

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

DIPLOMOVÁ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ 2008

KATEŘINA KONDĚLKOVÁ



Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

Pentraxin PTX3 - nový marker imunopatologického zánětu
(Diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Marcela Drahošová

HRADEC KRÁLOVÉ 2008

Bc. KATEŘINA KONDĚLKOVÁ

PODĚKOVÁNÍ

Při této příležitosti bych ráda poděkovala paní RNDr. Marcele Drahošové za odborné vedení a pomoc při sestavování diplomové práce a 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.

Souhrn

Pentraxin 3 (PTX3) je nově identifikovaný reaktant akutní fáze, který sdílí některé strukturální a funkční vlastnosti s CRP, klasickým krátkým pentraxinem. Na druhou stranu, PTX3 má své unikátní biologické vlastnosti, včetně možné role v patogenezi kardiovaskulárních chorob a v procesu doprovázející přirozený vývoj operační rány. Na rozdíl od CRP, který je tvořen převážně v játrech, PTX3 je produkován zejména v místech poškození tkáně. Syntéza PTX3 je vyvolána prozánětlivými cytokiny TNF- α nebo IL-1 β , mikrobiálními složkami stěn jako například lipopolysacharidy. Plazmatické koncentrace PTX3 jsou zvýšené u velkého množství chorobných stavů jako například u chorob koronární artérie, u pulmonální infekce a akutního poranění plic, u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, u pacientů s depresí, během normálního těhotenství a preeklampsie, u pacientů s psoriázou a během kardio operací s nebo bez kardiopulmonárního bypassu. PTX3 byl stanoven užitím detekčního setu (Alexis Biochemicals, Švýcarsko), cat.no.ALX-850-299-KI01 pro sendvičovou ELISA aplikaci, která poskytuje záchyt monoklonálních protilátek k PTX3, detekci polyklonálních protilátek k PTX3 a rekombinantní PTX3 (standard). Goeckermanova terapie je vysoce efektivní v léčbě psoriázy. GT dosahuje dobrých klinických výsledků s dlouhodobou remisí u většiny pacientů. Produkce PTX3 aktivovanými monocyty - makrofágy u pacientů s psoriázou není pravděpodobně jediným zdrojem PTX3 u těchto pacientů. Je známo, že buňky endotelu značně přispívají k produkci PTX3. Porovnávali jsme PTX3 kinetiku u pacientů operovaných „on-pump“ a „off-pump“. Našli jsme významně vyšší PTX3 uvolňování u pacientů operovaných s použitím kardiopulmonárního bypassu. Tyto objevy mohou naznačovat rozdílnou tendenci k zánětlivé odpovědi u těchto dvou skupin pacientů. U akutního infarktu myokardu a dalších chorob, PTX3 může poskytovat marker bezpochybně kvalitnější v prognostické hodnotě než je CRP.

Summary

Pentraxin 3 (PTX3) is a newly identified acute phase reactant which shares some structural and some functional properties with CRP, classical short pentraxin. On the other hand, PTX3 displays unique biological properties of its own, including a possible role in the pathogenesis of cardiovascular diseases and in processes accompanying the natural evolution of surgical wounds. Unlike CRP, which is manufactured predominantly in the liver, PTX3 is produced especially at sites of tissue damage. PTX3 synthesis is induced by proinflammatory cytokines TNF- α or IL-1 β and by microbial wall constituents such as the lipopolysaccharide (LPS). Plasma protein PTX3 concentrations are elevated in a wide range of diseased states, such as in coronary artery disease, in pulmonary infection and acute lung injury, in patients with chronic kidney disease, in patients with depression, during normal pregnancy and preeclampsia, in patients with psoriasis and during cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass. PTX3 was detected using detection set (Alexis Biochemicals, Switzerland) cat.no. ALX-850-299-KI01 for sandwich ELISA application that provided capture monoclonal antibody to PTX3, detection polyclonal antibody to PTX3 and recombinant PTX3 (standard). Goeckerman's therapy of psoriasis is highly efficient in the treatment of psoriasis. GT achieves good clinical response followed by a long-term remission in a majority of patients. The PTX3 production by activated monocyte-macrophage cells in patients with psoriasis is very likely not the single source of PTX3 in these patients. It is well established that endothelial cells contribute substantially to the overall production of PTX3. We compared separately the PTX3 kinetics in „on-pump“ and „off-pump“ patients. We found a significantly higher PTX3 release in patients operated on with the use of cardiopulmonary bypass. These findings may imply different propensity to the inflammatory response in the two groups. In the setting of acute myocardial infarction and other diseases, PTX3 may provide a marker undoubtedly superior in prognostic value to CRP.

Obsah

Seznam použitých zkratk	- 2 -
1. Úvod a cíl	- 4 -
2. Teoretická část	- 5 -
2.1. Pentraxin 3 a jeho vztah k imunitnímu systému	- 5 -
2.1.1. Pentraxinová rodina.....	- 5 -
2.1.2. Proteiny akutní fáze.....	- 8 -
2.1.3. Pentraxin 3 a komplementární systém	- 9 -
2.1.4. Pentraxin a apoptóza	- 12 -
2.1.5. Dvojitá role pentraxinu 3 v autoimunitních reakcích.....	- 15 -
2.2. Výskyt pentraxinu 3 v souvislosti s různými chorobnými stavy	- 17 -
2.2.1. Vzestup hladiny pentraxinu 3 u chorob koronární arterie.....	- 17 -
2.2.2. Dlouhý pentraxin 3 u pulmonární infekce a akutního poranění plic.....	- 23 -
2.2.3. Plazmatický pentraxin 3 u pacientů s chronickým onemocněním ledvin	- 23 -
2.2.4. Diferenciální exprese PTX3 ve fibroblastech u pacientů s depresí.....	- 24 -
2.2.5. Plazmatická a tkáňová exprese Pentraxinu 3 během normálního těhotenství a preeklampsie.....	- 26 -
2.2.6. Působení samotného PTX3 proti Aspergillu a v kombinaci s fungicidy	- 28 -
2.2.7. Pentraxin 3 a psoriáza	- 30 -
2.3. ELISA.....	- 31 -
3. Experimentální část	- 34 -
3.1. Charakteristika souboru.....	- 34 -
3.2. Laboratorní metodika stanovení pentraxinu 3 (PTX3) ELISA technikou	- 36 -
3.3. Statistické zpracování výsledků	- 39 -
3.3.1. Základní statistika	- 39 -
3.3.2. Testovací statistika	- 39 -
4. Výsledky	- 40 -
4.1. Výsledky PTX3 u pacientů s psoriázou	- 40 -
4.2. Výsledky PTX3 u pacientů s kardio operací.....	- 41 -
5. Tabulky a grafy	- 43 -
6. Diskuze	- 52 -
7. Závěr	- 56 -
8. Seznam literatury	- 57 -

Seznam použitých zkratk

PTX3	pentraxin 3
TSG-14	tumor nekrotizující faktor-stimulovaný genovou sekvencí-14
CRP	C-reaktivní protein
SAP	sérový amyloid P
IL-6	interleukin 6
IL-1 β	interleukin 1 β
PTX3	pentraxin 3
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
IL-1	interleukin 1
LPS	lipopolysacharidy
IFN γ	Interferon γ
IL-10	interleukin 10
IL-6	interleukin 6
IL-12	interleukin 12
IL-4	interleukin 4
FGF 2	fibroblastický růstový faktor 2
KpOmpA	vnější membránový protein A z <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LOX-1	lecitin-like oxidovaný lipoproteinový receptor 1 o nízké hustotě
SREC-1	scavenger receptor přítomný na endotelových buňkách
DCs	dendritické buňky
TLR-2	toll-like receptor 2
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
TGT- β	transformující růstový faktor β
APCs	antigen-prezentující buňky
SLE	Systémový lupus erythematoses
RA	Revmatoidní artritida
AMI	akutní infarkt myokardu
CPB	kardiopulmonární bypassu
SIRS	systémový zánětlivý reakční syndrom
CABG	koronární arteriální bypasseová transplantace
OPCAB	alternativní název kardioperace bez použití CPB

„on-pump“	pacienti operovaní s použitím kardiopulmonárního bypassu
„off-pump“	pacienti operovaní bez použití kardiopulmonárního bypassu
TB	pulmonální tuberkulóza
IP-10/CXCL10	INF- γ inducible protein 10
GFR	glomerulární filtrace
HD	hemodialýza
PD	peritoneální dialýzu
DEX	dexamethason
IA	Invazivní aspergilloza
D-AMB	deoxycholátní amphotericin B (Fungizone)
L-AMB	liposomální amphotericin B (AmBizone)
GT	Goeckermanova terapie
SD	směrodatná odchylka
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent essay
EIA	Enzyme Immunoassay
pNPP	p-nitrofenylfosfát
ABTS	2,2'-azo-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonovou kyselina)
OPD	o-fenylenediamin
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidinovou báze
TF	tkáňový faktor
HUVECs	endotelové buňky z umbilikální žíly
SMCs	buňky hladké svaloviny
mAb	monoklonální protilátka

1. Úvod a cíl

Pentraxiny jsou součástí nadrodiny multifunkčních molekul charakteristických multimerní strukturou. Je to rodina proteinů, pro kterou je typická zploštělá β šroubovicová struktura a ligandy vázající vápník. Jméno „pentraxin“ je odvozeno z řeckých slov pět (penta) a plod (ragos), týkajících se radikální symetrie pěti monomerů, které vytvářejí kruh. Všechny pentraxiny se podílí na obraně organismu před pronikajícími patogenními mikroorganismy a na odstraňování vlastních apoptických buněk, čímž chrání organismus před rozvojem autoimunitních reakcí.

Cílem této práce je:

1. Shrnout současné znalosti o pentarxinu 3. Získat informace, jestli PTX3 může sloužit jako marker chorobných stavů a zda je možné jeho použití v terapii.
2. Zjistit, zda PTX3 může sloužit jako prognostický marker v konkrétních případech. Jako model jsem si vybrala pacienty s psoriázou, imunopatologickým stavem projevujícím se na pokožce. Provéřit, zda jsou plazmatické koncentrace PTX3 zvýšené u těchto pacientů a jestli Goeckermanova terapie snižuje PTX3 hladiny.
3. Jako druhý model jsem si vybrala kardiochirurgické operace. Zhodnotit kinetiku PTX3 u „on-pump“ a „off-pump“ operací. Která z těchto operací je méně riskantní z hlediska rozvoje zánětlivé odpovědi ve vztahu s PTX3.

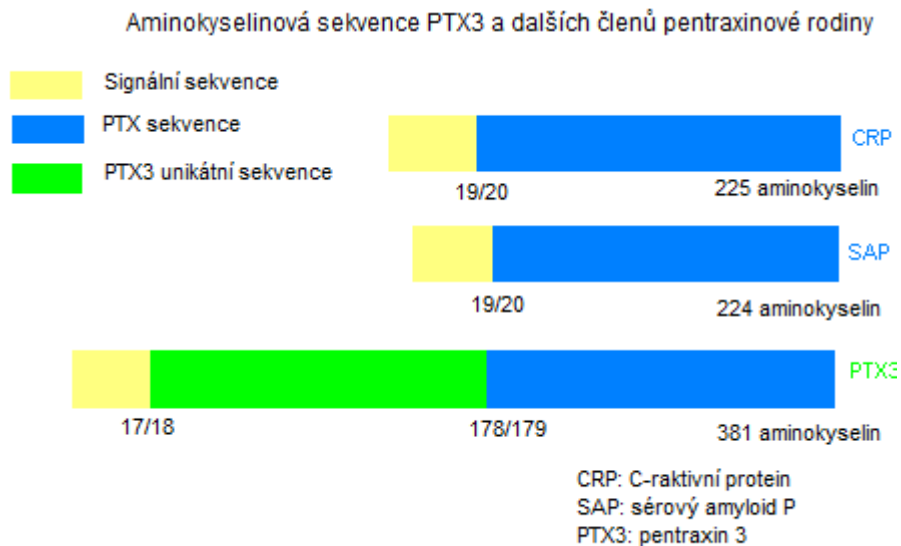
2. Teoretická část

2.1. Pentraxin 3 a jeho vztah k imunitnímu systému

2.1.1. Pentraxinová rodina

Pentraxiny můžeme rozdělit na tzv. krátké a dlouhé. C-reaktivní protein (CRP) a sérový amyloid P (SAP) patří mezi krátké pentraxiny a jsou známy jako reaktanty akutní fáze. U lidí je z těchto dvou pentraxinů bez pochyby důležitější CRP, zatímco funkce SAP není ještě zcela známá. U myší se na druhou stranu setkáváme s opačnou situací, kde CPR hraje pouze zanedbatelnou roli v reakci akutního zánětu. Oba pentraxiny jsou produkovány v játrech, kde je klíčovým regulačním mediátorem interleukin 6 (IL-6), zejména pokud jde o lidský CRP (3). Doplnkovým místem produkce CRP jsou ledviny a cévní stěny. Nicméně přínos těchto alternativních zdrojů k celkové hladině CRP během akutního zánětu nedosahuje velkého biologického významu (11).

Všechny pentraxiny patří mezi evolučně velmi staré proteiny. Během evoluce bylo jejich složení zachováno s pouze bezvýznamnými modifikacemi (11). Při hledání genů, jejichž produkty by mohly sloužit jako markery zánětlivých reakcí zapojených do cévní stěny, Breviario a kol. (1992) použili diferenciální hybridizaci k identifikaci různých cDNA, které jsou indukovány v lidských cévních endotelových buňkách interleukinem 1- β (IL-1 β). Jeden nově objevený gen mezi těmito cDNA byl nazván pentraxin 3. Lidský gen PTX3 je umístěn na chromozomu 3 (3q25) (30, 57). Tento gen kóduje 381 aminokyselin. PTX3 gen obsahuje 3 exony a je transkribován jako 1861 nukleotidová mRNA. Gen pentraxinu 3 byl pojmenován jako TSG-14 („tumor nekrotizující faktor stimulovaný genovou sekvencí-14“), protože dochází k jeho indukci ve fibroblastech léčených tumor nekrotizujícím faktorem (Lee a kol., 1990, 1993) (24).



Obr. 2.1.1. -1 Sekvence aminokyselin PTX3 (25)

Pentraxin 3 patří mezi dlouhé pentraxiny (40-50 kD), kam spadá i neuronální pentraxin 1 a neuronální pentraxin 2, a je strukturálně podobný klasickým krátkým pentraxinům. C terminální konec PTX3 složený z 203 aminokyselin je shodný s C terminálním koncem CRP a SAP, ale N terminální konec skládající se ze 178 aminokyselin je jedinečný. Protomery pentraxinu 3 se shromažďují do vyšších uspořádaných komplexů tvořených z 10-20 monomerových podjednotek (tj. dekamery nebo dodekamery) (11). PTX3 je produkován buňkami imunitního systému jako nepostradatelná složka humorální vrozené imunity, podílící se tak zejména na buněčném rozpoznávání a zánětlivých procesech. Na rozdíl od CRP, který je tvořen převážně játry, pentraxin 3 je produkován zejména v místech poškození tkáně, přičemž játra hrají v produkci pouze okrajovou roli. Tvorba pentraxinu 3 se odehrává dodatečně také v místech, která jsou vzdálená od poškozené tkáně, jde zejména o cévní endotel kosterních svalů a srdce (11). Pentraxin 3 je exprimován na stimulovaných dendritických buňkách, nediferencovaných a diferencovaných myoblastech, revmatoidních arteriálních synoviálních buňkách, gliálních buňkách, makrofázích a buňkách endotelu, na buňkách hladké svaloviny u pokročilých aterosklerotických plaků, na glomerulárních mesangiálních buňkách a preadipocytech. Syntéza pentraxinu 3 je indukována prozánětlivými cytokiny jako je tumor nekrotizující faktor α (TNF α) nebo interleukin 1(IL-1), dále mikrobiálními složkami a také lipopolysacharidy (LPS). Interferon γ (IFN γ), který je ve většině případů synergický s LPS, v monocytech inhibuje produkci pentraxinu 3. Naproti

tomu interleukin 10 (IL-10), nejúčinnější protizánětlivý cytokin, v produkci pentraxinu 3 synergizuje s LPS. Interleukin 6 (IL-6), hlavní cytokin regulující syntézu CRP v játrech, hraje v produkci pentraxinu 3 negativní roli (11).

Tabulka 2.1.1. -1 Syntéza pentraxinu 3

Induktory	Inhibitory
Lipopolisacharidy	IL-6
IL-1 β	MCP-1
TNF- α	M-CSF
IL-10	GM-CSF
	INF- γ

Funkčním protipólem pentraxinu 3 je TNF. Fyziologický průběh obranných reakcí vyžaduje koordinovanou aktivitu obou působků. Je-li rovnováha mezi nimi porušena, dochází v závislosti na převažující nebo chybějící aktivitě jednoho z nich ke zvýšené náchylnosti organismu k některým infekcím, vyvolaným zejména podmíněně patogenními fungálními původci, anebo k poškození organismu reakcemi obranného zánětu.

Pentraxin 3 je nový reaktant akutní fáze, jehož důležitost v biologii savců, včetně člověka, je v počátku poznání. Lidský PTX3 se liší od klasických pentraxinů v jeho velikosti (přibližně 23 kD pro SAP a CRP a 43 kD pro PTX3), v jeho genomické organizaci (2 exony pro SAP a CRP a 3 exony pro PTX3), chromozomální lokalizaci (chromozom 3 pro PTX3 a chromozom 1 pro SAP a CRP) a zejména v in vitro expresi.

Bylo zjištěno, že PTX3 je zvýšen u kriticky nemocných pacientů, s vzestupem od syndromu systémové zánětlivé odpovědi k septickému šoku. PTX3 hladiny mají vztah ke klinické závažnosti choroby (59). U akutního infarktu myokardu a dalších kritických stavů může poskytovat informaci, která je srovnatelná v prognostické hodnotě s C-reaktivním proteinem. Současně hraje pentraxin 3 důležitou roli v přirozené imunitě, která chrání tělo před některými napadajícími mikroorganismy. Dále se také podílí na odstraňování apoptických buněk (11).

2.1.2. Proteiny akutní fáze

Bílkoviny akutní fáze mají kromě svého účinku při zánětlivých procesech nebo jiných náhlých poškozeních tkání také některé účinky specifické. Proto změna jejich koncentrace v krevní plazmě může být u některých stavů odlišná. Co se týče rychlosti nástupu a trvání změn, můžeme je rozdělit do 4 skupin.

V první skupině jsou reaktanty akutní fáze s rychlou odpovědí jako C-reaktivní protein a sérový amyloid P. Jejich vzestup nastává již po 6 hodinách a dosahuje maxima za 48 hodin. Vzestup může být až 1000 násobný oproti fyziologické hodnotě. Tyto reaktanty mají důležité postavení v reakci akutní fáze a tím v obranném mechanismu jedince.

V druhé skupině jsou proteiny, jejichž nástup i vrchol je o něco pozvolnější. K prokazatelnému zvýšení dochází 12 až 24 hodin po poškození tkání a vrcholí za 72 až 96 hodin. Návrat k normálním hodnotám je u nekomplikovaných případů za 18 až 21 dní. Patří sem α_1 -antichymotrypsin, α_1 -antitrypsin, haptoglobin a fibrinogen. Maximální vzestup je 2 až 4 násobný.

Tabulka 2.1.2. -1 Změny v koncentraci proteinů akutní fáze (1)

Reaktant	Patologické zvýšení (krát)	Fyziologické hodnoty (g/l)	Typická koncentrace při zánětu (g/l)	Rychlost odpovědi (hodiny)
CRP	až 1000	0,00007-0,008	0,4	6 - 10
SAP	až 1000	0,001-0,030	2,5	6-10
α_1 -anti-chymotrypsin	2 - 4	0,3 - 0,6	3,0	10
α_1 -antitrypsin	2 - 4	1,0 - 2,0	7,0	
α_1 -kyselý glykoprotein	2 - 4	0,5 - 1,4	3,0	24
Haptoglobin	2 - 4	1 - 3	6,0	
Fibrinogen	2 - 4	2 - 4,5	10	
Ceruloplasmin	0,5	0,15-0,6	2,0	
C-3 komplement	0,5	0,55 - 1,2	3,0	48-72
C-4 komplement	0,5	0,20 - 0,50	1,0	

Třetí skupina, zastoupená např. ceruloplasminem a C3-složkou komplementu, reaguje ještě pozvolněji a maximální vzestup je obvykle 50 -100%.

Ve čtvrté skupině je pak např. transthyretin (=prealbumin), transferin a albumin, které se považují za negativně reagující reaktanty akutní fáze, u nichž se při poškození tkání koncentrace v krevní plazmě snižuje (1).

Řada fyziologických a biochemických změn, které se vyskytují během zánětlivé odpovědi, jsou výsledkem interakcí mezi cytokiny a různými buněčnými typy (59). Například, zvýšení sérových hladin hlavních reaktantů akutní fáze, CRP a SAP, je výsledkem vystavení jaterních buněk cytokinům, zejména IL-6 (60).

2.1.3. Pentraxin 3 a komplementární systém

Komplement je tvořen systémem asi 30 rozpustných membránových proteinů, které jsou syntetizovány hepatocyty, granulocyty, enterocyty, makrofágy a monocyty. Tyto bílkoviny se kaskádovitým způsobem přeměňují z neaktivní formy do podoby aktivních enzymů. Komplementový systém má po aktivaci podobné vlastnosti jako specifické imunitní reakce. Poskytuje opsoniny k urychlení fagocytózy. Hlavní složkou komplementového systému je komponenta C3, která je v plazmě přítomna v nejvyšší koncentraci.

K aktivaci komplementu dochází třemi způsoby, které se liší počátečními fázemi. První ze způsobů je klasická cesta aktivace, která představuje nejdéle známou aktivační cestu. Na počátku klasické cesty se na komplex antigenu a protilátky třídy IgG nebo IgM naváží neaktivní podjednotky první složky komplementu C1, označované jako C1q, C1r a C1s. Vazbou dojde ke změně prostorového uspořádání těchto podjednotek a tím k získání enzymové aktivity. Aktivní C1 atakuje složku C4 a štěpí ji na C4a a C4b. C4a se uvolní do okolí a C4b ve vazbě k C1 štěpí složku C2 na fragmenty C2a a C2b. Vzniká tak komplex C4b-C2b, který má schopnost štěpit C3.

Další možností je lektinová cesta aktivace komplementu, která nevyžaduje přítomnost komplexu antigen-protilátka, protože bílkoviny podobné C1q se vážou na cukerné složky buněčných stěn přímo. Tím dojde k aktivaci C1r a C1s. Poté následuje děj podobný klasické cestě.

Poslední možností aktivace komplementu je alternativní cesta, kdy je komplement aktivován prostými povrchy buněk, bakterií, virů, plísní, kvasinek a parazitů, které mají přístupné a volné aminové či hydroxylové skupiny. S těmito

skupinami interaguje složka C3, která se váže s faktorem B a uvolní se složky C3a a Ba a vznikne komplex C3bBb, který je schopen štěpit další molekuly C3 a B.

Výsledkem aktivace komplementu je vznik komplexu atakujícího membránu z C5 až C9. Definitivně je membrána proděravěna po navázání 12 až 18 molekul C9. V membráně vznikají póry, do cytoplazmy se dostává voda a dojde k lýze buněk (2).

Receptory pro složky komplementu jsou přítomny na řadě buněk a slouží k usnadnění vazby jednotlivých komponent za účelem odstranění cizorodých nebo nevhodných částic, které jsou vázány do imunokomplexů nebo jsou opsonizovány složkami komplementu.

Pentraxin 3 vykazuje vysokou afinitu k první součásti komplementární kaskády C1q. V prostředí s nadbytkem CRP nebo SAP dojde k vyvázání pentraxinu 3 z komplexu s C1q. Jestliže CRP nebo SAP jsou vázány s C1q v přítomnosti nadbytku pentraxinu 3, dojde k opačné situaci. Jakmile dojde k vazbě C1q, pentraxin 3 zahájí buď iniciaci, nebo inhibici aktivace komplementové kaskády přes klasickou cestu. Příslušný efekt závisí na aktuálních podmínkách okolí. U lokálně produkovaného pentraxinu 3 dochází k aktivaci komplementu, což probíhá během zánětu nebo poškození tkání. Tímto pentraxin 3 podporuje lokální obrannou reakci. Pentraxin 3, přítomný v cirkulaci, tj. vzdálený od místa lokálního zánětu, inhibuje aktivaci komplementu tím, že se molekula pentraxinu 3 vloží mezi C1q a následující komponenty komplementární kaskády. Tím dojde k obsazení příslušných vazebných míst pentraxinem 3 a zabránění přímého kontaktu C1q s dalšími komponentami komplementu, proto aktivační proces nemůže pokračovat. Tímto pentraxin 3 brání ohromné aktivaci komplementární kaskády během systémového zánětlivého procesu.

Pentraxin 3 se váže na povrch apoptických buněk. Tato aktivita pentraxinu 3 podporuje odstranění apoptických buněk a zbytků tkání, což je předpokladem pro správné hojení zranění. V této roli opsoninu si pentraxin 3 vybral za cíl některé mikroorganismy, především podmíněně patogenní houbu *Aspergillus fumigatus*, ale také *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella typhimurium*. Napoleone a kol. (2002) zjistili, že se pentraxin 3 váže se spórami ale ne s hyfy *Aspergillus fumigatus*. Spory indikují expresi pentraxinu 3 v monocytech a dendritických buňkách. PTX3 napomáhá interakcím mononukleárních fagocytů se spórami. Pokud dojde k dostatečné opsonizaci pentraxinem 3, spóry jsou pohlceny vlastními alveolárními makrofágy a následně odstraněny plícemi. Tento objev podporuje důležitost

opsonické role pentraxinu 3 v obranných reakcích a naznačuje existenci pentraxin 3 specifického receptoru na cílových buňkách. Nicméně tento receptor nebyl ještě identifikován (11).

PTX3 a C1q složka komplementu jsou humorální faktory vrozené imunity, produkované v místě zánětu a jsou velmi důležité v imunitní reakci proti řadě mikrobů včetně aspergila, který je příčinou nosní polypózy. Ve studii byl měřen PTX3 a C1q v polypové tkáni nosu, v normální nosní sliznici a v séru pacientů a zdravých kontrol. Bylo zjištěno, že normální nosní sliznice má vyšší hladiny PTX3 ve srovnání se sérem. Naopak nebylo zjištěno žádné měřitelné lokální zvýšení PTX3 u polypů ve srovnání s normální sliznicí. C1q hladiny byly vyšší u polypů než u normální nosní sliznice. Vysoké hladiny PTX3 jsou přítomny v normální nosní sliznici, což naznačuje roli pentraxinu v udržování tkáňové homeostázy. Zvýšené C1q hladiny u nosních polypů mohou být indikací pokračující zánětlivé odpovědi v nosní sliznici u těchto pacientů (45).

U myší, které mají deficit exprese pentraxinu 3, byla zjištěna náchylnost k invazivní pulmonální aspergillose (Garlanda a kol., 2002). Tato náchylnost je spojena s deficitem rozpoznání spór alveolárními makrofágy a dendritickými buňkami a také nedostatkem příslušných reakcí Th buněk (30). U těchto myší bylo také zjištěno snížení hladiny $\text{INF-}\gamma$, IL-12 a zvýšení hladiny IL-4. Tyto změny se mohou upravit podáváním pentraxinu 3.

Dias a kol. (2001) vytvořili transgenní myši, které exprimují více pentraxinu 3. Tato zvířata mají zvýšenou rezistenci k endotoxickému šoku vyvolanému LPS a k polymikrobiální sepsi. Makrofágy získané z těchto zvířat se ukázaly být citlivější k INF-gamma.

Kromě C1q komponenty komplementu se pentraxin 3 dále váže s:

1. fibroblastickým růstovým faktorem 2 (FGF 2), což je mediátor účastnící se procesu angiogeneze. Rusnati a kol. (2004) zjistili, že se PTX3 váže s FGF 2 s vysokou afinitou. Tato vazba zabrání navázání FGF 2 na jeho receptory, čímž dojde k jeho inhibici. Tímto dojde k proliferaci buněk endotelu a neovaskularizaci. Autoři naznačili, že PTX3 může upravovat angiogenezi v různých fyziopatologických podmínkách řízených zánětem, přirozenou imunitou a/nebo neoplastickou transformací.
2. extracelulárním matrixovým proteinem TSG-G, který podporuje přestavbu tkání.

3. vnějším membránovým proteinem A z *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA), což je nově objevený mediátor zánětu.

Rozpoznání KpOmpA je zprostředkováno přes scavenger receptory LOX-1 (lecitinlike oxidovaný lipoproteinový receptor 1 o nízké hustotě) a SREC-1 (scavenger receptor přítomný na endotelových buňkách – 1). Oba receptory se vyskytují na makrofázích a dendritických buňkách (DCs). KpOmpA aktivuje imunitní efektorové buňky přes toll-like receptor (TLR)-2. KpompA spouští transmembránovou signalizaci nezralých dendritických buněk, která reguluje molekuly CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), mezibuněčné adhezní molekuly ICAM-1 (CD54) a molekuly MHC první nebo druhé třídy. KpOmpA také způsobuje produkci IL-12 a TNF- α . Tímto takřka dochází k dozrávání dendritických buněk. KpOmpA dále také směřuje exogenní antigeny do MHC třídy I prezentační cesty. Všechny tyto aktivity KpOmpA vrcholí mobilizací účinných antibakteriálních imunitních reakcí. Makrofágy ve spojení s komplementárním systémem a pentraxiny eliminují bakterie. Dozrávající dendritické buňky spouští antigenně specifické imunitní reakce, které jsou vykonány cytotoxickými CD8+ T lymfocyty. Exogenní antigeny, které byly pohlceny dendritickými buňkami pomocí endocytózy, se dostávají do cytosolické MHC třídy I prezentační cesty. Mimoto vede buněčná signalizace způsobená KpOmpA k produkci monocytů/makrofágů a pomocí dendritických buněk k produkci pentraxinu 3. Tato vlastnost KpOmpA vyjadřuje zdánlivě nejednoznačnou či dokonce protikladnou vlastnost vrozených imunitních reakcí, které jednak bojují s infekcí a jednak opravují a regenerují poškozené tkáně. Pentraxin 3 podporuje obě z těchto nejednoznačných aktivit. Je to efektní mediátor boje přirozené imunity a zároveň podporuje eliminaci vlastních poškozených buněk (11).

2.1.4. Pentarxin a apoptóza

Významným faktorem při poškození tkání různými patogenními podněty je zánik buňky. Morfologicky i funkčně jsou rozlišovány dva způsoby smrti buňky: nekróza a apoptóza.

Smrt buňky nekrózou je výsledkem neschopnosti udržet strukturálně-funkční ohraničení od mezibuněčného prostoru a vůči okolním buňkám. Při nekróze dochází k narušení buněčných membrán. Buňka zvětšuje svůj objem, ztrácí vnitřní strukturu, aktivují se její enzymy, které postupně rozkládají jak vlastní buňku tak okolní

mezibuněčnou hmotu. Tento děj je doprovázený místní zánětlivou reakcí a možnými následnými fibrotickými změnami tkáně.

Nekróza buňky je vždy patologickým dějem, ale apoptóza se vyskytuje i za fyziologických podmínek při remodelaci tkání, zejména během embryonálního a fetálního vývoje, a při udržování normální buněčné dynamiky a v některých tkáních. Protože je apoptóza fyziologický děj, a protože spočívá v uplatnění vlastních buněčných mechanismů, bývá také označována jako „programovaná buněčná smrt“, neboť jde o důležitou formu udržování buněčné homeostázy.

Za patologických okolností mohou změny apoptózy způsobit chorobný stav. K apoptickému zániku buňka potřebuje energii, je tedy zachován oxidativní metabolismus.

Mechanismem apoptózy jsou eliminovány buňky, které jsou nadpočetné nebo nějakým způsobem škodlivé. Po stránce morfologické buňka, která vstupuje do apoptózy, začne tvořit výchlípky membrány, tzv. blebs („bublinky“). Po indukci apoptózy se buňka s „bleby“ začne velmi rychle jakoby točit. Poté se taková buňka sraší, chromatin se začne kondenzovat a segmentuje se jádro. Postupně se vytvoří takzvaná apoptická tělíska, která obsahují části cytoplazmy a fragmenty jádra. Orgány v těchto apoptických těliscích jsou většinou intaktní a schopné funkce. Poté jsou buňka nebo její rozpadlé části fagocytovány makrofágem (12).

Buňka se při apoptóze rozpadá, ale apoptická tělíska zůstávají ohraničeny vůči okolí cytoplasmatickou membránou. Fyziologické interakce buňky s okolními buňkami a s mezibuněčnou hmotou jsou potlačeny, buňka se izoluje od svého okolí. Proteolytické pochody, které jsou aktivované uvnitř buňky, zůstávají omezeny pouze na buňku a nezasahují do jejího okolí. Zánik buňky apoptózou na rozdíl od zániku nekrózou nevyvolává zánětlivou reakci (13).

Objem buňky se během apoptózy zmenšuje a buňka se nakonec rozpadne na několik různě velkých apoptických tělísek. Jejich membrána je pozměněna, což způsobuje jejich fagocytózu a odstranění okolními buňkami.

V zánětlivé nebo poškozené tkáni dochází k rapidnímu vzestupu počtu umírajících buněk. Na tyto buňky se vážou všechny pentraxiny, aby se tělo pomocí fagocytózy zbavilo zemřelých buněk a intracelulárních součástí, které se uvolňují z poškozených nebo umírajících buněk. Odstranění těchto apoptických buněk a subcelulárních složek pomocí makrofágů a pentraxinů začíná parakrinním uvolněním protizánětlivých mediátorů jako TGF- β (transformující růstový faktor β), což zaručuje

imunologickou tichou buněčnou smrt. Vysoce imunologické peptidy, které jsou za normálních okolností integrované na žijících buňkách, vstupují do extracelulárního prostředí. Uvolněné intracelulární součásti jsou identifikovány pomocí dendritických buněk jako cizí antigeny. Pokud nedojde k jejich odstranění, mohou propuknout katastrofické autoimunitní reakce. Pentraxiny pomocí eliminace imunologického materiálu zabraňují vážnému autoimunitnímu poškození, které jinak může napadat vlastní tkáň. Klíčovým bodem v tomto procesu je zkřížená prezentace antigenních neoepitopů uvolněných z tkání dendritickými buňkami cytotoxickým CD8+ T lymfocytům. Toto je běžná situace při jakékoli závažnější operaci.

Antigeny z extracelulárního prostředí jsou prezentovány APCs (antigen-prezentující buňky) na molekulách MHC (hlavní histokompatibilní komplex) první třídy, za účelem aktivace efektorových CD8+ T lymfocytů. Zároveň je tato zkřížená prezentace důležitým mechanismem, kterým imunitní systém monitoruje tkáň, zda nejsou přítomny cizí (např. mikrobiální) antigeny nebo vlastní autoantigeny, které jsou rozpoznány imunitním systémem jako cizí. Výsledkem zkřížené prezentace je buď imunitní reakce, nebo imunitní tolerance.

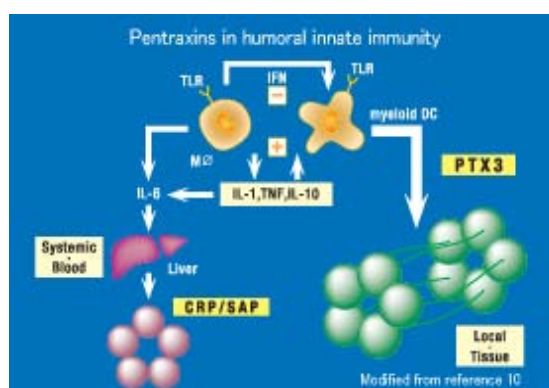
Antigenní zkřížená prezentace je v prostředí, přetékajícím extracelulárními antigeny, různě rozšířená. Rozsáhlá buněčná smrt vyvolává aktivaci imunitního systému. Následkem toho se množství pentraxinu 3 zvyšuje.

Kdykoli dojde k detekci antigenu, DCs spouští antigen specifickou na MHC závislou imunitní reakci, která je zaměřená na eliminaci intracelulárních mikroorganismů, tumorových buněk nebo neo/autoantigenních vlastních buněk nebo jejich frakcí. Dendritické buňky zkříženě prezentují antigenní epitopy ve spojení s molekulami MHC třídy I cytotoxickým CD8+ T lymfocytům bez ohledu na antigenní původ (cizí antigeny nebo fragmenty pocházející z vlastních buněk). Efektorové CD8+ T lymfocyty interagují s prezentovanými antigeny až po jejich zpracování do krátkých peptidů pomocí antigen prezentujících buněk a následném spojení s molekulami MHC třídy I. Až poté cytotoxické CD8+ T lymfocyty identifikují komplexy antigen-MHC třídy I, které jsou určeny k eliminaci. Pentraxin 3 zde působí jako mediátor funkcí dendritických buněk (11).

2.1.5. Dvojitá role pentraxinu 3 v autoimunitních reakcích

Za normálních homeostatických podmínek, buňky umírající apoptózou aktivují produkci pentraxinu 3 dendritickými buňkami. Apoptické buňky, ke kterým je pentraxin 3 vázán, úspěšně zabraňují spojení nezralých dendritických buněk. Pentraxin 3 také limituje produkci prozánětlivých cytokinů a kostimulačních molekul, které jsou potřebné pro dozrávání a antigen prezentující schopnosti DCs. Souběžně je minimalizována nebo úplně zastavena klonální expanze T lymfocytů, které mohou spouštět cytotoxické autoimunitní reakce.

Nicméně se může stát, že pentraxinem 3 označené apoptické buňky, v závislosti na akutním nadbytku antigenů, zejména mikrobiálního původu, mohou uniknout pohlcení dendritickými buňkami. V takovémto případě pentraxin 3 zvýší produkci prozánětlivých cytokinů potřebných k boji s infekcí, zatímco současně dojde k omezení zkřížené prezentace antigenních neoepitopů autoreaktivním CD8+ T lymfocytům. Pokud existuje současně mikrobiální infekce a rozsáhlá buněčná smrt, tak pentraxin 3 poskytuje jak obranu tak zároveň zabraňuje přehnanému ničení tkání. Tímto jsou chirurgické rány efektivně chráněny pentraxinem 3 jak před infekcí, tak před autoimunitním poškozením. Na druhou stranu pentraxin 3 nezasahuje do prezentace rozpustných antigenů efektorovým buňkám, která je potřebná k eliminaci extracelulárních mikrobiálních patogenů. Klasický krátký pentraxin CRP značně přispívá do těchto procesů tím, že vytváří celkové protizánětlivé prostředí, ve kterém jsou apoptické buňky ničeny makrofágy (11).



Obr. 2.1.5. -1. Pentraxin v humorální vrozené imunitě (25)

Vysoké hladiny PTX3 byly nalezeny u pacientů s autoimunitními chorobami, jako například RA (Revmatoidní artritida) a systémová skleróza a u těch

s vaskulitidou malých cév, například Churg-Strauss syndrom, Wegenerova granulomatoza a mikroskopická polyangitida, ale ne u pacientů s SLE (Systémový lupus erythematoses) nebo Crohnovou chorobou. U pacientů s těmito autoimunitními chorobami hladiny PTX3 korelují s aktivitou choroby a odpovědí na terapii. Výzkumy zjistily, že exprese PTX3 je u těchto autoimunitních chorob charakteristická u aktivovaných patologických buněk (synovocyty u RA, fibroblasty u systémové sklerózy a endoteliální buňky u vaskulitidy malých cév). Tyto objevy indikují, že PTX3 produkovaný lokálně v místě zánětu, může hrát důležitou roli v lokální citlivosti na poranění u autoimunitní choroby (30).

2.2. Výskyt pentraxinu 3 v souvislosti s různými chorobnými stavy

2.2.1. Vzestup hladiny pentraxinu 3 u chorob koronární arterie

Pentraxin 3 je marker, který odráží etiologii vaskulárního poranění velmi přesně a okamžitě. PTX3 se zdá být výborným prognostickým biomarkerem pro akutní koronární syndrom.

Výskyt pentraxinu 3 je pozorován zejména ve stěně cév. U pacientů, kteří mají vaskulitidu malých cév, se pentraxin 3 nachází v depozitech tvořených umírajícími leukocyty, které se shromažďují v místech před poškozenou cévou anebo dokonce přímo v cirkulaci. Syntéza pentraxinu 3 může být vyvolána aterogenními lipoproteiny v buňkách hladké svaloviny. Indukce pentraxinu 3, která je vyvolána TNF α , IL-1, lipopolysacharidy a dalšími látkami, podporuje syntézu tkáňového faktoru v lidských buňkách endotelu. V aterosklerotických plátech je pentraxin 3 produkován infiltrovanými makrofágy a rozloženými buňkami endotelu.

Zánět je hlavním přispívajícím faktorem k vývoji aterosklerotického plátu, ischemické srdeční choroby a má patogenní roli u akutního infarktu myokardu. PTX3 je produkován jako odpověď na tento zánětlivý stimul (48,49).

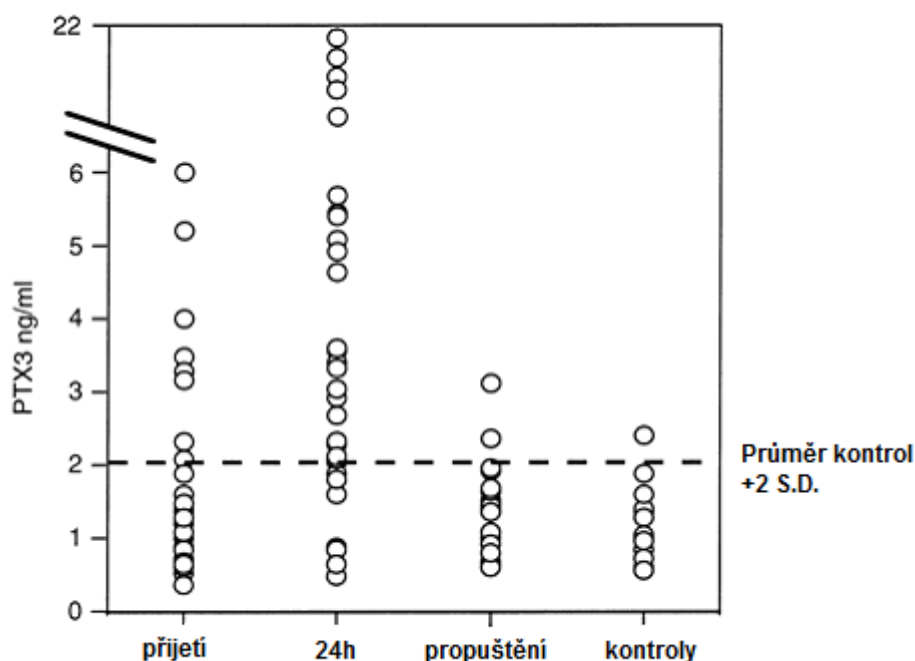
Klonování myšího PTX3 umožňuje in vivo analýzu exprese této molekuly u myší. Po podávání bakteriálních lipopolysacharidů byl PTX3 exprimován ve vysokých hladinách v srdci. Tento objev vnesl otázku, jestli je PTX3 tvořen v kardiomyocytech a zdali může být zvýšen během srdeční ischemie a tím sloužit jako nový nezávislý indikátor poškození myocytů (50).

Podle studie je PTX3 přítomen v normálních a hypertrofních lidských kardiomyocytech, je zvýšen v krvi pacientů s AMI a uvolňuje se z umírajících nebo nekrotických myocytů. Tyto umírající či nekrotické buňky mohou uvolňovat PTX3, protože propustnost myocytů je pozměněna jako výsledek nekrotického procesu. Buněčná distribuce PTX3 v myokardu u pacientů s AMI je čistě odlišná od té CRP, protože CRP je lokalizován v nekrotických místech společně s C3 a C4 komponenty komplementu. Komplement je u AMI aktivován lokálně skrz klasickou cestu a představuje mechanismus zvětšení tkáňového poškození (50).

Ve studii byly měřeny hladiny PTX3 a CRP při příjmu pacientů s akutním infarktem myokardu, po 24 hodinách a po propuštění z nemocnice. U podskupiny pacientů byla krev odebírána po 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 a 72 hodinách a při propuštění z nemocnice, aby se popsala přesnější časová kinetika PTX3 a CRP po

AMI. PTX3 byl měřen sendvičovou ELISA metodou na základě monoklonálních protilátek (mAb) MNB₄ a králičího antiséra. Sérové koncentrace CPR byly stanoveny enzymatickou imunoesejí s polyklonálními protilátkami sendvičovými kity (50).

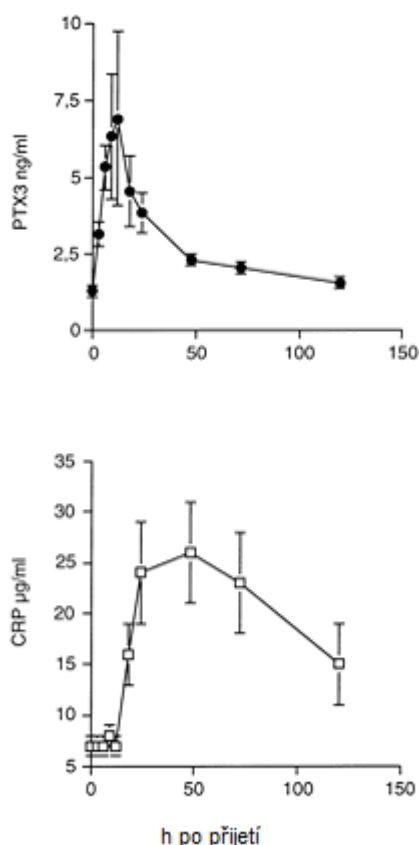
PTX3 plazmatické koncentrace u kontrolních pacientů bez historie nebo přítomnosti ischemické srdeční choroby byly v průměru $0,99 \pm 0,51$ ng/ml. Na základě této hodnoty byla stanovena cut off koncentrace PTX3 na 2,01 ng/ml, což je průměrná hodnota + 2 S.D. Cut off pro CRP byla stanovena stejným postupem na 2,56 μ g/ml. Průměrná koncentrace PTX3 při příjmu pacientů s AMI byla $1,77 \pm 1,49$ ng/ml. 24 hodin po přijetí byly u 76% pacientů plazmatické hladiny zvýšené a pouze u 8% pacientů byly hladiny stále vyšší při propuštění z nemocnice. 47% pacientů mělo při příjmu vyšší koncentrace CRP než jsou normální hladiny a u 91% se tyto hladiny po 24 hodinách zvýšily a u 73% klesly při propuštění (50).



Obr. 2.2.1. – 1 PTX3 plazmatické hladiny u lidí s AMI. Tyto hladiny byly měřeny při přijetí, po 24 hodinách (24 h) a při propuštění z nemocnice. Čerchovaná čára představuje cut off hodnotu (průměr kontrol + 2 S.D.) (podle Peri a spol.,(50), upraveno).

Z kompletního časového průběhu PTX3 a CRP, který se získal měřením koncentrací u podskupiny pacientů v častých časových úsecích, je znát, že kinetika obou pentraxinů je rozdílná. Hladiny PTX3 dosahují vrcholu u pacientů s AMI mnohem dříve (7,5 hodin) než CRP (24 hodin) po počátku bolesti na hrudi ($P <$

0,001). Nejvyšší hladiny pentraxinu 3 v plazmě se u AMI pacientů vyskytují nezávisle na postupně se zvětšující nekróze myokardu nebo na závažnosti selhání srdce. Jediná významná rozdílnost byla nalezena u věku, kdy pacienti nad 64 let měli po 24 hodinách od počátku AMI symptomů vyšší PTX3 koncentrace než mladší pacienti ($5,93 \pm 5,57$ vs. $2,87 \pm 1,31$ ng/ml, $P = 0,035$) (50).



Obr. 2.2.1. – 2 Časový průběh cirkulace PTX3 a CRP u podskupiny AMI pacientů.

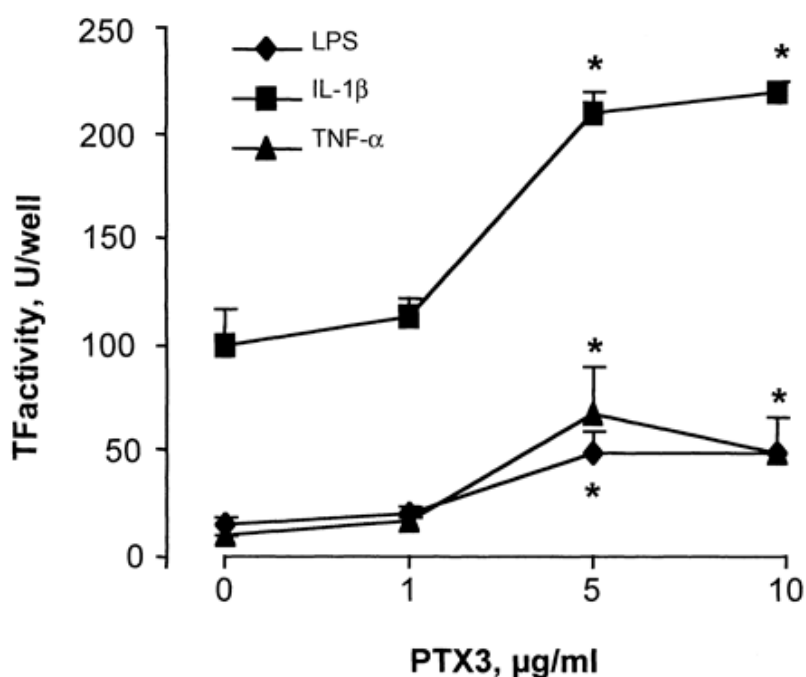
Koncentrace PTX3 a CRP byly měřeny ELISA (podle Peri a spol., (50), upraveno).

U akutního infarktu myokardu se pentraxin 3 považuje za časný marker poškození srdečního svalu, protože dosahuje své nejvyšší hladiny v plazmě dříve než CRP(4). Podle studie, ve které se měřily plazmatické hladiny PTX3 u pacientů se srdečním selháním a u kontrolních subjektů bez srdeční příhody sendvičovou metodou, byly koncentrace plazmatického PTX3 vyšší u pacientů se srdeční příhodou než u kontrol ($P < 0,0001$) (41).

Pentraxin 3 je marker, který poskytuje nejlepší prognostické informace týkající se mortality do 3 měsíců po srdeční příhodě. Podle výzkumu pacienti, u kterých byla první den naměřená hladina pentraxinu 3 v plazmě vyšší než 10,73 ng/ml, byli

vystavení trojnásobně vyššímu riziku smrti během následujících 3 měsíců ve srovnání s pacienty, u kterých hladina pentraxinu 3 nepřesáhla 5,49 ng/ml. Prognostická informace poskytovaná pentraxinem 3 byla vyhodnocena jako kvalitnější co se týče přesnosti než prognostické hodnoty poskytované hladinami kreatinkinázy, troponinem T nebo N-terminálním pro-brain natriuretickým peptidem, natož samotným CRP (11).

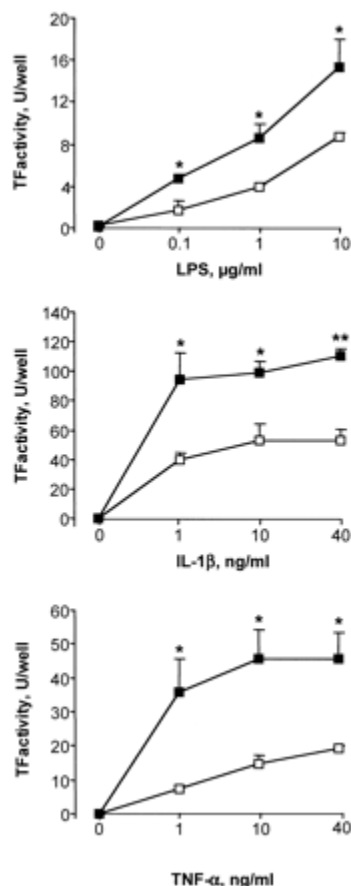
Protože tkáňový faktor (TF), in vivo spouštěč krevní koagulace, hraje dominantní roli ve vytváření trombu po ruptuře aterosklerotického plátu, testovala se možnost, zda PTX3 může modulovat TF expresi. Lidské endotelové buňky inkubované s endotoxinem (lipopolysacharidy) nebo zánětlivými cytokiny (interleukin 1 β , tumor nekrotizující faktor α) exprimují TF.



Obr. 2.2.1. – 3 TF aktivita u HUVECs vystavených různým koncentracím PTX3. * P < 0,05 vs. vzorek bez PTX3 (podle Napoleone a spol.,(49)).

Zánětlivé události vedou k aktivaci koagulace a tvorbě trombů. TF nalezený v aterosklerotickém plátu a jeho expozice po ruptuře plaku může vést k trombóze, vaskulární okluzi a infarktu myokardu. Mezi TF produkujícími buňkami, které se účastní tvorby plaku, hrají endotelové buňky důležitou roli. Ze studie vyplynulo, že PTX3 zvyšuje expresi TF na endotelových buňkách vystavených různým patofyziologickým podnětům. Po inkubaci PTX3 s lidskými endotelovými buňkami

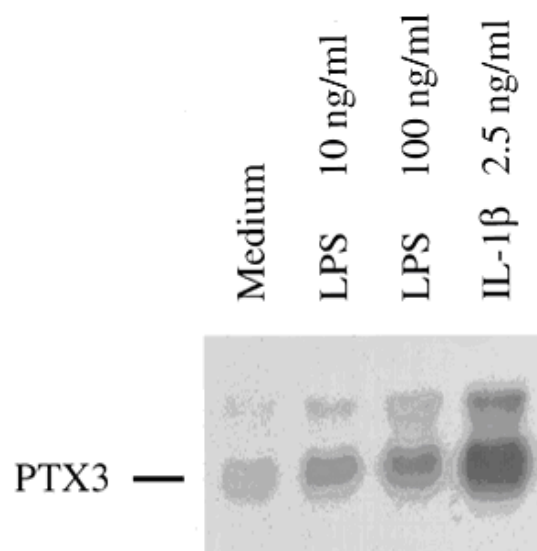
z umbilikální žíly (HUVECs) nebyla pozorována žádná prokoagulační aktivita. Ale pokud dojde ke stimulaci HUVECs různými koncentracemi klasických TF induktorů (LPS, IL-1 β a TNF- α), přítomnost PTX3 zvyšuje TF aktivitu.



Obr. 2.2.1. – 4 Efekt PTX3 na TF expresi HUVECs. TF exprese byla měřena u HUVECs, které byly vystaveny 4 hodiny při 37°C různým koncentracím LPS, IL-1 β nebo TNF- α bez (□) nebo s (■) PTX3. TF aktivita byla měřena testem aktivovaného koagulačního času. * P < 0,05 a ** P < 0,001 vs. odpovídající vzorek bez PTX3 (podle Napoleone a spol.,(49)).

Aby se zhodnotila specifika PTX3, který patří k rodině pentraxinů, která zahrnuje klasické členy jako je CRP a SAP, ve studii bylo testováno, zda tyto 2 reaktanty akutní fáze mohou být také modulátory HUVECs exprese. Výsledky studie ukazují, že ani CRP ani SAP nemohou modulovat TF expresi jak v klidových tak v aktivovaných HUVECs, což ukazuje, že PTX3 je specifický. CRP je znám, že moduluje TF expresi monocytů v periferní krvi. Jeho aktivita zřejmě vyžaduje přítomnost dalšího exogenně přidaného podnětu, což naznačuje, že CRP je spíše induktor než zesilovač TF tvorby. CRP testovaný na HUVECs neindukuje TF syntézu (49).

Hlavní dvě buněčné součásti aterosklerotických lézí, jmenovitě makrofágy a endotelové buňky, silně produkují PTX3 v odpovědi na zánětlivý podnět. Byla provedena studie, ve které se testovala PTX3 exprese v pokročilých lidských aterosklerotických lézích. Imunohistochemická analýza demonstruje silnou PTX3 expresi v lézích, zatímco ve zdravých neaterosklerotických prsních artériích nebyla exprese detekována. Bylo zjištěno, že endotelové buňky a makrofágy jsou hlavními producenty PTX3 během aterosklerotického procesu a také malý zlomek buněk hladké svaloviny (SMCs) exprimuje PTX3. Studie také zkoumala tvorbu PTX3 mRNA v kulturách lidských SMCs. Na nestimulovaných kulturách nebyla detekována žádná nebo pouze velmi malá aktivita PTX3. Produkce PTX3 byla indukována jako odpověď na LPS nebo IL-1 β . Tyto výsledky potvrzují, že SMCs mohou exprimovat PTX3 mRNA a že tato exprese je indukována zánětlivými podněty.



Obr. 2.2.1. -5 PTX3 mRNA exprese v lidských SMCs. Indukce PTX3 mRNA po 4 hodinové stimulaci buď 10 nebo 100 ng/ml LPS nebo 2,5 ng/ml IL-1 β (podle Rolph a spol.,(58), upraveno).

IL-1 a TNF jsou exprimovány v pokročilých aterosklerotických lézích a tyto dvě molekuly jsou hlavními kandidáty na regulaci PTX3 exprese.

Ze studie vyplývá, že PTX3 může hrát stejnou roli v periférii, jakou hraje CRP v cirkulaci a že může být zapojen do patogeneze aterosklerózy (58).

2.2.2. *Dlouhý pentraxin 3 u pulmonární infekce a akutního poranění plic*

PTX3 hraje důležitou roli v předcházení infekce, způsobené některými bakteriemi, houbami a viry v plicích (27). Rekombinantní PTX3 byl navrhován jako potenciální antifungální molekula pro terapii.

Byla provedena studie, jejímž cílem bylo stanovit efekt mechanismu ventilace na PTX3 expresi. Pokusné krysy byly vystaveny intravenózní injekci lipopolysacharidů (LPS) nebo krvácení s následnou resuscitací. Zvířata byla poté vystavena buď relativně vysoké (12ml/kg) nebo nízké (6 ml/kg) objemové ventilaci, která trvala 4 hodiny. Vysoko objemová ventilace významně zvyšuje expresi PTX3 v plicích. PTX3 aktivita závisí na závažnosti plicního poranění.

Ke stanovení efektů LPS, krvácení nebo poškozené ventilace na PTX3 expresi, byly sledovány další skupiny krys. Porušená ventilace významně poškodí plíce a tím zvýší tvorbu PTX3. Zvýšená lokální produkce PTX3 indikuje vysoko objemovou ventilaci (14).

INF- γ inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) je chemokin zapojený do opožděného typu hypersenzitivity a přitažlivosti monocytů a aktivovaných T lymfocytů do zánětlivého ohniska, kde je PTX3 součástí vrozené imunity. V Guinejské republice byli sledováni pacienti s nově diagnostikovanou pulmonální tuberkulózou (TB) a zdraví pacienti jako kontroly. Krevní hladiny CXCL10 a PTX3 byly hodnoceny metodou ELISA nejdříve během diagnózy, poté po 2 měsících a na konci léčby. U neléčených pacientů byly hladiny CXCL10 a PTX3 vyšší než u kontrol. U vyléčených pacientů došlo ke snížení jak CXCL10 tak PTX3 hladin. Také u dříve zdravých kontrol, u kterých došlo k rozvoji TB během vyšetření, a u 2 pacientů, u kterých došlo k relapsu po léčbě, bylo pozorováno výrazné zvýšení plazmatických hladin jak CXCL10 tak PTX3. Ze studie vyplývá, že aktivní TB je spojena se zvýšením plazmatických hladin PTX3 a CXCL10. Přestože je měření těchto proteinů nespecifické pro TB, může pomoci při monitorování aktivity choroby a účinnosti terapie (31).

2.2.3. *Plazmatický pentraxin 3 u pacientů s chronickým onemocněním ledvin*

Plazmatické koncentrace pentraxinu 3 byly analyzovány ve vztahu k GFR (glomerulární filtrace), zánětu, kardiovaskulárním chorobám a proteinovým ztrátám energie u skupiny pacientů s třetím až čtvrtým stádiem chronického selhání ledvin a

u pacientů s pátým stádiem chronického selhání ledvin. Tyto hodnoty byly porovnávány s kontrolními vzorky. Podle hladin pentraxinu 3 bylo analyzováno přežití pacientů s pátým stádiem chronického selhání ledvin (29).

Obě skupiny pacientů se selháváním ledvin měly vyšší koncentrace pentraxinu 3 než kontrolní skupina. Nejvyšší hladiny byly zjištěny u pacientů s pátým stádiem nemoci.

Pacienti s proteinovou ztrátou energie, zánětem a kardiovaskulární chorobou měli vyšší koncentrace PTX3 než pacienti bez těchto příznaků. Po prozkoumání věku, pohlaví, CRP a kardiovaskulárních chorob, byla mortalita významně vyšší u nemocných, kteří měli vysokou hladinu PTX3. U pacientů s chronickým selháváním ledvin je zvýšená hladina pentraxinu 3 prognostickým ukazatelem mortality (15).

PTX3 je podle výzkumu také značně zvýšen u pacientů na hemodialýze (HD), ale jeho hladiny nejsou zvýšeny u pacientů, kteří podstoupili peritoneální dialýzu (PD). Ve studii se zkoumaly vzorky plazmy od HD pacientů, PD pacientů, pacientů s chronickým selháváním ledvin bez dialýzy a zdravých subjektů. PTX3 hladiny byly výrazně vyšší u HD pacientů (5.8 ng/ml) než u ostatních skupin. Podle výzkumu nebyly významné rozdíly v PTX3 hladinách u PD (1.5 ng/ml), u pacientů s chronickým selháváním ledvin bez dialýzy (1.5 ng/ml) a kontrolních subjektů (0.76ng/ml). Produkce PTX3 byla vyšší ve všech krevních vzorcích odebraných po 3 hodinách po HD ve srovnání s hladinami u vzorků získaných před HD. Toto zvýšení v PTX3 produkci indikuje, že HD procedura přispívá ke zvýšení PTX3 hladin (44).

Navíc, CRP hladiny byly zvýšeny jak u HD (0.8 mg/dl), PD (1.1 mg/dl) tak u pacientů s chronickým selháváním ledvin bez HD (0.9 mg/dl) ve srovnání s kontrolními subjekty (0.12 mg/dl). A u pacientů s PD byly pozorovány i vyšší hladiny IL-6 (10.8 pg/ml) a prozánětlivých parametrů (29).

2.2.4. Diferenciální exprese PTX3 ve fibroblastech u pacientů s depresí

V této studii byla použita diferenciální zobrazovací technika k porovnání genetické exprese PTX3 v kultuře fibroblastů získaných od pacientů s vážnou depresí s melancholií, od pacientů trpících depresí bez melancholie a od zdravých dobrovolníků. Dále byly zavedeny inkubační experimenty, kdy byly fibroblasty od melancholiků a zdravých dobrovolníků inkubovány s isoproterenolem 1M, dexamethasonem (DEX) 500nM a interleukinem 1 β (IL-1 β) 50ng/ml.

Dexamethason je lék, který obsahuje steroidní hormony běžně produkované v těle každého člověka (19). DEX tlumí zánět, alergické projevy a snižuje normální i chorobně zvýšenou činnost systému nutného pro obranyschopnost organismu (18). Isoproterenol je syntetické sympatomometikum s přednostním působením na beta-adrenergní receptory. Používá se jako kardiostimulans a antialergikum (17).

Vzorky kůže byly odebrány pomocí biopsie, kultury fibroblastů rostly v Dulbeccos modifikovaném Eagle médiu (Life Technologies, Grand Island, NY) (Manier a kol., 1996, 2000).

Fibroblasty z kultur byly lyzovány, RNA izolována a čištěna a naklonována. Fibroblastická RNA byla rozdělena pomocí elektroforézy. RNA byla přenesena z gelu na nylonovou membránu, zde byla imobilizována pomocí UV zesílení. Prehybridizace proběhla při 70°C, následovala hybridizace a promytí při pokojové teplotě a následně při 70°C. Po inkubaci byla RNA extrahována a mRNA kvantifikována pomocí Northern blot analýzy.

Základní PTX3 mRNA exprese u melancholických pacientů byla přibližně 3,5krát vyšší než u kontrol nebo pacientů bez melancholie.

Kultury fibroblastů získané od zdravých dárců a od lidí s depresí s melancholií byly inkubovány 0,5, 1, 4 a 24 hodin s izoproterenolem 1M, DEX 500 nM a IL-1 β 50 ng/ml. Odpověď na IL-1 β se vyskytla v závislosti na čase s vrcholem během 4 hodin a s poklesem k základní hladině během 24h. Podobná situace byla u DEX, kdy byla exprese zvýšená během 4 hodin, ale tato hladina byla během 24 hodin udržována. Isoproterenol nevyvolal žádné závažné změny v expresi PTX3 během časových intervalů. Po zjištěné maximální odpovědi na IL-1 β a DEX během 4 hodin, byly vytvořeny křivky závislé na dávce s použitím maximální koncentrace. Fibroblasty byly inkubovány s koncentracemi IL-1 β 0, 2,5, 25, 50 a 100 ng/ml, s maximální odezvou dosaženou při 50 ng/ml. Podobně se vytvořila křivka závislá na dávce pro DEX s koncentracemi 0, 25, 250, 500 a 1000 mmol, kdy maximální odezva byla při 250 mmol.

Výsledky této studie se týkaly pouze fibroblastů, přičemž tyto buněčné typy mohou, ale nemusí představovat genovou expresi odpovídající situaci v mozku. Hlavní funkce pentraxinu 3 není ještě zcela známa, ale je spojen s neuronální apoptózou a může mít také neuroprotektivní funkci (Ravizza a kol., 2001) (16).

2.2.5. Plazmatická a tkáňová exprese Pentraxinu 3 během normálního těhotenství a preeklampsie

Buněčná smrt se objevuje normálně během těhotenství, ale stává se kritickou během komplikace těhotenství, preeklampsie.

Preeklampsie je onemocnění v těhotenství, které vede u ženy k zvýšenému krevnímu tlaku a vylučování bílkovin močí. Objevuje se zhruba u šesti procent těhotných žen. Preeklampsii jsou ohroženy především ženy, které trpí cukrovkou, zvýšeným krevním tlakem, onemocněním srdce, obezitou, autoimunitním onemocněním a chronickým onemocněním ledvin. Rizikovým faktorem je též těhotenství v pokročilejším věku (přes 40 let) a prodělání této nemoci při dřívějším těhotenství. Preeklampsie se většinou objevuje po šestém měsíci těhotenství. Plod je omezen v růstu, dochází k redukci plodové vody a snížené zásobě kyslíku a živin. Během preeklampsie je zesílena buněčná smrt a také zvýšená koncentrace fetálních DNA a cytokeratinů v mateřské krvi. Makroskopicky jsou u preeklampsie více zastoupené oblasti ischemických klkovitých nekróz a cévních okluzivních lézí. Rozvíjí se přehnaná mateřská zánětlivá odpověď se zvýšenou endoteliální permeabilitou a agregací destiček. V placentě také dochází k expresi cytokinů, včetně TNF α (21,22).

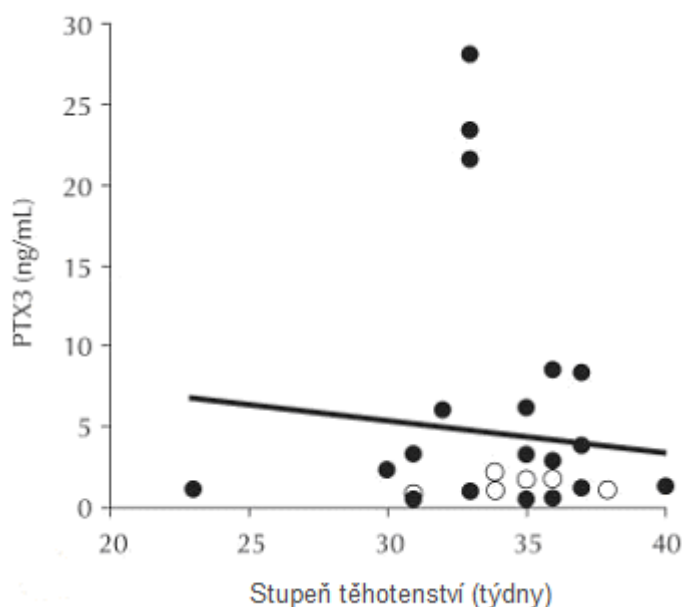
V této studii bylo předpokládáno, že vyšší hladiny cirkulujícího PTX3 mohou identifikovat pacientky s preeklampsii.

Byly studovány ženy s preeklampsii (n=30), ženy s těhotenstvím bez komplikací (n=66), zdravé ženy (n=50), ženy, u kterých se vyvinula akutní bakteriální infekce (n=20) a ženy s revmatoidní artritidou (n=20). Byl zaznamenán stupeň těhotenství, mateřská váha, systolický a diastolický krevní tlak, věk a váha placenty. Srovnání byla provedena mezi pacientkami s preeklampsii (n=30) a kontrolními těhotnými ženami s podobným stupněm těhotenství (kontroly, n=37).

Koncentrace PTX3 byly měřeny pomocí testu ELISA na základě MNB₄ PTX3 specifických monoklonálních protilátek a na králičích PTX3 specifických polyklonálních imunoglobulinech IgG. Tato analýza je vysoce citlivá a specifická, nebyly zpozorovány žádné zkřížené reakce s ostatními pentraxiny, obzvláště s CRP nebo SAP.

PTX3 byl exprimován v epitelu zárodečné blány, mesodermu plodového obalu, trofoblastickém terminálním klku a perivaskulárním stromatu u placenty těhotných pacientek bez komplikací. Cirkulující hladiny neustále stoupaly během normálního těhotenství a dosahovaly vrcholu během námahy.

Poté se měřil PTX3 v séru pacientek s preeklampsií a kontrol. Hladiny PTX3 byly nápadně vyšší u pacientek s preeklampsií (5.08 ± 1.34 ng/ml vs. 0.59 ± 0.07 ng/ml). V koncentracích příbuzného zánětlivého pentraxinu CRP nebyly pozorovány žádné významné rozdíly (9.44 ± 2.67 vs. 5.21 ± 1.1 µg/ml).



Graf 2.2.5. -1 Rozptylový diagram naznačuje vztah mezi koncentrací PTX3 a stupněm těhotenství při vzorkování u pacientek se závažnou preeklampsií (●, n=25) a u pacientek s mírnou preeklampsií (○, n=5). Každý subjekt byl vzorkován jednou a každý symbol představuje jeden subjekt (podle Rovere-Querini a spol.,(20), upraveno).

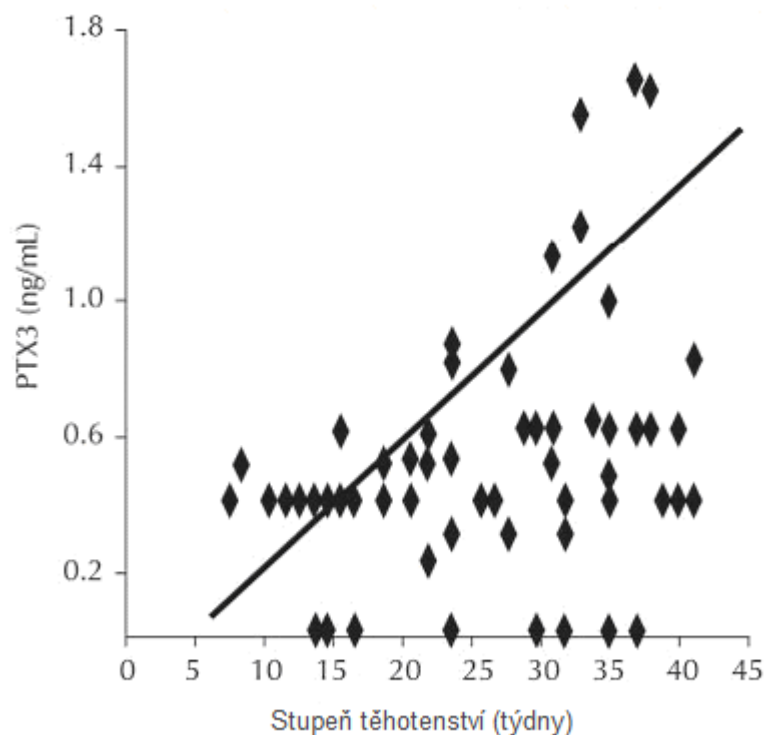
Logistická regresní analýza byla použita pro zhodnocení pravděpodobnosti rozvinutí preeklampsie na základě cirkulujících hladin PTX3. Hodnoty PTX3 byly vyšší u pacientek se závažnou preeklampsií (5.38 ± 1.3 ng/ml) než u pacientek s mírnou preeklampsií (1.3 ± 0.03 ng/ml).

Tab. 2.2.5. -1 Hladiny PTX3 CRP u pacientek s preeklampsií a kontrol

	Pacientky s preeklampsií	Kontroly
PTX3 (ng/ml)	5.08 ± 1.34	0.59 ± 0.07
CRP (mg/l)	9.44 ± 2.67	5.21 ± 1.1

Poslední data o pentraxinech naznačují, že jsou rekrutovány v místech poškození tkáně a nápravy a ovlivňují plodnost žen. PTX3, který je tvořený v periferních tkáních pod kontrolou zánětlivých podnětů, mění zkříženou prezentaci epitopů exprimovaných apoptickými buňkami T lymfocytům. Rozsáhlá

buněčná/tkáňová smrt představuje výzvu pro imunitní systém. Toto je obzvláště důležité ve vztahu matka/embryo.



Graf 2.2.5. -2 Rozptylový diagram naznačuje vztah mezi koncentrací PTX3 a stupněm těhotenství u vzorků zdravých těhotných žen (n=66). Každý subjekt byl vzorkován jednou a každý symbol představuje jeden subjekt (podle Rovere-Querini a spol.,(20), upraveno).

Apoptóza je normální jev během těhotenství a potenciální substráty pro zkříženou prezentaci jsou tvořeny bez prosazování mateřské imunizace proti embryu. PTX3 je proto tvořen fyziologicky, když se během těhotenství odehrává apoptóza. PTX3 selektivně váže pozdní apoptické a nekrotické buňky. Ve vyvíjející se placentě má PTX3 pravděpodobně klíčovou roli v tlumení zkřížené prezentace antigenů embrya mateřským T lymfocytům, tudíž předchází alloimunizaci (20,47).

2.2.6. Působení samotného PTX3 proti *Aspergillu* a v kombinaci s fungicidy

Pentraxin 3 je základní součástí lidské rezistence k pľumonární aspergillose. Studie zjišťovala protektivní účinky podáváním pentraxinu 3 samostatně anebo v kombinaci s deoxycholátním amphotericinem B (Fungizone) nebo liposomálním amphotericinem B (AmBizone) proti invazivní aspergillose u myší, kterým byla provedena allogenní transplantace kostní dřeně. PTX3, samotný nebo v kombinaci

s polyeny, byl podáván intranasálně nebo parenterálně před, během nebo po intranasální infekci spórami *Aspergillus fumigatus*. U myší se sledovala rezistence k infekci a parametry vrozené a získané T-pomocné imunity.

Invazivní aspergillosa (IA) je hlavní příčina jak nosokominální pneumonie tak úmrtí při allogenní transplantaci kostní dřeně (26). Navzdory pokrokům v časně diagnóze a novým antifungálním činidelům, většina případů invazivní aspergillosy zůstává nediodagnostikována a neléčená vede ke smrti.

Myši s deficiencí PTX3 jsou citlivé k *Aspergillus fumigatus*, což je spojené s poruchou možnosti zvyšovat adaptivní typ 1 imunitní reakce. Tato porucha ale může být napravena podáváním exogenního PTX3.

Různé dávky PTX3, D-AMB nebo L-AMB, samotných nebo v kombinacích, byly vpravovány intraperitoneálně nebo intranasálně (pouze PTX3) 5 dnů před infekcí *Aspergillus* (profylaktická léčba) nebo během infekce (terapeutická léčba).

Výsledky ukazují, že PTX3 v dávkách 1 a 0.2 mg/kg poskytuje ochranu, indukující kompletní rezistenci k IA a významně ($P < 0.05$, léčené vs. neléčené myši) snižuje zátěž v plicích, zejména u myší, které dostaly vyšší dávku. PTX3 hodnocený po infekci výrazně ($P < 0.05$, 1 mg/kg PTX3 léčené vs. neléčené) zvýšil přežití myší jen při vyšší dávce, ale obě dávky PTX3 významně redukovaly fungální zátěž v plicích a vyšší dávka i v mozku. Podobné výsledky byly získány u myší léčených 5ng L-AMB/kg. D-AMB neposkytuje stejnou úroveň protekce, zvýšené přežití a snížené fungální zatížení bylo pozorováno pouze u nejvyšších tolerovaných dávek (4mg/kg) podávaných po infekci. V této studii byla také hodnocena citlivost PTX3 vyléčených myší k aspergillové reinfekci a bylo zjištěno, že léčba PTX3 také významně zvyšuje rezistenci k reinfekci.

Léčba PTX3 značně zvyšuje produkci IL-12 a snižuje produkci IL-10, čímž se PTX3 uplatňuje jako kontrola nad zánětlivými procesy v místě infekce a působí jako vynikající regulátor rovnováhy mezi prozánětlivými a protizánětlivými podněty. Studie naznačila, že rovnováha mezi prozánětlivými a protizánětlivými cytokiny (např. TNF- α a IL-10) může určit optimální protektivní imunitu k houbám.

Bylo zjištěno, že jak profylaktická tak terapeutická léčba pentraxinem 3 významně zvyšuje expresi IFN- γ a redukuje expresi IL-4.

Studie zjišťovala, zda může být imunomodulační aktivita PTX3 využita ke zvýšení terapeutického účinku L-AMB nebo D-AMB. Bylo zjištěno, že každé léčivo

podávané samostatně výrazně redukuje růst hub v plicích, ale nezajišťuje přežívání myši, s výjimkou PTX3 podávaného samostatně před infekcí. Kombinovaná terapie PTX3 a L-AMB, jak před tak i po infekci, vyléčí myši z infekce.

Kombinovaná léčba PTX3 a D-AMB podávána po infekci výrazně zvýší rezistenci myši k infekci ve srovnání s léčbou samotným D-AMB. Předpokládá, že PTX3 pracuje více synergicky s L-AMB než s D-AMB.

Tato studie ukázala, že PTX3, buď samotný, nebo v kombinaci s fungicidními činiteli, indikuje léčebnou reakci s minimální patologií u myši s IA. Výsledky této studie naznačují možnost kombinační terapie fungicidů a imunomodulačních látek, jako je PTX3, zaměřené na obnovení optimální přirozené imunity a získání imunitní rezistence k *A.fumigatus* u transplantací kostní dřeně (23).

2.2.7. *Pentraxin 3 a psoriáza*

Psoriáza je definována jako T-buňkami zprostředkovaná imunitní systémová zánětlivá choroba s manifestací na pokožce, charakterizována hyperproliferací a abnormální diferenciací keratinocytů, zánětlivými změnami na cévách, infiltráty z aktivovaných T-lymfocytů, hromaděním polynukleárů, hojnou proliferací endotelových buněk a deregulací apoptických buněk. Četné faktory přispívají do iniciace psoriázy. Zahrnují specifické genetické faktory, jako jsou alely hlavního histokompatibilního komplexu, a různé spouštěcí faktory, včetně stresu, kožního traumatu a infekce (46). Psoriáza je považována za imunodysregulační proces s převahou Th1 převládajících znaků imunitní odpovědi. Zánětlivé cytokiny, jako TNF- α , IL-1 β a IL-6, zřetelné u pacientů s psoriázou, iniciují kaskádu, která aktivuje zánět lokalizovaný v pokožce a cirkulaci (46). Psoriáza je časté, neinfekční, zánětlivé autoimunitní onemocnění, probíhající chronicky, s velkým sklonem k recidivám (51). Je charakterizována výskytem polokulovitých růžových až červených papulí, ostře ohraničených, které jsou na povrchu kryty stříbřitými drolicími se šupinami. Často bývá postižena vlasatá část hlavy a nehty dalšími predilekčními místy jsou oblasti loktů, kolen a křížová krajina (52). Během choroby je pozměněna řada parametrů imunitního systému, včetně změny pentraxinové rodiny proteinů akutní fáze v periferní krvi.

Goeckermanova metoda terapie (GT) psoriázy, která je založená na denní aplikaci farmaceutického uhelného dehtu na zasaženou pokožku s následnou

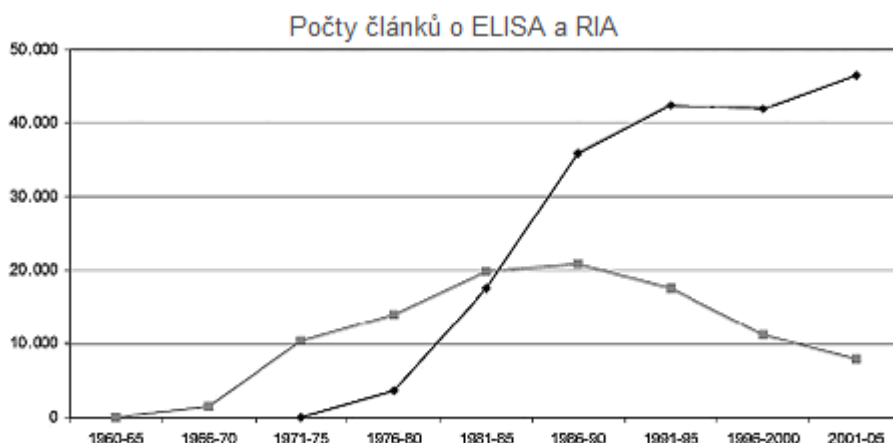
expozicí těla hladině UV světla, byla uvedena Williamem Goeckermanem v roce 1925. Navzdory potenciálnímu zvýšenému genotoxickému riziku v důsledku přímého vystavení pokožky uhlovodíkům nacházejících se v uhelném dehtu, je tato terapie preferována z několika důvodů. Mezi nimi jsou nejdůležitější snadné podávání, nízká cena a dosažení dobrých klinických výsledků s dlouhodobou remisí. Goeckermanova terapie kombinuje protizánětlivé a imunomodulační efekty alifatických a aromatických uhlovodíků a imunosupresivní a imunomodulační účinky UV záření. Touto terapií dochází ke snížení abnormální hyperproliferativní aktivity epidermálních buněk (53).

Jak keratinocyty tak pokožka infiltrovaná zánětlivými imunitními buňkami jsou u pacientů s psoriázou bohaté zdroje cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a mediátorů s četnými prozánětlivými aktivitami. U pacientů s psoriázou dochází k významnému zvýšení hladin PTX3 v séru. U těchto pacientů nejsou pravděpodobně jediným zdrojem produkce PTX3 aktivované monocyty-makrofágy. Předpokládá se, že buňky endotelu značně přispívají k celkové produkci PTX3 (54, 56).

U kultur monocytů a v plazmě neléčených pacientů s psoriázou byla nalezena pozoruhodná exprese, produkce a uvolňování PTX3. U skupiny s mírnou psoriázou byla PTX3 produkce také evidentní, ale byla nižší než u pacientů s těžkou psoriázou. Lidské monocyty produkují PTX3 v odpovědi na zánětlivý podnět (46).

2.3. ELISA

ELISA techniku vyvinuli a vytvořili Peter Perlmann a Eva Engvall na Stockholmské Univerzitě, Švédsko. V roce 1971 Engvall a Perlmann publikovali jejich první článek na téma ELISA a demonstrovali kvantitativní měření IgG v králičím séru značeným alkalickou fosfatázou. Komericializace testů ELISA začala během let 1960 a 1970. Ve vývoji destiček (96 jamek), ve kterých je nekovalentně vázán buď antigen, nebo protilátka, byly použity techniky založené na pevné fázi. Technické pokroky vedly k vývoji automatických pipetujících zařízení (Micromedics, Hamilton), vícekanálových pipet (Labsystems), čteček mikrotitračních destiček, promývaček a v letech 1980 byl vyrobený Boehringer-Mannheim a Abbot plně automatický test.



Obr. 2.3. - 1. Odhady počtů článků publikovaných během pětiletých period od roku 1960 do roku 2005 (podle Lequin,(33), upraveno).

Počet článků s klíčovým slovem EIA nebo ELISA v letech 1980 rapidně vzrostl a dosáhl přibližně 40 000 citací během pětiletých period od roku 1990 (33).

ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay), někdy také označovaná jako EIA (**E**nzyme **I**mmuno**A**ssay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci koncentrace protilátek nebo antigenů. Metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce. Je to metoda velmi citlivá a zároveň poměrně jednoduchá.

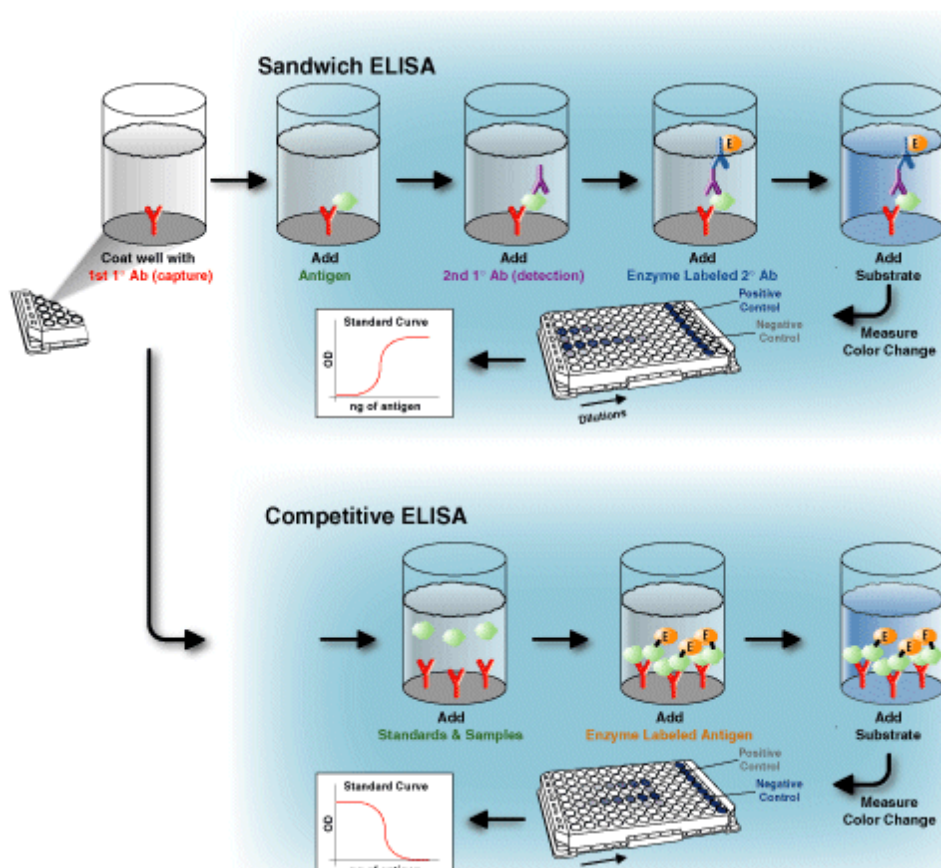
Pro průkaz specifických protilátek i antigenů existuje široké spektrum různých modifikací ELISA testu (34-36).

ELISA reakce pro stanovení antigenu se provádí v 96 jamkových polystyrénových mikrotitračních destičkách, kdy na dno každé jamky je absorbována protilátka. Do jamek přidáme vyšetřované sérum a po navázání antigenu na protilátku je zbytek séra odstraněn promytím. Poté se do jamek přidává druhá protilátka proti vyšetřovanému antigenu, konjugát označený enzymem, nejčastěji peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou. Po inkubační době je roztok odstraněn a jamky se opět promývají. Konečným krokem je přidání enzymového substrátu a produkce barevného produktu způsobená chemickou změnou substrátu. Po pevně stanovené inkubační době je enzym inaktivován, aby došlo k zastavení reakce než se změří optická hustota - absorbance. Množství barevného produktu je úměrné množství vyšetřovaného antigenu (37,38).

ELISA testy využívají substrátů, které by měly být stabilní, bezpečné a levné. Nejčastěji používané enzymy, které mění bezbarvý substrát na barevný produkt, jsou alkalická fosfatáza a peroxidáza. Alkalická fosfatáza přeměňuje p-nitrofenylfosfát

(pNPP) na žlutý p-nitrofenol. Substráty užívané s peroxidázou zahrnují 2,2'-azo-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonovou kyselinu) (ABTS), o-fenylenediamin (OPD) a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinovou bázi (TMB), které poskytují zelenou, oranžovou a modrou barvu v tomto pořadí (39).

Jedna z nejvíce používaných imunoesejí je sendvičová ELISA, viz obrázek.



Obr. 2.3. -2. Provedení sendvičového a kompetitivního ELISA testu (39).

3. Experimentální část

3.1. Charakteristika souboru

Vyšetřovaný soubor týkající se pacientů s psoriázou tvořilo 49 subjektů, 31 žen a 18 mužů, jejichž průměrný věk byl 37,5 let, v rozsahu 18-75 let. Těmto pacientům se krev pro stanovení PTX3 koncentrací odebírala před Goeckermanovou terapií a po této terapii. Tyto hodnoty se porovnávaly s kontrolami, což bylo 42 zdravých dárců krve s průměrným věkem 35,9 let, v rozsahu 23 - 65 roků. Informovaný podepsaný souhlas byl získán od každého pacienta. Goeckermanova terapie byla navržena dermatology a každému pacientovi byla přizpůsobena na základě aktivity jeho choroby. Průměrná délka terapie byla 24 dnů, v rozsahu 12-30 dnů. Účinnost Goeckermanovy terapie byla sledována použitím PASI score. Terapie byla zastavena, pokud se dosáhlo snížení PASI score o 80%. 5% farmaceutický uhelný dehet byl aplikován denně na postiženou pokožku (10 – 75% celkového tělesného povrchu). Pacienti byli posléze ozářeni UV světlem, kdy délka záření byla individuální v závislosti na aktivitě choroby, v rozpětí 1 až 15 minut. Dávka světelného paprsku byla kontrolována pomocí Sola-Scope 2000 spektrometru (Scolatell, UK) a pro UV-B záření činila 245, 60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ a pro UV-A záření 134,4 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Dotazníkem se zjišťovalo, zda pacienti již dříve neprodělali terapii dehtem a UV zářením a pacienti s pozitivní osobní historií byli vyřazeni ze studie. Vzorky žilní krve se odebíraly před a po Goeckermanově terapii. Kontrolám byly také odebrány vzorky krve. Z krve se získalo sérum a to bylo zamraženo při -20°C .

Další soubor se týkal 34 pacientů, kteří prodělali kardio operaci a to buď s použitím („on-pump“) anebo bez použití („off-pump“) kardiopulmonárního bypassu. V „on-pump“ skupině (n=17) bylo 14 mužů a 3 ženy, zatímco v „off-pump“ skupině (n=17) bylo 12 mužů a 5 žen. Průměrný věk pacientů byl $70,5 \pm 7,1$ u „on-pump“ skupiny a $66,4 \pm 10,1$ u „off-pump“ skupiny. Obě dvě skupiny se od sebe významně nelišily věkem, pohlavím, počtem anastomóz a ejekčních frakcí. U obou skupin pacientů byla krev odebrána v časových bodech 1 (úvod do anestezie), 2 (po ukončení operace), 3 (první pooperační den), 4 (třetí pooperační den) a 5 (sedmý pooperační den) a v těchto bodech byla měřena hladina PTX3 ze séra. Všem pacientům byl podáván aspirin 100 mg v jedné denní dávce až do pátého dne před operací. Pacienti léčení protizánětlivými činidly, buď steroidy nebo NSAID, byli

vyloučeni ze studie, stejně tak i pacienti se sérovým kreatinem $>130 \mu\text{mol/l}$ nebo s poruchou jater. U žádného z pacientů nebylo známo, že by trpěl současně malignitou. Všichni účastníci byli detailně informováni ohledně cíle studie a podepsali souhlas. Kardiochirurgické zákroky jsou v současnosti prováděny dvěma odlišnými způsoby. Buď jde o operaci na srdci, které je vyřazeno z činnosti a jeho funkci přebírá podpůrné zařízení (technika využívající CPB - kardiopulmonární vypase neboli „on-pump“ operace), anebo jde o novější přístup, operaci na bijícím srdci („off-pump“ operace). Kardiochirurgické operace bez použití CPB jsou považovány za méně rizikové ve smyslu rozvoje syndromu systémové zánětlivé odpovědi (61). Pooperační péče byla zajišťována na jednotce intenzivní péče kardiochirurgické kliniky, ze které byli pacienti v závislosti na zdravotním stavu překládáni na standardní oddělení.

„On-pump“ operace se provádí střední sternotomií na bijícím srdci bez použití mimotělního oběhu. Místo anastomosis je lokálně stabilizováno speciálním zařízením. Nejprve jsou šity distální anastomosis štěpů, kdy je do koronární tepny zavedena malá trubička (shunt), která zajišťuje průtok krve tepnou při šití anastomosis a zároveň zlepšuje přehlednost intervenovaného místa omezením krvácení z koronární tepny. Po dokončení anastomosis je shunt odstraněn. Centrální anastomosis jsou šity rovněž na parciální nástěnné svorce. Na srdce jsou připevněny elektrody pro případnou stimulaci srdeční činnosti. Je provedena osteosynteza hrudní kosti a sutura podkoží a kůže (62). „Off-pump“ operace se provádí střední sternotomií, kdy je po kanylaci aorty a ouška pravé síně zaveden mimotělní oběh. Srdce je zastaveno v diastole po naložení příčné svorky a instilaci hyperkalemické studené krevní kardioplegie. Nejprve jsou šity distální anastomosis štěpů. Po odstranění příčné svorky jsou na parciální nástěnné svorce šity centrální anastomosis jednotlivých štěpů a zároveň je obnovena srdeční činnost. Poté je ukončen mimotělní oběh a jsou odstraněny kanyly. Na srdce jsou také připevněny elektrody pro případnou stimulaci srdeční činnosti a následně je provedena osteosynteza hrudní kosti a sutura podkoží a kůže (63).

3.2. Laboratorní metodika stanovení pentraxinu 3 (PTX3) ELISA technikou

PTX3 se detekuje použitím detekčního setu od firmy Alexis Biochemicals (Švýcarsko, cat.no. ALX-850-299-KI01) pro sendvičovou metodu ELISA, která poskytuje záchyt monoklonálních protilátek k PTX3, detekci polyklonálních protilátek k PTX3 a rekombinantní PTX3 (standard).

Detekce probíhá v ELISA destičkách s 96 jamkami.

Roztoky:

1. Pufr na ředění coatovací protilátky:

uhličitanový pufr pH 9,6

Na₂CO₃ 1,59 g

NaHCO₃ 2,93 g

NaN₃ 0,2 g

Voda do 1000 ml

2. Promývací roztok:

PBS pH 7,4

NaCl 9,0 g

KH₂PO₄ 0,2 g

Na₂HPO₄.12H₂O 2,9 g

KCl 0,2 g

Voda do 1000 ml

3. Blokovací roztok:

Sušené kravské mléko 5g

Promývací roztok 100ml

4. Coatovací roztok (ALX-804-464), konc. 100µg/0,1ml:

700 ng/ml coatovací protilátky

100 µl/ jamku

Obsah lahvičky (cca 0,1ml) naředit do 143 ml uhličitanového pufru

1 destička: 8 µl protilátky do 12 ml uhličitanového roztoku

5. Biotinovaná protilátka (ALX-210-365B-C050), konc. 50µg/0,05ml:

25ng/ml

100 µl/jamku

Obsah lahvičky rozpustit v 2000 ml promývacího roztoku

1 destička: 5 µl protilátky rozpustit v 10 ml promývacího roztoku (20x koncentrovaný roztok) a před použitím naředit 20x (1 ml + 19 ml promývacího roztoku)

6. Standard (ALX-201-124), konc. 10µg/0,1ml:

75 pg/ml až 2400 pg/ml

zásobní roztok 100ng/10 ml získáme rozpuštěním obsahu lahvičky v 10 ml promývacího roztoku

kalibrační křivka: 10- 5 - 2,5 - 1,25 - 0,62 – 0,31 – 0,16 – 0,08 ng/ml

nejvyšší bod křivky 10x ředěný zásobní roztok: 40µl zásobního roztoku + 360µl promývacího roztoku a dále přetahovat po 200 µl dvojkovou řadou.

Vlastní postup:

1. Připravíme destičku (Nunc MaxiSorp 446612).
2. Napipetujeme po 100 µl coatovacího roztoku do každé jamky a inkubujeme přes noc při 4°C.
3. Po inkubaci vyklepneme obsah jamek a 3x promyjeme 300 µl promývacího pufru. Přebytečnou kapalinu vytřepeme do buničiny.
4. Napipetujeme 250-300 µl blokovacího roztoku a inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě.
5. Vyklepeme obsah jamek a promyjeme 3x 300 µl promývacího roztoku.
6. Napipetujeme standard (duplikáty) a vzorky po 50 µl. Inkubujeme 2 hodiny při 37°C.
7. Promyjeme 5x 300 µl promývacího roztoku.
8. Napipetujeme po 100 µl biotinované protilátky a inkubujeme 1 hodinu při 37°C.
9. Promyjeme 5x 300 µl promývacího roztoku.
10. Napipetujeme po 100 µl streptavidin-HRP konjugát a inkubujeme 1 hodinu při pokojové teplotě.
11. Promyjeme 5x 300 µl promývacího roztoku.

12. Napipetujeme po 100 μ l chromogenního substrátu.
13. Po vývinu zbarvení (cca 15 min) měříme na fotometru při 450 nm.

Laboratorní teplota se uvádí v rozmezí od 18 do 25°C.

3.3. Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software MedCalc (Belgie).

3.3.1. Základní statistika

Pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu byla zjištěna normalita rozložení hodnot sledovaných parametrů.

Základní charakteristikou je aritmetický průměr (v případě zjištěné normality) či medián (při nenormálním rozložení hodnot) a směrodatná odchylka.

3.3.2. Testovací statistika

Po kontrole normality dat byly podsoubory sledovaného parametru porovnávány mezi sebou:

- parametrickým *t-testem* (tzv. Studentovým 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 $P > 0,05$

4. Výsledky

Vyšetřovaný soubor týkající se pacientů s psoriázou tvořilo 49 subjektů, 31 žen a 18 mužů, jejichž průměrný věk byl 37,5 let, v rozsahu 18-75 let. Těmto pacientům se krev pro stanovení PTX3 koncentrací odebírala před Goeckermanovou terapií a po této terapii. Tyto hodnoty se porovnávaly s kontrolami, což bylo 42 zdravých dárců krve s průměrným věkem 35,9 let, v rozsahu 23 - 65 roků.

Hodnoty PTX3 (ng/ml) u pacientů s psoriázou před a po Goeckermanově terapii jsou uvedeny v *Tabulce 5. -1*.

Základní statistika a testovací statistika týkající se psoriázy jsou uvedeny v *Tabulce 5. -4 a 5. -5*.

Další soubor se týkal pacientů, kteří prodělali kardio operaci. Z 34 pacientů 17 podstoupilo operaci s použitím kardiopulmonárního bypassu (14 mužů a 3 ženy) a 17 (12 mužů a 5 žen) bylo operováno bez použití bypassu. U obou skupin pacientů byla krev odebrána v časových bodech 1 (úvod do anestezie), 2 (po ukončení operace), 3 (první pooperační den), 4 (třetí pooperační den) a 5 (sedmý pooperační den) a v těchto bodech byla měřena hladina PTX3 ze séra.

Hodnoty PTX3(ng/ml) u pacientů operovaných pomocí mimotělního oběhu („on-pump“) jsou uvedeny v *Tabulce 5. -2* a hodnoty PTX3 (ng/ml) u pacientů operovaných bez mimotělního oběhu („off-pump“) v *Tabulce 5. -3*.

Základní statistika a testovací statistika týkající se kardio operací jsou uvedeny v *Tabulce 5. -6 a 5. -7*.

K detekci hladin PTX3 jsme použili metodu ELISA (Alexis Biochemicals, Švýcarsko, cat.no. ALX-850-299-KI01).

4.1. Výsledky PTX3 u pacientů s psoriázou

Goeckermanova terapie významně pozitivně ovlivnila vážnost choroby. V porovnání se sérovými hladinami zdravých dárců (PTX3: $1,06 \pm 0,64$ ng/ml) byly sérové hladiny PTX3 ($1,92 \pm 0,69$ ng/ml) u pacientů před Goeckermanovou terapií významně vyšší ($P < 0,0001$), což znázorňuje *Graf 5 -2*. Sérové hladiny PTX3 se u pacientů významně snížily po Goeckermanově terapii. Hladiny PTX3 klesly z $1,92 \pm 0,69$ ng/ml před terapií na $1,66 \pm 0,57$ ng/ml po terapii ($P = 0,0396$). Porovnání hladin PTX3 zdravých dárců a pacientů s psoriázou před a po Goeckermanovou terapií znázorňuje *Graf 5. -1*. Ve srovnání s kontrolami, sérové hladiny PTX3 u pacientů

s psoriázou zůstávají významně vyšší i po Goeckermanově terapii ($P < 0,0001$), což je znázorněno v *Grafu 5. -3*.

4.2. Výsledky PTX3 u pacientů s kardio operací

U „on-pump“ skupiny byly referenční sérové hladiny PTX3 (časový bod 1, úvod do anestézie) $0,44 \text{ ng/ml} \pm 0,05$. Statisticky významný vrchol byl dosažen po ukončení operace (časový bod 2, hladina PTX3 $0,87 \pm 0,14 \text{ ng/ml}$). Nejvyšší hodnoty PTX3 ($1,47 \pm 0,27 \text{ ng/ml}$) během celého pozorovacího období byly získány během prvního pooperačního dne (časový bod 3). Poté začaly hladiny PTX3 klesat, třetí pooperační den (časový bod 4) dosáhly hladiny $0,66 \pm 0,35 \text{ ng/ml}$ a během sedmého pooperačního dne (časový bod 5) se buď vrátily, nebo mírně poklesly pod základní hladinu s průměrnou hodnotou $0,31 \pm 0,51 \text{ ng/ml}$. Vzestup a pokles koncentrace PTX3 u pacientů operovaných pomocí „on-pump“ operace znázorňuje *Graf 5. -6*.

„Off-pump“ skupina pacientů začala se základní hladinou PTX3 $0,33 \pm 0,88 \text{ ng/ml}$ v časovém bodě 1. Po ukončení operace (časový bod 2) dosáhly hladiny PTX3 hodnoty $0,37 \pm 0,48 \text{ ng/ml}$. Statisticky významný vzrůst byl dosažen v časovém bodě 3, tedy během prvního pooperačního dne, s hladinami PTX3 dosahujícími $1,09 \pm 0,5 \text{ ng/ml}$. Ve srovnání s „on-pump“ pacienty, PTX3 hladiny u „off-pump“ pacientů zůstaly zvýšené v časovém bodě 4 (třetí pooperační den, PTX3 $0,57 \pm 0,91 \text{ ng/ml}$) a vrátily se k základní hodnotě sedmý pooperační den (časový bod 5, PTX3: $0,28 \pm 0,16 \text{ ng/ml}$). Kinetika uvolňování PTX3 u pacientů operovaných pomocí „off-pump“ operace je znázorněna v *Grafu 5. -5*.

Pokud porovnááme tyto dvě skupiny pacientů, tak zjistíme, že obě skupiny vykazují významné zvýšení sérových hladin PTX3 po operaci. Nicméně, jsou zde podstatné rozdíly v kinetice uvolňování PTX3 a celkové velikosti odpovědi PTX3. U „on-pump“ pacientů se zvýšená sérová hladina PTX3 vyskytla dříve než u „off-pump“ pacientů. U obou skupin byly nejvyšší hodnoty sérových hladin PTX3 dosaženy shodně během prvního pooperačního dne, ale s rozdílnými příslušnými hladinami ($1,47 \pm 0,27 \text{ ng/ml}$ pro „on-pump“ skupinu versus $1,09 \pm 0,5 \text{ ng/ml}$ pro „off-pump“ skupinu), nicméně nedosáhly statistické významnosti. *Graf 5. -4* znázorňuje nejvíce pozoruhodný rozdíl mezi dvěma skupinami po ukončení operace (PTX3 $0,87 \pm 0,14$

ng/ml u „on-pump“ skupiny versus $0,37 \pm 0,48$ ng/ml u „off-pump“ skupiny; P = 0,0012).

5. Tabulky a grafy

Tab. 5. -1 Hodnoty PTX3(ng/ml) u pacientů s psoriázou, a to PŘED a PO Goeckermanově terapii.

Číslo pacienta	PTX3 před	PTX3 po	PTX3 kontrola
1	2,69	1,86	0,69
2	2,36	2,39	0,4
3	2,34	2,02	1,03
4	1,73	1,23	1,51
5	2,07	1,79	1,56
6	1,63	1,85	0,21
7	3,36	1,34	0,75
8	1,29	1,09	2,48
9	3,13	1,78	1,1
10	2,31	1,33	1,42
11	1,38	1,16	0,91
12	1,33	1,39	1,17
13	1,03	1,81	2,02
14	0,82	2,59	0,91
15	1,25	2,94	1,71
16	1,76	1,83	0,81
17	2,72	0,91	0,92
18	2,56	3,41	1,49
19	2,35	1,11	0,84
20	0,89	2,77	1,94
21	2,22	1,84	0,75
22	3,09	1,28	1,25
23	1,17	1,31	1,03
24	3,25	1,36	0,83
25	1,98	1,62	1,42
26	2,99	2,38	0,84
27	1,51	1,36	0,95
28	0,67	0,97	0,93
29	1,31	1,55	0,78
30	1,24	1,38	1,23
31	1,53	1,31	1,48
32	1,98	1,84	0,71
33	1,48	1,44	1,42
34	2,28	1,23	0,71
35	1,65	1,2	0,98
36	1,56	1,2	0,88
37	1,54	1,5	0,31
38	2,92	2,54	0,79
39	2,92	1,09	0,85
40	1,14	1,06	1,14
41	2,64	2,41	0,88
42	1,06	0,69	0,64

Tab. 5. -1 Hodnoty PTX3(ng/ml) u pacientů s psoriázou, a to PŘED a PO Goeckermanově terapii.

(Pokračování)

Číslo pacienta	PTX3 před	PTX3 po	PTX3 kontrola
43	1,63	2,34	
44	1,19	1,04	
45	1,71	1,33	
46	2,8	1,91	
47	1,56	1,58	
48	2,48	2,08	
49	1,73	2,11	

Tab. 5. -2 Hodnoty PTX3(ng/ml) u pacientů operovaných pomocí mimotělního oběhu („on-pump“)

číslo pacienta	"on-pump" 1	"on-pump" 2	"on-pump" 3	"on-pump" 4	"on-pump" 5
2	0,273	0,446	1,38	1,171	0,198
3	0,349	0,628	1,733	0,21	0,051
9	0,413	0,964	1,716	0,785	0,373
10	2,715	0,973	1,498	0,994	0,864
11	0,256	0,473	3,649	0,217	0,756
13	0,126	0,221	0,285	0,062	0,09
16	0,26	2,078	1,591	1,661	0,51
19	0,314	0,41	0,865	0,338	0,275
20	0,47	0,954	0,802	0,616	0,314
25	0,071	1,521	1,782	0,695	0,318
26	0,764	1,078	0,957	1,753	0,437
28	0,312	0,399	0,406	0,695	0,242
30	0,292	1,017	2,116	0,567	0,271
31	0,271	0,352	1,63	0,328	0,095
34	0,234	1,549	1,595	0,599	0,226
36	0,073	0,607	0,843	0,522	0,238
37	0,449	1,266	2,266	0,118	0,096

Tab. 5. -3 Hodnoty PTX3 (ng/ml) u pacientů operovaných bez mimotělního oběhu („off-pump“)

číslo pacienta	"off-pump" 1	"off-pump" 2	"off-pump" 3	"off-pump" 4	"off-pump" 5
4	0,257	0,214	0,084	0,11	0,025
5	0,157	0,771	1,471	0,161	0,061
6	0,234	0,292	1,986	1,312	0,238
7	0,45	0,405	0,682	0,483	0,3
8	0,269	0,07	0,149	0,119	0,182
12	0,315	0,357	1,122	0,868	0,13
14	0,148	0,148	1,194	0,361	0,174
15	0,386	0,099	1,126	1,058	0,436
18	0,259	0,267	1,772	0,64	0,374
21	1,057	0,752	1,843	0,551	0,232
22	0,306	0,398	1,843	0,735	0,33
23	0,35	0,506	0,465	0,489	0,874
24	0,162	0,108	0,355	0,349	0,223
27	0,298	0,499	1,273	0,406	0,278
29	0,601	0,8	0,623	0,612	0,705
33	0,226	0,417	1,666	0,246	0,25
35	0,155	0,275	1,037	1,205	0,09

Tab. 5. -4 Základní statistika – psoriáza

	Aritmetický průměr	Medián	Směrodatná odchylka	Normalita
PTX3 (ng/ml) před terapií	1,9231	1,7300	0,7176	ANO
PTX3 (ng/ml) po terapií	1,6643	1,5000	0,5827	ANO
PTX3 (ng/ml) kontrola	1,0636	0,9250	0,4544	ANO

Tab. 5. -5 Testovací statistika – psoriáza

	Pravděpodobnost (P)
PTX3 před x PTX3 po	0,0396
PTX3 před x PTX3 kontrola	< 0,0001
PTX3 po x PTX3 kontrola	< 0,0001

PTX3 před – hladiny PTX3 u pacientů s psoriázou před Goeckermanovou terapií, PTX3 po – hladiny PTX3 u pacientů s psoriázou po Goeckermanově terapii, PTX3 kontrola - hladiny PTX3 od zdravých dárců krve.

Tab. 5. -6 Základní statistika – kardio operace

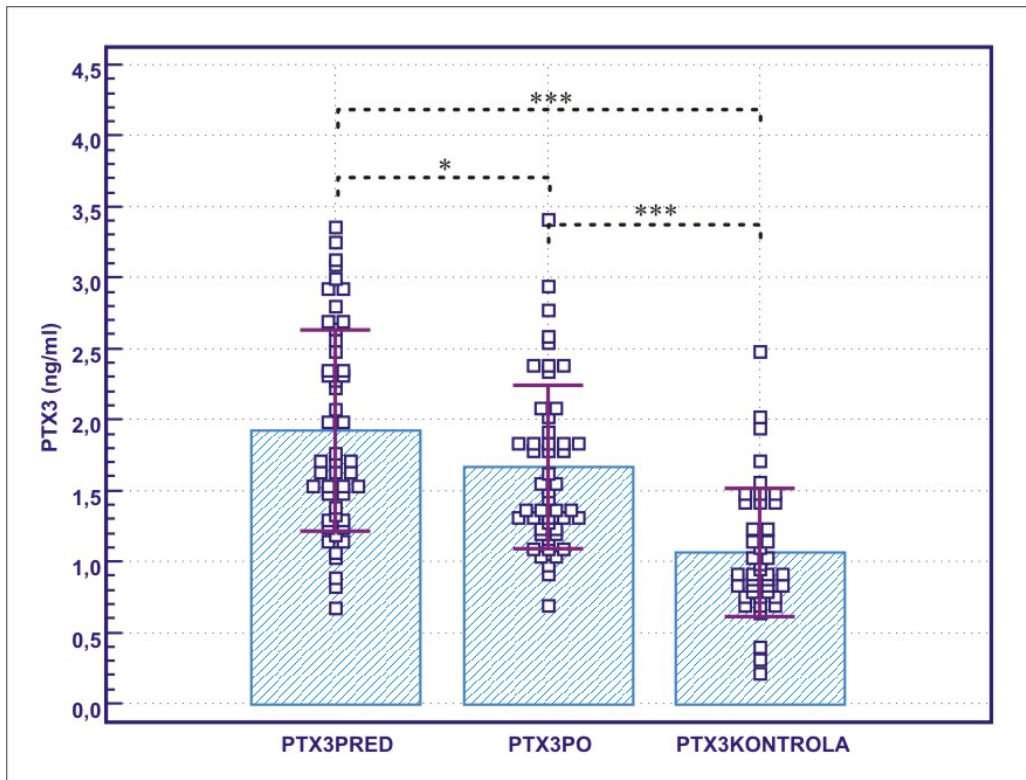
Hladiny PTX3 (ng/ml)	Aritmetický průměr	Medián	Směrodatná odchylka	Normalita
„off-pump“ 1	0,3312	0,2690	0,2205	ANO
„off-pump“ 2	0,3752	0,3570	0,2321	ANO
„off-pump“ 3	1,0995	1,1260	0,6195	ANO
„off-pump“ 4	0,5709	0,4890	0,3654	ANO
„off-pump“ 5	0,2884	0,2380	0,2192	ANO
„on-pump“ 1	0,4495	0,2920	0,6061	NE
„on-pump“ 2	0,8786	0,9540	0,5111	ANO
„on-pump“ 3	1,4773	1,5910	0,7943	ANO
„on-pump“ 4	0,6665	0,5990	0,4927	ANO
„on-pump“ 5	0,3149	0,2710	0,2243	ANO

„off-pump“- hladiny PTX3 (ng/ml) u pacientů operovaných bez mimotělního oběhu, „on-pump“ – hladiny PTX3 (ng/ml) u pacientů operovaných s mimotělním oběhem. 1 - hladiny PTX3 před operací, 2 – hladiny PTX3 po ukončení operace, 3 – hladiny PTX3 během prvního pooperačního dne, 4 – hladiny PTX3 během třetího pooperačního dne, 5 – hladiny PTX3 během sedmého pooperačního dne.

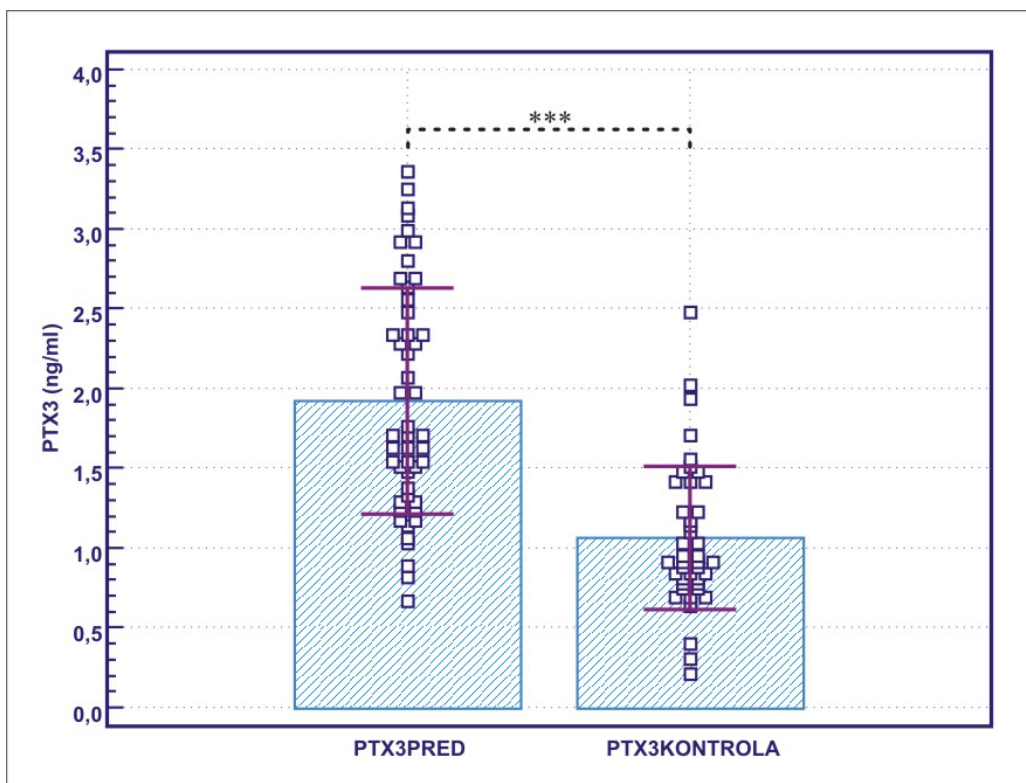
Tab. 5. -7 Testovací statistika – kardio operace

	Pravděpodobnost (P)
„off-pump“ 1 x „on-pump“1	>0,20
„off-pump“ 2 x „on-pump“2	=0,0012
„off-pump“ 3 x „on-pump“3	=0,1961
„off-pump“ 4 x „on-pump“4	=0,5534
„off-pump“ 5 x „on-pump“5	=0,7260
„off-pump“ 1 x „off-pump“2	=0,4097
„off-pump“ 1 x „off-pump“3	=0,0001
„off-pump“ 1 x „off-pump“4	=0,0308
„off-pump“ 1 x „off-pump“5	=0,5080
„on-pump“ 1 x „on-pump“2	<0,01
„on-pump“ 1 x „on-pump“3	<0,01
„on-pump“ 1 x „on-pump“4	<0,10
„on-pump“ 1 x „on-pump“5	<0,20

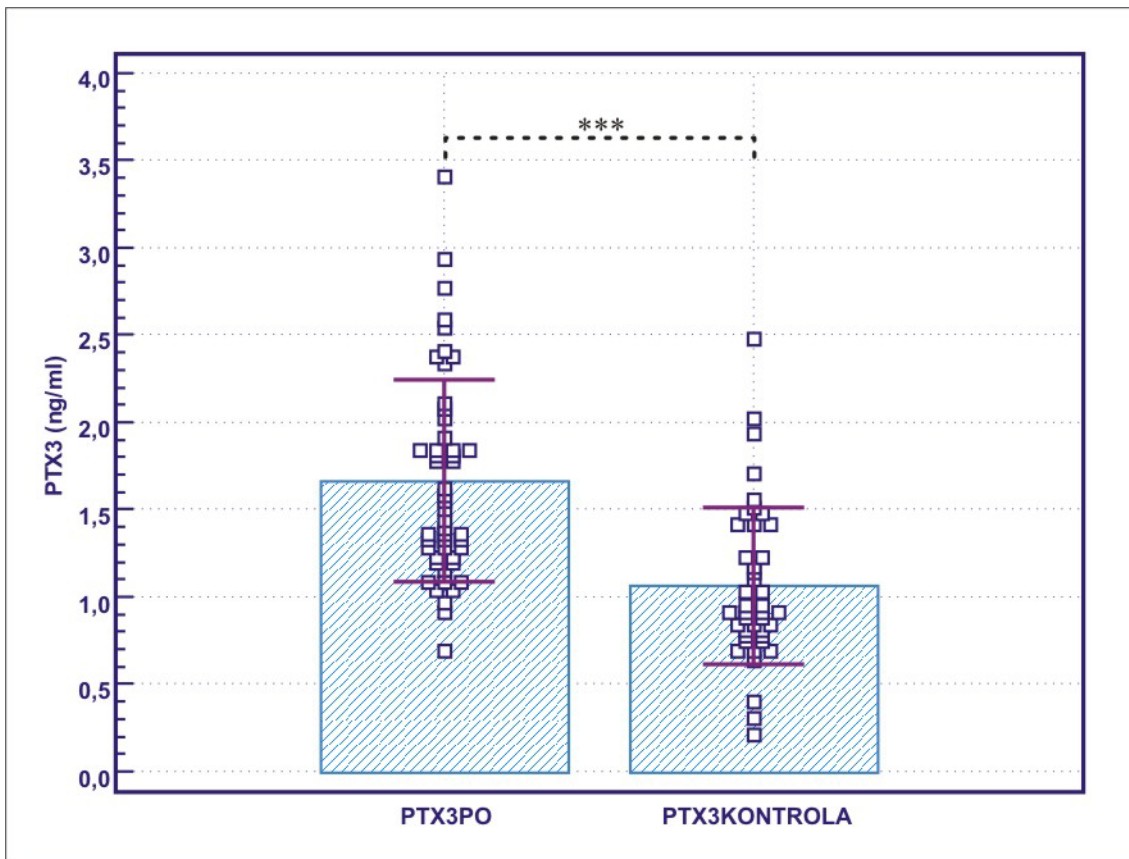
„off-pump“, „on-pump“ – viz tab. 6-6



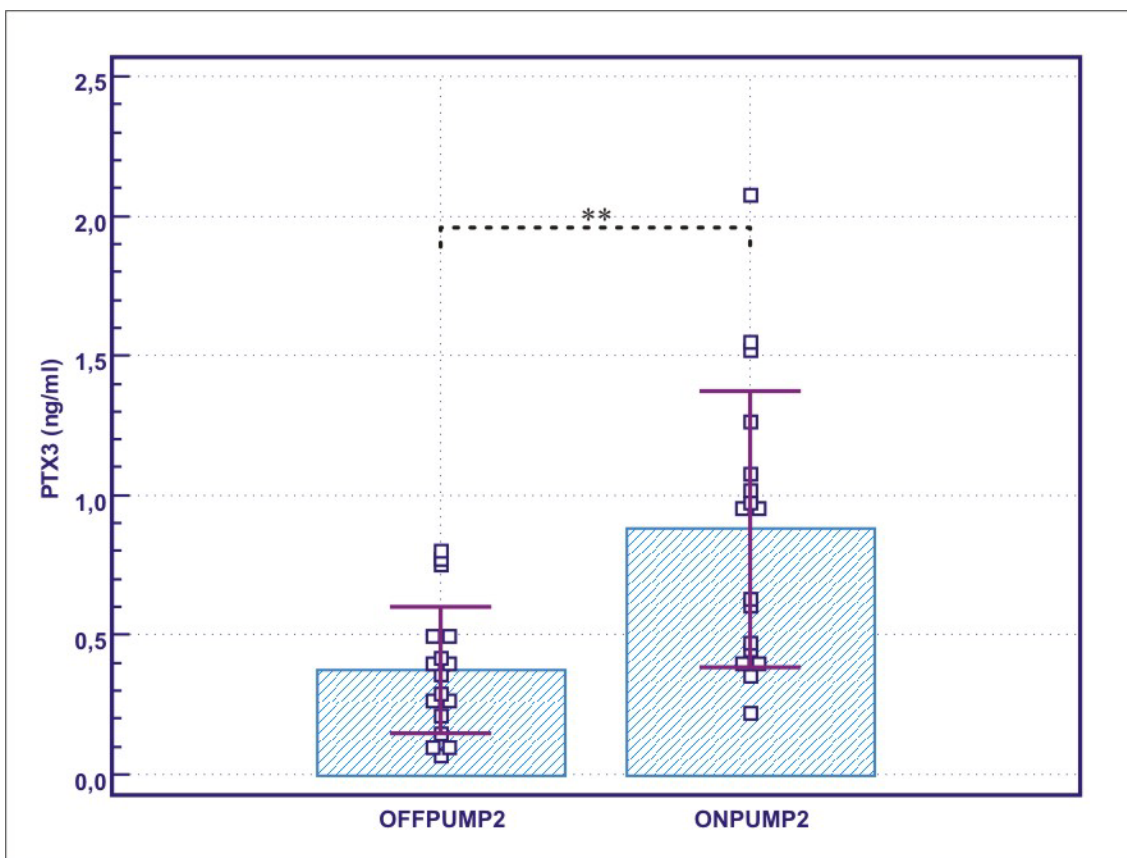
Graf 5. -1 Hodnoty PTX3 (ng/ml) u pacientů s psoriázou. PTX3PRED – hladiny PTX3 u pacientů s psoriázou před Goeckermanovou terapií, PTX3PO – hladiny PTX3 po Goeckermanově terapii, PTX3KONTROLA – hladiny PTX3 od zdravých dárců krve. * Statisticky významné (0,01 - 0,05), *** Statisticky významné (< 0,001)



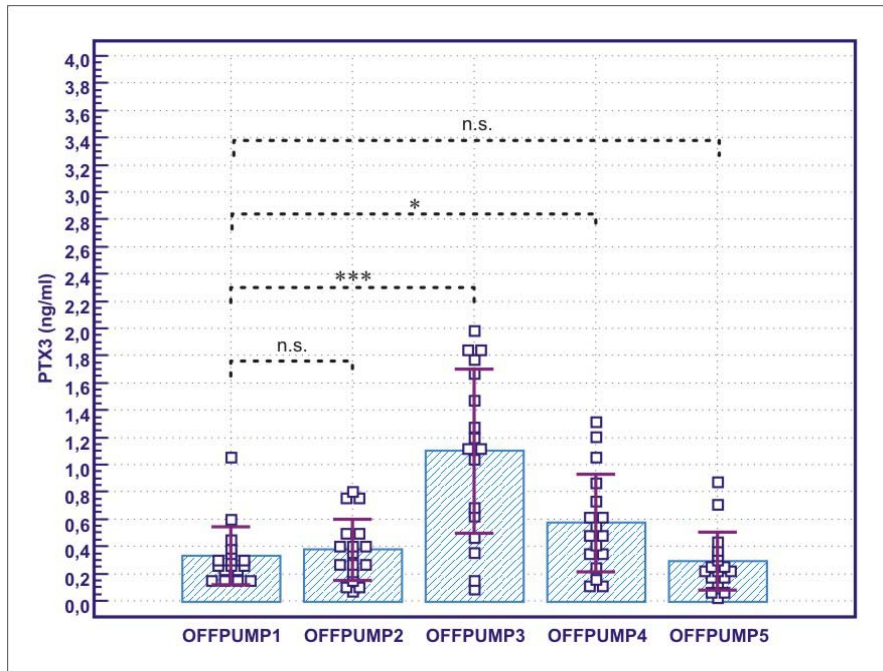
Graf 5. -2 Hodnoty PTX3 (ng/ml) u pacientů s psoriázou. PTX3PRED – hladiny PTX3 u pacientů s psoriázou před Goeckermanovou terapií, PTX3KONTROLA – hladiny PTX3 od zdravých dárců krve. *** Statisticky významné (< 0,001)



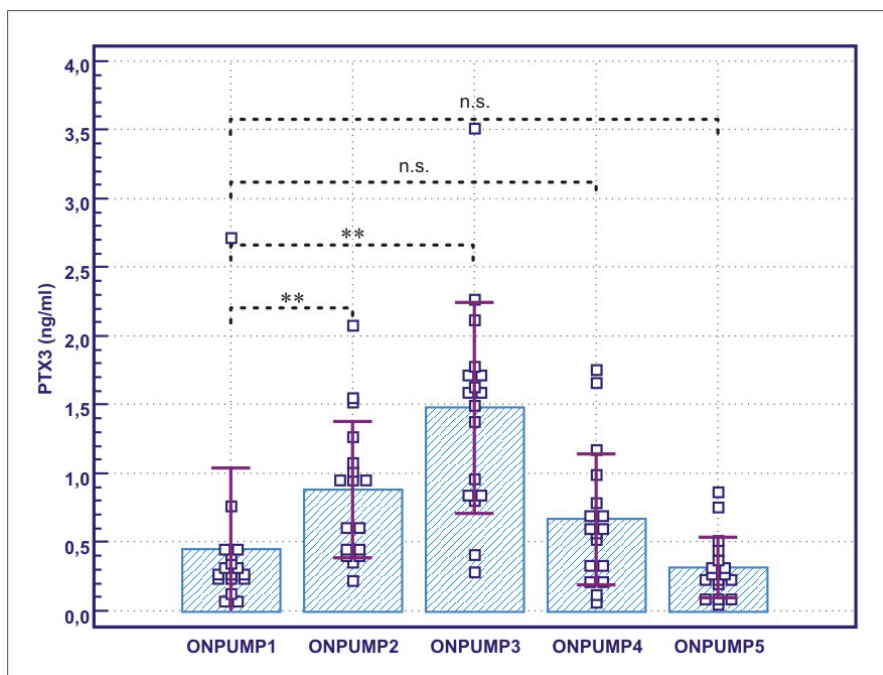
Graf 5. -3 Hodnoty PTX3 (ng/ml) u pacientů s psoriázou. PTX3PO – hladiny PTX3 po Goeckermanově terapii, PTX3KONTROLA – hladiny PTX3 od zdravých dárců krve. *** Statisticky významné (< 0,001)



Graf 5. -4 Hladiny PTX3 (ng/ml) u pacientů operovaných buď pomocí mimotělního, nebo bez mimotělního oběhu. OFFPUMP2 – hladiny PTX3 u pacientů operovaných bez mimotělního oběhu v časovém bodě 2 (po ukončení operace) , ONPUMP2 – hladiny PTX3 u pacientů operovaných s použitím mimotělního oběhu v časovém bodě 2 (po ukončení operace). ** Statisticky významné (0,001 – 0,01)



Graf 5. -5 Hladiny PTX3 (ng/ml) u pacientů operovaných bez mimotělního oběhu. OFFPUMP1 - hladiny PTX3 v časovém bodě 1 (před operací), OFFPUMP2 - hladiny PTX3 v časovém bodě 2 (po ukončení operace), OFFPUMP3 - hladiny PTX3 v časovém bodě 3 (první pooperační den), OFFPUMP4 - hladiny PTX3 v časovém bodě 4 (třetí pooperační den) a OFFPUMP5 - hladiny PTX3 v časovém bodě 5 (sedmý pooperační den). * Statisticky významné (0,01 - 0,05), *** Statisticky významné (< 0,001), n.s. Statisticky nevýznamné



Graf 5. -6 Hladiny PTX3 u pacientů operovaných s použitím mimotělního oběhu. ONPUMP1 - hladiny PTX3 v časovém bodě 1 (před operací), ONPUMP2 – hladiny PTX3 v časovém bodě 2 (po ukončení operace), ONPUMP3 - hladiny PTX3 v časovém bodě 3 (první pooperační den), ONPUMP4 - hladiny PTX3 v časovém bodě 4 (třetí pooperační den), ONPUMP5 – hladiny PTX3 v časovém bodě 5 (sedmý pooperační den). ** Statisticky významné (0,001 – 0,01), n.s. Statisticky nevýznamné

6. Diskuze

PTX3 je nově identifikovaný reaktant akutní fáze, který sdílí některé strukturní i funkční vlastnosti s CRP. PTX3 má ale také své unikátní biologické vlastnosti, včetně možné role v patogenezi kardiovaskulárních a jiných chorob. Důležitost PTX3 v biologii savců, včetně člověka, je v počátku poznání. Zvýšené PTX3 haldiny jsou detekovatelné u vážných infekcí, autoimunitních a degenerativních poruch, jako je revmatoidní artritida, systémová sklerodermie a vaskulitida malých cév. U akutního infarktu myokardu a dalších kritických pacientů může poskytovat marker, který může být kvalitnějším prognostickým ukazatelem než je CRP. PTX3 také hraje důležitou roli v mechanismech přirozené imunity, v ženské plodnosti, v regulaci zánětlivých reakcí a chrání hostitele před některými mikroorganismy (11, 46).

Vyšetřovaný soubor týkající se pacientů s psoriázou tvořilo 49 pacientů, 31 žen a 18 mužů, jejichž průměrný věk byl 37,5 let, v rozsahu 18-75 let. Těmto pacientům se krev pro stanovení PTX3 hodnot odebírala před Goeckermanovou terapií a po této terapii. Tyto hodnoty se porovnávaly s kontrolami, což bylo 42 zdravých dárců krve s průměrným věkem 35,9 let, v rozsahu 23 - 65 roků. Informovaný podepsaný souhlas byl získán od každého pacienta. Goeckermanova terapie byla navržena dermatology a každému pacientovi byla přizpůsobena na základě aktivity jeho choroby. Průměrná délka terapie byla 24 dnů, v rozsahu 12-30 dnů.

Goeckermanova terapie, která je založena na kombinaci protizánětlivých a imunomodulačních efektů alifatických a aromatických uhlovodíků nacházejících se ve farmaceutickém uhelném dehtu a imunosupresivních a imunomodulačních aktivitách UV záření, je vysoce efektivní v léčbě psoriázy. GT dosahuje dobrých klinických výsledků s dlouhodobou remisí u většiny pacientů. Tato terapie snižuje abnormální hyperproliferativní kapacitu epidermálních buněk (53,54). U pacientů s psoriázou jsou jak keratinocyty tak pokožka infiltrovaná zánětlivými imunitními buňkami bohaté zdroje cytokinů, růstových faktorů a mediátorů s četnými prozánětlivými aktivitami, včetně pentraxinů.

Bevelacqua a spol. našli zvýšené hladiny PTX3 v plazmě u 44 neléčených pacientů s psoriázou. Pacienti s těžkou psoriázou vykazují PTX3 plazmatické hladiny významně vyšší než kontroly i než pacienti s mírnou psoriázou ($p < 0,0001$). Nebyla pozorována žádná statistická významnost mezi PTX3 plazmatickými hladinami u

pacientů s mírnou psoriázou a zdravými kontrolami. Také monocyty získané od pacientů s těžkou psoriázou produkují vyšší PTX3 hladiny ve srovnání s monocytami pacientů s mírnou formou psoriázy a zdravými kontrolami ($p=0,006$, $p<0,0001$, v tomto pořadí). Na rozdíl od plazmatických hladin, kde byly nalezeny důležité rozdíly v produkci PTX3 u pacientů s mírnou psoriázou ve srovnání se zdravými kontrolami. PTX3 hladiny byly velmi nízké v séru zdravých subjektů, ale rapidně se zvýšily jako odpověď na zánětlivou stimulaci, jako jsou infekce a autoimunitní a degenerativní poruchy (46).

Hyperplazie epidermu, aktivace fibroblastů a buněk endotelu a infiltrace leukocyty jsou rysy psoriázy a jsou spojeny s chronickou zánětlivou odpovědí. Produkce PTX3 je indukována zánětlivými mediátory, jako jsou LPS, IL-1 β a TNF- α . Tyto cytokiny byly již dříve označeny jako důležité modulátory v psoriatickém procesu (46).

Vazba pentraxinů buď na patogenní mikroby, nebo na poškozené tělní struktury je následována aktivací vrozené imunitní reakce a to buď uvolněním prozánětlivých cytokinů, anebo aktivací komplementárního systému. Významná korelace nalezená mezi buněčnou produkcí a plazmatickými hladinami PTX3 u psoriázy, je znamením buněčné aktivace monocytů/mikrofágů, prvních buněk, které infiltrují psoriatické léze (46). Ale produkce PTX3 aktivovanými monocytami - makrofágy u pacientů s psoriázou není pravděpodobně jediným zdrojem PTX3 u těchto pacientů. Je známo, že buňky endotelu značně přispívají k produkci PTX3 (55). Dysregulace endotelových součástí včetně neoangiogeneze je nedílnou součástí imunopatogeneze psoriázy (56).

Další soubor se týkal 34 pacientů, kteří prodělali kardio operaci a to buď s použitím („on-pump“) anebo bez použití („off-pump“) kardiopulmonárního bypassu. V „on-pump“ skupině ($n=17$) bylo 14 mužů a 3 ženy, zatímco v „off-pump“ skupině ($n=17$) bylo 12 mužů a 5 žen. Průměrný věk pacientů byl $70,5 \pm 7,1$ u „on-pump“ skupiny a $66,4 \pm 10,1$ u „off-pump“ skupiny. U obou skupin pacientů byla krev odebrána v časových bodech 1 (úvod do anestézie), 2 (po ukončení operace), 3 (první pooperační den), 4 (třetí pooperační den) a 5 (sedmý pooperační den) a v těchto bodech byla měřena hladina PTX3 ze séra.

Porovnávali jsme PTX3 kinetiku u pacientů operovaných „on-pump“ a „off-pump“. Našli jsme významně vyšší PTX3 uvolňování u pacientů operovaných s použitím kardiopulmonárního bypassu. Tyto objevy mohou naznačovat rozdílnou

tendenci k zánětlivé odpovědi u těchto dvou skupin pacientů. I když bylo statisticky významné zvýšení sérových hladin PTX3 pozorováno u obou skupin, žádná z hladin hodnocených během periody experimentu nepřesáhla PTX3 hladiny v současné době považované za normální (okolo 2,0 ng/ml). S velkou pravděpodobností tyto výsledky odráží fakt, že všichni pacienti v obou skupinách byli bez komplikací klinického průběhu jak během operace, tak během pooperačního období.

Kardiochirurgické operace představují náročný výkon, který je i přes velké pokroky v této oblasti mnohdy spojen s řadou pooperačních komplikací. Ty mohou souviset s aktivací nespecifických složek imunitního systému a rozvojem syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS), což je stav indukovaný kontaktem krve s umělým povrchem mimotělního oběhu a vede k mnoha pooperačním komplikacím, jako je myokardiální dysfunkce, respirační, renální a neurologická dysfunkce, poruchy srážlivosti krve a funkce jater a v konečném důsledku může způsobit multiorgánové selhání (65).

Kardiochirurgické zákroky jsou v současnosti prováděny dvěma odlišnými způsoby. Buď jde o operaci na srdci, které je vyřazeno z činnosti a jeho funkci přebírá podpůrné zařízení (technika využívající CPB – kardiopulmonární bypass, neboli „on-pump“ operace), anebo jde o novější přístup – operaci na bijícím srdci („off-pump“ operace). Kardiochirurgické operace bez použití CPB jsou považovány za méně rizikové ve smyslu rozvoje syndromu systémové zánětlivé odpovědi a jsou stále více používané řadou chirurgických týmů na místo klasické CPB. Při operaci s použitím CPB dochází k daleko většímu ischemicko-reperfučnímu poškození. Z pohledu rozvoje systémové zánětlivé odpovědi je operace s použitím CPB považována za rizikovější (61). Základním důvodem k zavedení operací bez mimotělního oběhu do praxe je předpoklad snížení morbidit nemocných při zachování bezpečnosti a efektivnosti vlastního výkonu (64).

Řada studií provedených v posledních několika letech, které jsou zaměřené na vyšetření různých zánětlivých markerů, ukázala snížení zánětlivých reakcí u pacientů operovaných pomocí „off-pump“ techniky ve srovnání s „on-pump“ operacemi. Na druhou stranu, definitivní důkaz podporující užití „off-pump“ operací, které by vedly k redukci mortality ve srovnání s „on-pump“ protějškem stále chybí. Navíc, některé studie týkající se zánětlivé odpovědi vyvolané „on-pump“ nebo „off-pump“ operacemi dospěly k závěru, že řada rozdílů pozorovaných mezi těmito 2 skupinami byla spíše kvantitativní než kvalitativní povahy. Tyto rozdíly mohou být

vysvětleny základním faktem, že jakákoli závažná operace vyvolává rozvrácení celotělové integrity vedoucí k poškození tkání, krvácení, nestabilitě srdečního rytmu a krevního tlaku (32).

Rolph a spol. testovali produkci PTX3 v pokročilých aterosklerotických plátech. Stejně jako CRP je i PTX3 indukován akutními zánětlivými podněty a je zvýšen v krvi pacientů s AMI. Byla zjištěna silná exprese PTX3 v pokročilých aterosklerotických lézích. Zjistili, že PTX3 byl produkován zejména makrofágy a endotelovými buňkami. Tyto výsledky ukazují, že PTX3 může hrát určitou roli v patogenezi aterosklerózy (58).

Peri a spol. zjišťovali, zda PTX3 může sloužit jako včasný indikátor akutního infarktu myokardu. Testovali 37 pacientů s AMI symptomy. Zjistili, že PTX3 je přítomen v neporušeném myokardu, zvyšuje se v krvi u pacientů s AMI a uvolňuje se z poškozených myocytů. PTX3 rapidně vrcholí po přijetí pacientů s AMI příznaky do nemocnice a dosahuje vrcholu mnohem dříve než CRP. Autoři navrhli, že PTX3 může sloužit jako indikátor nevratného poškození myocytů u ischemické kardiomyopatie (50).

Napoleone a spol. studovali, zda PTX3 reguluje expresi tkáňového faktoru (TF) v lidských endotelových buňkách. Tkáňový faktor je in vivo spouštěč krevní koagulace a hraje dominantní roli ve vytváření trombu po ruptuře aterosklerotického plaku. Endotelové buňky inkubované s lipopolysacharidy nebo zánětlivými cytokiny (IL 1 β , TNF α) exprimují TF. Přítomnost PTX3 zvyšuje aktivitu TF. Opět poskytli důkaz přispívání zánětu do patogeneze ischemické choroby srdeční a dokázali, že markery zánětu mohou předpovídat riziko koronární srdeční choroby. Shodně se studií Peri a spol. zjistili, že PTX3 je uvolňován z nekrotických myocytů (49).

7. Závěr

Goeckermanova terapie je vysoce efektivní v léčbě psoriázy a dosahuje dobrých klinických výsledků s dlouhodobou remisí u většiny pacientů. Sérové hladiny PTX3 u pacientů s psoriázou jsou před Goeckermanovou terapií významně vyšší v porovnání s hladinami zdravých dárců. Když jsme porovnali koncentrace PTX3 u pacientů s psoriázou před a po Goeckermanově terapii, zjistili jsme výrazné snížení hladin PTX3 po této terapii. Tato terapie snižuje abnormální hyperproliferativní kapacitu epidermálních buněk (53,54), které jsou bohatými zdroji cytokinů, růstových faktorů a mediátorů s četnými prozánětlivými aktivitami, včetně pentraxinů. Pravděpodobně proto dochází ke snížení hladiny PTX3 po terapii. Ve srovnání s kontrolami zůstávají sérové hladiny PTX3 u pacientů s psoriázou stále významně vyšší i po Goeckermanově terapii. PTX3 může být použit jako nový marker pro monitorování progresu a chorobné aktivity psoriázy.

Zjistili jsme, že PTX3, protein akutní fáze, je uvolňován do cirkulace během chirurgických operací srdce. Pacienti operovaní s použitím CPB mají významně vyšší hladiny než pacienti operovaní bez použití CPB. Při operaci s použitím CPB dochází k daleko většímu ischemicko-reperfuznímu poškození. Vlivem CPB operací dochází k řadě pooperačních komplikací, které souvisí s aktivací nespecifických složek imunitního systému a rozvojem syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS), který je indukovaný kontaktem krve s umělým povrchem mimotělního okruhu. Je možné, že PTX3 vzhledem k jeho unikátní kinetice, bude poskytovat stejnou prognostickou hodnotu u kardio operací stejně, jak je tomu u AMI pacientů, což naznačil Latini a spol., a u kriticky nemocných pacientů, jak publikoval Muller a spol. (57).

8. Seznam literatury

1. **Masopust J.:** Metabolismus proteinů, <http://web.telecom.cz/dotdiag/dokument/patobio/metabol.pdf> , 11. 9. 2007.
2. **Jílek P.:** Základy imunologie, Praha, Anyway, 2002.
3. **Kelly J., O'Neill M.J.F., Kniffin C.L., Hamosh A., Tiller G.E., McKusick V.A.:** C-REACTIVE PROTEIN, PENTRAXIN-RELATED; CRP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=123260>, 11. 9. 2007.
4. **Prázná J.:** Biologické funkce C-reaktivního proteinu a jeho využití v laboratorní diagnostice. Alergie 4, 2006, s. 317-320.
5. **Hořejší V., Bartůňková Jiřina:** Základy imunologie. TRITON, Praha, 2002.
6. **Bartůňková J., Paulík M. a kol.:** Vyšetřovací metody v imunologii. GRADA, Praha, 2005.
7. **Stites Daniel P., Terr Abba I.:** Základní a klinická imunologie. Victoria Publishing, 1991.
8. **Fučíková T. a kol. :** Základy klinické imunologie. RDI PRESS, Praha, 1994.
9. **Rovenský J., Pavelka K. a kol.:** Klinická reumatologie. OSVETA, Martin, 2000.
10. **Krejsek J., Kopecný O.:** Klinická imunologie, Nucleus, Hradec Králové, 2004.
11. **Kuneš P., Lonský V., Mandřák J., Brtko M., Koláčková M., Andrýs C., Kudlová M., Krejsek J.:** Essential PTX3 biology (not only) for cardiologists and cardiac surgeons. ACTA MEDICA (Hradec Králové) 2007;50(1), s. 29-33.
12. **Neuwirtová, R.:** Povede poznávání mechanismu apoptózy k novým terapeutickým postupům? Časopis lékařů českých, 140, 2001, s. 460-464.
13. **Nečas, E.:** Obecná patologická fyziologie, Karolinum, 2004, s. 112-117.
14. **He X., Han B., and Liu M.:** Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 292 (5), 2007, s. 1039-1049.
15. **Tong M., Carrero J.J., Qureshi A.R., Anderstam B., Heimbürger O., Bárány P., Axelsson J., Alvestrand A., Stenvinkel P., Lindholm B., and Suliman M.E.:** Plasma Pentraxin 3 in Patients with Chronic Kidney Disease: Associations with Renal Function, Protein-Energy Wasting, Cardiovascular Disease, and Mortality. Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN, 2 (5), 2007, s. 889-897.

16. **Shelton R.C., Liang S., Liang P., Chakrabarti A., Manier D.H. and Sulser F.:** Differential Expression of Pentraxin 3 in Fibroblasts from Patients with Major Depression. *Neuropsychopharmacology* (2004) 29, 126–132, advance online publication, 5 November 2003; doi:10.1038/sj.npp.1300307.
17. **Hyne S.:** Sympatomimetika, http://www.medicabaze.cz/index.php?&sec=term_detail&termId=18&tname=Sympatomimetika, 20. 3. 2008.
18. DEXAMETHAZON LÉČIVA 20X0.5MG Tablety, <http://www.lekarna.cz/dexamethazon-leciva-20x0-5mg-tablety/>, 20. 3. 2008.
19. Nežádoucí účinky kortikoidů - Prednisonu a Dexamethasonu, <http://www.detskaonkologie.cz/pages/kortikoidy.html> , 20. 3. 2008.
20. **Rovere-Querini P., Antonacci S., Dell'Antonio G., Angeli A., Almirante G., Dal Cin E., Valsecchi L., Lanzani Ch., Sabbadini M.G., Doglioni C., Manfredi A.A. and Castiglioni M.T.:** Plasma and Tissue Expression of the Long Pentraxin 3 During Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Obstetrics and gynecology*, 108 (1), 2006, s. 148-155.
21. **Měchurová A.:** Preeklampsie a eklampsie, <http://www.porodnici.cz/sos-porodnice?id=11> , 20. 3. 2008.
22. **Pařízek A.:** Preeklampsie neboli pozdní gestóza, <http://www.porodnice.cz/node/3711> , 20. 3. 2008.
23. **Gaziano R., Bozza S., Bellocchio S., Perruccio K., Montagnoli C., Pizzurra L., Salvatori G., De Santis R., Carminati P., Mantovani A., and Romani L.:** Anti-Aspergillus fumigatus Efficacy of Pentraxin 3 Alone and in Combination with Antifungals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004, s. 4414–4421.
24. Pentraxin-3, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Pentraxin-3>, 21. 10. 2007.
25. A vascular injury marker, Pentraxin 3 (PTX3), http://www.ppmx.com/en/rd/diagnosticagents/PTX3_e.html, 21. 10. 2007.
26. **Bozza S., Bistoni F., Gaziano R., Pizzurra L., Zelante T., Bonifazi P., Perruccio K., Bellocchio S., Neri M., Iorio A.M., Salvatori G., De Mantis R., Calvitti M., Doni A., Garlanda C., Mantovani A, and Romani L.:** Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood*, 15 2006, Vol. 108, No. 10, s. 3387-3396.

27. **Okutani D., Han B., Mura M., Waddell T.K., Keshavjee S., and Liu M.:** High volume ventilation induces Pentraxin 3 expression in multiple acute lung injury models in rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 292 (1), 2007, s. 144-153.
28. **Converse P.J.:** PENTRAXIN 3; PTX3, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602492>, 21.10.2007.
29. **Charnow J.A.:** Pentraxin 3 Elevated in HD Patients. *Issue of Renal And Urology News*. September 01, 2007.
30. Pentraxin 3 and Autoimmunity, http://www.medscape.com/viewarticle/543904_6, 31. 10. 2007.
31. **Azzurri A., Sow O.Y., Amedei A., Bah B., Fialko S., Peri G., Benagiano M., D'Elis M.M., Mantovani A. and Del Prete G.:** IFN- γ -inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection*, Volume 7, Issue 1, 2005, s. 1-8.
32. **Kuneš P., Lonský V., Mandák J., Koláčková M., Andrýs C., Kudlová M., Krejsek J.:** The long pentraxin 3 in cardiac surgery: Distinct response in „on-pump“ and „off-pump“ patients. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. Volume 41, Issue 3, 2007, s. 171 – 179.
33. **Lequin R.M.:** Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 51, No. 12, 2005, s. 2415–2418.
34. **Toman M. a kol.:** *Veterinární imunologie*. Grada Publishing, Praha, 2000.
35. **Tijssen P.:** *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Elsevier, Amsterdam, 1985.
36. **Tizard I.R.:** *Veterinary Immunology - an introduction*. Saunders co., Philadelphia, 1996.
37. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay), <http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/method/ELISA.html>, 31. 1. 2008.
38. Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA), <http://www.poultry-health.com/library/serodiss/elisa.htm>, 31. 1. 2008.
39. ELISA Kits, <http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/elisa>, 1. 1. 2008.

40. **Tranguch S., Chakrabarty A., Guo Y., Wang H., Dey S.K.:** Maternal pentraxin 3 deficiency compromises implantation in mice. *Biology of reproduction* 2007; 77(3), s. 425-432.
41. **Satoshi Suzuki, Yasuchika Takeishi, Takeshi Niizeki, Yo Koyama, Tatsuro Kitahara, Toshiki Sasaki, Mina Sagara and Isao Kubota:** Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. *American Heart Journal*, Volume 155, Issue 1, 2008, s. 75-81.
42. **Olesen R., Wejse C., Velez D.R., Bisseye C., Sodemann M., Aaby P., Rabna P., Worwui A., Chapman H., Diatta M., Adegbola R.A., Hill P.C., Østergaard L., Williams S.M., Sirugo G.:** DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes and Immunity* 2007; 8(6): s. 456-467.
43. **Castellano G., Di Vittorio A., Dalfino G., Marrone D., Simone S., Capobianco C., Pertosa G., Grandaliano G. and Schena F.P.:** Pentraxin 3 (PTX3) and complement cascade activation in the failure of arteriovenous fistula (AVF) in hemodialysis (HD). *Molecular Immunology*, Volume 44, Issue 16, 2007, s. 3936-3937.
44. **Boehme M., Kaehne F., Kuehne A., Bernhardt W., Schröder M., Pommer W., Fischer C., Becker H., Müller C., Schindler R.:** Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease. *Nephrology, dialysis, transplantation: European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007; 22(8), s. 2224-2229.
45. **Baruah P., Trimarchi M., Dumitriu I.E., Dellantonio G., Doglioni C., Rovere-Querini P., Bussi M., Manfredi A.A.:** Innate responses to *Aspergillus*: role of C1q and pentraxin 3 in nasal polyposis. *American journal of rhinology*, 21 (2), 2007, s. 224-230.
46. **Bevelacqua V., Libra M., Mazzarino M.C., Gangemi P., Nicotra G., Curatolo S., Massimino D., Plumari A., Merito P., Valente G., Stivala F., La Greca S., Malaponte G.:** Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients. *International journal of molecular medicine*, 18 (3), 2006, s. 415-423.
47. **Cetin I., Cozzi V., Pasqualini F., Nebuloni M., Garlanda C., Vago L., Pardi G., Mantovani A.:** Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in

- preeclampsia and intrauterine growth restriction. American journal of obstetrics and gynecology, 194 (5), 2006, s. 1347-1353.
48. **Latini R., Maggioni A.P., Peri G., Gonzini L., Lucci D., Mocrelli P., Vago L., Pasqualini F., Signorini S., Soldateschi D., Tarli L., Schweiger C., Fresco C., Cecere R., Tognoni G., Mantovani A.** on behalf of the Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation.*, 110(16), 2004, s. 2349-54.
49. **Napoleone E., Di Santo A., Bastone A., Peri G., Mantovani A., de Gaetano G., Donati M.B., Lorenzet R.:** Long Pentraxin PTX3 Upregulates Tissue Factor Expression in Human Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22, 2002, s. 782 - 7.
50. **Peri G., Inrona M., Corradi D., Iacuitti G., Signorini S., Avanzini F., Pizzetti F., Maggioni A.P., Moccetti T., Metra M., Livio Dei Cas, Ghezzi P., Sipe J.D., Gianpietro Re, Olivetti G., Mantovani A., Latini R.:** PTX3, A Prototypical Long Pentraxin, Is an Early Indicator of Acute Myocardial Infarction in Humans. *Circulation.* 102, 2000, s. 636-41.
51. Lupénka (Psoriáza), <http://www.dermatology.cz/lupenka/> , 12. 3. 2008.
52. **Semrádová V.:** Psoriáza, <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/r028.rtf> , 13. 3. 2008.
53. **Goeckerman WH** (1925): Treatment of psoriasis. *Northwest Med* 24: s. 229-231.
54. **Lebwohl M., Ali S.:** Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *J Am Acad Dermatol*, 45, 2001, s. 487-498.
55. **Inrona M., Alles V.V., Castellano M., Picardi G., De Gioia L., Bottazzi B. et al.:** Cloning of mouse PTX3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*, 87, 1996, s. 1862-72.
56. **Leong T.T., Fearon U., Veale D.J.:** Angiogenesis in psoriasis and psoriatic arthritis: clues to disease pathogenesis. *Curr Rheumatol Rep*, 7, 2005, s. 325-329.
57. **Muller B., Peri G., Doni A., Torri V., Landmann R., Bottazzi B., Mantovani A.:** Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med.*, 29(7), 2001, s. 1404-7.

58. **Rolph M.S., Zimmer S., Bottazzi B., Garlanda C, Mantovani A, Hansson G.K.:** Production of the Long Pentraxin PTX3 in Advanced Atherosclerotic Plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(5), 2002, s. 10 - 4.
59. **Steel, Whitehead:** The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today*, 15(2), 1994, s. 81-8.
60. **Baumann H., Gauldie J.:** The acute phase response. *Immunol Today* 15(2), 1994, s. 74-80.
61. **Jankovičová K., Kudlová M., Kolářková M., Kuneš P., Andrys C., Mandřák J., Lonský V., Krejsek J.:** Stresové proteiny Hsp60 a Hsp70 u kardiologických pacientů. *Cor Vasa*, 49(10), 2007, s. 356–361.
62. Revaskularizace myokardu bez mimotělního oběhu (OPCAB - Off-Pump Coronary Artery Bypass), <http://www.kardio-motol.cz/opcab> , 21. 3. 2008.
63. Revaskularizace myokardu v mimotělním oběhu (CABG - Coronary Artery Bypass Graft), <http://www.kardio-motol.cz/cabg> , 21. 3. 2008.
64. **Němec P.:** Méně invazivní techniky při chirurgické revaskularizaci myokardu. *Kardiologická revue*, 3, 2003, s. 120-123.
65. **Gwozdziewicz M.:** Arteriální revaskularizace myokardu, GRADA, 2007.