbou x po léčbě, před léčbou x kontrola, po léčbě x kontrola) :

parametrickým t- testem v případě normálního rozložení dat

neparametrickým Wilcoxonovým testem v případě nenormálního

rozložení dat

Úroveň statistických rozdílů je vyjádřena pomocí parametru p :

vysoká statistická významnost	$p < 0,001$
střední statistická významnost	$p = 0,001 - 0,01$
nízká statistická významnost	$p = 0,01 - 0,05$
bez statistické významnosti	$p > 0,05$

8.4 Výsledky

8.4.1 Přehled naměřených hodnot

V tabulkách. 1 a 2 jsou uvedené hodnoty měřených parametrů před léčbou a po léčbě Goeckermavou terapií. Tabulka č. 3 ukazuje hodnoty u kontrolní skupiny.

Tabulka č. 1: Přehled naměřených parametrů před léčbou

PŘED									
pacient	věk	PASI	pohlaví	endoglin	sCD30	MCP-1	sCD28	sFas ligand	sApo-1/fas
1	58	23, 4	1	10, 41	65, 29	510	0, 431	0, 016	1852, 2
2	28	18, 3	1	14, 73	39, 86	250	0, 652	0, 045	1450, 7
3	39	23, 4	1	4, 36	38, 74	224, 2	0, 401	0, 027	895, 3
4	32	9, 01	1	6, 68	53, 53	131, 8	0, 642	0, 047	6647, 9
5	66	19, 3	1	7, 36	21, 23	148, 9	0, 512	0, 041	905, 9
6	19	30, 3	1	6, 14	92, 75	278, 5	0, 462	0, 026	925, 1
7	50	16, 7	0	7	64, 66	205, 8	0, 428	0, 021	992, 8
8	53	19, 2	0	7, 23	32, 76	174, 2	0, 508	0, 029	654, 6
9	44	36, 7	1	9, 55	103, 3	232, 2	0, 555	0, 025	757, 1
10	62	22, 8	0	8, 41	19, 73	193, 8	0, 568	0, 029	1134, 2
11	34	16, 8	1	10, 59	41, 2	348, 9	0, 332	0, 007	889, 5
12	23	24, 9	0	3, 45	60, 29	216, 9	0, 493	0, 011	862, 2
13	52	13, 8	1	10, 82	33, 53	428, 9	0, 581	0, 033	1486, 4
14	52	18, 4	0	10, 5	58, 79	198, 8	0, 468	0, 021	1477, 7
15	48	22	1	11, 32	80, 05	473, 9	2, 246	0, 04	1992, 4
16	33	19, 5	0	7, 18	59, 02	116, 9	0, 615	0, 042	877, 4
17	28	21, 4	0	4, 82	38, 86	177, 6	0, 501	0, 032	830, 9
18	68	24, 9	0	6	159	247, 5	0, 387	0, 049	870, 4
19	76	10, 5	0	6, 14	138, 1	161, 3	0, 401	0, 015	2357, 4
20	35	14, 2	0	8, 14	35	310, 6	0, 61	0, 046	1051
21	45	14, 9	0	9, 36	63, 92	291, 9	0, 413	0, 002	695, 1
22	30	15, 6	1	6, 77	26, 85	563, 5	0, 597	0, 176	1000, 3
23	54	19, 4	1	9, 64	16, 94	333, 9	0, 606	0, 039	35700
24	23	19, 9	1	7, 14	53, 03	207, 7	0, 581	0, 047	3392, 5
25	73	42	1	7, 09	37, 75	169, 6	0, 59	0, 031	1827, 6
26	58	3, 5	0	7, 23	73, 14	264, 8	0, 539	0, 039	1277, 6
27	57	19, 2	1	7, 95	22, 79	269, 1	0, 559	0, 037	3295, 5
28	20	26, 4	1	10, 05	108, 7	227, 6	0, 519	0, 022	833, 1
29	26	19, 2	0	5, 95	31, 46	217, 9	0, 724	0, 059	703, 4
30	37	17, 2	1	7, 91	54, 25	301, 1	0, 543	0, 054	1238, 2
31	68	15, 6	0	5, 45	134, 7	398, 6	0, 538	0, 087	1545, 4
32	18	25, 7	0	10, 86	87, 48	83, 6	0, 666	0, 146	989, 8
33	49	13, 8	0	8, 82	61, 19	155, 7	0, 6	0, 039	1254, 3
34	32	2, 2	1	7, 5	298, 7	178, 7	0, 348	0, 002	2241, 5
35	67	22, 5	1	6, 05	330, 5	323, 4	0, 525	0, 008	3320, 7

36	26	14	1	7, 3	27, 15	197, 9	0, 374	0, 011	594, 9
37	41	17, 1	0	7, 23	57, 85	146, 9	0, 593	0, 046	844
38	24	16, 5	0	5, 32	48, 99	213, 2	0, 385	0, 025	672, 2

PASI =psoriasis area and severity index, pohlaví 1 = muž, 0 = žena

Tabulka č. 2: Přehled naměřených parametrů po léčbě

PO									
pacient	věk	PASI	pohlaví	endoglin	sCD30	MCP-1	sCD28	sFas ligand	sApo-1/fas
1	58	11, 4	1	8, 86	61, 32	604, 7	0, 44	0, 035	1896, 9
2	28	6, 6	1	12, 64	22, 57	321, 2	0, 713	0, 052	1079, 3
3	39	15, 4	1	3, 73	34, 99	293, 1	0, 428	0, 03	717, 5
4	32	2, 2	1	5, 91	73, 68	184, 5	0, 649	0, 051	1120, 4
5	66	9, 4	1	7, 91	24, 08	182, 6	0, 53	0, 051	1143, 2
6	19	20, 8	1	6, 09	67, 05	211, 1	0, 464	0, 035	833, 7
7	50	11, 9	0	5, 64	59, 06	195, 7	0, 41	0, 028	870, 4
8	53	14, 1	0	6, 68	34, 97	222, 2	0, 538	0, 049	772, 7
9	44	16, 9	1	8, 95	56, 66	177, 2	0, 563	0, 035	1187, 3
10	62	4, 9	0	6, 5	18, 6	188, 5	0, 613	0, 045	1475, 8
11	34	5	1	8, 41	49, 82	235, 2	0, 363	0, 025	940, 4
12	23	21, 3	0	4, 36	50, 44	145, 5	0, 446	0, 015	649, 3
13	52	2, 5	1	7, 82	51, 7	341, 7	0, 626	0, 041	1651, 8
14	52	14	0	8, 23	45, 37	357, 2	0, 413	0, 024	1005, 6
15	48	10, 8	1	8, 77	83, 57	553, 3	17, 78	0, 027	2427, 2
16	33	5, 5	0	7, 55	56, 18	200, 3	0, 667	0, 054	961, 2
17	28	8, 3	0	4, 05	45, 21	146, 1	0, 549	0, 04	931, 1
18	68	24, 9	0	6, 45	104, 4	324, 2	0, 388	0, 044	763, 6
19	76	8, 1	0	6, 05	50, 63	185, 7	0, 385	0, 017	1375, 4
20	35	3, 1	0	5, 91	17, 84	170, 9	0, 699	0, 066	944, 3
21	45	6, 7	0	7, 32	89, 77	217, 1	0, 384	0, 023	1046, 8
22	30	4, 2	1	5, 91	18, 89	525, 8	0, 737	0, 18	1173, 1
23	54	2, 2	1	7, 95	17, 75	259, 1	0, 597	0, 029	36000
24	23	1, 8	1	6, 68	23, 68	244, 3	0, 584	0, 042	1436, 7
25	73	16, 5	1	8, 86	64, 42	208, 5	0, 613	0, 041	2824, 4
26	58	0, 6	0	6, 32	46, 22	222, 9	0, 575	0, 043	1316, 9
27	57	4, 9	1	7, 95	33, 79	212, 3	0, 563	0, 053	2388, 9
28	20	8, 2	1	7, 91	78, 83	273, 4	0, 476	0, 04	1083, 3
29	26	8, 4	0	6, 23	22, 56	133, 8	0, 672	0, 057	816, 2
30	37	12, 3	1	8, 73	48, 77	305, 6	0, 541	0, 063	1050, 9
31	68	5, 4	0	7, 36	50, 86	426, 1	0, 534	0, 083	2480, 9
32	18	6, 2	0	8, 95	83, 21	148, 1	0, 563	0, 188	950, 3
33	49	4	0	6, 95	49, 8	380, 7	0, 568	0, 05	1330, 3
34	32	1, 6	1	5, 36	31, 32	159, 2	0, 362	0, 026	2083, 9
35	67	19, 5	1	4, 73	190, 8	295, 9	0, 482	0, 024	2680, 1
36	26	3	1	7, 68	30, 06	212, 9	0, 39	0, 03	914, 7
37	41	2, 7	0	5, 23	26, 43	159, 1	0, 586	0, 045	1224, 3
38	24	11, 1	0	5, 82	32, 19	166, 9	0, 373	0, 024	517, 9

PASI =psoriasis area and severity index, pohlaví 1 = muž, 0 = žena

Tabulka č. 3 :Přehled naměřených parametrů u kontrolního souboru

kontrola	věk	pohlaví	endoglin	sCD30	MCP-1	sCD28	sFasL	sApo-1/fas
k1	34	1	4, 61	32, 459	245, 264	0, 653	0, 045	704, 114
k2	19	0	5, 97	23, 756	358, 438	0, 815	0, 035	405, 922
k3	28	1	4, 18	24, 825	326, 261	1, 028	0, 039	635, 658
k4	51	0	4, 66	27, 241	274, 702	0, 645	0, 095	436, 131
k5	44	1	4, 69	16, 696	274, 729	0, 971	0, 194	875, 04
k6	22	0	5, 11	17, 826	299, 093	0, 756	0, 043	879, 009
k7	37	1	5, 17	34, 088	270, 596	1, 028	0, 048	404, 087
k8	41	0	5, 65	24, 634	195, 253	0, 645	0, 031	430, 456
k9	35	1	3, 47	28, 58	36, 334	0, 971	0, 053	782, 604
k10	22	0	4, 63	59, 077	139, 872	0, 702	0, 042	698, 385
k11	46	1	4, 94	21, 169	230, 032	0, 464	0, 035	637, 212
k12	30	0	4, 86	31, 506	46, 705	0, 908	0, 035	336, 513
k13	43	0	6, 16	42, 589	201, 468	0, 325	0, 028	570, 31
k14	28	1	4, 6	24, 883	450, 097	0, 489	0, 031	1354, 198
k15	27	0	2, 78	30, 31	247, 438	0, 521	0, 045	463, 737
k16	23	1	4, 23	42, 019	338, 854	1, 131	0, 032	1052, 108
k17	32	0	6, 25	42, 168	280, 406	0, 794	0, 039	648, 549
k18	30	1	4, 29	29, 607	217, 955	0, 685	0, 045	578, 695
k19	29	0	5, 11	29, 94	200, 303	0, 965	0, 043	859, 752
k20	47	1	5, 34	24, 984	320, 098	0, 857	0, 041	918, 288
k21	44	0	6, 14	20, 057	229, 801	0, 793	0, 069	363, 84
k22	25	1	5, 97	34, 431	273, 855	0, 959	0, 067	1062, 157
k23	32	1	4, 09	23, 515	278, 706	1, 015	0, 063	825, 789
k24	47	0	4, 8	24, 75	190, 021	0, 659	0, 058	726, 11
k25	30	1	4, 09	36, 487	297, 852	1, 131	0, 076	1050, 49
k26	42	0	5, 63	78, 263	223, 718	0, 794	0, 045	963, 167
k27	37	1	5, 68	31, 778	288, 26	0, 685	0, 041	447, 023
k28	28	0	3, 47	45, 903	214, 523	0, 563	0, 043	646, 602
k29	32	1	3, 47	32, 042	229, 89	1, 159	0, 035	2637, 028
k30	38	0	4, 35	23, 041	149, 489	1, 162	0, 042	609, 079
k31	28	1	4, 32	41, 325	235, 328	1, 072	0, 035	726, 365
k32	32	0	4, 97	32, 002	164, 329	0, 563	0, 024	685, 919
k33	21	1	4, 09	36, 261	209, 138	1, 159	0, 067	977, 796
k34	47	0	4, 35	30, 547	470, 496	0, 801	0, 042	819, 569
k35	43	0	3, 84	36, 748	267, 211	1, 162	0, 058	327, 831
k36	46	1	3, 38	22, 547	206, 684	0, 857	0, 076	634, 495
k37	39	0	5, 43	27, 579	93, 031	0, 563	0, 045	484, 002
k38	32	1	4, 38	31, 613	221, 011	0, 814	0, 043	575, 607
k39	28	0	5, 03	23, 54	207, 179	1, 367	0, 0068	1184, 737
k40	32	1	7, 07	55, 815	82, 662	0, 703	0, 051	1889, 324

k41	42	0	5, 11	45, 93	229, 726	0, 685	0, 043	1099, 807
k42	32	1	5, 8	44, 335	140, 271	0, 965	0, 042	1104, 452
k43	27	0	3, 92	42, 985	145, 1	0, 568	0, 039	848, 885
k44	28	1	5, 45	27, 294	195, 246	0, 469	0, 048	1120, 383
k45	23	1	5, 94	39, 426	360, 787	0, 815	0, 035	857, 154
k46	27	0	5, 34	47, 469	81, 933	0, 688	0, 042	741, 067
k47	37	1	6, 14	37, 058	267, 41	0, 759	0, 038	755, 265
k48	22	0	5, 97	47, 057	156, 211	1, 162	0, 051	592, 866
k49	30	1	4, 09	156, 22	22, 348	1, 072	0, 032	1199, 553
k50	25	0	4, 8	63, 17	346, 565	0, 82	0, 025	1047, 892
k51	40	1	4, 09	55, 429	196, 239	0, 742	0, 068	1936, 382
k52	29	0	3, 47	58, 807	174, 427	0, 738	0, 095	733, 359
k53	56	1	4, 35	71, 767	271, 828	0, 855	0, 194	903, 291
k54	39	0	4, 32	59, 915	182, 28	0, 828	0, 043	493, 036
k55	42	1	4, 97	41, 335	286, 979	0, 857	0, 048	1247, 995
k56	49	0	4, 09	29, 38	248, 608	1, 028	0, 024	748, 578
k57	38	0	4, 35	13, 341	282, 009	0, 563	0, 031	919, 539
k58	30	1	3, 84	18, 481	224, 529	1, 159	0, 043	1624, 069
k59	39	0	7, 07	41, 682	439, 992	1, 162	0, 042	1046, 003
k60	36	1	5, 11	11, 626	372, 629	0, 791	0, 046	1004, 664
k61	47	1	7, 07	18, 453	371, 154	0, 645	0, 035	502, 654
k62	43	0	5, 11	37, 757	289, 373	0, 835	0, 048	431, 521
k63	20	1	5, 8	25, 821	277, 679	0, 661	0, 046	720, 808

pohlaví 1 = muž, 0 = žena

8.4.2 Statistické zpracování výsledků

Základní statistické údaje jsou zachyceny v tabulce 4. Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů průměrných hodnot u vyšetřovaného a kontrolního souboru je uvedeno v tabulce 5 .

Tabulka č. 4 :Základní statistické údaje pro jednotlivé markery

	aritmetický průměr	směrodatná odchylka	medián	normalita
endoglin před	7, 8539	2, 2572	7, 265	ne
endoglin po	7, 0118	1, 7146	6, 815	ne
endoglin kontrola	4, 8802	0, 9479	4, 8	ano
sCD30 před	72, 9222	66, 949	56, 051	ne
sCD30 po	51, 2498	32, 0525	49, 2885	ano
sCD30 kontrola	37, 0054	20, 6304	32, 002	ano
MCP-1 před	251, 9947	108, 8419	221, 05	ano
MCP-1 po	257, 7	115, 0188	215	ano
MCP-1 kontrola	238, 8953	92, 8943	230, 032	ano
sCD28 před	0, 5656	0, 296	0, 5385	ne
sCD28 po	0, 9806	2, 8009	0, 545	ne
sCD28 kontrola	0, 8286	0, 2211	0, 814	ano
sFasL před	0, 0387	0, 0341	0, 0325	ne
sFasL po	0, 0475	0, 0357	0, 041	ne
sFasL kontrola	0, 0499	0, 0305	0, 043	ne
Apo-1/fas před	2377, 2947	5666, 5175	1025, 65	ne
Apo-1/fas po	2212, 2816	5660, 3125	1101, 85	ne
Apo-1/fas kontrola	841, 0622	407, 4067	748, 578	ano

Tabulka č. 5 Hodnocení statistické významnosti

Apo-1/fas	před x po	před x kontrola	po x kontrola
p	0, 879	0, 0000	0, 0000
endoglin	před x po	před x kontrola	po x kontrola
p	0, 0002	<0, 0001	<0, 0001
MCP-1	před x po	před x kontrola	po x kontrola
p	0, 6443	0, 5216	0, 3703
sCD28	před x po	před x kontrola	po x kontrola
p	0, 2641	0, 0000	0, 0000

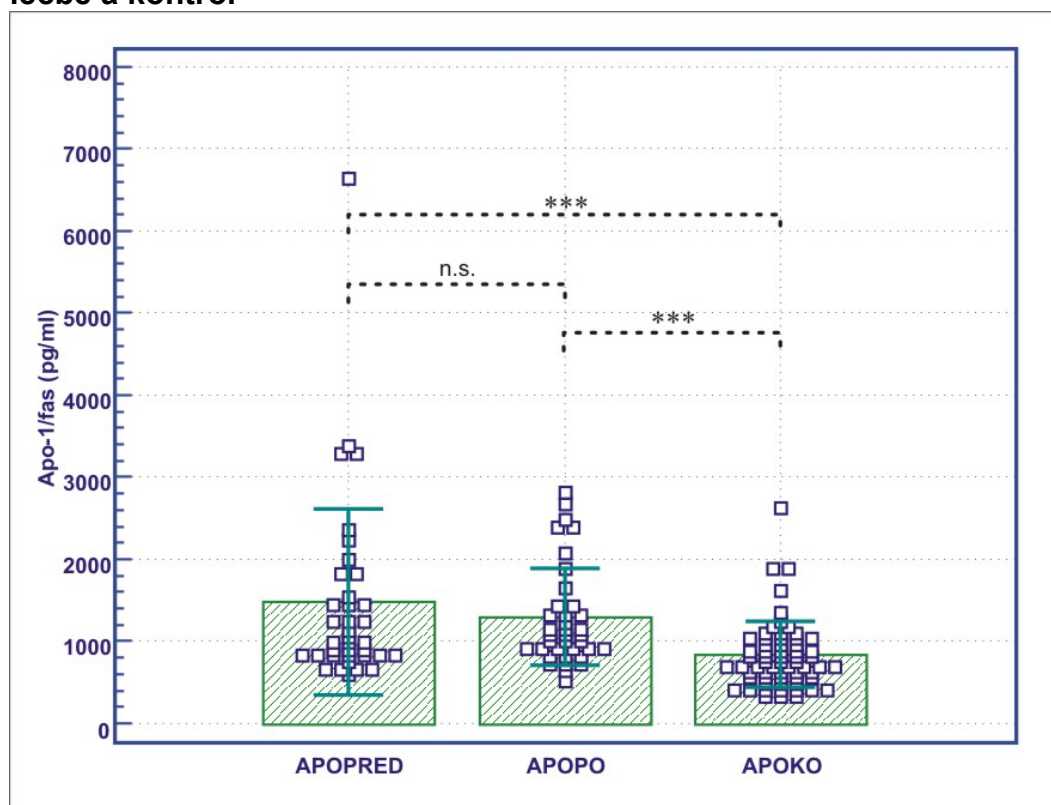
sCD30	před x po	před x kontrola	po x kontrola
p	0, 004	0, 0001	0, 0077
sFas ligand	před x po	před x kontrola	po x kontrola
p	0, 0000	0, 0014	0, 1971

Hodnota p vyjadřuje statistickou významnost mezi porovnávanými parametry

8.4.3 Grafické zpracování výsledků

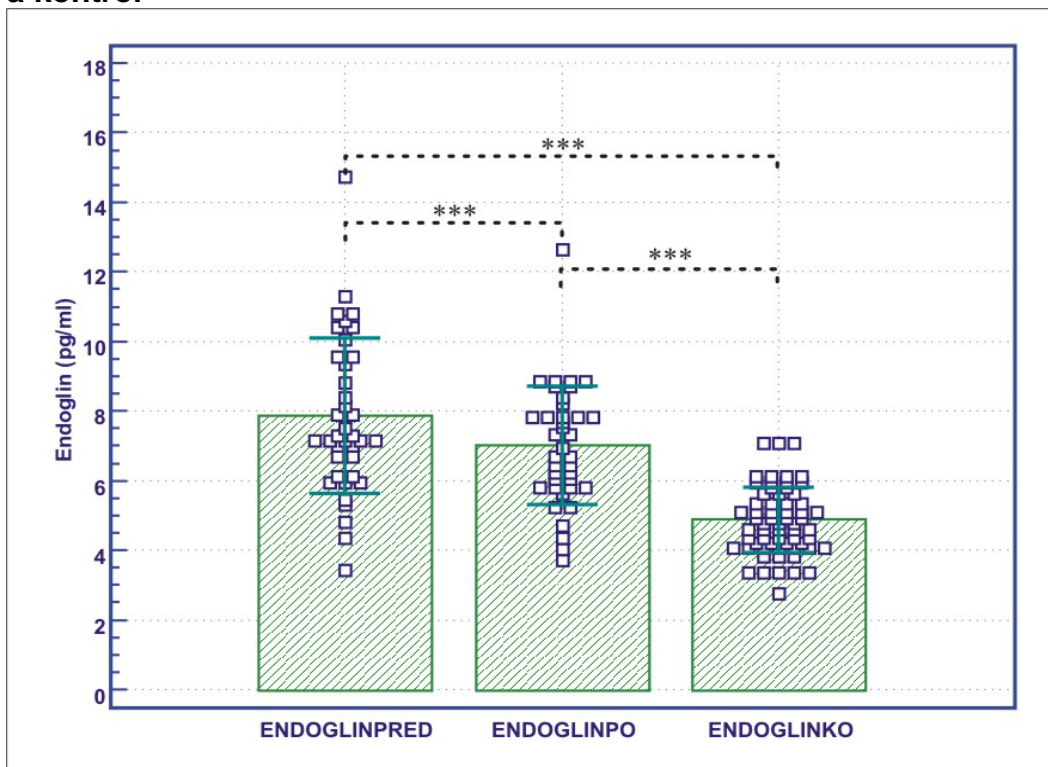
Porovnání naměřených hodnot jednotlivých parametrů před léčbou, po léčbě a hodnoty kontrol jsou znázorněny pomocí sloupcových grafů 1-6. Střed obdélníku představuje medián, spodní hrana 25. percentil, horní hrana 75. percentil a úsečky minimum a maximum po vyloučení odlehlých hodnot.

Graf č. 1 :Porovnání naměřených koncentrací sApo-1/fas před léčbou, po léčbě a kontrol



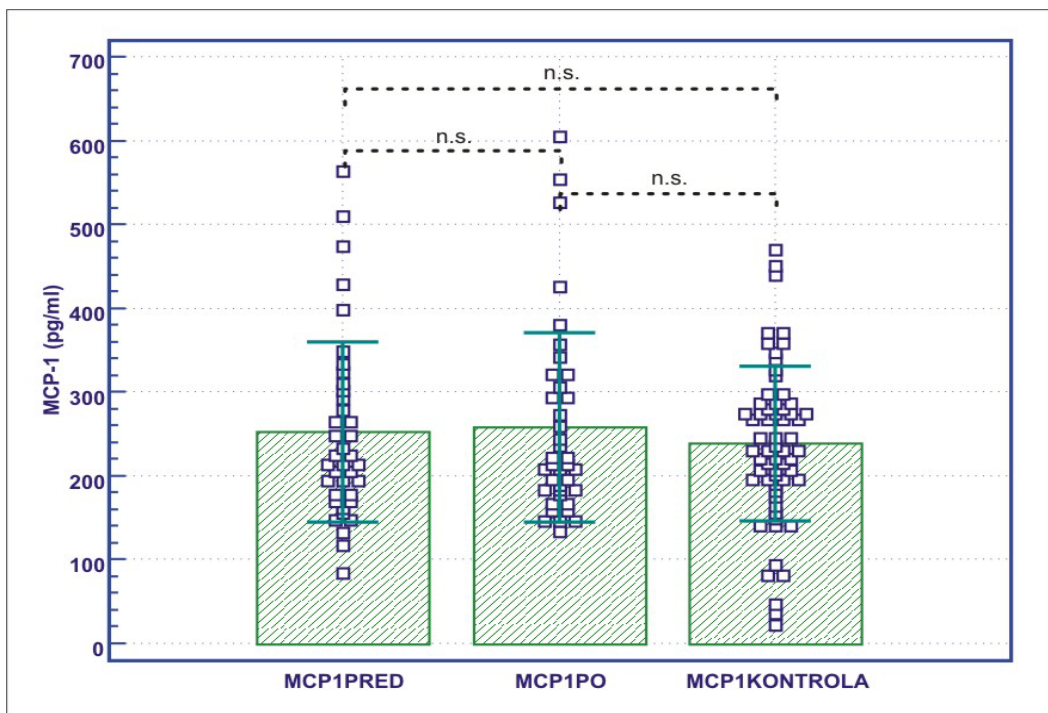
Pokles koncentrace po léčbě není statisticky signifikantní (n. s.). Statisticky významné jsou ale rozdíly mezi kontrolami a hodnotami před léčbou i po léčbě (***)

Graf č. 2 Porovnání naměřených koncentrací endoglinu před léčbou, po léčbě a kontrol



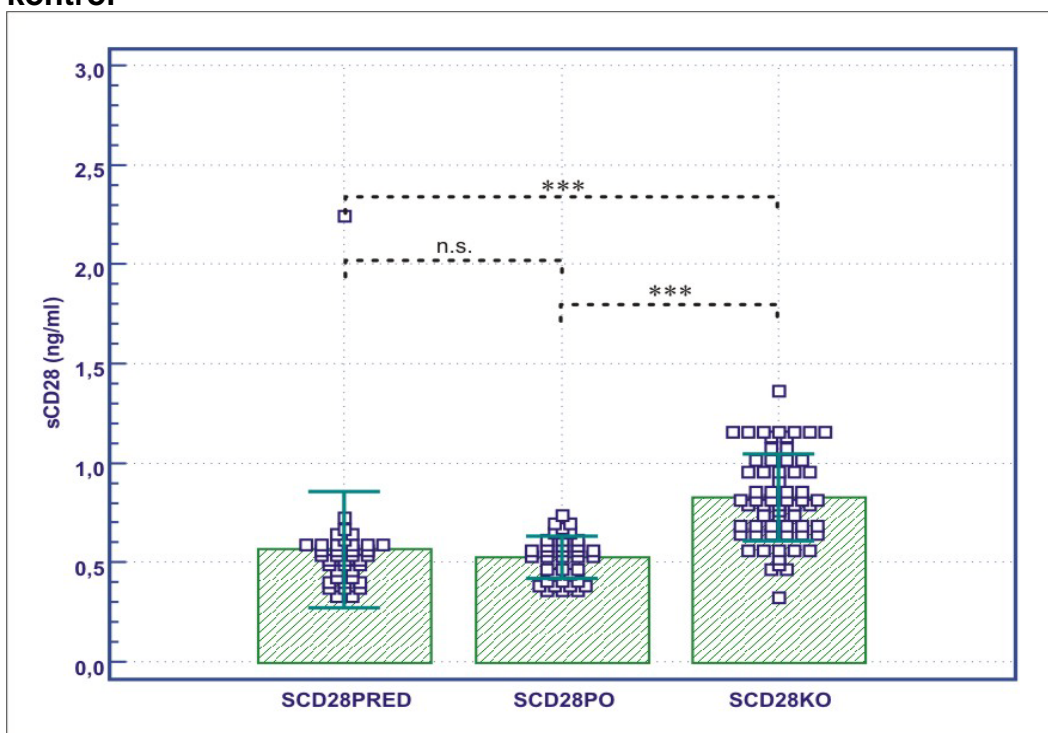
Pokles koncentrace endoglinu je statisticky signifikantní mezi všemi porovnávanými skupinami (***)

Graf č. 3 Porovnání naměřených koncentrací MCP-1 před léčbou, po léčbě a kontrol



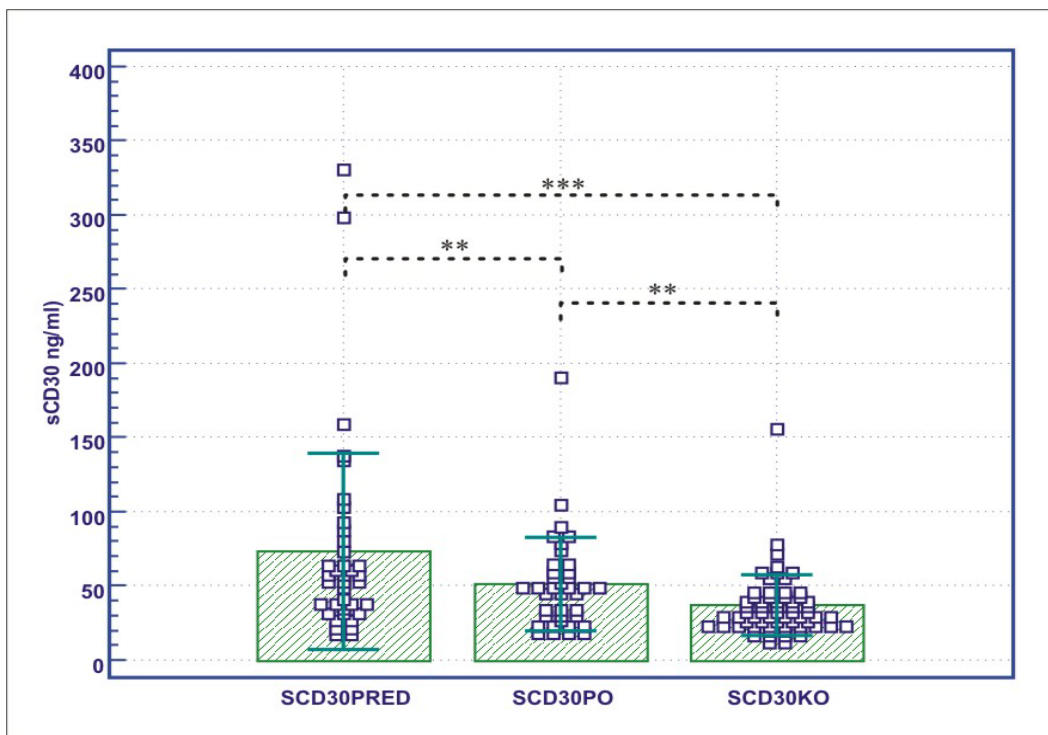
Pokles koncentrace MCP-1 není statisticky významný ani u jedné porovnávané skupiny (n. s.)

Graf č. 4 Porovnání naměřených koncentrací sCD28 před léčbou, po léčbě a kontrol



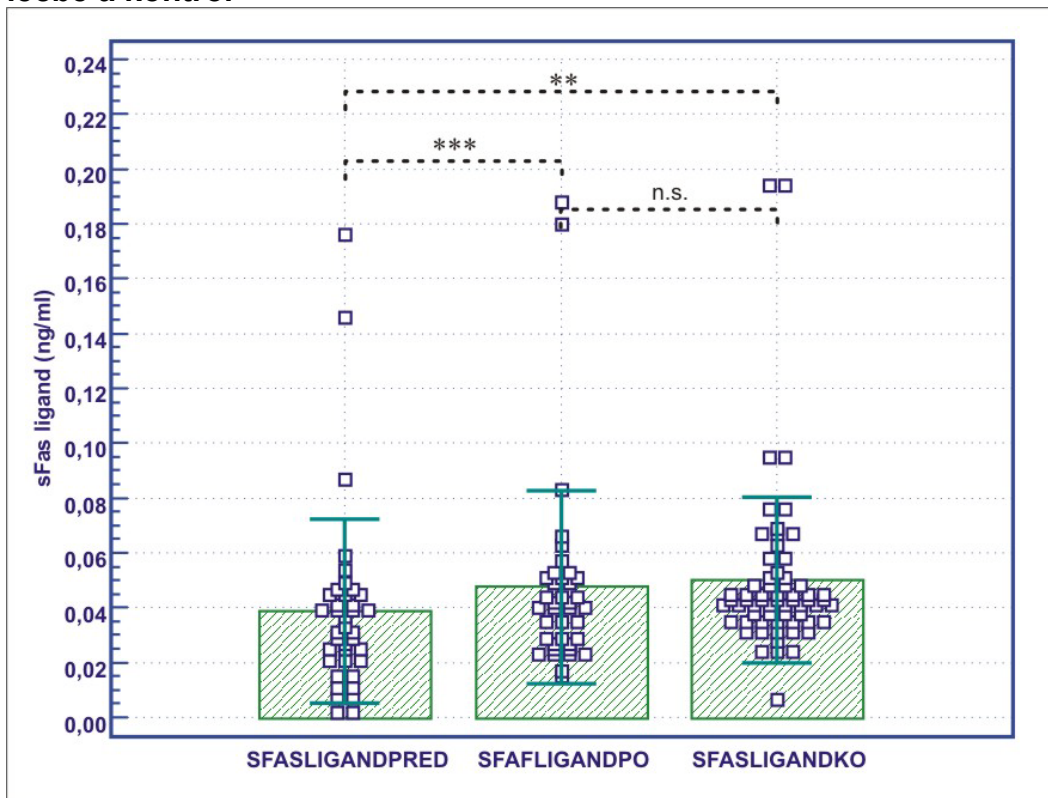
Pokles koncentrace po léčbě není statisticky významný (n. s.) . Statisticky významné jsou ale rozdíly mezi kontrolami a hodnotami před léčbou i po léčbě (***) .

Graf č. 5 Porovnání naměřených koncentrací sCD30 před léčbou, po léčbě a kontrol



Pokles koncentrace po léčbě je středně statisticky významný (**), stejně jako u porovnání mezi hodnotami po léčbě a kontrolou. Rozdíl mezi hodnotami před léčbou a kontrolou je statisticky signifikantní (***)

Graf č. 6 Porovnání naměřených koncentrací sFas ligand před léčbou, po léčbě a kontrol



Změna koncentrace sFas ligandu po léčbě je statisticky významná (***), rozdíl mezi hodnotami po léčbě a kontrolou není signifikantní, středně statisticky významné je porovnání mezi hodnotami před léčbou a kontrolou (**)

9 Diskuze

Psoriáza je jedním z nejčastějších kožních onemocnění, jejíž prevalence v evropské populaci činí 2-3%. Přestože známe řadu patofyziologických mechanismů vedoucích k rozvoji onemocnění, přesné imunologické procesy nejsou dosud zcela objasněny. Důležitou úlohu hrají Th1 a Tc1 lymfocyty, které produkují velké množství IFN- γ a TNF- α . Tyto cytokiny dále způsobí zvýšenou expresi zánětlivých proteinů keratinocytů. Aktivované keratinocyty uvolňují chemokiny a růstové faktory, které poté stimulují neutrofile k přestupu do místa zánětu, způsobují vaskulární změny a hyperplasii keratinocytů.

V naší práci jsme se zaměřili na sledování změny koncentrace vybraných parametrů (sApo-1/fas, sCD28, sCD30, endoglin, MCP-1, Fas ligand) po léčbě Goeckermanovou terapií. Hladiny jednotlivých markerů jsme stanovovali metodou ELISA.

Vyšetřovaný soubor tvořilo 18 žen a 20 mužů s chronickou psoriázou. Kontrolní skupinou bylo 63 zdravých jedinců.

Plazmatické hladiny Apo-1/fas jsou považovány za ukazatele apoptózy. Lidská kůže je neustále vystavována kontaktu s různými antigenními stimuly. K udržení homeostázy je zapotřebí mechanismů, které eliminují T-lymfocyty po aktivaci antigeny či autoantigeny. Procesem apoptózy se zabrání patologickému nahromadění aktivovaných či autoreaktivních T-lymfocytů.

Ze studie Laporta a kol. vyplývá, že v epidermis zdravých jedinců činí apoptotický index (množství buněk v apoptóze) 0, 12%, u pacientů s psoriázou 0, 035% a v době léčby terapií PUVA je index 0, 31%. Výsledky tedy ukazují, že inhibice apoptozy hraje roli v patogenezi onemocnění a po použití PUVA terapie dochází ke zvýšené apoptóze aktivovaných lymfocytů³³.

Navzdory Goeckermanově terapii se hladiny solubilního Apo-1/fas ve vyšetřovaném souboru statisticky významně nezměnily. Signifikantní rozdíly ale nacházíme v porovnání s koncentracemi u kontrolní skupiny.

Solubilní Fas ligand je považován za ukazatel apoptózy. V naší práci jsme zjistili významně vyšší hladiny sFas ligandu po léčbě. U psoriázy dochází ke zvýšenému nahromadění aktivovaných T-lymfocytů. Vyšší koncentrace po léčbě tedy pravděpodobně značí snahu organismu eliminovat patologicky transformované lymfocyty. Rozdíly mezi naměřenými koncentracemi po léčbě a u kontrol nebyly významné.

Gutierrez-Steil a kol. studovali expresi fas ligandu. U všech 5 pacientů bylo odhaleno, že po léčbě UV zářením došlo k silné expresi ligandu keratinocyty³⁵. Teraki a kolektiv ve své studii odhadují, že abnormality v apoptotickém procesu u psoriázy mohou být způsobeny přítomností proteinu Bcl-xL, které apoptózu blokuje³⁴.

Endoglin je ukazatelem probíhajícího zánětu, angiogeneze či tumoru. Latamendiá a kol. zjistili, že inhibice exprese endoglinu zvyšuje schopnost TGF- β potlačit buněčný růst a migraci buněk²⁸.

Endoglin je glykoprotein exprimovaný převážně na endoteliálních buňkách. Van de Kerkhof a kol. prokázali na skupině 8 pacientů s psoriázou vztah mezi přítomností parakeratózy a zvýšenou expresí endoglinu⁵².

U našeho vyšetřovaného souboru se hladiny endoglinu významně lišily mezi kontrolní skupinou a souborem pacientů. Po léčbě dehtem a UV zářením jsme zaznamenali signifikantní pokles koncentrace endoglinu u nemocných. Pokles hladiny ukazuje na utlumení zánětlivého procesu a proliferace endoteliálních buněk.

MCP-1 je důležitým regulačním faktorem pro interakci proliferujících keratinocytů a dermálních makrofágů v patogenezi psoriázy. Množství cytokinů u psoriázy je jiné než u zdravých lidí nebo u ostatních dermatóz. Gillitzer a kol. odhalili zvýšenou expresi MCP-1 mRNA u pacientů s psoriázou v porovnání se zdravými jedinci. Zjistili také, že existuje úměra mezi expresí mRNA a množstvím CD68+ (kožní makrofágy), které se hromadí v subepidermální oblasti. Tento vztah nebyl ovšem potvrzen pro CD3+ buňky a pro neutrofile, proto se předpokládá, že MCP-1 má chemotaktický vliv pouze na makrofágy a ne na T-lymfocyty a neutrofile²⁴. Zvýšené hladiny chemokinů u 15 pacientů s psoriázou v porovnání s 15 zdravými dobrovolníky popisuje ve své studii i Park a Kim²⁷.

V případě našeho měření nebyla zjištěna žádná statistická významnost mezi porovnávanými soubory.

CD28 je důležitým regulátorem pro aktivaci T-lymfocytů. Je exprimována CD4

T-lymfocyty a poskytuje tzv. druhý signál pro aktivaci imunitní odpovědi. U pacientů se zánětlivým, imunopatologickým onemocněním bychom čekali vyšší hladiny sCD28. Naše měření ale prokázalo vyšší hodnoty u kontrolní skupiny. Příčinou může být fakt, že koncentrace sCD28 byly velmi nízké a tím i spolehlivost výsledku je méně přesná. Přítomnost kostimulačních molekul sCD28, sCD80 a sCD86 u pacientů s jiným autoimunitním onemocněním sledovali Kakoulidou a kol. . Vyšetřovaný soubor tvořilo 118 nemocných s myasthenia gravis a kontrolní skupinou bylo 156 zdravých jedinců. Nebyly nalezeny žádné rozdíly v sérových hladinách těchto solubilních molekul²³.

Molekula sCD30 je považována za marker aktivace Th2 buněk. Psoriáza je onemocněním charakterizované převahou Th1 lymfocytů, které tlumí proliferaci Th2 lymfocytů. Zvýšené hladiny sCD30 značí snahu organismu tlumit probíhající zánět a obnovit rovnováhu Th1/Th2.

Benngtsson a kol. sledovali hladiny sCD30 u pacientů s atopickou dermatitidou i pacientů s lupénkou. V prvním případě stanovili signifikantně vyšší hladiny sCD30 v porovnání se zdravými kontrolami, ale nebyl zaznamenán významný pokles po léčbě. Hladiny sCD30 u 9 pacientů s psoriázou a zdravými dobrovolníky se významně nelišily. (statistická analýza může být ale méně vypovídající vzhledem k malému počtu vyšetřovaných jedinců)²⁰.

V naší práci jsme zjistili signifikantně vyšší koncentrace sCD30 u vyšetřované skupiny před léčbou oproti koncentracím po léčbě. Významně nižší byly hladiny u kontrolního souboru. Zvýšené hladiny sCD30 by mohly představovat regulační aktivitu Th2 subsetu CD4+ lymfocytů směřující k zmírnění Th1 zánětu. Po léčbě je hladina snížena, jelikož tato regulace už není zapotřebí.

10 Závěr

U vyšetřovaného souboru, který tvořilo celkem 38 pacientů, jsme sledovali koncentrace endoglinu, MCP-1, sCD28, sCD30, Apo-1/fas a Fas ligandu před léčbou a po léčbě Goeckermanovou terapií. K porovnání hodnot jsme použili kontrolní skupinu zdravých jedinců.

Z našich naměřených údajů vyplývá, že markery Apo-1/fas a sCD28 nejsou vhodné pro sledování účinnosti terapie (při porovnání hodnot před léčbou a po léčbě jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly) . Lze je ale použít pro diagnózu onemocnění.

U markerů sFas ligand, sCD30 a endoglinu jsme zaznamenali signifikantní rozdíly u pacientů s psoriázou před léčbou a kontrolní skupinou. Jsou tedy vhodné pro diagnózu psoriázy. Statisticky významné byly i poklesy hladin po léčbě, proto by stanovení těchto markerů mohlo zlepšit monitorování průběhu onemocnění a hodnocení úspěšnosti léčby.

Žádné signifikantní rozdíly jsme nezjistili u MCP-1.

Seznam literatury:

1. Krueger J. G. : *The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biological agents.* J. Am. Acad. Dermatology 2002;46;1-23
2. Bowcock A. M. , Krueger J. G. : *Getting under the skin: The immunogenetics of psoriasis.* Immunology 2005;5;699-711
3. Gottlieb A. B., Krueger J.G., Wittkowski K., Dedrick R. et al. : *Psoriasis as a model for T-cell-mediated disease.* Arch. Dermatology 2002;138;591-601
4. Chamian F., Krueger J.G. : *Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis.* Rheumatology 2004;16;331-337
5. Rott S., Mrowietz U. : *Recent developments in the use of biologics in psoriasis and autoimmune disorders. The role of autoantibodies.* British Medical Journal 2005;330;716-720
6. Veale D.J., Ritchlin C., FitzGerald O. : *Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis.* Annals of Rheumatic Diseases 2005;64;26-29
7. Barker J. N. W. N. : *Genetics of psoriasis.* Journal of Dermatological Treatment 1998;9;3-5

8. Ettler K. : *Indexy v klinickém hodnocení psoriázy a atopického ekzému*. Česko-slovenská dermatologie 1995;70;45-47
9. Henseler T. : *Genetics of psoriasis*. Dermatology 1998;290;463-476
10. Lázníčková P., Ettler K., Derner V., Krejsek J., Nožičková M. : *Vyšetření některých imunologických parametrů u pacientů s lupénkou*. Česko-slovenská dermatologie 1997;72;55-59
11. Štork J., Klibal R., Vosmík F. : *Dendritické buňky prezentující antigen v patogenezi psoriázy*. Česko-slovenská dermatologie 2002;77;174-153
12. Arenberger P. : *Fototerapie při léčbě některých dermatóz*. Česko-slovenská dermatologie 1994;69;1001-108
13. Benáková N., Ettler K., Štork J., Vašků V. : *Psoriáza nejen pro praxi*, Triton, 2007
14. Krejsek J., Kopecký O. : *Klinická imunologie*; Nucleus, 2004
15. Capon F., Munro M., Barker J., Trenebath R. : *Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene*. Journal of Investigative Dermatology 2002;118;745-751
16. Lee Soo. Y., Lee Sang Y., Kandala G., Liou M.L., Liou H. Ch., Choi Y. : *CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF- κ B activation and binding specificity*. Immunology;93;9699-9703
17. Fletcher C. L. , Orchard G.E., Hubbard V., Whittaker S.J., Edelson R.L., Russell-Jones R. : *CD30 cutaneous lymphoma in association with Atopic Eczema*. Arch. Dermatology 2004;140;449-454
18. Muta H., Boise L.H., Fang L., Podack E.R. : *CD30 signals intergate expression of cytotoxic effector molecules, lymphocyte trafficking signals, and signals for proliferation and apoptosis*, The Journal of Immunology 2000;165;5105-5111
19. Powell I. F., Li T., Jäck H.M., Ellis T. M. : *Construction and expression of a Soluble form of human CD30 ligand with functional activity*. Journal of Leukocyte Biology 1998;63;752-757
20. Bengtsson A., Holm L., Bäck O., Fransson J., Scheynius A. : *Elevated serum levels of soluble CD30 in patients with atopic dermatitis*. Clinical and Experimental Immunology 1997;109;533-537
21. Ward S.G. : *CD28:a signalling perspective*. Biochemical Journal 1996;318; 361- 377
22. Gibson S., Truitt K., Lapushin R., Khan H., Imboden J. B. Mills G. B. : *Efficient*

- CD28 signalling leads to increases in the kinase activities of the TEC family tyrosine kinase EMT/ITK/TSK and the SRC family tyrosine kinase LCK.* Biochemical Journal 1998;330;1123-1128
23. Kakoulidou M., Wang X., Zhao X., Pirskanen R., Lefvert A. : *Soluble costimulatory factors sCD28, sCD80, sCD86 and sCD152 in relation to other markers of immune activation in patients with myasthenia gravis.* Journal of Neuroimmunology 2007; 185;150-161
 24. Gillitzer R., Wolff K., Tong D., Müller Ch., Yoshimua T., Hartmann A. A., Stingl G., Berger R. : *MCP-1 mRNA experection in basal keratinocytes of psoriatic lesions.* Journal of Investigative Dermatology 1993;101;127-131
 25. Pai R., Ha H., Kirschenbaum M. A., Kamanna V. S. : *Role of TNF- α on mesangial cell MCP-1 expression and monocyte migration:mechanisms mediated by signal transduction.* J. Am. Soc. Nephrology 1996;7;914-923
 26. Engelhardt E., Toksoy A., Goebeler M., Debus S., Bröcker E. B., Gillitzer R. : *Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10 and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subset in human wound healing.* American Journal of Pathology 1998;153;1849-1860
 27. Park J. H., Kim N.I. : *A study on the relationship of the severity of psoriasis, serum soluble E-selectin, MCP-1 and RANTES.* Journal of Dermatology 2004;42;138-144
 28. Latamendía A., Lastres P., Bottela L.M., Raab U., Langa C., Velasco B., Attisano L., Bernabeu C. : *Role of endoglin in cellular response to transforming growth factor- β .* The Journal of Biological Chemistry 1998;273;33011-33019
 29. Fonsatti E., Maio M. : *Highlights on endoglin:from basis findings towards clinical applications in the human cancer.* Journal of Translational Medicine 2004;2;
 30. Lebrin F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R. L., Valdimarsdottir G, Thorikay M., Mummery Ch., Arthur H. M. Dijke P. : *Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-b/ALK1 signal transduction.* The EMBO Journal 2004;23;4018-4028
 31. Lukešová Š., Kopecký O., Dvořák J., Hlávková D. : *Angiogeneze u renálního karcinomu.* Interní medicína 2007;1;21-27
 32. De Panfilis G. : *“Activation-induced cell death“:a special program able to preserve the homeostasis of the skin?* Experimental Dermatology 2002;11;1-11
 33. Laporte M., Galand P., Fokan D., de Graef C., Heenen M. : *Apoptosis in*

- established and healing psoriasis. Dermatology 2000;200;314-316*
34. Teraki Y., Shiohara T. : *Apoptosis in the skin. European Journal of Dermatology 1999; 9; 413-426*
 35. Gutierrez-Steil Ch., Wrone-Smith T., Sun X., Krueger J.G., Coven T., Nickoloff J. B. : *Sunlight-induced basal cell carcinoma tumor cells and ultraviolet-B-irradiated psoriatic plaques express Fas ligand. Journal of Clinical Investigation 1998;101; 33-39*
 36. Jílek P. : *Základy imunologie, Praha, Anyway 2002*
 37. Nečas O. a kol. : *Obecná biologie, H&H 2000*
 38. Bartůňková J., Paulík M. : *Vyšetřovací metody v imunologii. Grada 2005*
 39. Lequin R. M. : *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Clinical Chemistry 2005;12;2415-2418*
 40. Hercogová J. : *Farmakoterapie psoriázy. Remedia 2006;16;408-411*
 41. Arenberger P. : *Psoriasis vulgaris-nejnovější poznatky o léčbě. www.zdravcentra.cz 10. 12. 2007*
 42. Benáková N. : *Psoriáza a současné léčebné možnosti www.solen.cz 20. 11. 2007*
 43. Barták P. : *Je psoriáza nemoc vyléčitelná? www.tigis.cz 20. 11. 2007*
 44. Drozenová H. , Arenberger P. : *Biologické léčba psoriázy www.zdravcentra.cz 5. 3. 2008*
 45. Benáková N. : *Biologika v terapii psoriázy www.remmedia.cz 2. 3. 2008*
 46. Brabcová I. , Viklický O. , Lácha J. : *Úloha chemokinů při rejekci transplantovaných tkání www.tigis.cz 19. 12. 2007*
 47. ELISA Kits www.millipore.com 10. 2. 2008
 48. ELISA www.microvet.arizona.edu 22. 3. 2008
 49. Fas ligand www.wikipedia.org 28. 1. 2008
 50. Apoptóza www.zdravcentra.cz 15. 2. 2008
 51. Psoriasis www.healthy-skin-duide.com 23.1.2008
 52. Van de Kerkhof P.C.M., Rulo H.F.C., Van Peltj P.A., Van Vlijmen-Willems M.J.J., DeJonge M.G.J. *Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin www.cat.inist.fr 19. 4. 2008*