

# OVlivNĚNÍ GENOVÉ EXPRESE U HYPERPROLIFERATIVNÍCH KOŽNÍCH ONEMOCNĚNÍ

## Předmluva

### 1. Literární úvod a přehled dané problematiky

- 1.1 **Změny životního cyklu epidermálních buněk v procesu hyperproliferace**
  - 1.1.1. Molekulární podstata procesů proliferace a diferenciacce
  - 1.1.2. Apoptóza jako terminální diferenciacce epidermálních buněk
- 1.2 **Molekulárně genetická podstata psoriázy jako charakteristického zástupce hyperproliferativních onemocnění kůže**
- 1.3 **Nové geny a jejich potenciální role v patogenezi hyperproliferativních kožních onemocnění**
- 1.4 **Molekulárně genetická podstata nemelanomových kožních nádorů**
- 1.5 **Vliv UV záření na vznik nádorových onemocnění**
  - 1.5.1. Molekulární podstata působení UV záření
  - 1.5.2. Tumorigenicita UV záření

### 2. Praktická část – vymezení cíle práce

Ovlivnění genové exprese u aktinické keratózy imiquimodem, látkou ovlivňující imunitní odpověď

- 2.1 **Aktinická keratóza jako prekanceróza s přechodem do carcinoma in situ**
- 2.2 **Mechanismus účinku imiquimodu**
- 2.3 **Charakteristika sledovaných genů**
- 2.4 **Materiál a metodika**
- 2.5 **Výsledky**
- 2.6 **Diskuse**
- 2.7 **Shrnutí**

### 3. Závěr

- 3.1 **Význam studia genové exprese k objasnění patogeneze hyperproliferativních kožních chorob**
- 3.2 **Nové přístupy v terapii hyperproliferativních kožních onemocnění**  
**Imunomodulancia v dermatologii jako nové substance ovlivňující imunitní odpověď**
- 3.3 **Boj proti vzrůstající incidenci kožních nádorů preventivními opatřeními**

Poděkování

Seznam použité literatury

## Předmluva

Úvodní část této dizertační práce dává náhled na vybrané aspekty dané problematiky, zabývá se nastíněním molekulární podstaty hyperproliferativních kožních onemocnění, do kterých jsou zahrnuty vedle psoriázy jako charakteristického zástupce i nemelanomové kožní nádory. Dále rozebírá částečně i exogenní vliv UV záření na jejich vznik. Vlastní výzkumná práce je zaměřena na skupinu genů, jejichž exprese byla zkoumána u onemocnění aktinickou keratózou v souvislosti s její léčbou topickým imunomodulátorem – imiquimodem. Zkoumané geny lze rozdělit do skupin na geny modulující imunitní odpověď, geny podílející se na apoptotických procesech a na geny hrající potenciální roli ve vzniku nádorů.

## 1. LITERÁRNÍ ÚVOD A PŘEHLED DANÉ PROBLEMATIKY

### 1. 1 Změny životního cyklu epidermálních buněk v procesu hyperproliferace

Podstata hyperproliferativních kožních onemocnění obecně tkví ve změnách regulace životního cyklu epidermálních buněk vlivem různých činitelů. Tyto procesy jsou složitě řízeny. Pojem hyperproliferace se v dermatologii užívá k popisu širokého spektra procesů, kdy dochází k poruše rovnováhy mezi proliferací a diferenciací epidermálních buněk ve prospěch proliferace.

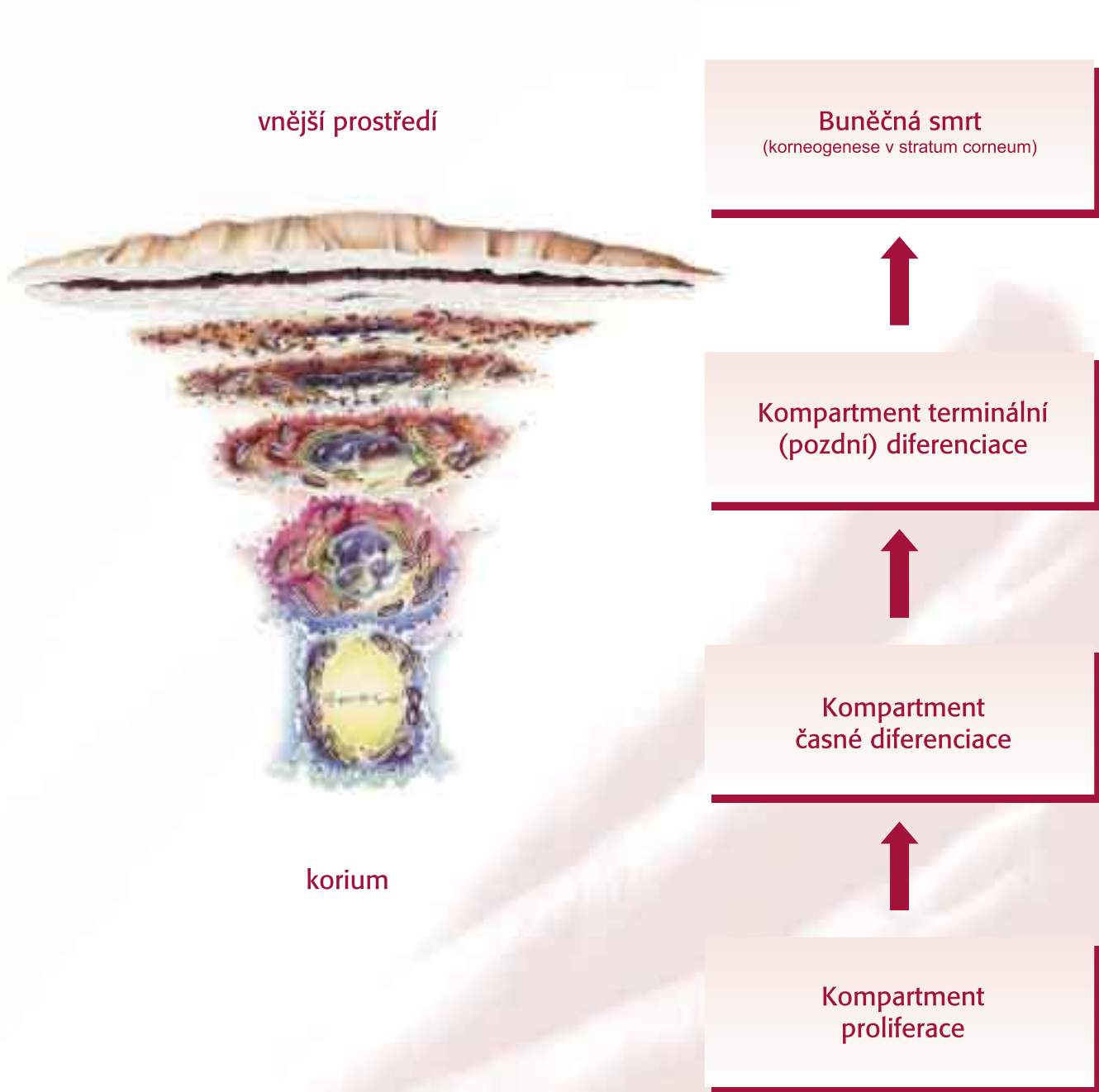
V širším slova smyslu se do těchto patologických změn řadí i vznik nádorového bujení, kde je též specificky narušená rovnováha fyziologických procesů v epidermálních buňkách. K porozumění patogeneze onemocnění je třeba objasnit fyziologickou podstatu procesů v epidermálních vrstvách kůže.

#### 1.1.1 Molekulární podstata procesů proliferace a diferenciacie epidermálních buněk

Kůže jako největší orgán lidského těla pokrývá celý tělesný povrch a je v přímém kontaktu s okolím. Pro svou hlavní úlohu, a tou je ochrana proti nepříznivým vlivům zevního prostředí, je dokonale funkčně přizpůsobena. Svými fyzikálními vlastnostmi (pevnost, pružnost a posunlivost proti spodině) chrání před mechanickým poškozením hlubších tkání. Imunologické pochody a také samodezinfekční schopnost kůže chrání organismus před nesčetnými mikroorganismy. Vedle ostatních neméně důležitých kožních funkcí, jako je termoregulace, melanogeneze, sekreční činnost, permeabilita a kožní cití, je nejdůležitější funkcí bariéra kůže, především její vrchní vrstvy epidermis (stratum corneum), chránící před toxickými vlivy z vnějšího prostředí (89). Je zajištěna schopností keratinocytů (KC), epidermálních kožních buněk, tvořit keratin (procesem keratinizace).

KC procházejí životním cyklem, proliferačními a diferenciacními pochody (příloha 1), které podléhají komplexní regulaci.

# ŽIVOTNÍ CYKLUS EPIDERMÁLNÍCH BUNĚK - PROLIFERACE, DIFERENCIACE A APOPTÓZA



Homeostáza nepřetržité obnovy kožních epidermálních buněk je udržována rovnováhou mezi proliferací, diferenciací a buněčnou smrtí. Jakoby absurdně je vitalita kůže závislá na přesně organizovaných procesech proliferace, vyzrávání a následně buněčné smrti v nejvrchnějších vrstvách stratum corneum (90, 106). Ačkoliv charakterizujeme korneocyty (buňky stratum corneum) jako mrtvé, bezjaderné buňky, vykazují tyto metabolickou činnost a jsou jako hlavní zodpovědné za ochrannou bariéru kůže.

V centru zájmu výzkumných skupin je molekulární a biochemická podstata regulace v jednotlivých epidermálních kompartmentech. Už ve stratum basale je zřejmý význam molekul regulujících buněčný cyklus. Představuje kompartment proliferace, zahrnující kmenové buňky - přechodně se amplifikující KC. Další regulace je na úrovni suprabazální, kam vcestovávají KC a míří do vyšších vrstev epidermis. KC v této fázi podléhají časné diferenciaci, která

je spojena se změnami v buněčném cyklu, a to se zástavou růstu, aktivací transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a s uvolněním specifických mediátorů. Tyto jsou pak schopny různými stimuly, včetně aktivace p53, chránit buňku před předčasnou apoptózou (107, 114). Produkty těchto antiapoptotických genů jsou např. c-IAP1, c-IAP2, TRAF1, TRAF2 (9, 139). Přerušením signální dráhy NF- $\kappa$ B farmakologicky nebo genetickou intervencí bylo dokázáno *in vitro* (44, 107) i na zvířecích modelech (114), že dochází ke zvýšení četnosti apoptotických KC v experimentech. Pro zajímavost, v mnoha jiných buněčných systémech je aktivace NF- $\kappa$ B nápomocná buněčné proliferaci, zatímco v KC NF- $\kappa$ B zastavuje v G1-fázi buněčný cyklus, pravděpodobně indukci inhibitoru cyklin-dependentních proteinkináz p21 (114). Součinnost proteinů p21 a p53 je dobře známa (108). Současné výzkumy dokazují také význam tzv. Notch signální dráhy pro spuštění procesu diferenciaci KC (91).

### 1.1.2 Apoptóza jako terminální diferenciaci epidermálních buněk

Následná terminální (pozdní) diferenciaci epidermálních buněk je charakterizována jako speciální forma apoptotických změn. Od poloviny šedesátých let se apoptóza dostala do popředí zájmu vědců a tento složitý proces je dodnes podroben rozsáhlému vědeckému výzkumu. Apoptóza byla v minulosti považována za patologický proces (33). Kerr a kol. (53) definovali apoptózu jako fyziologický proces buněčné smrti, která probíhá nejen při embryogenezi, jak popsal Glücksmann (33), ale též v dospělém organismu. Vykazuje znaky procesu řízeného

geneticky a ovlivněného vnějšími stimuly z prostředí. Na rozdíl od nekrózy se jedná o soubor změn cytoplazmatických a jaderných, které vedou k odstranění apoptotické buňky z tkáně bez poškození okolních buněk (příloha 2).

## ROZDÍLNÉ MORFOLOGICKÉ ZMĚNY

### APOPTÓZA

X

### NEKRÓZA

#### 1. Smrštění buněk

kolaps cytoskeletální struktury,  
buňky okrouhlé s eosinofilní cytoplazmou,  
kondenzace bazofilního jádra - pyknóza,  
cytoplazmatická membrána - impermeabilní



#### 2. Karyorhexe a následná celulární fragmentace

rozdělení buněk na drobné částice  
**bez poškození membrán  
lysozomů a mitochondrií**



#### 3. Apoptotická tělíska a jejich fagocytóza

tělíska vzhledem k velikosti špatně  
zobrazitelná světelným mikroskopem,  
fagocytóza sousedními buňkami  
a makrofágy  
**bez známek zánětlivé reakce**

#### 1. Časné zvětšení objemu



#### 2. Ztráta integrity

mitochondriální a cytoplazmatické membrány  
ruptura lysozomů



#### 3. Vznik zánětlivé reakce

Pozn.: Délka trvání apoptózy např. u lymfocytů: 1 - 3 hod.  
a u epidermálních keratinocytů: 48 - 72 hod.

Apoptóza je velmi komplexní proces, který se uplatňuje nejenom v epidermis, ale též v ostatních tkáních, např. tkáňová regrese na základě apoptózy řízené hormonální stimulací nebo deplecí v hormonálně citlivých tkáních (52, 111). Apoptotické děje se uplatňují všude tam, kde dochází během života jedince ke kontinuální obnově buněčných struktur, jako např. v hemopoetickém a imunitním systému, také ve všech epiteliálních tkáních. Mnoho výzkumných skupin se v poslední době zabývalo výzkumem signálních drah vedoucích k apoptóze v normální i patologicky změněné epidermis (36, 59, 94, 126, 128, 141).

Apoptózu lze schématicky rozdělit na fázi iniciační, efektorovou a kontrolní (135). V iniciaci procesu apoptózy mají zásadní úlohu membránové receptory – receptory smrti

(death receptors) a jejich ligandy. Skupina receptorů smrti patří do rodiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNFR), jsou to např. receptor CD95 (Apo-1/Fas) (46), receptor tumor nekrotizujícího faktoru 1 (TNFR1) nebo receptory smrti - 3, 4, 5 (DR3, 4, 5). V buňce se rovněž vyskytují proteiny, které jsou analogy receptorů smrti – tzv. Decoy receptory (DcR1 - DcR3), jejichž navázání na ligand však nevede k přenosu signálu apoptózy do nitra buňky. Vazbou receptoru smrti a ligandu dochází k aktivaci a k nastartování apoptotického procesu v buňce. Tímto složitým procesem dochází k aktivaci kaspáz (příloha 3), klíčových enzymů podílejících se na efektorové fázi apoptózy (příloha 4). Funkce mnohých kaspáz není dosud objasněna, v minulosti byly označovány různými synonymy, příloha 5 ukazuje některé z nich.

### příloha 3

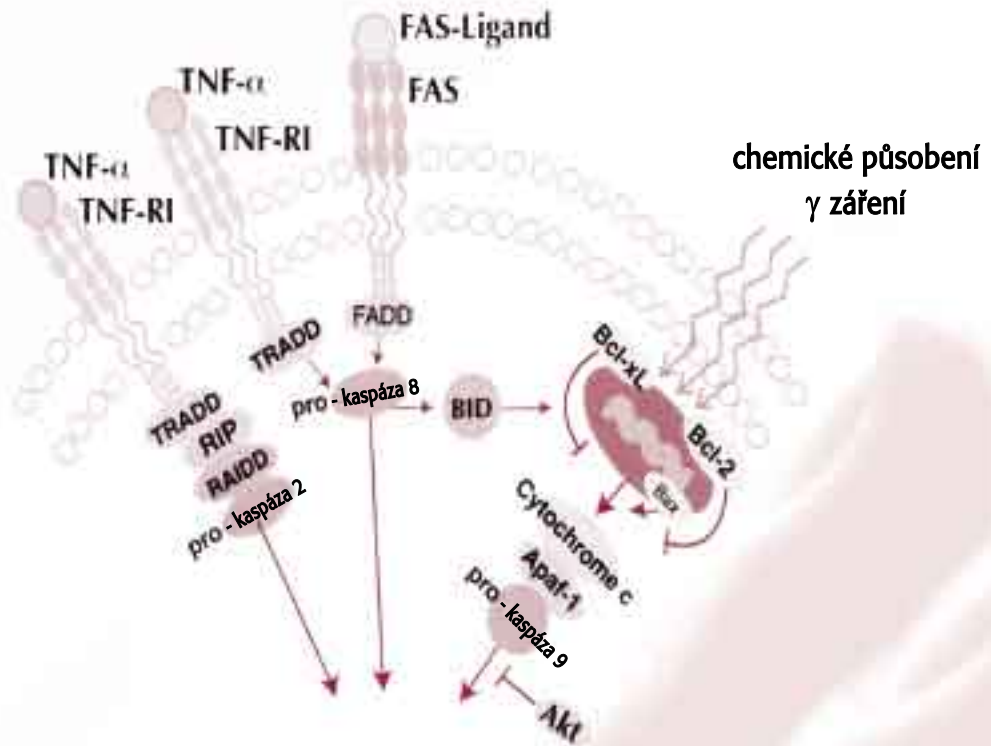
#### Kaspázy – „Cysteinylyl aspartic acid – proteases“

- jsou enzymy, které se rozhodujícím způsobem podílejí na apoptotickém procesu v buňce
- cysteinové proteázy, hydrolyticky štěpící peptidovou vazbu bílkovin v místě za asparaginylovým zbytkem
- jsou členy interleukin-1 $\beta$  konvertujícího enzymu z rodiny cysteinových proteáz

V buňkách existují v inaktivní formě proenzymu a proteolytickými procesy pak vznikají aktivní formy. Některé kaspázy (Kas. - 2, 8, 9 a 10) fungují v kontaktu s doménami povrchových receptorů jako např. FAS (CD95), TNFR-1 (CD120a), DR-3 nebo CARD jako spouštěči signálních drah, jejichž výsledkem je apoptóza dané buňky. Tento koncept kaskádovitěho působení je přirovnán k spuštění koagulační kaskády, jejichž faktory jsou úzce příbuzné s rodinou serinových proteáz.

Důležitou funkcí kaspáz je působení na cytoplazmatické i jaderné proteiny, jako např. keratin 18, poly ADP ribose polymeráza (PARP) a DNA-dependentní protein kináza (DNA-PKcs), které se účastní rozpoznávání a reparace poškození genomové DNA, U1 ribonukleoprotein, lamininy, protein kináza C, součásti cytoskeletu jako je aktin. Některé z nich (PARP) se používají v molekulární biologii jako indikátory apoptózy (PARP-FITS CSSA firmy Biosource).

## SCHÉMA KASPÁZOVÉ AKTIVACE



**aktivace efektorových kaspáz  
(kaspáza 3, 6 a 7)**



**DNA fragmentace**



**APOPTÓZA**





## SYNONYMA KASPÁZ

Kaspáza - 1*	→	Interleukin-1 $\beta$ Converting Enzyme (ICE)
Kaspáza - 2##	→	Ich-1, Nedd2
Kaspáza - 3**	→	CPP332, Yama, Apopain, SCA-1 a LICE
Kaspáza - 4*	→	ICErel-II, TX a ICH-2
Kaspáza - 5*	→	ICErel-III a TY
Kaspáza - 6**	→	Mch-2
Kaspáza - 7**	→	Mch-3, ICE-LAP-3 a CMH-1
Kaspáza - 8#	→	FLICE, Mach-1 a MCH5
Kaspáza - 9##	→	ICE-LAP6, Mch6 a Apaf-3
Kaspáza - 10#	→	FLICE-2, Mch4
Kaspáza - 11		
Kaspáza - 12		
Kaspáza - 13	→	ERICE
Kaspáza - 14	→	Mini-ICE

\* - ICE podrodina

\*\* - Ced-CCP32 podrodina

# - Mach/FLICE podrodina

## - ICH (ICE a CED-3 homolog) podrodina

Částečně převzato z Kleibl Z. a kol., Sb. lék. 2002.

Nejdetailněji je prostudována aktivace kaspázy-3 (105), jejímž substrátem jsou poly (ADP-ribóza) polymeráza a DNA-dependentní protein kináza (DNA-PKcs), které se účastní rozpoznání a reparace poškození genomové DNA, dále U1 ribonukleoprotein, lamininy, jaderné membrány, proteinkináza C a součásti cytoskeletu, jako je např. aktin. Výsledným efektem aktivace kaspáz je tvorba fragmentů DNA, vznikající hydrolytickým štěpením genomové DNA. Je to charakteristická známka probíhající apoptózy, tento proces může být vizualizován elektroforetickou separací DNA v agarózovém gelu. Fragmentace je výsledkem aktivace endogenních endonukleáz, jejichž činnost je závislá na koncentraci  $Ca^{++}$  a  $Mg^{++}$  v buňce (75). Efekt aktivovaných kaspáz zahrnuje také přenos signálu na kaskádu kináz, aktivujících genovou expresi modulací NF- $\kappa$ B a AP-1, která má na apoptózu inhibiční účinek.

Kaspázy lze aktivovat jednak přímo signální drahou začínající vazbou receptorů smrti a ligandu, nebo mechanismem zprostředkovaným mitochondriemi. K indukci apoptózy za účasti mitochondrií dochází při poškození buňky zářením, při poškození genomové DNA, prostřednictvím hormonální signalizace (např. steroidními hormony) nebo při depleci růstových faktorů, jejichž přítomnost je limitujícím faktorem pro většinu buněk (54). V membráně mitochondrií ovlivňují apoptózu vzájemnými interakcemi produkt protoonkogenu Bcl-2 a jeho homologní proteiny. Rodina proteinu Bcl-2 je důležitá v procesu aktivace kaspáz, řídí ji uvolněním cytochromu c z intermembránového prostoru mitochondrie. V současnosti je známo přes 20 proteinů této rodiny, které působí jako

inhibitory i aktivátory apoptózy (2). Příklady a jejich funkce jsou zobrazeny v příloze 6.

## RODINA Bcl - 2

### PROAPOPTOTICKÉ

- Bak:** Bcl-2 antagonist/killer  
**Bax:** Bcl-2 sdružený  
 x protein - isoformy -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$   
**Bcl-10:** inaktivuje NF- $\kappa$ B.  
**Bcl-g**  
**Bcl-x<sub>S</sub>:** krátká isoforma Bcl-x

### Různé regulační faktory:

- BAR:** apoptotický regulátor  
**Bad:** Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2 associated death promoter - proapopt.

### ANTIAPOPTOTICKÉ

- Bcl-2:** B-cell lymphoma  
**Bcl-x:** má isoformu  
 dlouhou Bcl-x<sub>L</sub>  
 Bcl-w  
**Bag:** Bcl-2-binding protein  
**Boo**

Při výčtu důležitých faktorů řídících apoptózu nelze nezmínit důležitost tumor supresorového genu p53. Jde o transkripční faktor, který má mnoho funkcí. Vedle uplatnění při nádorovém bujení má též dominantní úlohu v kontrole stavu buněčného genomu – strážce jeho stability (62). Důsledky jeho aktivace jsou různé podle toho, ve které fázi buněčného cyklu k ní dojde. Aktivace v G1 fázi vede k zastavení cyklu v „kontrolním bodě“, čímž je dán dostatek prostoru k realizaci opravných procesů. Poškození DNA např. zářením je právě aktivizujícím podnětem, který zvyšuje množství p53 v buňce. Po skončení oprav se množství p53 sníží a buněčný cyklus může pokračovat směrem k replikaci DNA. Dojde-li k poškození v premitotickém období, navede p53 buňku na dráhu programované buněčné smrti (14). Protein p53 je induktorem exprese Bax, Bad a negativním regulátorem Bcl-2 (81, 82). Kromě proteinů rodiny Bcl-2 zvyšuje protein p53 za určitých podmínek i expresi Fas receptoru a tzv. p53-indukovaných genů (PIG) (97). Pro zprostředkování apoptózy je patrně rozhodující exprese genu homologního s chinonovou oxidoreduktázou PIG3. Protein PIG3 vede k produkci kyslíkových radikálů, které jsou silnými aktivátory apoptózy poškozující mitochondriální membránu, což má za následek uvolnění cytochromu c. p53 je rovněž induktorem IGF-BP3 (insulin-like growth factor binding protein 3), jehož hyperexprese může inhibovat mitogenní aktivitu IGF (insulin-like growth factor), a tím vyvolávat indukci apoptózy. Všechny zmíněné funkce proteinu p53 se však nevyskytují jako univerzální mechanismus a samotná exprese Bax, PIG3, nebo IGF-BP3 nejsou sto vyvolat

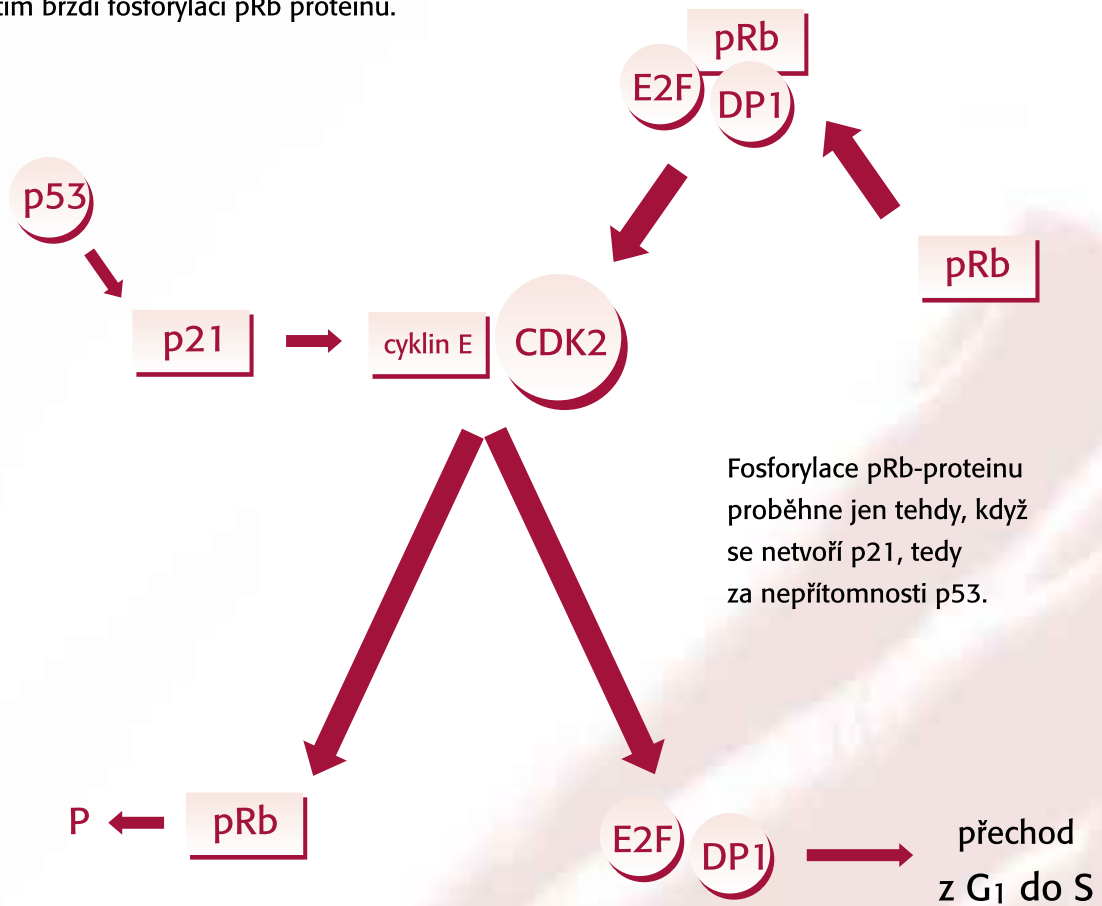
kompletní apoptotickou odpověď. Předpokládá se proto, že úloha proteinu p53 v indukci apoptózy je komplexnější (8, 95).

Souhrnně řečeno, vlastní regulační funkce proteinu p53 je vykonávána na úrovni aktivace nebo represe p53 dependentních genů, což vede k zásahu do replikace DNA, regulace buněčného cyklu, apoptózy a diferenciace buněk. Jedna z drah p53 ovlivňující buněčný cyklus je znázorněna v příloze 7.

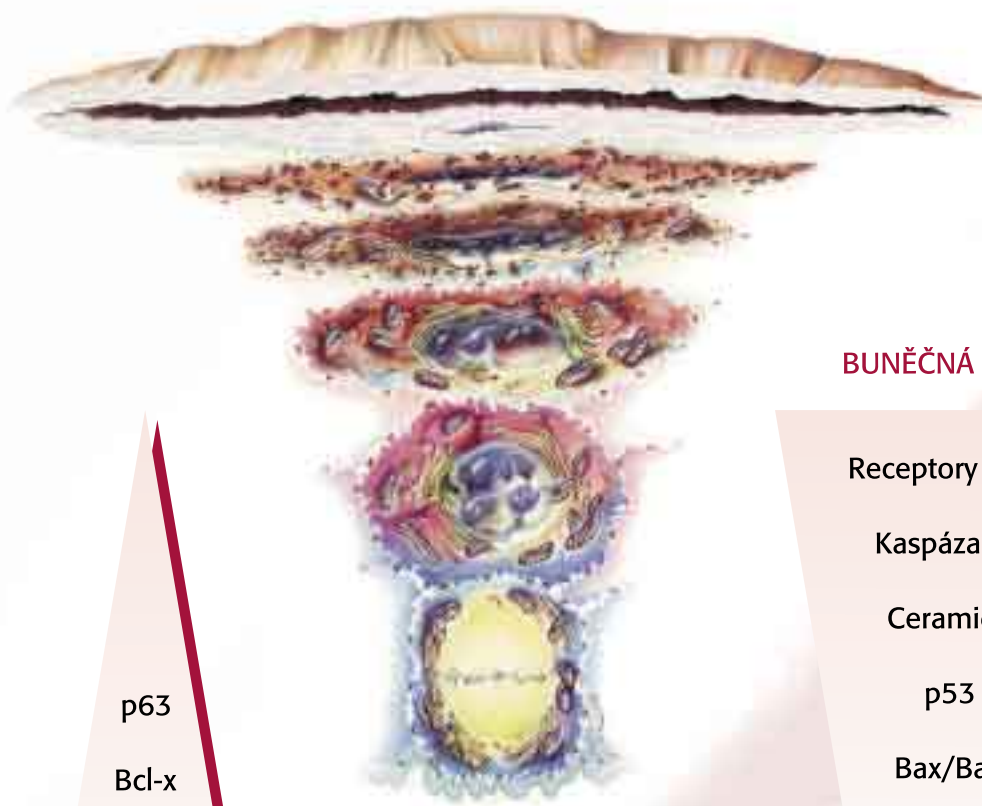
Tato mozaika popisující funkce a provázanost jednotlivých mediátorů a signálních drah vedoucích k přežití nebo buněčné smrti není zdaleka úplná a detailní. Jejím úkolem je přiblížení a nastínění složitého problému fyziologické rovnováhy mezi faktory, které zajišťují správný průběh životního cyklu buněk epidermis (příloha 8). Jako hlavní patofyziologický model hyperproliferativních a nádorových onemocnění kůže se uvažuje posunutí rovnováhy ve směru delšího přežívání KC, a to ve smyslu úniku transformovaných buněk z apoptotické regulace nebo ve smyslu hyperexprese antiapoptotických regulátorů. Další výzkum na poli terapeutických zásahů do těchto mechanismů vychází z podrobného prozkoumání pochodů na úrovni molekulární, jak v normální, tak i patologicky změněné kůži.

## P53 A JEHO VZTAH K BUNĚČNÉMU CYKLU

Protein p21 transkripčně regulovaný proteinem p53 inaktivuje cykE.CDK2, a tím brzdí fosforylací pRb proteinu.



## ROVNOVÁHA MEZI PŘEŽÍVÁNÍM A SMRTÍ EPIDERMÁLNÍCH BUNĚK



### BUNĚČNÁ SMRTI

Receptory smrti

Kaspáza 14

Ceramidy

p53

Bax/Bak

TRAIL

FasL

TNF- $\alpha$

ASK-1

p63

Bcl-x

AKT

KGF

EGFR

PPAR

Notch

NF- $\kappa$ B

Integriny

Decoy receptory

**PŘEŽÍVÁNÍ  
EPIDERMÁLNÍCH BUNĚK**

Převzato z Nickloff BJ et al.: JID Symposium proceedings 7, 2002.

## 1. 2 Molekulárně genetická podstata psoriázy jako charakteristického zástupce hyperproliferativního onemocnění kůže

Psoriáza (lupénka) patří mezi chronické kožní onemocnění, jehož výskyt je velmi rozšířen. Je charakterizována vzestupem proliferace a poruchou procesu diferenciace KC.

Etiopatogenetická souvislost vzniku psoriázy s alterací genové exprese je empiricky dokázána familiárním výskytem. Je k dispozici velké množství informací o genech asociovaných určitým způsobem s onemocněním lupénkou, i když kauzální souvislost je stále diskutována a je předmětem dalšího výzkumu. Jsou popsány různé genové lokusy v asociaci s psoriázou. Např. alela PSORS1 je lokalizovaná na chromosomu 6p21.3 ve spojení s HLA-I systémem a odhaduje se, že přispívá ke vzniku psoriázy v 30 až 50 %. Takovýchto genových lokusů bylo popsáno několik (PSORS1-5, PSORS7 a PSORS8) (13). Zaměříme-li se např. na PSORS4, genový lokus vyskytující se na chromozomu 1q21, lze zde najít rozsáhlou skupinu 21 genů kódujících proteiny označené jako S100. Jsou součástí komplexu epidermální diferenciace. Exprese 14 z nich byla zjištěna v normální a/nebo v patologicky změněné epidermis. Úloha těchto genů ve spojení s kalciovými ionty na subcelulární úrovni reguluje různé buněčné funkce. Fungují jako mediátory Ca-asociovaných signálních transdukcí, dále i jako chemotaktické agens, což může být stěžejní role v patogenezi psoriázy, kde jsou některé z nich zvýšeně exprimovány (26).

Relativně nově byl identifikován gen nazvaný psoriasin (S100A7). Poprvé byl izolován z psoriatické léze. Je známo, že je exprimován jak v kultuře normálních i maligních KC, ale i maligně změněných epiteliálních

buněk v duktálním karcinomu in situ. Tyto důkazy podporují hypotézu o asociaci tohoto genu s abnormálními procesy diferenciace buněk. Současné poznatky podporují tvrzení, že psoriasin je důležitý jako chemotaktický faktor hematopoetických buněk v patogenezi zánětlivých onemocnění kůže, dále ukazují roli tohoto genu v časných stádiích nádorů prsu a souvislost s rozvojem invazivního fenotypu. Jeho detekce je experimentálně používána jako marker spinaliomu a diagnostický marker k rozlišení invazivity nádorových buněk karcinomu prsu. Dalším novým genem popsáným v souvislosti se zvýšenou expresí u psoriázy a výskytem na chromozomu 1q21 je S100A15. Podle nejnovější studie jsou detekovány 2 isoformy tohoto genu, jejichž funkční charakteristiky nebyly ještě popsány (146).

V patogenezi lupénky se dále uplatňuje složitý komplex imunitních procesů, které jsou zprostředkovány kožním imunitním systémem (SALT) a které ve svém důsledku mají za následek infiltraci polymorfonukleárů, T-lymfocytů, Langerhansových buněk a buněk monocytomakrofágového systému, produkci cytokinů a chemokinů za vzniku psoriatických ložisek. Je dokázáno, že patologická proliferace KC je iniciována infiltrací epidermis aktivovanými T-lymfocyty. Úlohy CD4+ a CD8+ T-lymfocytů byly kontroverzně diskutovány (99, 100). Imunologický model vzniku a vývoje psoriatických ložisek je velmi komplexní, jedním ze základních dějů je interakce aktivovaných CD4+ lymfocytů s antigen-prezentujícími buňkami, které putují do regionální lymfatických uzlin, kde

jsou produkovány klony CD4+ T-lymfocytů. Ty pak cestují zpět do kůže a aktivují CD8+ lymfocyty, které následně prolifерují a produkují cytokiny typu Th1 a růstové faktory. Tyto látky spouštějí řetězec reakcí působících na proliferaci KC a dávajících vznik psoriatických ložisek. Značné úsilí výzkumníků bylo vynaloženo na identifikaci spouštěče způsobujícího aktivaci T-lymfocytů. Proto se výzkumné skupiny začaly zabývat různými receptory T-lymfocytů a jejich ligandy, jak endo- tak exogenními. Jako spouštěcí faktory, které by mohly aktivovat T-lymfocyty, jsou uvažovány retroviry, superantigeny (uvolňovány bakteriálně), streptokokové M-proteiny, neuropeptidy jako je substance P.

Otázka patogeneze psoriázy je velmi složitá a výzkum na tomto poli není zdaleka ukončen. Detailní popis těchto procesů není hlavním tématem této práce. Avšak pokrok v této oblasti stojí za zmínku v souvislosti s možnostmi rozvoje terapeutického zásahu přímo do patologických imunologických procesů v kůži. Imunoterapie psoriázy je na velkém vzestupu díky novému přístupu v léčbě skupinou terapeutik nazývanou biologika.



## 1. 3 Nové geny a jejich potenciální role v patogenezi hyperproliferativních

### kožních onemocnění

V kapitole 1.2 byly částečně popsány nové geny ze skupiny S100 proteinů. Další geny, které byly nově objevené v souvislosti se změnami v proliferaci a diferenciaci epidermálních buněk a u kterých se předpokládá souvislost s apoptotickými procesy v KC, jsou geny HAX-1 a hurpin.

HAX-1 je gen kódující intracelulární protein, který byl experimentálně izolován spolu s proteinem HS1, substrátem tyrozinkinázové Src rodiny. Funkce genu HAX-1 není zcela jasná. Experimenty odhalily, že tyrozinkinázy jsou aktivovány zkříženou reakcí antigenních receptorů a účastní se signálních drah a transkripčních regulací receptorů, které umožňují apoptotickou a proliferativní odpověď. Dále bylo dokázáno, že exprese genu HAX-1 je silně zvýšena v ložisku psoriázy, kde jsou mimo jiné deregulovány procesy apoptotické i proliferační. HAX-1 obsahuje tzv. BH domény, typické pro proteiny Bcl-rodiny, které se podílí na regulaci apoptózy (121). Kromě toho HAX-1 vykazuje značnou podobnost s proteinem Nip3, který interaguje spolu s 19 kDa-proteinem adenoviru E1B s Bcl-2 proteinem a proteinem viru Epstein-Barr (BHRF1). Funkce těchto 3 proteinů je spojena s antiapoptotickými procesy. Dále bylo odhaleno, že HAX-1 umožňuje formování komplexu proteinu Bcl-2 s proteinem EB viru – EBNA-LP (74). Výsledky mnohých studií dokazují, že HAX-1 hraje roli v regulaci apoptózy, a předpokládá se, že chrání buňky před apoptotickými signály. Detailní působení zatím není důkladně prozkoumáno.

Další gen, jehož funkce má souvislost s apoptotickými procesy, patří do skupiny tzv. serpinů. Serpiny jsou inhibitory serinových proteáz, což jsou enzymy, mezi které patří např. trypsin, trombin, různé endopeptidázy. Tyto se podílejí na různých fyziologických procesech imunologických i hemokoagulačních. Mají podíl na aktivaci některých peptidových prekurzorů, což vyústí ve stimulaci prozánětlivých procesů. Aktivita serinových proteáz musí být regulována, což je úkol jejich inhibitorů-serpinů. Skupina serpinů je rozdělena do 2 kategorií. Hurpin patří do skupiny ovalbuminů. Jeho označení hurpin (HaCat UV-responsible serpin) vyplývá z toho, že byl poprvé izolován v HaCat buňkách po působení UV záření (1).

Experimenty ukazují na možné antiapoptotické účinky hurpinu a to za dvou následujících okolností. Exprese hurpinu v ložiscích psoriázy je výrazně zvýšená, dále byla patrná zvýšená exprese hurpinu i v biotických vzorcích bazaliomu a spinaliomu. Různá pozorování ukázala, že velké množství proteáz se účastní apoptotického procesu. Z toho, co bylo zmíněno o funkci inhibitorů proteáz, je jasné, že k zachování rovnováhy v tomto procesu musí mít inhibitory proteáz antiapoptotickou funkci. V souvislosti s apoptózou a proteázami byla detailněji prozkoumána funkce především kaspáz (viz výše kap. 1.1.2). Souhrnně lze z těchto poznatků hypoteticky vyvozovat, že hyperexprese hurpinu je spojena s rezistencí k apoptóze v daném prostředí.

Dalším důkazem, že hurpin souvisí s antiapoptotickými procesy, je experiment, při kterém byl hurpin izolován v rámci sledování genů, jejichž exprese je ovlivěna UV zářením. Exprese hurpinu v KC, které byly ozářeny UV zářením, je snížena. UV záření, jak již bylo řečeno, mimo jiné indukuje apoptózu v KC. Z toho můžeme usuzovat, že geny reprimované UV zářením, včetně hurpinu, účinkují v opačném smyslu než jsou apoptotické mechanismy. Porozumění významu hurpinu v procesech růstu, diferenciaci a apoptózy ve zdravé tkáni, ale i v patologických stavech jako je psoriáza nebo nádorová onemocnění, může mít velký medicínský dopad.

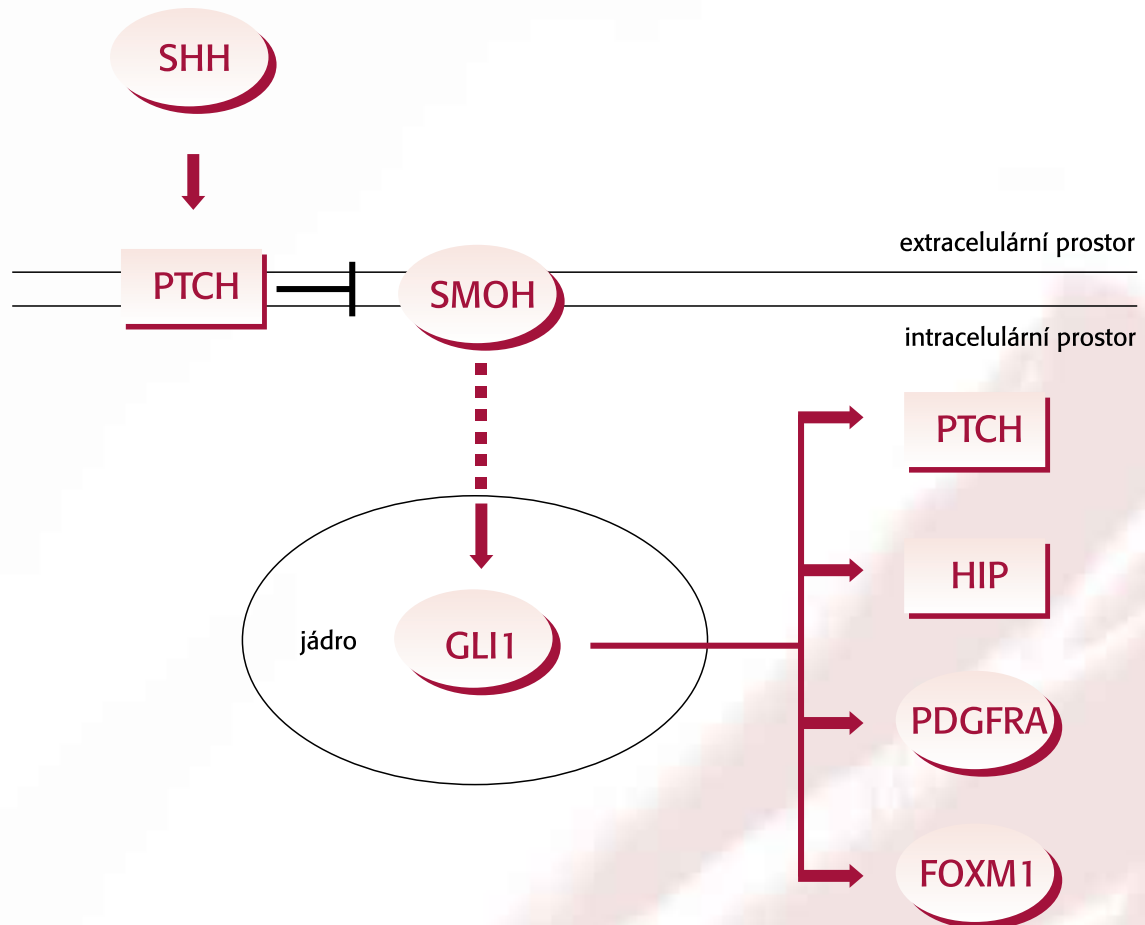
## 1. 4 Molekulárně genetická podstata nemelanomových kožních nádorů

Z předchozích kapitol lze vyvodit, jak velký je v současnosti význam studia molekulární podstaty hyperproliferativních kožních onemocnění. Mnoho dermatologických vědeckých skupin se zaměřilo na zkoumání molekulární podstaty epitelálních tumorů kůže, které se označují též jako nemelanomová nádorová onemocnění kůže (nonmelanoma skin cancer = NMSC). Do této skupiny patří mimo jiné bazaliom (basal cell carcinoma = BCC) a spinaliom (dlaždicobuněčný karcinom, squamous cell carcinoma = SCC). Riziko vzniku těchto nádorů je určeno jak genetickými faktory, individuálním kožním typem, tak je také závislé na působení exogenních nox, ze kterých je nejdůležitější UV-záření, především UV-B (290-320 nm).

Velmi významný pokrok ve studiu molekulární podstaty BCC byl zaznamenán v souvislosti s identifikací mutací genu na dlouhém raménku 9. chromosomu, který je lidským homologem genu drosofilu, tzv. patched gen (PTCH-gen) (32, 37, 50). PTCH-gen kóduje transmembránový protein, který je receptorem pro signální molekulu z rodiny Hedgehog, jejíž zástupcem v kožních buňkách je Sonic-Hedgehog molekula (SHH). Je součástí signální dráhy Sonic-Hedgehog (SHH), jejíž aberantní nekontrolovaná aktivace způsobená mutací PTCH-genu (s následnou mutací membránového proteinu SMOH-humánního homologu Smooth-proteinu drosofilu) je přítomná v BCC. Fyziologická funkce této signální dráhy je popsána při embryonálním vývoji kožního orgánu a také při kontrole růstu vlasových folikulů. V příloze 9 je schématické zobrazení signální dráhy Sonic-Hedgehog. Vazba molekuly SHH

na PTCH-receptor blokuje přenos signálu na protein SMOH a další intracelulární a nukleární aktivace signální dráhy. Aktivace této signální dráhy, způsobená mutacemi PTCH-genu nebo jinde, má za následek zvýšenou transkripci genu GLI1 a následně cílových genů jako PTCH, Hedgehog-interacting-protein (HIP), PDGFRA (růstový faktor) a FOXM1 (transkripční faktor). Poslední dva jmenované hrají roli při stimulaci proliferace a při regulaci buněčného cyklu (43). Vedle aktivace SHH-signální dráhy mutacemi PTCH nebo SMOH jsou prokázány asi v 50 % BCC mutace genu p53 (35) a dále asi u 1/3 BCC bodové mutace protoonkogenu z rodiny RAS, především HRAS (25, 129).

SCC se liší od BCC nejen klinicky a histologicky, ale i ve změnách na úrovni molekulárně genetické. Např. se zdá, že aktivace SHH - signální dráhy, která je jednou z hlavních změn u BCC, nehraje ve vzniku a vývoji SCC žádnou roli (43). Jeden z podstatných rozdílů je vývoj nádorových změn. Je známa kožní léze, která předchází SCC. Pravděpodobnost rozvoje SCC z aktinické keratózy (AK) je 2-16 %. Odtud pramení vícestupňový model vzniku tumoru od AK až k metastazujícímu SCC. Tomu odpovídají změny na úrovni molekulárně genetické, které můžeme pozorovat v jednotlivých stádiích progresu nádoru. Důležité při posuzování prognózy nádoru je to, které epidermální buňky jsou postiženy genetickými změnami. Na základě dnešních poznatků jsou zdrojem vzniku SCC zárodečné buňky interfolikulární epidermis, které mají vysokou proliferační schopnost. Po genetické alteraci dochází ke vzniku klonální expanze postižených buněk, u kterých je pravděpodob-

**SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ SIGNÁLNÍ DRÁHY SONIG - HEDGEHOG**

nost dalších genetických změn vedoucích k růstu tumoru větší (96). Už v časných stádiích AK, téměř v 80 % případů, jsou pozorovány mutace genu p53. Méně časté jsou v AK mutace genů RAS, především KRAS a HRAS. Dále pak jsou v AK zaznamenány změny genomové na chromosomech 17p, 17q, 9p, 3p, a 13q (129).

Co se týče molekulární podstaty SCC, zaměřuje se výzkum na tumorsupresorové geny lokalizované na dlouhém raménku 9. chromozomu (např. genový lokus nazvaný ESS1, který byl sledován v rodinách s vícečetnými keratolakantomy). Naproti tomu na krátkém raménku inaktivace CDKN2A-tumorsupresorového genu (9p21) je proces spojený s progresivními změnami v SCC (25, 86). Další molekulární změny spojené s SCC jsou na úrovni růstových faktorů, často je pozorována aktivace genu receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), a to cestou amplifikace genu EGFR nebo hyperexpresí jeho ligandu, epidermálního růstového faktoru (25). Další poznatky výzkumu ukazují, že aberantní aktivace těchto růstových faktorů může hrát významnou roli v potenciálu metastazování SCC.

Souhrnem lze říci, že dosavadní výzkumy molekulárně genetických změn SCC ukazují na postupnou kumulaci genetických změn na různých úrovních, především v regulaci buněčného cyklu, dále regulaci apoptózy i růstových faktorů, které vedou k progresi od AK až k metastazujícímu SCC. Tyto změny vedoucí k SCC jsou pravděpodobně složitější na rozdíl od BCC, kde se testují terapeutické možnosti zásahu do SHH-signalizace (144). Proto se v léčbě SCC nezdá nový terapeutický koncept tak přínosný jako u BCC nebo AK.

## 1. 5 Vliv UV záření na vznik nádorových onemocnění

Zkoumání exogenních vlivů a jejich reflexe do životního cyklu epidermálních buněk je jedním z hlavních úkolů moderního výzkumu v dermatologii. Vzhledem ke zvýšené incidenci kožních onemocnění v souvislosti s dlouhodo-

bou expozicí UV záření je sluneční záření, především jeho UV spektrum a jeho působení na organismus, středem zájmu mnoha výzkumných skupin.

### 1.5.1 Molekulární podstata působení UV záření

UV záření tvoří spektrum elektromagnetického záření o vlnové délce 200 - 400 nm, je rozděleno do 3 částí UVA - 320 - 400 nm, UVB - 280 - 320 nm a UVC 200 - 280 nm. Sluneční UVC je zadržováno ochrannou ozónovou vrstvou ve stratosféře, která se v důsledku civilizačních vlivů zmenšuje, a tím se snižuje její ochranná schopnost (19). Největší část biologických účinků je způsobena UVB a UVA spektrem záření. Podle energie, kterou jednotlivá spektra

UV záření nesou, můžeme jednotlivé části seřadit: UVC>UVB>UVA, zatímco hloubka penetrace při působení na lidské tělo vzrůstá s vlnovou délkou (UVA>UVB>UVC).

Kůže, největší orgán lidského těla, je nejpřístupnější a přímo vystavena slunečnímu záření v první linii. Biologické účinky UV záření na lidské tělo jsou různorodé, mnoho z nich patří mezi škodlivé. Ty jsou v dnešní době nebezpečí „ozónové díry“ velmi aktuální.

Škodlivé účinky záření na lidský organismus, konkrétně na kůži, lze na molekulární úrovni schématicky rozdělit na změny:

#### 1) v imunitní odpovědi:

- a) erytémová reakce (vasodilatace, edém a změna teploty)
- b) zánětlivá reakce způsobená produkcí zánětlivých cytokinů a alterací adhezivních molekul
- c) imunosuprese na úrovni:
  - funkce a recirkulace lymfocytů
  - pozdního typu přecitlivělosti a kontaktní přecitlivělosti
  - antigen prezentujících buněk (migrace Langerhansových buněk (LC) z epidermis do regionálních lymfatických uzlin)

#### 2) na úrovni celulární - „sunburn cells“ (dyskeratóza, apoptóza a fagocytóza)

#### 3) na úrovni DNA (změny v genové expresi proto-onkogenů: *ras*, *c-fos* onkogen; a anti-onkogenů: p53)

**Ad 1a)** Iniciální zánětlivá reakce po expozici UV záření je lokální vazodilatace cév

podkoží a následný erytém. Výskyt erytému má dvě fáze – iniciální (časný) erytém, který se ob-

jeví ještě v průběhu expozice, a následný o větší intenzitě, který se objevuje hodinu po expozici s maximem po 8 hodinách. Příčiny erytému byly předmětem zkoumání mnoha vědeckých skupin. Např. Logan a Wilhelm zkoumali erytérovou reakci na mnoha zvířecích modelech, zkoumali různé aspekty včetně vaskulární permeability, tkáňové leukocytózy a rozsahu erytému. Výskyt vaskulární permeability kopíruje křivku výskytu erytému, a ten je různý v závislosti na dávce a druhu UV záření a též na zkoumaném biologickém druhu (65-68).

Mnoho různých faktorů bylo považováno za molekulární podstatu erytérové reakce. Jeden z prvních předpokládaných mediátorů časného erytému byl histamin vzhledem k jeho působení při termickém poranění. Avšak pokusy blokovat vznik erytému podáním antihistaminik na zvířecím modelu (morčatům a králíkům) byly neúspěšné. Podáním antagonistů H1 a H2 serotoninových receptorů po expozici UV záření byl blokován vznik časného erytému, avšak nebyla eliminována pozdní erytérová reakce (147). Jejím potlačení, avšak ne zamezení, přispívá podání inhibitorů syntézy prostaglandinů jako je kyselina acetylsalicylová a indomethacin, z čehož vyplývá, že na vzniku pozdního erytému se podílí zvýšená produkce prostaglandinů (PG), především PGE2 a PGF2 $\alpha$  (12). Avšak erytém navozený po expozici UVA nebo po 8-methoxypsoralen/UVA terapii (PUVA) nelze ovlivnit podáním indomethacinu lokálně, intradermálně ani perorálně. Z toho je zřejmé, že vznik erytému po UVA expozici není přímo indukován působením PG (85).

V poslední době se dostávají do popředí nové poznatky ve výzkumu oxidu dusnatého (NO) v buněčné fyziologii. NO je

produkován keratinocyty po UV iradiaci (23). Zatímco exprese NO je závislá na dávce záření, enzym NO syntetáza, podílející se na syntéze NO, je produkován kontinuálně. V téže studii se ukazuje, že podání inhibitoru NO syntetázy pokusným morčatům zajišťuje ochranný UV faktor 8, 71. Z toho lze usuzovat, že NO je jedním z hlavních faktorů podílejících se na vzniku zá-  
nětlivé reakce, vasodilatace a erytému.

Také poškození DNA může sehrát roli při vzniku erytému. DNA je chromoforem UV záření při vzniku erytému, protože akční spektrum erytému odpovídá tomu, při kterém vzniká nejvíce pyrimidinových dimerů, a to až do 334 nm. (29). Tento objev byl potvrzen výzkumem *Monodelphis domestica*, kde se prokázalo, že fotoreaktivace DNA je způsobena DNA fotolyasou, DNA reparativním enzymem, jehož působení redukuje erytérovou reakci (21).

Souhrnně řečeno, vasodilatace a následná erytérová reakce po UV expozici je multifaktoriální proces, kde jednu z klíčových rolí mají PG a NO. Minoritní, ale stále důležitou roli hrají cytokiny a ostatní prozánětlivé mediátory.

**Ad 1b)** Akutní expozice UV záření způsobuje mnoho změn v kožní tkáni, zahrnující produkci cytokinů (6, 69, 122). Cytokiny patří do velké skupiny proteinových mediátorů se širokým funkčním spektrem. Mezi důležité funkce cytokinů patří regulace hematopoiezy, řízení buněčné proliferace a diferenciaci (skupina faktorů stimulujících tvorbu kolonií, růstové faktory), rozvoj buněčné a humorální imunitní odpovědi, navození hojivých procesů v ranách a v neposlední řadě rozvoj zánětlivé reakce. Po UV expozici kůže vystupuje do popředí sekrece cytokinů s prozánětlivým a imunomodulačním

účinkem. Jelikož působení cytokinů můžeme charakterizovat jako autokrinní a parakrinní, cytokiny produkované po daném stimulu, v našem případě akutní UV expozici, různými buňkami epidermis se ovlivňují navzájem a potencují vznik sítě cytokinů s různými agonistickými i antagonistickými účinky. Mezi hlavní prozánětlivé cytokiny patří cytokin TNF- $\alpha$ , jehož exprese dramaticky vzroste po UV ozáření. Je to cytokin s pleiotropními účinky, produkovaný velkým množstvím různých typů kožních buněk, jako např. mastocyty, KC, aktivovanými LC, i dermálními dendritickými buňkami (DC). Jeho účinky jsou velmi rozmanité. Prohlubuje zánětlivou reakci alterací adhezivních molekul v okolí, čímž pomáhá zvýšené infiltraci leukocytárních buněk. Má schopnost vyvolat produkci jiných cytokinů, jako např. interleukinu-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), jehož komplex (IL-1 $\beta$ , IL-1 receptory typu 1 a 2 a jejich antagonistu IL-1RA) je též ovlivněn po expozici UV zářením (7). Tvorba dalších cytokinů produkovaných KC, jako jsou interleukin 6, 8, 12, 15 (IL-6, 8, 12, 15), byla prokázána po expozici UV záření *in vitro* i *in vivo* (56, 57, 83, 133).

Široká škála adhezivních molekul je exprimována epidermálními buňkami i epiteliálními buňkami cévních stěn v dermis. Jsou to např. selektiny, intergriny, adresiny aj. Většinou hrají významnou roli při zánětlivé reakci. E-selectin (ELAM-1) je hyperexprimován v místě akutního UVB zánětu, jeho úkolem je zprostředkovat imunitní odpověď ve smyslu infiltrace neutrofilů a paměťových T-lymfocytů. Intracelulární adhezivní molekula 1 (ICAM-1) je důležitá adhezivní molekula v kůži vzhledem k jejím schopnostem umožňovat kontakt T-lymfocytů a KC. Její hlavní úloha je interakce T-lymfocytů s antigen prezentujícími buňkami,

kteří v kůži zastupují LC. Efekt UV záření na ICAM-1 expresi na KC je bifázický, na dávce závislý s iniciálním snížením exprese po 24 hod a poté s pozdější indukcí exprese (93). Exprese této molekuly na LC je zásadní a její snížení může ovlivnit schopnost LC stimulovat T-lymfocyty (22), což je v souladu s modelem imunosuprese po UV radiaci kůže.

V nedávné době byl zjištěn pokles v expresi E a P kadherinů v melanocytech po UV ozáření, z čehož vyplývá zhoršení kontaktu KC a melanomových buněk. Z toho je možné usuzovat na zvýšení metastatického potenciálu transformovaných buněk a možnost progresu zhoubného bujení (115).

**Ad 1c) Imunosuprese** je vážnou komplikací vyskytující se při přirozené kožní reakci po UV ozáření. Jeden z prvních experimentů, které dokázaly snížení imunitní odpovědi po UV radiaci, ukázal redukci kontaktní přecitlivělosti kůže, která byla iritována dinitrochlorbenzenem po předešlé UV iradiaci (38). Následující experimenty ukázaly antigenní povahu nádorů indukovaných UV zářením. Kripke a kol. ukázali ve svých experimentech, že nádory indukované UV zářením jsou schopny růst v organismu, ve kterém nacházíme systémovou alteraci imunitní odpovědi, a že tyto nádory lze transplantovat zase jen do imunosuprimovaných hostitelských organismů (60).

Současné poznatky dávají prostor hypotézám o příčinách imunosuprese. Bylo dokázáno, že UVB záření ovlivňuje imunitní reakci v mnoha parametrech zahrnující alteraci funkce (84) a recirkulace T-lymfocytů (102), reakci pozdního typu přecitlivělosti (132) a kontaktní přecitlivělosti (34), ale též redukční účinky na

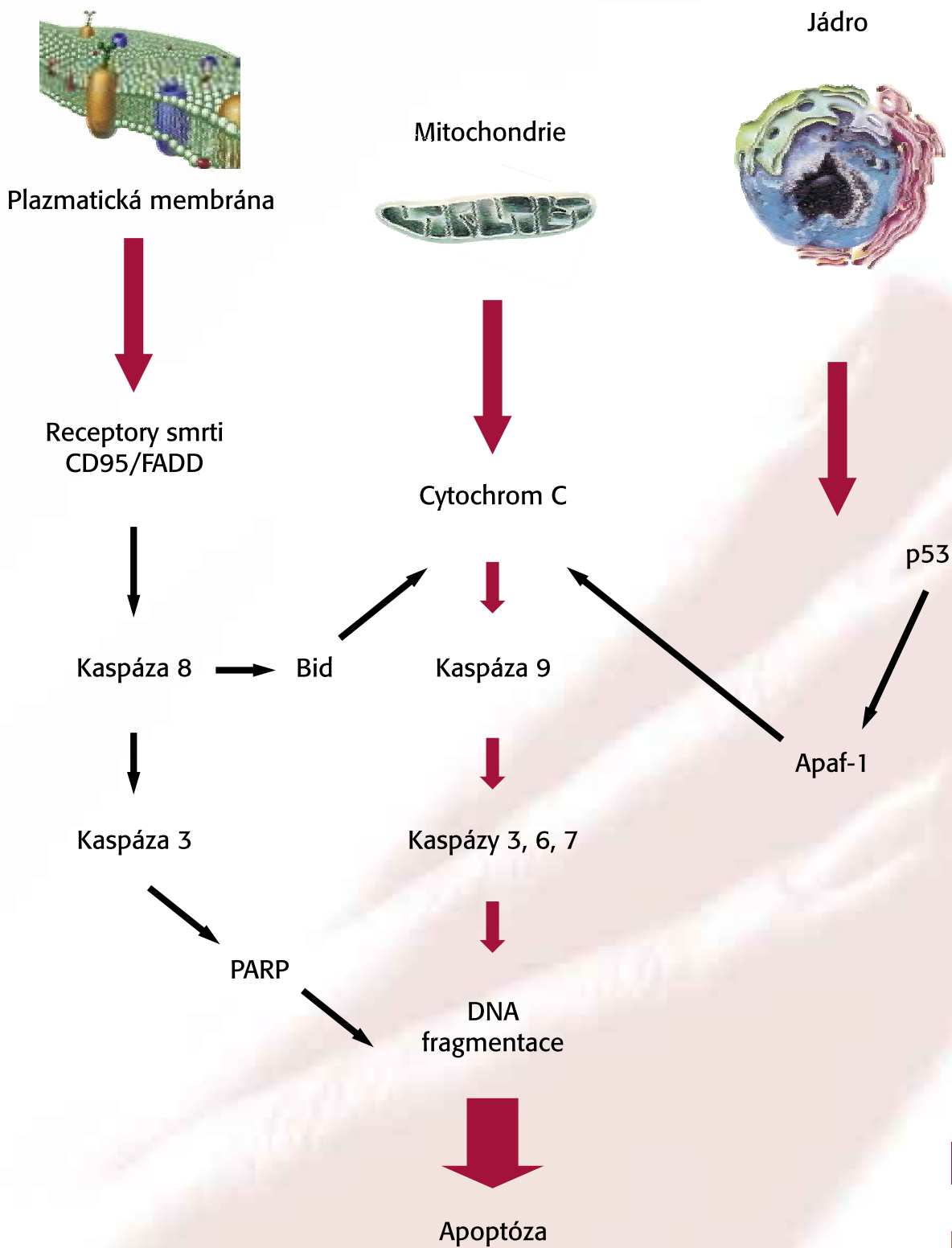


produkcí protilátek (119). Experimenty s Langerhansovými buňkami (LC) dokazují, že UV záření způsobuje alteraci v morfologii a kinetice LC, čímž se mění jejich schopnosti jako buněk prezentujících antigen (101).

Je dokázáno, že důsledky expozice UV-záření je možné přičíst úloze T-supresivních lymfocytů, které snižují efekt Th1-lymfocytů cestou produkce Th2-cytokinů (131), čímž upravují Th1/Th2-rovnováhu ve prospěch funkce Th2-lymfocytů. Kombinace těchto faktorů mění normální kožní imunitní reakci ve smyslu snížení buněčné imunity, což je hlavní složka imunitní odpovědi umožňující obranu proti nádorovým změnám a infekčním agens.

**Ad 2)** Jedním z dalších následků UV iradiace kůže je poškození epidermálních buněk a následná snaha organismu o jejich odstranění. Buňky popisované v literatuře jako „sunburn cells“ jsou apoptotické KC, které jsou ireverzibilně poškozené UV zářením a podléhají apoptóze a fagocytóze. Význam těchto buněk byl dříve nejasný, ale v dnešní době se sbírají důkazy o tom, že „sunburn cells“ jsou nejenom markery poškození slunečním zářením, ale jejich apoptotické procesy chrání organismus před nádorovými procesy v kůži (148). Jak naznačuje schéma v příloze 10 existuje mnoho signálních drah spouštějících apoptózu v KC. Proč organismus vytvořil mnohočetný spouštěcí systém lze vyložit nutností eliminovat potenciální neoplastické buňky i v případě, že některá ze signálních drah je inaktivní. Jedná se o model multifunkční ochrany proti vzniku nádorového bujení.

## ŠKODLIVÉ PŮSOBNÍ UV ZÁŘENÍ NA KERATINOCYTY



Převzato z Nickloff BJ et al.: JID Symposium proceedings 7, 2002.

### 1.5.2 Tumorigenicita UV záření

Naše pochopení vědecké podstaty vzniku kožních nádorů se za poslední desetiletí významně rozšířilo. V dřívější době byl základem vědeckého pozorování klinický a mikroskopický obraz kožních tumorů, v dnešní době se vědci zaměřují na působení UV záření na kůži, přesněji na genetické změny po dlouhodobé expozici slunečnímu záření. Všeobecně známé poznatky o tom, že dlouhodobá expozice slunečnímu záření způsobuje zvýšenou incidenci kožních nádorů, byly dermatology empiricky zjištěny, ale podstata kancerogenních účinků nebyla do detailů odhalena. Heterocyklické báze DNA jsou hlavním chromoforem absorbujícím UV záření. Absorpce spektra s maximem od 260-265 nm vede k poškození DNA, které za určitých podmínek může způsobit nádorové bujení. Vlivem UVB záření vzniká poškození DNA pyrimidinovými dimery v bazální a suprabazální vrstvě epidermis, ale i v LC (137). Vznik pyrimidinových dimerů je považován za iniciální krok v mutagenезi a tumorigenezí (39).

Mezi nejčastější mutace popisované po expozici UV zářením patří aktivace onkogenu *ras* (103) a dále pak zvýšená exprese protoonkogenu *c-fos* v epidermálních buňkách. Protoonkogeny *c-ras* kódují Ras-proteiny, které se zúčastňují řízení normálního růstu buněk. Mutanty obsahující onkogen *ras* jsou trvale aktivní a kódují Ras-protein, který je v trvale aktivní formě a jeho neustálé působení na cílový protein navozuje onkogenní proces. Protoonkogen *c-fos* kóduje za normálních okolností transkripční faktor, který je vnitřně nestabilní a působí jen omezenou dobu, čímž je zabráněno

onkogennímu účinku. V nádorech se ovšem často vyskytuje ve vysokých a neregulovaných koncentracích a působí v nich jako onkoprotein. Dalším faktorem, který je ovlivněn UV-expozicí, je transkripční faktor NF- $\kappa$ B, jehož podjednotka p64 je kódována protoonkogenem *c-rel*. Je dimerem dvou podjednotek p64 a p50. Obě podjednotky jsou v dimeru drženy regulačním proteinem I- $\kappa$ B. Teprve po uvolnění I- $\kappa$ B z tohoto dimeru vstupuje NF- $\kappa$ B do jádra a aktivuje transkripci genů proinflamatorních cytokinů (IL-2, aj.). Dojde-li však ke konverzi *c-rel* na *v-rel*, transkripční faktor ztrácí schopnost putovat do jádra a onkoprotein v-Rel ztrácí kontrolní mechanismy, zůstává v jádře a konstitutivně se váže na promotory příslušných genů (109).

O roli mutace antionkogenu p53 (tumor supresorového genu), při vzniku kožních nádorů není třeba diskutovat. Základní charakteristika tohoto multifunkčního genu byla podána již v kapitole 1.1.2. Sluneční záření způsobuje v epidermis mutaci genu p53, čímž může zapříčinit nádorovou iniciaci. Následná další expozice slunečnímu záření ruší normální buněčné populace procesem programované buněčné smrti. Ve spojení s hyperplastickým charakterem kůže vedou tyto procesy k podpoře tumorózních kožních změn. Tuto hypotézu potvrzují nálezy, které ukazují, že v 87,5 % kožních nádorů u bezsrstých myší po chronické UV expozici byla nalezena mutace v genu p53 (5).

Souhrnem lze o p53 říci, že je tumor supresorovým genem, jehož mutace je nejčastější u nádorových procesů nejen v kůži, ale i u tumorů tlustého střeva a prsu aj. Její role

v rozvoji spinaliomu i bazaliomu je považována za zásadní. Lze ji také nalézt v souvislosti s působením UV záření v prekancerózních procesech jako je aktinická keratóza.

Závěrem je třeba vyzdvihnout mechanismus působení UV záření při vzniku melanomových kožních nádorů ve dvou krocích. Prvním krokem je iniciace, která poškozením DNA způsobuje mutaci a vznik onkogenů (nebo mutaci antionkogenů). V druhé fázi je nutná opakovaná expozice karcinogenu, která vede k mutacím způsobujícím ztrátu kontroly buněčného cyklu. Podle této teorie UV záření působí současně jako iniciátor tak i promotor, což je relativně unikátní postup v procesu vzniku nádorových onemocnění.

## 2. PRAKTICKÁ ČÁST

### OVlivNĚNÍ GENOVÉ EXPRESE U AKTINICKÉ KERATÓZY IMIQUIMODEM, LÁTKOU OVLIVŇUJÍCÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Vlastní výzkumná práce byla zaměřena na aktinickou keratózu a její léčbu. Použití látky ze skupiny imunomodulancí – imiquimodu – je novým léčebným trendem v dermato-

logii. V předložené práci se sledovalo ovlivnění exprese vybraných genů. Výsledky pak přispěly k objasnění účinku imiquimodu, jehož přesný mechanismus nebyl dosud objasněn.

#### 2. 1 Aktinická keratóza jako carcinoma in situ

Aktinická keratóza (AK) patří podle klasické klasifikace mezi prekancerózní stavy s nízkým rizikem vývoje v invazivní spinaliom (SCC) (104). Avšak nová koncepce se snaží AK prezentovat jako počínající stadium onemocnění kontinuálně pokračující v SCC. Nové trendy v klasifikaci se snaží prosadit pojmenování AK jako carcinoma in situ. Lidé s touto diagnózou spadají do vyšší věkové skupiny a převážně se jedná o bělochy, tedy o populaci s vyšší senzitivitou na sluneční záření. Zároveň je v anamnéze důležitá dlouholetá nadměrná expozice slunečnímu záření. Podstata kancerogenního účinku UV záření byla popsána v předchozí kapitole 1.5.

Klinicky se AK jeví jako oválná ložiska šedobílých šupin s červenou spodinou, s teleangiektáziemi, po drobných traumatech snadno krvácející. Mezi typické lokalizace patří části těla vystavené dlouhodobě slunečnímu záření jako je obličej nebo dorsa rukou. Diagnóza se stanovuje většinou z klinického obrazu. Histologicky AK zpočátku nemetastazuje v případě, že pro-

liferace transformovaných neoplastických KC nepřesáhne epidermis. Ovšem v 2-16 % AK progreduje do hlubších struktur tkáně a má tendenci k metastazování, poté mluvíme již o SCC. Cockerell navrhuje novou nomenklaturu postižení podobnou cervikální intraepiteliální neoplasii, která je používána v gynekologii při stanovení nádorového postižení děložního čípku. Pojmenoval postižení AK jako keratinocytární intraepidermální neoplasie (KIN) a odstupňoval KIN do 3 stupňů dle invaze neoplastických buněk (18). Vzhledem k této prognóze by léčba AK měla být dostatečně časná a agresivní. Jen pro připomenutí příloha 11 shrnuje možnosti léčby AK. Čím dříve je léčba AK zavedena, tím úspěšněji je zamezeno potenciální invazi karcinomu, čímž se vyhneme i agresivní léčbě následných malignit.

## MOŽNOSTI LÉČBY AKTINICKÉ KERATÓZY

### I. Obvyklá léčba:

Kryoterapie  
Kyretáž s nebo bez elektrokauterizace  
Lokální 5-fluorouracil

### II. Méně častá léčba:

Dermabraze  
Chemický nebo kryochirurgický peeling  
Laserová léčba  
Tretinoin a jiné topické retinoidy  
Alpha hydroxy kyselina  
Excize  
Fotodynamická terapie  
Topický imunomodulátor imiquimod

### III. Neobvyklá léčba:

Calcitriol a isotretinoin  
Diclofenac v gelu kyseliny hyaluronové  
Salicylová kyselina



## 2. 2 Mechanismus účinku imiquimodu

Jako jeden z nových alternativních postupů léčby AK byl úspěšně klinicky použit topický imunomodulátor imiquimod (IQ). Imiquimod (Aldara, R-837, S-26308) a resiquimod (R-484, S-28463) jsou nízkomolekulární látky, které patří do nové skupiny imunomodulátorů, tzv. imidazochinolinaminů (příloha 12). U těchto molekul byla prokázána antivirová a antitumorózní aktivita *in vitro* i ve studiích zvířecích a klinických (15, 16, 58, 71, 72, 73). V klinické praxi byl od roku 1997 topický IQ 5% krém pro svůj antivirový efekt registrován v USA i v západní Evropě k léčbě condylomata accuminata, klinické manifestaci papilomavirové infekce (HPV). Podstata mechanismu účinku IQ napovídala, že by bylo možno využít IQ i v léčbě jiných kožních virových infekcí, ale i kožních nádorů. Protinádorová aktivita IQ byla prokázána u množství experimentálně transplantovaných tumorů na zvířecích modelech (45). V posledních 3 letech vzhledem k antitumoróznímu efektu byl IQ klinicky testován v nejrůznějších indikacích, např. nemelanomové kožní nádory, ale i kožní lymfomy nebo maligní melanom (134, 145). Od r. 2004 je v USA a západoevropských zemích rozšířeno použití IQ 5% krému na lokální léčbu superficiálního bazaliomu a aktinické keratózy v obličejí a ve vlasaté části hlavy.

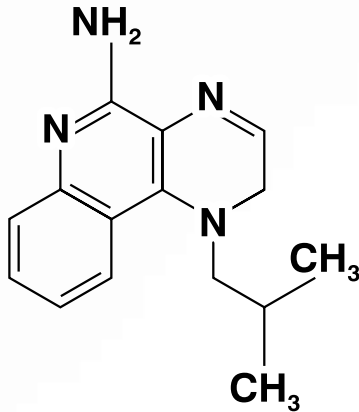
Historie výzkumu působení imidazochinolinů je velmi zajímavá a široká. Ačkoliv přesný mechanismus není doposud znám, bylo dokázáno, že účinek IQ je založen na indukci, syntéze a uvolňování specifických cytokinů např. interferonu- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , interleukinů (IL) - IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 různými typy buněk

(16, 45, 58, 127). Byl pozorován stimulační efekt aktivace NK-buněk, aktivace makrofágů k produkci NO, cytokinů a indukce proliferace a diferenciaci B-lymfocytů (16). IQ potencuje buněčnou imunitu nepřímo stimulací Th1 cytokinů (IFN- $\alpha$ ) a inhibicí Th2 cytokinů (IL-4, IL-5) (127). Ačkoliv hlavní cílovou buňkou působení IQ je makrofág, má IQ vliv i na další buňky imunitní odpovědi, zahrnující epidermální LC, hlavní antigen-presentující buňky v epidermis, ale i polymorfonukleární leukocyty. V *in vitro* studiích s tkáňovými kulturami keratinocytů bylo dokázáno, že IQ ovlivňuje genovou expresi cytokinů a též jejich produkci (58).

V nedávné době bylo ověřeno *in vitro* a na zvířecích modelech, že IQ a resiquimod patří mezi exogenní ligandy Toll-like receptorů 7 a 8 (TLR-7 a TLR-8), což je novým důkazem o ovlivnění vrozené imunitní odpovědi IQ (48). Nové studie popisují zásadní roli ve vrozené ale i získané imunitní odpovědi Toll-like receptorů (TLR) (124). Jsou označovány jako základní receptory k rozeznání specifických molekul asociovaných s patogenem (3). Vazba ligandu s TLR spustí kaskádu procesů, jejichž výsledkem je aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Prozatím je objasněna existence 11 typů savčích TLR a lidských TLR je identifikováno 10 typů (124). Ne u všech z nich jsou známy jejich ligandy. Jsou mezi nimi lipopolysacharidy, peptidoglykany, flagelin nebo bakteriální DNA obsahující nemetylovaný CpG motiv (příloha 13). Příloha 12 přináší přehledové shrnutí účinku IQ na různé typy buněk.

## CHEMICKÁ STRUKTURA A EFEKT IMIQUIMODU

1- (2-methylpropyl) - 1H imidazo [4,5-c] chinolin - 4 amin



### **Indukce exprese** v makrofázích (hlavní cílové buňky)

a) genů účastnících se zánětlivé reakce

- **IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$**

genů kódujících makrofágové proteiny zánětu

- **MIP-1a, MIP-1 $\beta$ , MIP-2a** a potenciální chemoatraktanty neutrofilů

genů transkripčních faktorů

- **IkB-a; IkB- $\beta$**  - regulací proteinů NF-kB/Rel se účastní v regulaci buněčné imunitní odpovědi

- **c-rel** regulace exprese IL-1, TNF- $\alpha$  IL-8

genu **PAI-2** (inhibitor 2 aktivátoru plasminogenu) iniciuje hojení zánětu

b) genu **iNOS** - enzyme zodpovědný za syntézu NO velmi účinný v obraně proti volným radiálům.

c) genu **CD 40** - protein ze skupiny TNF-receptorů antigen-presentujících buněk a genu **ICAM-1** (oba hrají roli v prezentaci antigenu v HLA II systému v T-lymfocytech)

### **Indukce exprese**

genů v lidských PBMC...T-buněk E rosette: CD14+, CD36+, HLA-DR+ monocytech

- **IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8**

### **Indukce exprese in vitro**

genů **IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$**  v keratinocytech

### **Indukce exprese in vivo**

genů v ložiscích condylomata accuminata

- efekt na expresi mRNA těchto cytokinů: **IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 p40,**

**a enzymu 2,5-adenylát syntetáza**

- efekt v keratinocytech - vzrůst exprese markeru diference K10 a fillagrinu

- pokles proliferativních markerů **c-myc** and **PCNA**

- vzestup exprese tumor supresorových genů - **pRb, p53**



## LIDSKÉ TOLL-LIKE RECEPTORY A JEJICH LIGANDY

Rodina Toll-like receptorů	exogenní ligand	endogenní ligand
<b>TLR-1</b> (možná asociace s TLR-2)	mykobakteriální lipoproteiny, lipopeptidy, lipoprotein B. Burgdorferi	neznámý
<b>TLR-2</b> (možná asociace s TLR-1 nebo TLR-6)	lipopolysacharidy, bakteriální peptidoglykany, mykoplazmové a bakteriální lipoproteiny	heat-shock protein 60, surfaktant protein A
<b>TLR-3</b>	Poly (I:C) vírová dsRNA (polyinosin-cytidylová kyselina)	neznámý
<b>TLR-4</b>	lipopolysacharidy, bakteriální peptidoglykany, mykoplazmové a bakteriální lipoproteiny	heat-shock protein 60 a 70, surfaktant protein A
<b>TLR-5</b>	flagellin	neznámý
<b>TLR-6</b> (možná asociace s TLR-2)	mykoplazmové lipoproteiny, bakteriální peptidoglykany	neznámý
<b>TLR-7</b>	syntetický-imiquimod nebo resiquimod, ssRNA bohaté na uridin nebo guanosin (virus chřipky, virus vezikul. stomatitidy)	neznámý
<b>TLR-8</b>	syntetický-imiquimod nebo resiquimod, ssRNA bohaté na uridin nebo guanosin (virus chřipky, virus vezikul. stomatitidy)	neznámý
<b>TLR-9</b>	CpG DNA	dsDNA
<b>TLR-10</b>	neznámý	neznámý

Částečně převzato z Zuany - Amorin, C. a kol., Nature Reviews Drug Discovery 1, 2002.

Vzhledem ke všem dostupným informacím a materiálům jsem se ve svém výzkumu zaměřila na sledování efektu IQ v léčbě AK a na sledování ovlivnění exprese určitých genů, které jsou zajímavé z hlediska působení IQ (IFN- $\alpha$ ,

IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10R, TLR-7 a TLR-8) a z hlediska alterace při tumorózních procesech (p53,  $\alpha$ - a  $\beta$ -kateniny, hurpin a HAX-1). V následující kapitole je nastíněna charakteristika jednotlivých genů.

## 2. 3 Charakteristika sledovaných genů

### Skupina genů související s imunitní odpovědí organismu:

#### Cytokiny a interferony:

Definice cytokinů hovoří o látkách charakteru malých polypeptidových molekul, které jsou secernovány různými druhy buněk po specifické stimulaci. Mají autokrinní, parakrinní a částečně i endokrinní účinky. I přes

jejich souvislost s imunitním systémem nejsou produkovány jen lymfocytárními buňkami a makrofágo-monocytárním komplexem, ale také buňkami neimunologickými jako jsou buňky endotelu nebo KC.

#### Interferon- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )

je cytokin, který má mimo jiné funkci antivirovou a antitumorózní. Jeho gen je kódován skupinou genů (v lidském organismu

14 geny), které jsou lokalizovány na krátkém raménku 9. chromozomu, a jsou přednostně exprimovány buňkami imunitního systému (17).

#### Interleukin 6 (IL-6)

je cytokinem akutní fáze zánětu, chemotakticky působí na leukocyty, které v místě zánětu svou aktivací produkují další množství

prozánětlivých cytokinů, čímž se rozvine kaskáda zánětlivé reakce. Zdrojem IL-6 jsou makrofágy, endoteliální buňky a T- lymfocyty.

#### Tumor nekrotizující faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

je cytokin, který má velmi široké pole působnosti. Patří mezi prozánětlivé cytokiny. TNF- $\alpha$  je hlavním mediátorem akutní fáze zánětlivé reakce. Hlavním biologickým účinkem je stimulace a aktivace neutrofilů a monocytů jako

buněk reagujících na infekční agens a hlavních činitelů ve vrozené imunitní odpovědi při invazi mikroorganismů. Působí mechanismem aktivace exprese nových povrchových receptorů endoteliálních buněk, tzv. adhezivních molekul, které

mění povrch endotelu a dává možnost adheze neutrofilů, monocytů a následně i lymfocytů. Důležité v zánětlivé reakci jsou dále ligandy těchto povrchových receptorů jako jsou integriny a selektiny. TNF- $\alpha$  stimuluje endoteliální

buňky a makrofágy k sekreci tzv. chemokinů, které způsobují leukocytovou chemotaxi. Další důležitou rolí tohoto cytokinu je indukce apoptózy určitých buněk, jejíž přesný mechanismus není znám.

#### **Receptor interleukinu 10 (IL-10R):**

Dalším zkoumaným genem se stal receptor interleukinu 10 (IL-10R). Úloha IL-10 je dá se říci opačná, než je úloha výše zmíněných cytokinů. IL-10 je inhibítozem aktivace makrofágů, což hraje roli v zajištění rovnovážného stavu při vrozené a buněčné imunitní odpovědi organismu. Hlavním zdrojem IL-10 jsou aktivované makrofágy, jejichž funkci inhibuje, což je klasický příklad negativní zpětné vazby. Další buňky, které jsou schopné za určitých okolností produkovat IL-10 jsou T-lymfocyty a též KC.

Co se týče receptoru IL-10, je jeho produkce v jiných než imunitních buňkách kůže velmi protichůdně diskutována (77, 113). Vzhledem k tomu, že IL-10 je pleiotropní imunosupresivní cytokin, předpokládá se, že protizánětlivý komplex IL10/IL-10R představuje mechanismus kontroly úrovně zánětlivé reakce. Některé studie ukázaly spojitost působení vit. D a jeho analogů na expresi IL-10R v epidermálních buňkách *in vitro* (78). Analoga vitamínů D se úspěšně využívají v léčbě psoriázy.

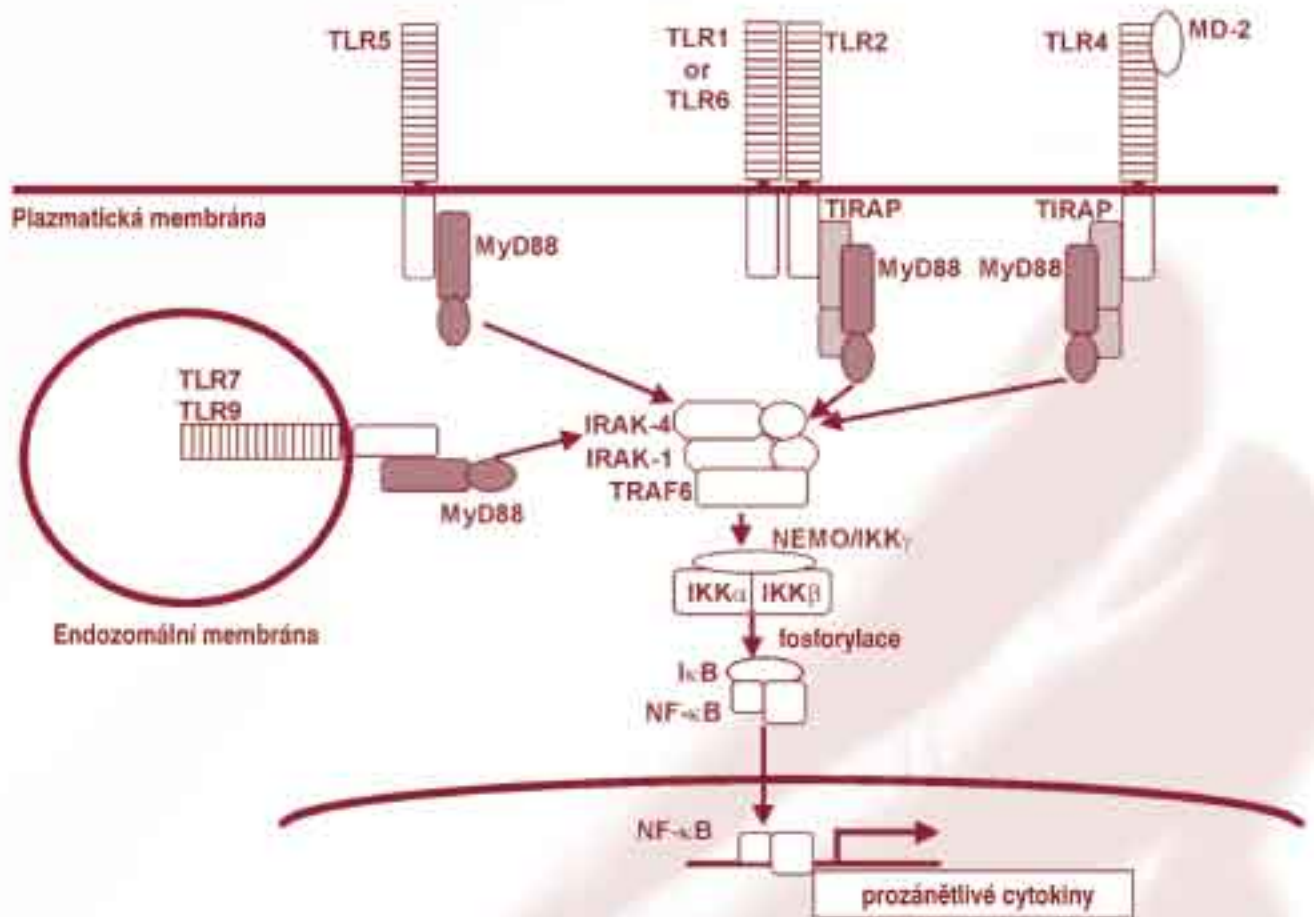
#### **Toll-like receptory 7 a 8:**

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2. Toll-like receptory 7 a 8 patří do rodiny TLR. Tato skupina receptorů je odvozena od Toll receptoru identifikovaného při studiu embryonálního vývoje *Drosophila melanogaster* (10). V roce 1996 bylo objasněno, že tento receptor hraje roli v antifugální obranyschopnosti organismu (64). Následně byla identifikována savčí homologa tohoto receptoru, Toll-like receptory 1-11 (48, 125), a u většiny z nich i ligandy (Příloha 13). Imiquimod jako exogenní ligand TLR-7 spouští při vazbě na receptor signální drá-

hu přes MyD88 (příloha 14). Pro doplnění, nové poznatky ukazují, že spuštění reakce po aktivaci TLR ligandem může probíhat po signální dráze nezávislé na MyD88 (123). Výsledkem stimulace obou signálních drah je aktivace a translokace NF- $\kappa$ B do buněčného jádra, což je nezbytný proces pro produkci prozánětlivých cytokinů (4). Tento proces aktivuje expresi celé řady transkripčních faktorů a jiných genů spřažených s aktivací TLR, tzn. se spuštěním imunitní reakce organismu (92).

## SCHÉMA TLR MyD88 DEPENDENTNÍ SIGNÁLNÍ DRÁHY

výsledným efektem je translokace NF- $\kappa$ B do buněčného jádra a spuštění exprese prozánětlivých cytokinů



Skupina genů alterovaných při tumorózních procesech:

**Hax-1 a hurpin:**

Nové poznatky o těchto genech a jejich účincích při apoptotických procesech, popsané v kapitole 1.3, byly podnětem pro

zkoumání ovlivnění exprese těchto genů při působení IQ na tumorózní proces AK.

**Tumor supresorový gen p53:**

Poznatky výzkumů týkajících se p53 jsou velmi rozsáhlé (viz kap 1.1.2 a 1.5.2). Expozice kůže UV zářením nejenom že aktivuje funkci p53 při eliminaci poškozených a transformovaných buněk, ale způsobuje mutace p53. Tím dochází ke ztrátě normální funkce

v apoptotickém procesu a dochází k vzestupu proliferace a k vzestupu neoplastických procesů v epidermis. Role p53 v patogenezi nemelanomových kožních nádorů je evidentní, otázkou je, do jaké míry klíčová.

**$\alpha$ - a  $\beta$ -kateniny:**

Další geny analyzované naší studií,  $\alpha$ - a  $\beta$ - kateniny, tvoří spolu s E-kadherinem a  $\gamma$ -kateninem komplex, který hraje důležitou roli v buněčné adhezi a v tkáňovém uspořádání. Kromě toho se alterace těchto genů zajímavým

způsobem podílí na progresi epiteliálních neoplázií (47, 49, 143). Alterace a změna funkce těchto molekul způsobí ztrátu intercelulární adheze s možnou následnou transformací, rozvojem tumorózního procesu (31).

## 2. 4 Materiály a metodika

### Klinická část studie

#### Klinické vzorky

Aktinické keratózy, lokalizované na čele, plešaté části hlavy a na končetinách v počtu 91 byly vyšetřovány a léčeny mužům (69,7 %) a ženám (30,3 %) ve věkovém rozmezí 55 až 76 let. Aktinická ložiska byla o celkovém

rozsahu do 30 cm<sup>2</sup>. Diagnóza byla stanovena v jednoznačných případech na základě klinického vyšetření a u čtyř pacientů ověřena histologickým vyšetřením.

#### Schéma léčby a kontrol

Klinická studie zahrnovala fázi přípravou (2 týdny), léčebnou (6 týdnů) a po léčebnou (3 týdny). Pacienti navštívili kliniku a podrobili se vyšetření v týdnu 1, 3, 5, 8 a 12 a dále v průběhu dalších 3-6 měsíců. V přípravné fázi byli pacienti podrobně seznámeni se studií, schématem léčby a detailně poučeni o aplikaci krému a to co se týče rozsahu ošetřované plochy, množství krému, doby působení a i s event. problémy při aplikaci a po ní.

Schéma léčby topickým imunomodulátorem imiquimodem 5% krémem (Aldara cream: 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, USA) bylo stanoveno takto: aplikace krému na ložiska AK o celkovém rozsahu do 25 cm<sup>2</sup> 3x týdně (pondělí, středa, pátek) ve stejnou dobu před spaním, aby doba působení byla nejméně 8 hodin. Celková doba léčby byla naplánována na 6 týdnů.

#### Účinnost a bezpečnost léčby

Pacienti byli při každé návštěvě kliniky vyšetřeni a při poslední kontrole 3 týdny po

V léčebné fázi byly plánovány 2 návštěvy s klinickým vyšetřením a to při zahájení léčby a v průběhu léčby cca v polovině. Další kontroly pacient absolvoval v průběhu léčby při komplikacích nebo nejasnostech s lokálním ošetřováním. U vybraných jedinců byl též proveden v tomto čase bioptický odběr z ošetřované léze.

Poléčebná fáze zahrnovala též dvě kontroly, kdy u zbylých jedinců byla provedena biopsie, zhodnoceny výsledky léčby a pacienti byli poučeni o následné péči zhojených ploch, o ošetřování s použitím krémů s ochrannými UV-filtry. Všichni pacienti byli vyšetřeni v průběhu 3 až 6 měsíců vzhledem k možnosti recidiv onemocnění a ke zhodnocení dlouhodobého efektu léčby nebo odhalení možných komplikací. Pacienti samozřejmě před zahájením studie podepsali informovaný souhlas a zavázali se dodržovat dané instrukce.

léčbě stanovena účinnost léčby dle klinického obrazu. Jako úplné vymizení ložisek byl klinický

obraz posuzován tehdy, když ošetřovaná plocha nejevila klinické známky AK, částečné vymizení ložisek AK v případě, že byla zaznamenána 75% redukce rozsahu postižení kůže AK. Dále byly hodnoceny nežádoucí účinky léčby, které pacienti subjektivně cítili během léčby, a lokální kožní reakce. Zde byla hodnocena v průběhu léčby

### **Biopsie**

Všichni pacienti se podrobili v přípravné fázi bioptickému vyšetření. Po aplikaci lokálního anestetika byly odebrány dvě tangenciální biopsie. První ze zdravé kůže s minimálním poškozením slunečním zářením (z mediální strany paže) a druhá z ložiska AK, které bylo vybráno k pozdější lokální léčbě. Dále v průběhu léčby

míra erytému, edému, erozí až ulcerací, krust a exsudativních ploch. Při vyšetření po léčbě byl posuzován povrch zhojených ploch a okolí, změna pigmentace, případně stupně jizvení nebo atrofie. Vše bylo hodnoceno stupněm 0-3, tj. žádné změny, mírné, střední a silné.

v době maximálního zánětlivého efektu byly biopsie z ložiska odebrány vybraným pacientům. 2-3 týdny po ukončení léčby byly provedeny tangenciální biopsie u zbývajících pacientů ze zhojených ložisek. Vedle molekulární analýzy jsme část vzorků vyšetřili histologicky a to 23,1 % během léčby a 38,5 % vzorků po terapii.

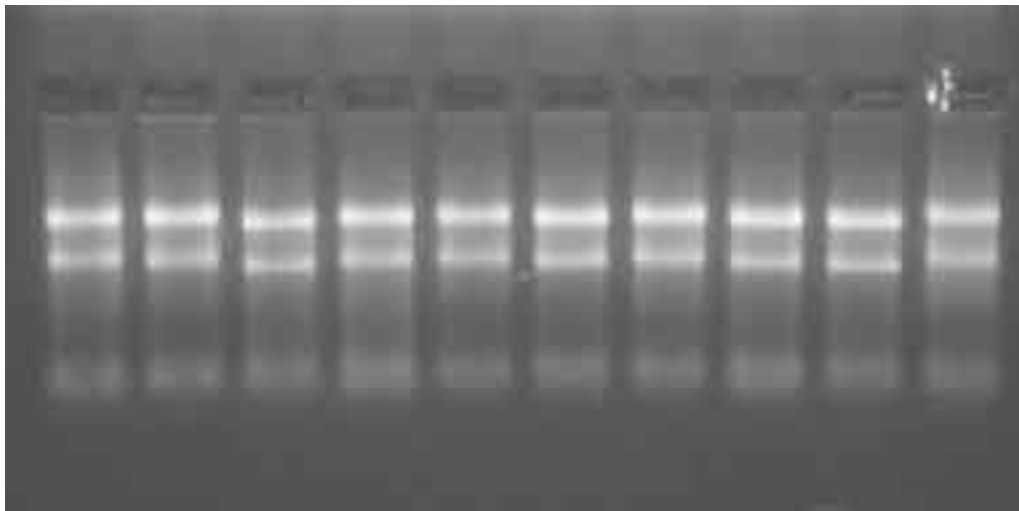
## **Laboratorní část studie**

### **Izolace RNA**

Biopsie byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a poté skladovány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zpracování bioptického materiálu bylo provedeno v identických krocích homogenizace materiálu v mikrodismembrátoru (Braun, Melsungen, SRN) a dále extrakce celkové RNA TRIzol reagentem (Invitrogen, Karlsruhe, SRN). Kvalita RNA byla testována v 1,2% agarózovém gelu vizualizací ethidium bromidem elektroforetický. Kvantita získané RNA byla měřena spektrofotometricky. Příloha 15 ukazuje příklad kvality celkové RNA typických vzorků.

## PŘÍKLAD KVALITY VZORKŮ CELKOVÉ RNA

izolované z biotických materiálů pomocí Trizol reagentia (Invitrogen, Karlsruhe, SRN).  
K elektroforetickému ověření kvality byl použit vždy 1  $\mu$ g izolované RNA.



◀ 28S rRNA

◀ 18S rRNA





### Semikvantitativní RT-PCR

K reverzní transkripci byl použit 1 µg celkové RNA a postupováno podle doporučeného protokolu firmy Invitrogen (Invitrogen™, Karlsruhe, SRN) (příloha 16). Protokol polymerázové řetězové reakce (PCR) je dále shrnut v příloze 17. Podmínky PCR byly optimalizovány pro každý jednotlivý gen. Příklad optimalizace pro TLR-8 je znázorněn v příloze 18. Příloha 19 sumarizuje primery forward a revers jednotlivých genů, dále počet cyklů amplifikace a koncentrace MgCl<sub>2</sub>, při kterých PCR probíhala. Ta při vlastním experimentu byla uskutečňována u každého genu ve 2 různých počtech cyklů a podmínky byly stanoveny takto: 1 min při 95 °C, 1 min při 56 °C, 1 min + 2 s/cyklus při 72 °C. Poslední cyklus byl ukončen přídatným krokem 5 min při 72 °C. PCR produkty byly vizualizovány ethidium bromidem v 1,5% aga-

rózovém gelu elektroforeticky. Intenzity jednotlivých pruhů byly monitorovány denzitometricky a standardizovány intenzitou pruhů β-aktinu, který byl použit jako housekeepingový gen a jehož PCR probíhala souběžně. Kvantifikace intenzity pruhů byla zpracována pomocí PC programu Multimager firmy Biogen. Následně byly PCR produkty jednotlivých genů subklonovány do plasmidu pCR TOPO II a transformovány do *E. coli* TOP 10F' (Invitrogen™, Karlsruhe, SRN). Následně byl DNA plasmid izolován QUIAex (Quiagen, SRN) a verifikována sekvence PCR produktu užitím M13 primerů.

Všechny dosažené výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu a statistická významnost byla stanovena při  $p < 0,05$ .

#### příloha 16

##### Reverzní transkripce dle protokolu firmy Invitrogen

protokol reverzní transkripce	objem n. koncentrace
celková RNA	1 µg
Superscript II	200 U
dithiothreitol	0,01 mmol/l
RT pufr	1x
deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTPs)	0,5 mmol/l
celkový objem	20 µl

#### příloha 17

##### Protokol polymerázové řetězové reakce

protokol PCR	objem n. koncentrace
cDNA	1 µl
primery	0,2 µmo/l
Taq polymeráza	2 U
PCR pufr	10x
MgCl <sub>2</sub> (kromě IFN-α)	1,5 mmol/l
MgCl <sub>2</sub> pro IFN-α	2 mmol/l
dNTPs	0,2 mmol/l
celkový objem	20 µl

## PŘÍKLAD OPTIMALIZACE PCR

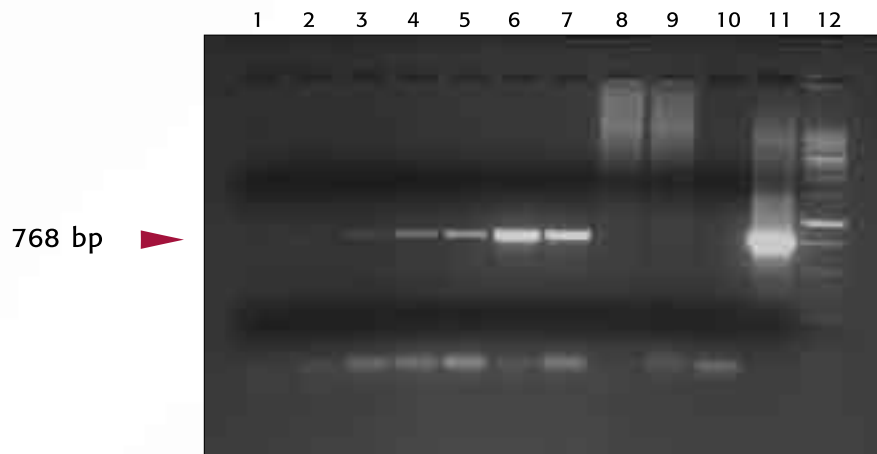
amplifikované fragmenty genu TLR-8 (768 bp).

Pruhy 1 – 6 vzestupný počet amplifikačních cyklů - 26, 28, 30, 32, 34, 36.

Pruhy 7 – 9 vzestupná koncentrace  $MgCl_2$  - 1,5 2,0 a 3 mmol/l.

Pruh 10 a 11 – negativní a pozitivní kontrola

Pruh 12 – velikostní DNA marker. - 1 kb



## TABULKA SHRNUJÍCÍ UKAZATELE PCR SLEDOVANÝCH GENŮ

geny	velikost fragmentu	počet cyklů	forward primers	reverse primers	c [MgCl <sub>2</sub> ]
IL-10R	439 bp	31,32	ccatcttgctgacaacttc	gtgtctgatactgtcttggc	1,5 mM
p53	566 bp	31,32	accagggcagctacggttgc	tcttgaggagattctcttc	1,5 mM
α-katenin	641 bp	31,32	acatctgcagcaaggtcaag	tcggcttggtcagagcttac	1,5 mM
β-katenin	704 bp	30,31	agaatgcagttcgccttcac	gatagctaggatcatcctgg	1,5 mM
Hurpin	522 bp	30,31	taagggcaatgggacaggag	ggatgtgacagtaaagcctatg	1,5 mM
HAX-1	587 bp	30,31	gtagccagatagtcaccagc	gtgagtgacaaaactgacatg	1,5 mM
TNF-α	610 bp	31,32	aggacgaacatccaaccttc	tacatgggaacagcctattg	1,5 mM
IFN-α	385 bp	35,36	gaatctctctttctctctgc	gggatctcatgatttctgctc	2 mM
IL-6	586 bp	32,33	tgaactccttccaccagc	gcgcagaatgagatgagttg	1,5 mM
β-aktin	447 bp	23,24	agagatggccacggctgctt	atttgcggtggacgatggag	1,5 mM
TLR-7	437 bp	32,33	gatgcctccagttgcatatc	gcaacagtctggtgatattagacg	1,5 mM
TLR-8	768 bp	33,34	ctgctgctgagtcataacag	ccatgttctcatccattagc	1,5 mM

**2. 5 Výsledky****Klinické výsledky**

Od ledna 2002 do října 2002 bylo vyhodnoceno 91 patientských vzorků. Všechny

subjekty absolvovaly kompletní léčebný a follow-up cyklus.

**Účinnost léčby**

Výsledný klinický efekt IQ byl velmi dobrý (příloha 20). V 53,9 % případů se znamenalo úplné vymizení ložisek AK po aplikaci IQ, 38,5 % vykazovalo známky částečného vymizení postižení AK, v 7,6 % byla zjištěna nereakce na léčbu.

Klinická reakce postižené kůže na aplikaci krému byla výrazná, ve smyslu typické zánětlivé reakce s jasně červeným erytémem, edémem, místy se tvořily eroze a krusty. Na zhojených ložiscích přetrvával erytém ještě

týdny po ukončení léčby. Příloha 21 hodnotí lokální kožní reakce. Jako nejčastější nežádoucí účinek bylo zaznamenáno svědění kůže v místě aplikace (38,5 % případů), dále pálení a citlivost kůže v místě aplikace (23,1 % případů). U dalších 23,1 % případů byly pozorovány celkové příznaky ve smyslu mírné únavy a bolesti hlavy. Celkové obtíže ve smyslu chřipkových symptomů, tzn. febrilie, únava, myalgie a noční pocení byly pozorovány v 7,6 %.

**Histologie**

Biopsie ložisek před léčbou byla histologicky verifikovaná jako AK a histologický obraz biopsií odebraných z ložisek během léčby ukázal výraznou zánětlivou infiltraci histiocytů a lymfocytů. Histologie vzorků odebraných po

terapii IQ byla bez známek AK v 92,4 % případů, ale částečně přetrvávala zánětlivá lymfocytární infiltrace, čímž je možno vysvětlit přetrvávající erytém zhojených ložisek po dobu několika týdnů po terapii IQ.

**Shrnutí klinických výsledků**

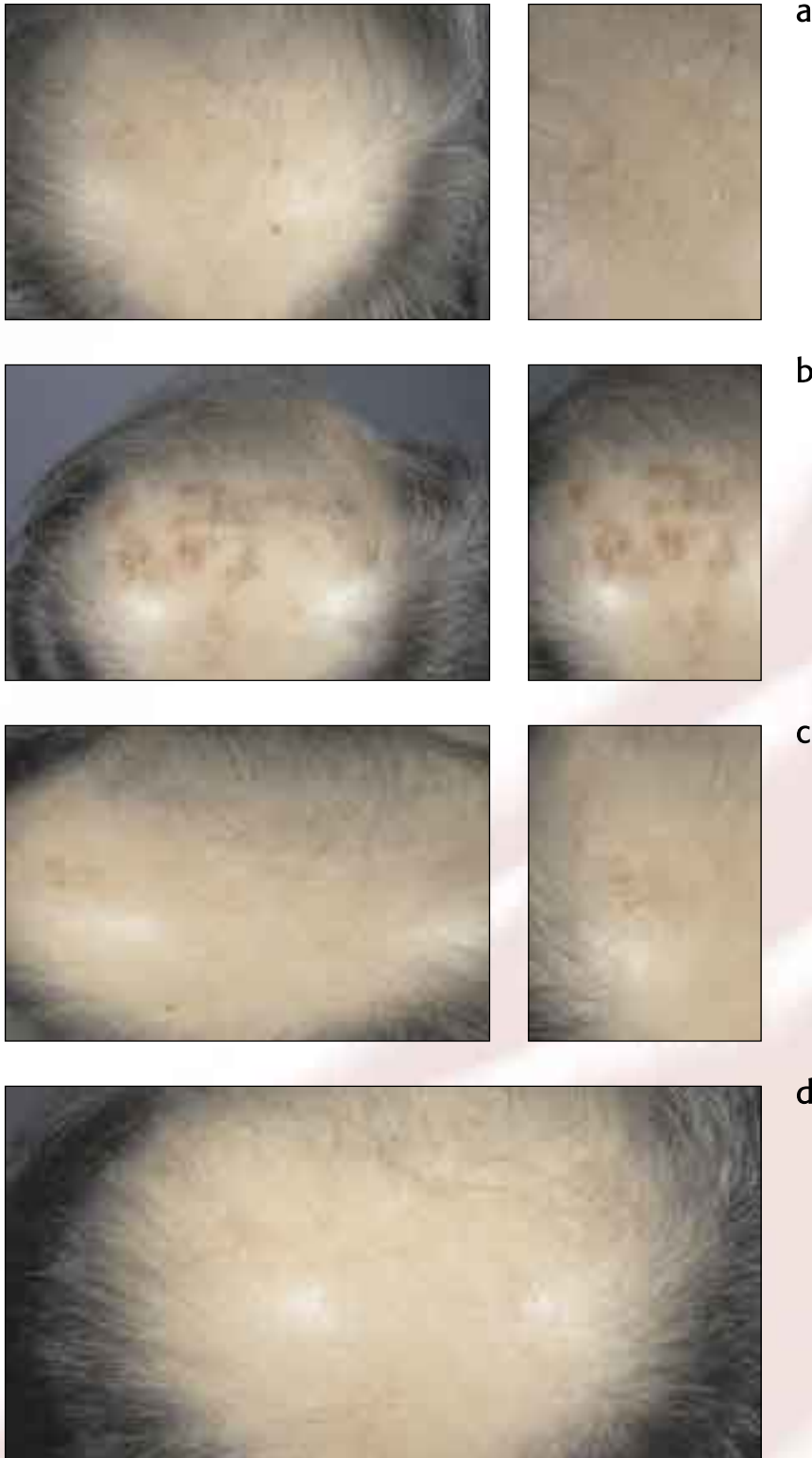
Kosmeticky byl efekt terapie uspokojivý, všichni pacienti byli s výsledky léčby spokojeni. Nejčastější nežádoucí účinek léčby byl pruritus.

Ve většině případů v následujících 10 měsících od ukončení terapie se neobjevila na léčených místech nová ložiska AK. Jen jeden pa-

cient s diagnózou revmatoidní artritidy s trvalou imunosupresivní medikací absolvoval přídatné léčebné pulzy po 4 a 8 týdnech.

## KLINICKÝ EFEKT IMIQUIMODU

Ložiska aktinické keratózy na hlavě před začátkem (a),  
3 týdny po zahájení léčby imiquimodem (b) a dále 3 týdny (c)  
a 17 týdnů (d) po ukončení terapie topickým imiquimodem.



## LOKÁLNÍ KOŽNÍ REAKCE (%)

lokální kožní reakce v průběhu léčby	intenzita			
	0	1	2	3
erytém	7,6	23,1	7,8	61,5
edém	10,5	56,1	33,4	0
eroze-ulcerace	12,6	46,2	34,8	6,4
krusty exsudativní plochy	35,5	41,4	23,1	0

lokální kožní reakce po léčbě	0	1	2	3
erytém	13,5	40,7	45,8	0
povrch	64,2	35,8	0	0
okolí	97,5	2,5	0	0
hyperpigmentace	81,3	10,3	8,4	0
jizvení event. atrofie	84,4	15,6	0	0

## Laboratorní výsledky

### Skupina genů související s imunitní odpovědí organismu:

#### Expresie cytokinů:

Zkoumání exprese skupiny cytokinů (IFN- $\alpha$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ ) a 1 cytokinového receptoru (IL-10R) bylo inspirováno klinickým pozorováním lokální zánětlivé reakce v místě aplikace IQ a též dostupnými informacemi o účincích IQ.

Expresie mRNA IFN- $\alpha$  v našich experimentech vykazovala individuální rozdíly. IFN- $\alpha$  jako hlavní cytokin s antivirovým efektem byl před terapií IQ ve zdravé tkáni a v AK exprimován bez signifikantních rozdílů. Expresie v průběhu terapie vykazovala téměř dvojnásobný vzestup. Ve vzorcích odebraných po terapii IQ poklesla exprese mRNA IFN- $\alpha$  opět na hodnoty srovnatelné s expresí před terapií (příloha 22).

V příloze 23 je jasně vidět signifikantní rozdíl v expresi IL-6 ve zdravé tkáni a v AK, kde byla exprese 7x vyšší. Vliv IQ na expresi IL-6 je

též jednoznačně prokázán. Vzestup exprese v AK před terapií v porovnání s expresí v průběhu léčby je pětinasobný. IL-6 v AK po terapii byl exprimován ve stejné intenzitě jako v AK před terapií.

Dalším analyzovaným genem byl gen pro TNF- $\alpha$ , prozánětlivý cytokin s pleiotropními účinky. Na úrovni mRNA exprese byly hodnoty ve zdravé tkáni, v AK před terapií signifikantně rozdílné, zato během a po terapii IQ bez signifikantních změn (příloha 24).

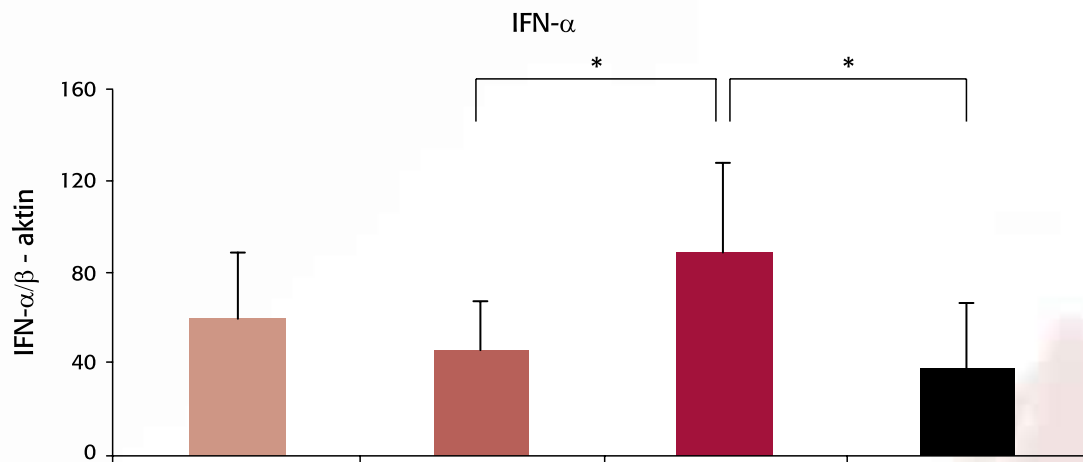
Kromě účinků IQ na Th1-cytokiny byl dalším zkoumaným genem v tomto experimentu IL-10R. Expresie tohoto receptoru byla srovnatelná ve zdravé tkáni a v AK před léčbou, dále byl pozorován vzestup exprese (1,2x) během terapie. Po léčbě se opět upravila exprese receptoru na hodnoty ve zdravé tkáni (příloha 25).

#### Expresie TLR-7 a TLR-8:

V našem výzkumu jsme se zaměřili na expresi mRNA TLR-7 a TLR-8, důležitých receptorů v iniciaci vrozené a získané imunitní odpovědi. V případě obou genů byla exprese v neléčené AK zvýšená (2x a 1,6x) oproti zdravé nepostížené kůži. Další vzestup (2,5x) exprese

během léčby AK IQ byl pozorován v případě TLR-7 a poté pokles na úroveň exprese v AK před léčbou. Oproti tomu exprese TLR-8 byla mírně, ale statisticky nevýznamně ovlivněna IQ (příloha 26).

## GRAF SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR IFN- $\alpha$



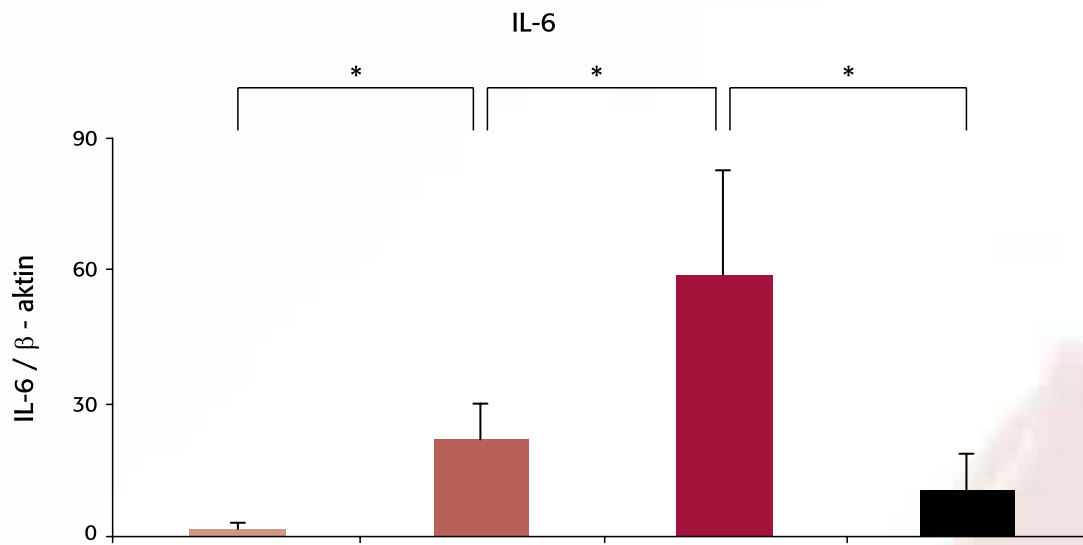
### Expres mRNA IFN- $\alpha$ vztažená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu



## GRAF SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR IL-6



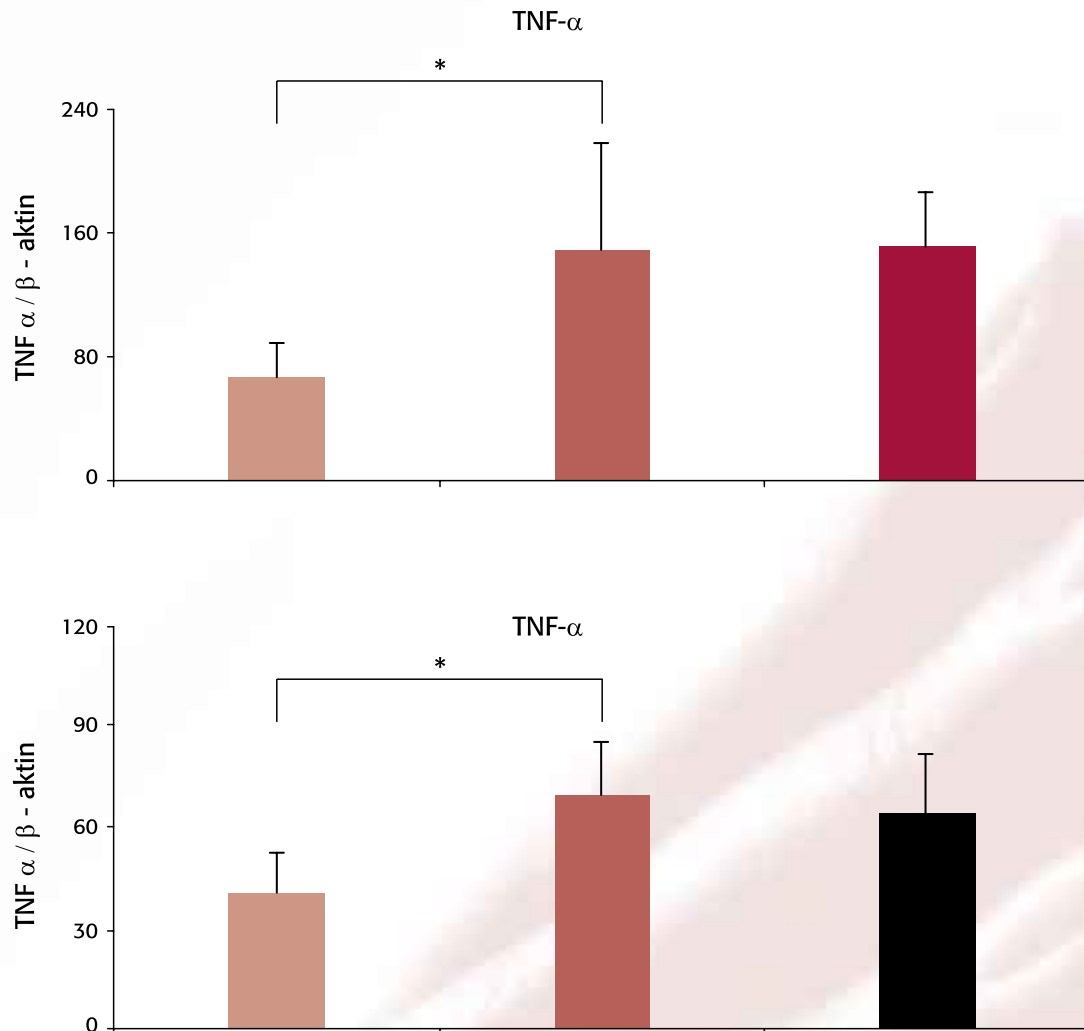
### Exprese mRNA IL-6 vztažená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu

## GRAFY SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR TNF- $\alpha$

Výsledky jsou interpretovány ve 2 grafech vzhledem k tomu, že při kvantifikaci intenzity pruhů jsme zaznamenali v obou PCR experimentech velké rozdíly při porovnání vzorků zdravé kůže a taktéž vzorků AK před terapií, takže by při sumaci obou grafů došlo ke zkreslení výsledků.

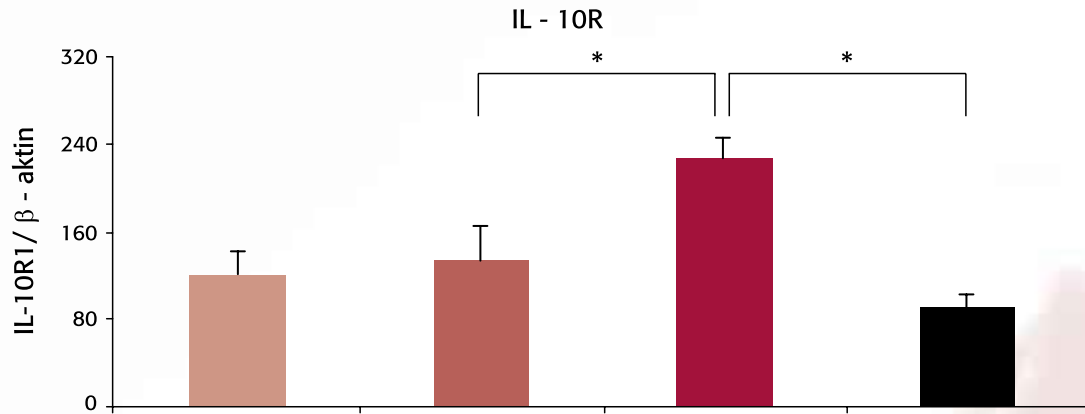


### Expresa mRNA TNF- $\alpha$ vztažená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu

## GRAF SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR IL - 10R

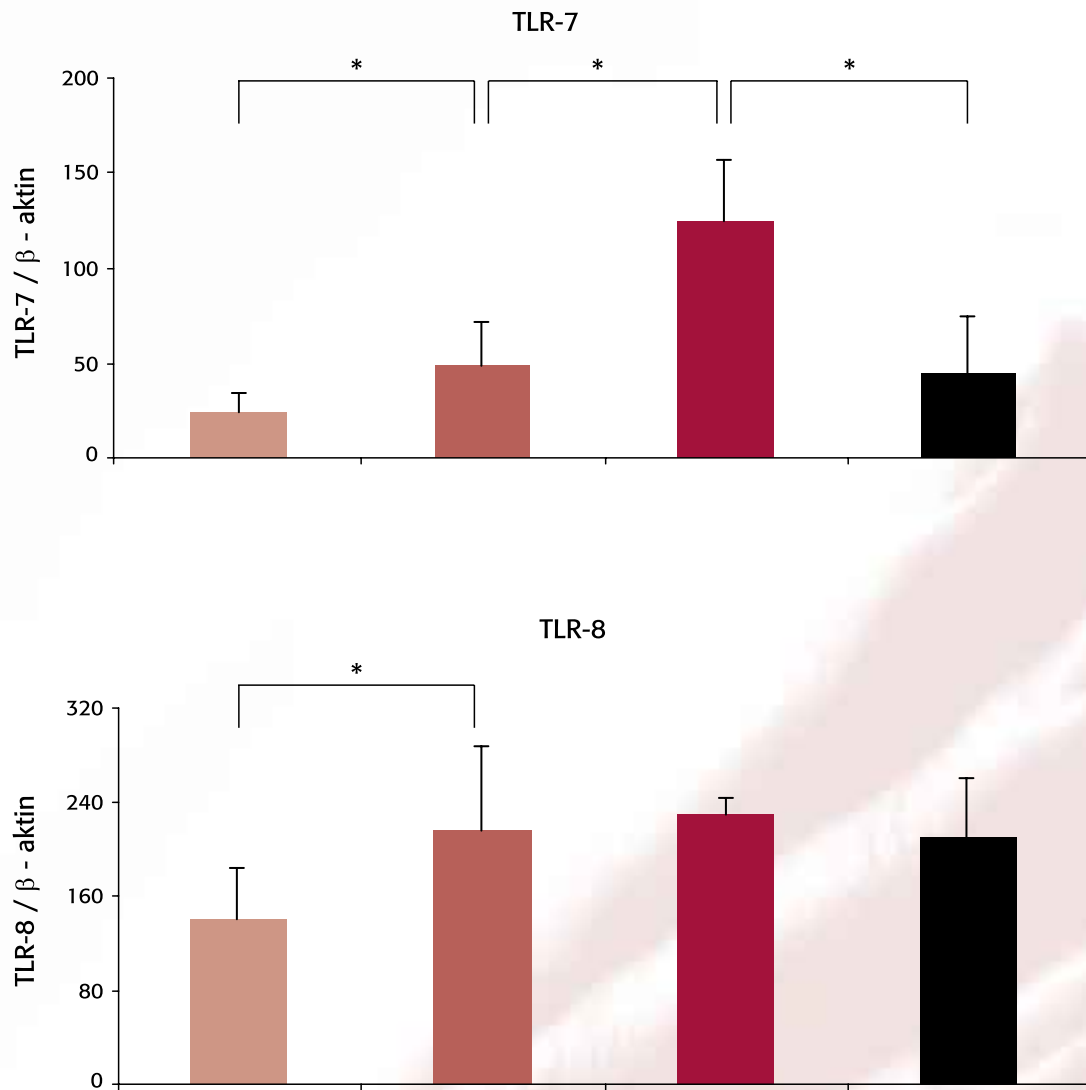


### Exprese mRNA IL - 10R vztažená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu

## GRAFY SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR TLR-7 a TLR-8



### Exprese mRNA TLR-7, resp. TLR-8 vztažená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu

**Skupina genů alterovaných při tumorózních procesech:****Expresse antiapoptotických genů a p53:**

Vzhledem k tomu, že se předpokládá, že při eliminaci AK působením IQ dochází k blokadě proliferace abnormálních, neoplastických KC a k indukci apoptózy, byla sledována expresse potenciálně antiapoptotických genů, hurpinu a HAX-1. V porovnání zdravé tkáně a AK před terapií byla expresse hurpinu 1,5 vyšší v AK. Na rozdíl od toho expresse Hax-1 nebyla ve zdravé tkáni a v porovnání s AK před léčbou statisticky významně změněná. V případě obou

genů jsme však našli statisticky významný pokles expresse během léčby IQ (0,2x), po léčbě nastala opět úprava do stavu, jaký byl před terapií (příloha 27).

Příloha 28 ukazuje výsledky našich experimentů týkající se expresse mRNA p53. Z grafu je vidět, že expresse mRNA p53 ve zdravé a postižené tkáni byla srovnatelná a ani terapie IQ neovlivnila jeho expresi.

**Expresse  $\alpha$ - a  $\beta$ - kateninů:**

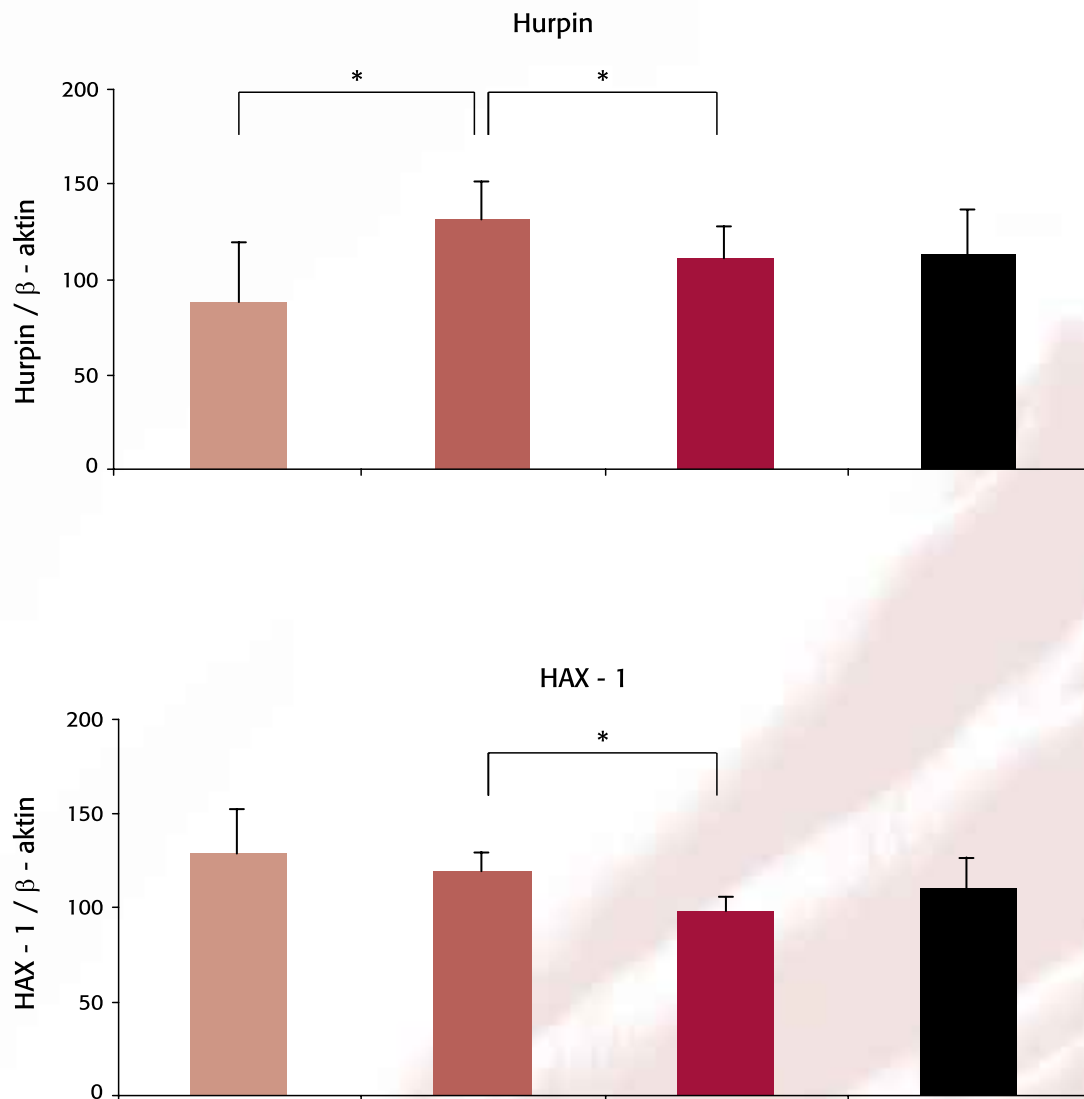
Další geny analyzované naší studií,  $\alpha$ -  $\beta$ - kateniny, tvoří spolu s E-kadherinem a  $\gamma$ -kateninem komplex, který hraje důležitou roli v buněčné adhezi a v tkáňovém uspořádání. Naše výsledky ukázaly individuální roz-

díly v expresi mRNA  $\alpha$ - a  $\beta$ - kateninu, ale po statistickém zpracování nebyl pozorován vliv IQ na expresi těchto adhezivních molekul, ani rozdíly v expresi ve zdravé tkáni a AK (příloha 29 a 30).

Přílohy 31 - 42 dávají nahlédnout do statistických výpočtů a příkladů kvantifikace RT-PCR všech sledovaných genů a dále předkládá

příklady vizualizace amplikonů jednotlivých genů v agarózovém gelu.

## GRAFY SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR Hurpinu a HAX-1

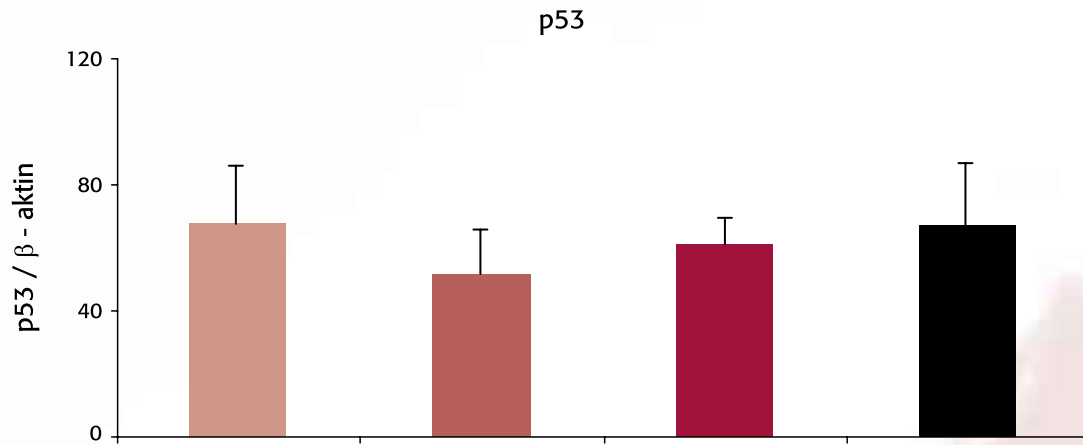


### Expres mRNA hurpinu, resp. HAX-1 vztahená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu

## GRAF SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR p53



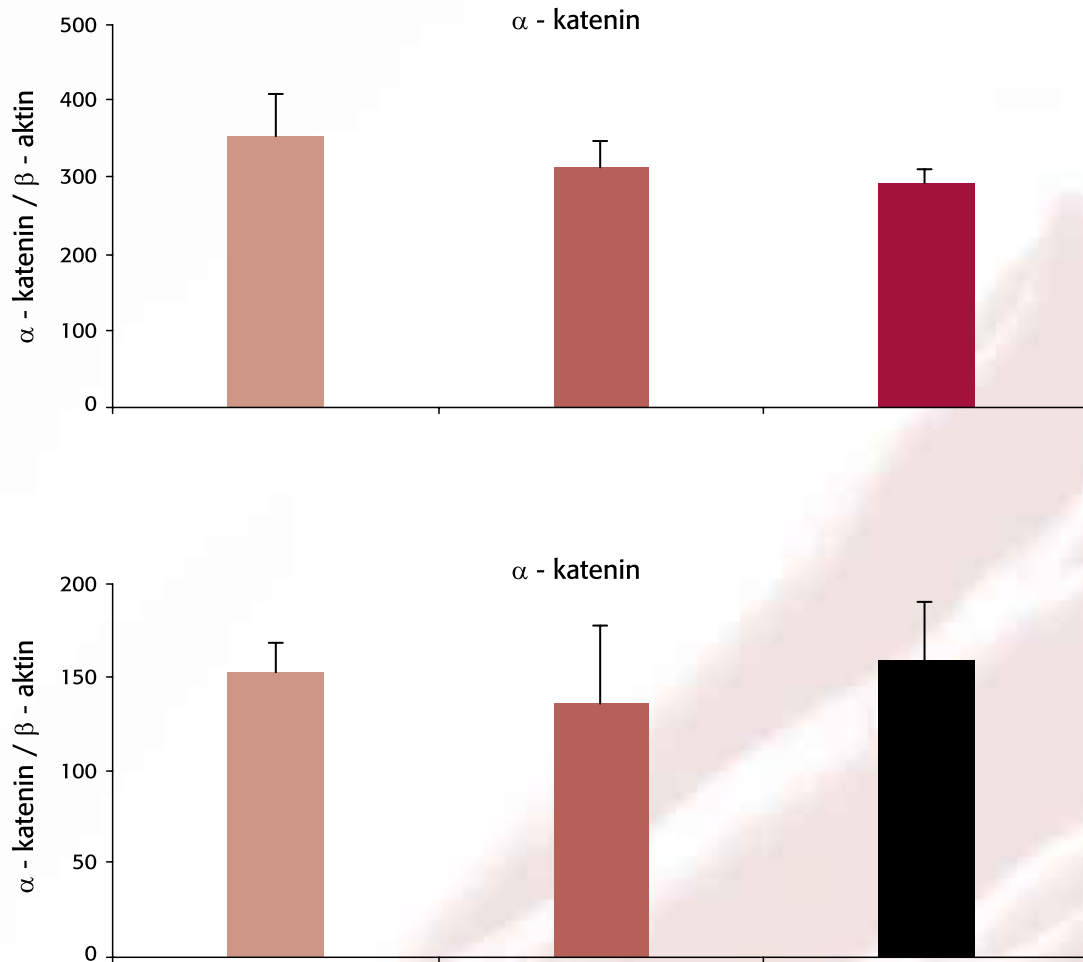
### Expres mRNA p53 vztažená k β-aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu

## GRAFY SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR $\alpha$ -kateninu

Výsledky jsou interpretovány ve 2 grafech vzhledem k tomu, že při kvantifikaci intenzity pruhů jsme zaznamenali v obou PCR experimentech velké rozdíly při porovnání vzorků zdravé kůže a také vzorků AK před terapií, takže by při sumaci obou grafů došlo ke zkreslení výsledků.



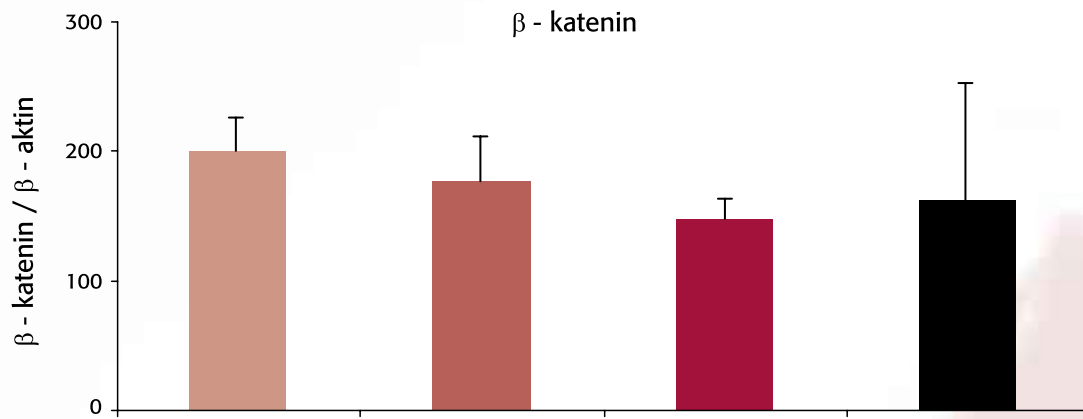
### Exprese mRNA $\alpha$ -kateninu vztážená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

\* označení statisticky signifikantního rozdílu



## GRAF SEMIKVANTITATIVNÍ RT-PCR $\beta$ -kateninu

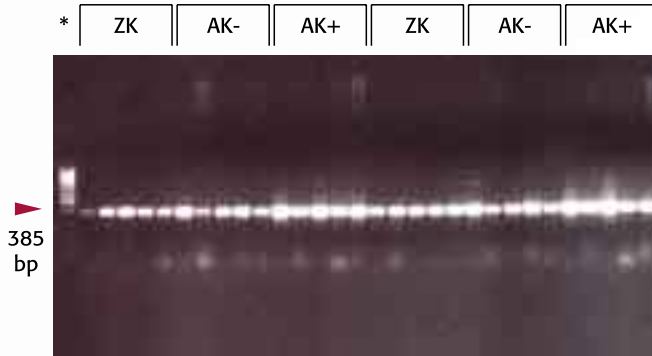


### Expres mRNA $\beta$ -kateninu vztažená k $\beta$ -aktinu

- ve zdravé kůži
- před léčbou v ložiscích aktinické keratózy
- v průběhu
- po léčbě imiquimodem

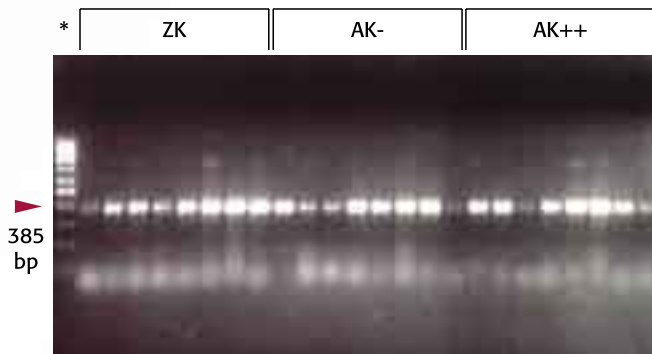
\* označení statisticky signifikantního rozdílu

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR IFN- $\alpha$



geny	vzorky zdravé kůže					
	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
$\beta$ -aktin	423,37	332,68	438,86	550,39	602,36	590,94
IFN- $\alpha$	269,04	389,94	418,64	399,97	143,48	397,06
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	63,55	117,21	95,39	72,67	23,82	67,19

geny	vzorky aktinické keratózy před terapií					
	P5	P6	P7	P8	P9	P10
$\beta$ -aktin	677,51	783,46	643,6	769,41	714,69	724,92
IFN- $\alpha$	262,79	409,36	108,46	326,60	261,58	307,49
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	38,79	52,25	16,85	42,45	36,60	42,42



geny	vzorky aktinické keratózy během terapie					
	B5	B6	B7	B8	B9	B10
$\beta$ -aktin	806,22	859,70	803,25	950,36	901,09	955,90
IFN- $\alpha$	1021,11	473,14	859,85	1219,26	606,32	519,34
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	126,65	55,04	107,05	128,29	67,29	54,33

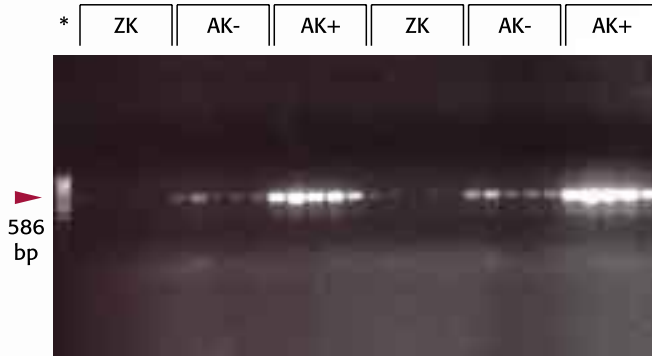
geny	vzorky aktinické keratózy po terapii					
	L5	L6	L7	L8	L9	L10
$\beta$ -aktin	703,19	810,84	771,18	527,45	888,44	758,82
IFN- $\alpha$	266,28	321,72	419,76	512,30	223,46	95,31
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	37,87	39,68	54,43	97,13	25,15	12,56

### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

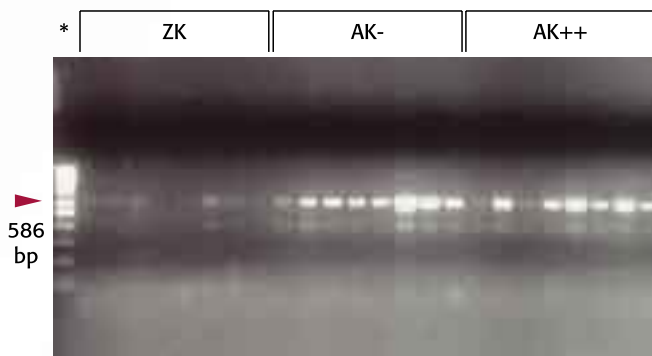
T-test-IFN- $\alpha$	
ZV/AK před terapií	0,22317
ZV/AK během terapie	0,05707
ZV/AK po terapii	0,10907
AK před terapií / během terapie	0,01044
AK před terapií / po terapii	0,43787
AK během terapie / po terapii	0,00611

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR IL-6



vzorky zdravé kůže						
geny	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
$\beta$ -aktin	423,37	332,68	438,86	550,39	602,36	590,94
IL-6	6,68	14,04	3,30	4,48	10,89	14,59
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	1,58	4,22	0,75	0,81	1,81	2,47

vzorky aktinické keratózy před terapií						
geny	P5	P6	P7	P8	P9	P10
$\beta$ -aktin	730,88	686,50	960,54	762,78	959,38	832,76
IL-6	29,10	53,85	119,45	59,53	84,08	80,78
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	3,98	7,84	12,44	7,80	8,76	9,70



vzorky aktinické keratózy během terapie						
geny	B5	B6	B7	B8	B9	B10
$\beta$ -aktin	863,32	806,22	859,70	803,25	950,36	901,09
IL-6	712,15	430,55	430,83	169,27	601,19	930,09
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	82,49	53,40	50,11	21,07	63,26	103,22

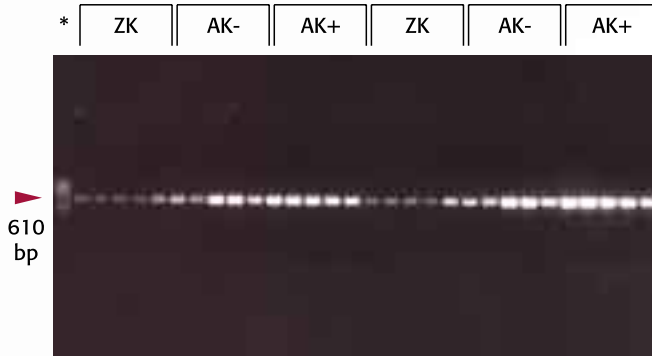
vzorky aktinické keratózy po terapii						
geny	L5	L6	L7	L8	L9	L10
$\beta$ -aktin	703,19	810,84	649,41	748,16	527,45	758,82
IL-6	22,14	100,69	13,34	49,82	47,95	40,70
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	3,15	12,42	2,05	6,66	9,09	5,36

### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

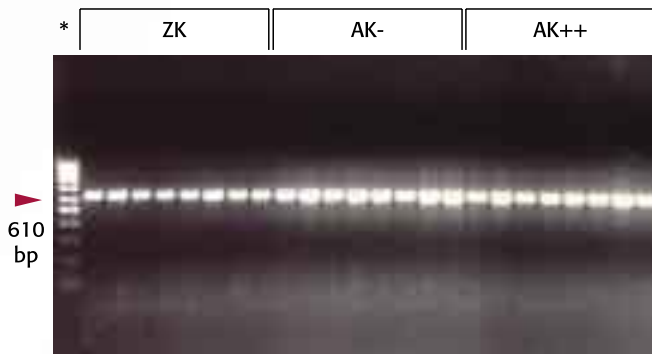
T-test IL-6	
ZV/AK před terapií	0,00329
ZV/AK během terapie	0,00003
ZV/AK po terapii	0,01860
AK před terapií / během terapie	0,00006
AK před terapií / po terapii	0,89008
AK během terapie / po terapii	0,00006

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR TNF- $\alpha$



vzorky zdravé kůže						
geny	Z5	Z6	Z7	Z11	Z12	Z13
$\beta$ -aktin	609,44	400,37	450,34	426,87	740,75	529,54
IL-6	125,42	196,86	124,60	395,01	346,71	546,69
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	20,58	49,17	27,67	92,54	46,81	103,24

vzorky aktinické keratózy před terapií						
geny	P5	P6	P7	P11	P12	P13
$\beta$ -aktin	714,69	724,92	646,56	730,88	686,50	832,76
IL-6	326,73	459,26	549,69	1377,92	858,67	1205,31
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	45,72	63,35	85,02	188,53	125,08	144,74



vzorky aktinické keratózy během terapie						
geny	L5	L6	L7	L8	L9	L10
$\beta$ -aktin	806,22	859,70	803,25	950,36	901,09	1022,45
IL-6	1242,8	979,05	923,95	1977,79	1892,07	1460,65
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	154,15	113,88	115,03	208,11	209,98	142,86

vzorky aktinické keratózy po terapií						
geny	B5	B6	B7	B8	B9	B10
$\beta$ -aktin	703,19	810,84	649,41	748,16	771,18	527,45
IL-6	202,94	564,69	278,98	383,84	339,98	128,55
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	28,86	69,64	42,96	51,30	44,09	24,37

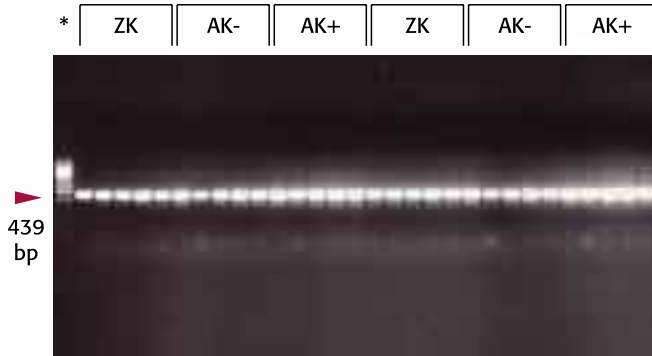
### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapií  
 \* DNA marker

T-test TNF- $\alpha$ k 1. grafu	
ZV/AK před terapií	0,003765
ZV/AK během terapie	0,92309
AK před terapií / během terapie	0,000021

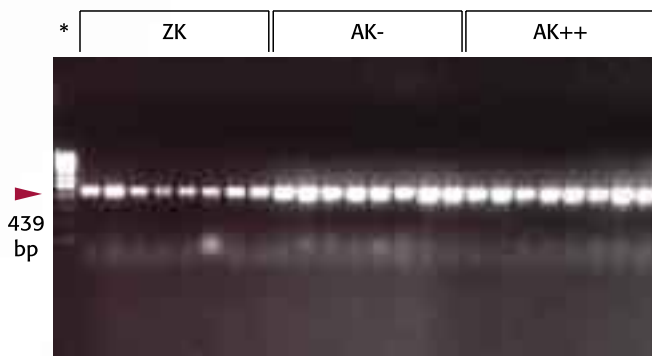
T-test TNF- $\alpha$ k 2. grafu	
ZV/AK před terapií	0,000348
ZV/AK po terapií	0,509473
AK před terapií / po terapií	0,000386

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR IL-10R



geny	vzorky zdravé kůže					
	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
β-aktin	400,37	332,68	438,86	602,36	590,94	774,91
IL-6	420,62	189,05	269,08	939,19	1092,45	1221,42
(IFN-α/β-aktin)*100	105,06	56,83	61,31	155,92	184,87	157,62

geny	vzorky aktinické keratózy před terapií					
	P5	P6	P7	P8	P9	P10
β-aktin	724,92	783,46	833,38	710,09	646,56	590,02
IL-6	418,77	912,28	841,91	1465,43	624,25	1175,72
(IFN-α/β-aktin)*100	57,77	116,44	101,02	206,37	96,55	199,27



geny	vzorky aktinické keratózy během terapie					
	B5	B6	B7	B8	B9	B10
β-aktin	863,32	806,22	859,70	803,25	950,36	901,09
IL-6	1624,11	1908,96	1951,85	1883,38	2259,9	2011,6
(IFN-α/β-aktin)*100	188,12	236,78	227,04	234,47	237,79	223,24

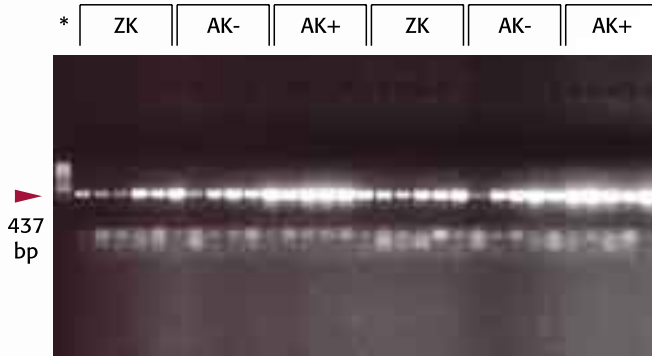
geny	vzorky aktinické keratózy po terapii					
	L5	L6	L7	L8	L9	L10
β-aktin	810,84	649,41	748,16	771,18	527,45	888,44
IL-6	774,27	416,39	711,95	763,92	452,28	945,59
(IFN-α/β-aktin)*100	95,49	64,12	95,16	99,06	85,75	106,43

### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

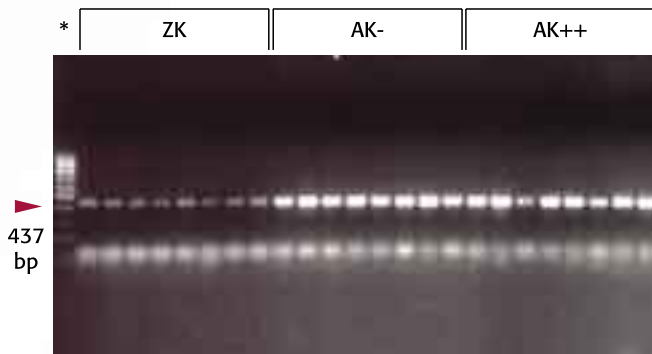
T-test IL-10R	
ZV/AK před terapií	0,61809
ZV/AK během terapie	0,00002
ZV/AK po terapii	0,03871
AK před terapií / během terapie	0,00000
AK před terapií / po terapii	0,00248
AK během terapie / po terapii	0,00000

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR TLR-7



vzorky zdravé kůže						
geny	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
β-aktin	332,68	438,86	550,39	602,36	590,94	426,87
IL-6	62,87	39,55	68,42	219,72	143,28	103,51
(IFN-α/β-aktin)*100	18,90	9,01	12,43	36,48	24,25	24,25

vzorky aktinické keratózy před terapií						
geny	P5	P6	P7	P8	P9	P10
β-aktin	833,38	710,09	960,54	590,02	730,88	686,50
IL-6	259,15	748,84	844,43	368,48	735,68	395,09
(IFN-α/β-aktin)*100	31,10	105,46	87,91	62,45	100,66	57,55



vzorky aktinické keratózy během terapie						
geny	B5	B6	B7	B8	B9	B10
β-aktin	806,95	863,32	806,22	859,70	803,25	950,36
IL-6	1479,29	751,84	1252,39	1286,83	1166,79	1240,24
(IFN-α/β-aktin)*100	183,32	87,09	155,34	149,68	145,26	130,50

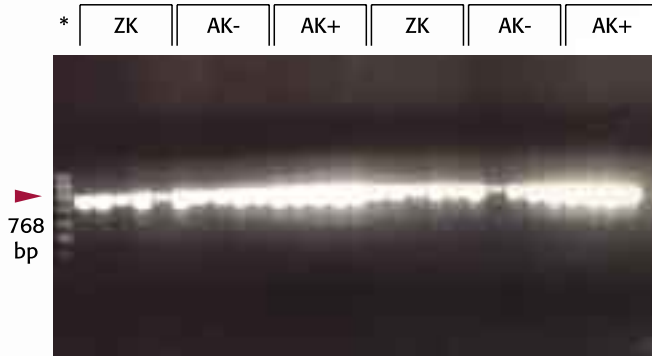
vzorky aktinické keratózy po terapii						
geny	L5	L6	L7	L8	L9	L10
β-aktin	703,19	810,84	748,16	771,18	888,44	758,82
IL-6	326,60	758,39	470,50	478,53	523,95	111,49
(IFN-α/β-aktin)*100	46,45	93,53	62,89	62,05	58,97	14,69

### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

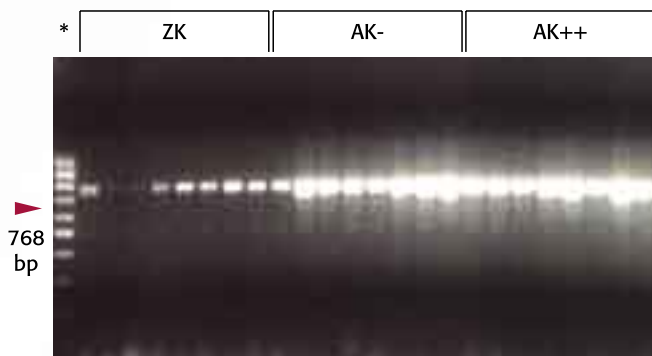
T-test TLR-7	
ZV/AK před terapií	0,00610
ZV/AK během terapie	0,00000
ZV/AK po terapii	0,15241
AK před terapií / během terapie	0,00006
AK před terapií / po terapii	0,62724
AK během terapie / po terapii	0,00012

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR TLR-8



vzorky zdravé kůže						
geny	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
$\beta$ -aktin	400,37	450,34	460,9	423,37	332,68	438,86
IL-6	569,53	361,78	252,34	453,92	550,83	465,29
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	142,25	80,33	54,75	107,22	165,57	106,02

vzorky aktinické keratózy před terapií						
geny	P5	P6	P7	P8	P9	P10
$\beta$ -aktin	769,41	714,69	724,92	783,46	833,38	710,09
IL-6	2763,64	1514,07	787,91	2506,45	2350,89	1962,95
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	359,19	211,85	108,69	319,92	282,09	276,44



vzorky aktinické keratózy během terapie						
geny	B5	B6	B7	B8	B9	B10
$\beta$ -aktin	806,22	859,70	803,25	950,36	901,09	1022,45
IL-6	2087,6	2288,05	2137,29	2029,59	1788,36	1904,22
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	258,94	266,15	266,08	213,56	198,47	186,24

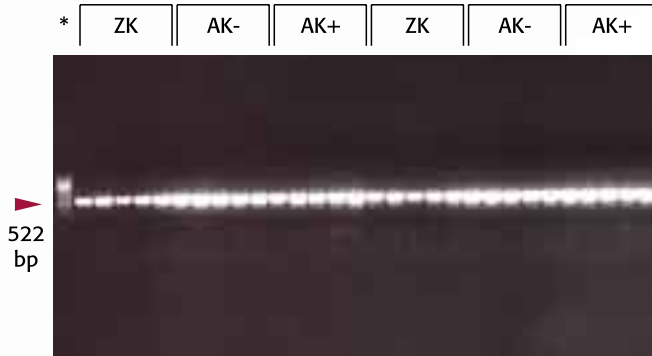
vzorky aktinické keratózy po terapii						
geny	L5	L6	L7	L8	L9	L10
$\beta$ -aktin	703,19	810,84	649,41	748,16	771,18	527,45
IL-6	1703,69	1343,91	776,13	1673,01	2247,63	1144,13
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	242,28	165,74	119,51	223,62	291,45	216,92

### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

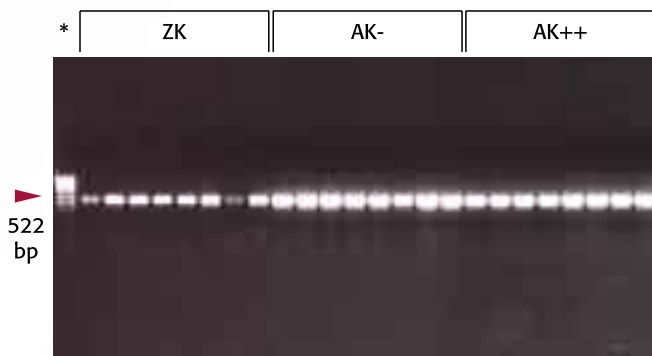
T-test TLR-8	
ZV/AK před terapií	0,00511
ZV/AK během terapie	0,00003
ZV/AK po terapii	0,00878
AK před terapií / během terapie	0,43230
AK před terapií / po terapii	0,89689
AK během terapie / po terapii	0,33402

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR HURPINU



vzorky zdravé kůže						
geny	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
$\beta$ -aktin	450,34	460,9	423,37	332,68	438,86	550,39
IL-6	387,80	295,15	350,59	523,39	98,13	442,79
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	86,11	64,04	82,81	157,33	22,36	80,45

vzorky aktinické keratózy před terapií						
geny	P5	P6	P7	P8	P9	P10
$\beta$ -aktin	783,46	833,38	710,09	646,56	590,02	730,88
IL-6	1032,45	1049,06	967,37	1206,26	988,45	965,27
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	131,78	125,88	136,23	186,57	167,53	132,07



vzorky aktinické keratózy během terapie						
geny	B5	B6	B7	B8	B9	B10
$\beta$ -aktin	859,70	950,36	901,09	1022,45	963,61	955,90
IL-6	853,66	1092,87	1093,29	915,37	881,02	1127,25
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	99,30	115,00	121,33	89,53	91,43	117,93

vzorky aktinické keratózy po terapií						
geny	L5	L6	L7	L8	L9	L10
$\beta$ -aktin	810,84	649,41	748,16	771,18	888,44	758,82
IL-6	808,99	853,98	682,67	882,16	749,60	887,74
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	99,77	131,50	91,25	114,39	84,37	116,99

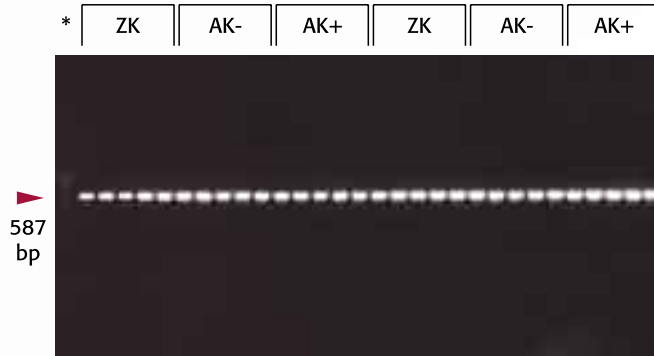
### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapií  
 \* DNA marker

T-test hurpin	
ZV/AK před terapií	0,00012
ZV/AK během terapie	0,02755
ZV/AK po terapií	0,04041
AK před terapií / během terapie	0,01315
AK před terapií / po terapií	0,08448
AK během terapie / po terapií	0,80394

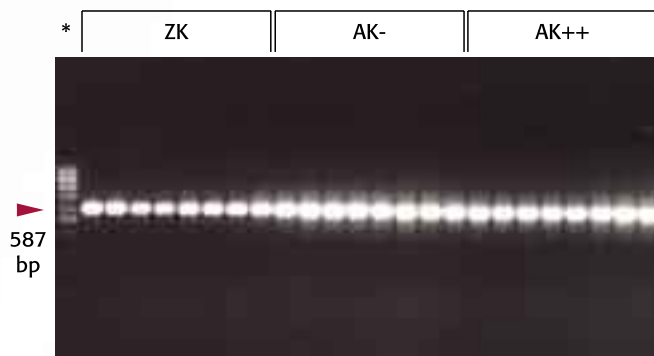


## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR HAX-1



vzorky zdravé kůže						
geny	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
β-aktin	609,44	400,37	450,34	460,9	423,37	602,36
IL-6	646,91	623,22	446,88	436,69	625,57	741,75
(IFN-α/β-aktin)*100	106,15	155,66	99,23	94,75	147,76	123,14

vzorky aktinické keratózy před terapií						
geny	P5	P6	P7	P8	P9	P10
β-aktin	783,46	833,38	710,09	646,56	590,02	730,88
IL-6	846,93	928,67	803,36	869,21	810,8	875,28
(IFN-α/β-aktin)*100	108,10	111,43	113,13	134,44	137,42	119,76



vzorky aktinické keratózy během terapie						
geny	B5	B6	B7	B8	B9	B10
β-aktin	803,25	950,36	901,09	1022,45	963,61	955,90
IL-6	752,57	948,9	1015,32	936,98	926,04	823,27
(IFN-α/β-aktin)*100	93,69	99,85	112,68	91,64	96,10	86,13

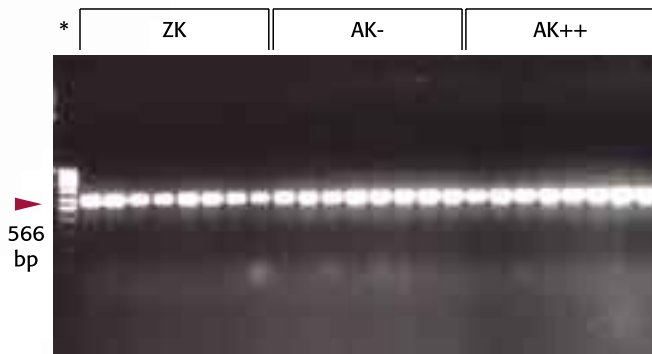
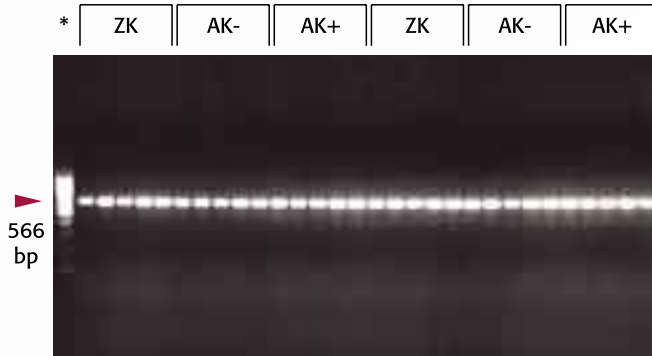
vzorky aktinické keratózy po terapii						
geny	L5	L6	L7	L8	L9	L10
β-aktin	810,84	649,41	748,16	527,45	888,44	758,82
IL-6	904,68	835,81	727,86	697,93	797,33	869,89
(IFN-α/β-aktin)*100	111,57	128,70	97,29	132,32	89,74	114,64

### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

T-test HAX-1	
ZV/AK před terapií	0,16307
ZV/AK během terapie	0,00011
ZV/AK po terapii	0,04086
AK před terapií / během terapie	0,00001
AK před terapií / po terapii	0,21517
AK během terapie / po terapii	0,08617

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR p53



### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

geny	vzorky zdravé kůže					
	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
β-aktin	423,37	332,68	438,86	550,39	602,36	590,94
IL-6	388,11	331,38	162,88	390,93	266,44	487,75
(IFN-α/β-aktin)*100	91,67	99,61	37,11	71,03	44,23	82,54

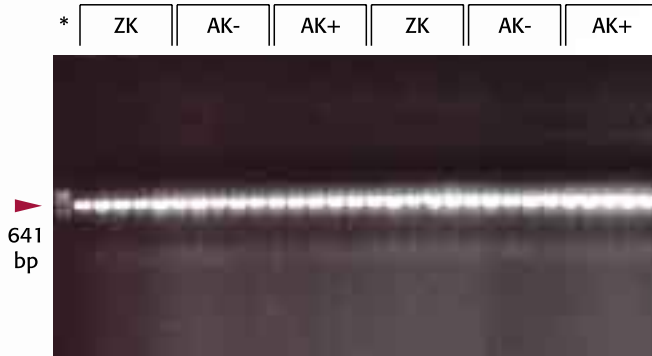
geny	vzorky aktinické keratózy před terapií					
	P5	P6	P7	P8	P9	P10
β-aktin	833,38	710,09	646,56	590,02	730,88	686,50
IL-6	491,31	360,22	401,05	340,89	528,49	457,85
(IFN-α/β-aktin)*100	58,95	50,73	62,03	57,78	72,31	66,69

geny	vzorky aktinické keratózy během terapie					
	B5	B6	B7	B8	B9	B10
β-aktin	803,25	950,36	901,09	1022,45	963,61	955,90
IL-6	534,14	609,32	547,63	515,63	687,46	551,17
(IFN-α/β-aktin)*100	66,50	64,11	60,77	50,43	71,34	57,66

geny	vzorky aktinické keratózy po terapii					
	L5	L6	L7	L8	L9	L10
β-aktin	649,41	748,16	771,18	527,45	888,44	758,82
IL-6	410,50	521,36	526,94	513,62	368,04	692,63
(IFN-α/β-aktin)*100	63,21	69,69	68,33	97,38	41,43	91,28

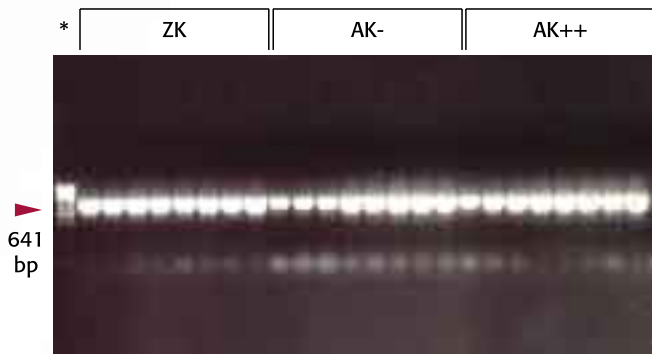
T-test p53	
ZV/AK před terapií	0,05973
ZV/AK během terapie	0,20590
ZV/AK po terapii	0,91894
AK před terapií / během terapie	0,08859
AK před terapií / po terapii	0,10806
AK během terapie / po terapii	0,45516

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR $\alpha$ -kateninu



vzorky zdravé kůže						
geny	Z5	Z6	Z7	Z11	Z12	Z13
$\beta$ -aktin	602,36	590,94	426,87	609,44	400,37	450,34
IL-6	2041,16	2336,85	1673,58	716,20	700,92	699,75
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	338,86	395,45	392,06	117,52	175,07	155,38

vzorky aktinické keratózy před terapií						
geny	P5	P6	P7	P11	P12	P13
$\beta$ -aktin	677,51	769,41	833,38	724,92	783,46	710,09
IL-6	934,84	802,87	745,56	359,14	661,94	2019,82
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	137,98	104,35	89,46	49,54	84,49	284,45



vzorky aktinické keratózy během terapie						
geny	B5	B6	B7	B8	B9	B10
$\beta$ -aktin	806,22	859,70	803,25	950,36	901,09	1022,45
IL-6	2462,22	2450,13	2141,6	2849,17	2940,31	2676,94
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	305,40	285,00	266,62	299,80	326,31	261,82

vzorky aktinické keratózy po terapií						
geny	L5	L6	L7	L8	L9	L10
$\beta$ -aktin	810,84	649,41	748,16	771,18	527,45	758,82
IL-6	1033,28	940,80	1052,02	1129,17	866,62	1079,72
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	127,43	144,87	140,61	146,42	164,30	142,29

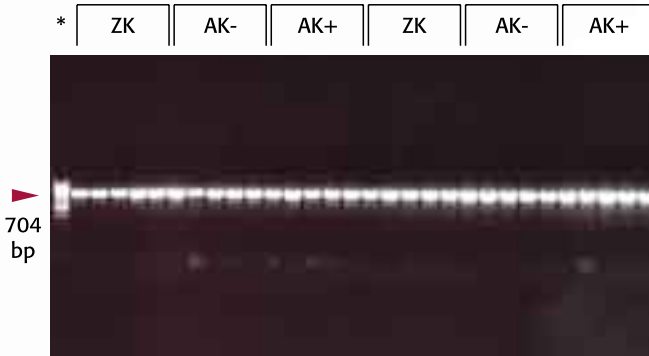
### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapií  
 \* DNA marker

T-test $\alpha$ -katenin 1. graf	
ZV/AK před terapií	0,12161
ZV/AK během terapie	0,14204
AK před terapií / během terapie	0,01656

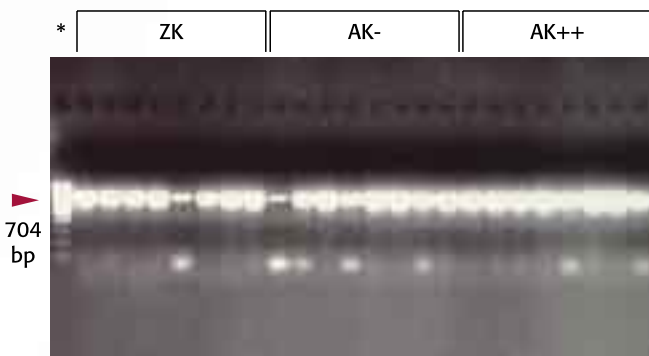
T-test $\alpha$ -katenin 2. graf	
ZV/AK před terapií	0,32222
ZV/AK po terapií	0,64691
AK před terapií / po terapií	0,24688

## PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ RT-PCR $\beta$ -kateninu



geny	vzorky zdravé kůže					
	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
$\beta$ -aktin	602,36	590,94	426,87	740,75	529,54	774,91
IL-6	1023,14	1078,79	996,98	1359,2	1180,69	1173,47
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	169,86	182,55	233,56	183,49	222,97	151,43

geny	vzorky aktinické keratózy před terapií					
	P5	P6	P7	P8	P9	P10
$\beta$ -aktin	714,69	724,92	783,46	833,38	710,09	646,56
IL-6	1122,17	1496,32	1578,96	1555,79	1388,3	763,76
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	157,01	206,41	201,54	186,68	195,51	118,13



geny	vzorky aktinické keratózy během terapie					
	B5	B6	B7	B8	B9	B10
$\beta$ -aktin	863,32	806,22	859,70	803,25	950,36	901,09
IL-6	1450,44	1050,58	1158,14	1298,71	1401,38	1661,57
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	168,01	130,31	134,71	161,68	147,46	184,40

geny	vzorky aktinické keratózy po terapii					
	L5	L6	L7	L8	L9	L10
$\beta$ -aktin	703,19	810,84	649,41	748,16	888,44	758,82
IL-6	1635,05	1679,69	1571,65	952,25	1855,47	1737,32
(IFN- $\alpha$ / $\beta$ -aktin)*100	232,52	207,15	242,01	127,28	208,85	228,95

### Vysvětlivky:

- ZK vzorky zdravé kůže  
 AK- vzorky aktinické keratózy před terapií  
 AK+ vzorky aktinické keratózy během terapie  
 AK++ vzorky aktinické keratózy po terapii  
 \* DNA marker

T-test $\beta$ -katenin	
ZV/AK před terapií	0,30842
ZV/AK během terapie	0,01098
ZV/AK po terapii	0,32359
AK před terapií / během terapie	0,12906
AK před terapií / po terapii	0,68624
AK během terapie / po terapii	0,66617

### Skupina genů související s imunitní odpovědí organismu:

#### Exprese cytokinů:

Vzhledem k dostupným informacím o vlastnostech IQ jako modulátoru imunitní odpovědi organismu bylo studium cytokinů a 1 cytokinového receptoru esenciální.

IFN- $\alpha$  je cytokin, který má vedle mnoha jiných funkcí i antivirový potenciál cestou indukce 2', 5'-oligoadenylátsyntetázy. Tento enzym je aktivován dvoušroubovicí RNA, vzniklou virovou replikací. Výsledný efekt tohoto složitého procesu je inhibice proteosyntézy a tím zánik buňky napadené virem. Mezi buňky, které jsou schopny produkovat IFN- $\alpha$  patří především buňky bílé krevní řady – aktivované nulové lymfocyty, monocyty. KC dle dostupné literatury nejsou schopny produkce IFN- $\alpha$ . KC po provokaci UVB, mitogeny, liposacharidy nebo jinými cytokiny jsou schopny produkce IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 a CSF (17, 30). Produkci IFN- $\alpha$  je možno stimulovat celou řadou faktorů zahrnujících viry, bakterie, xenogenní i allogenní nádorové buňky, buňky napadené virem. Naše poznatky o expresi mRNA IFN- $\alpha$  byly v souladu s dostupnými informacemi. Zajímavé byly individuální rozdíly v expresi IFN- $\alpha$ , což může korespondovat se stářím pacientů a stavem jejich imunitního systému. Souhrnně byly exprese IFN- $\alpha$  ve zdravé tkáni a v AK před terapií srovnatelné. Předchozí studie prokázaly, že IQ způsobuje vzestup exprese IFN- $\alpha$  jako hlavního mediátoru antivirové aktivity (127, 130). Další funkcí INF- $\alpha$ , která stojí za zmínku, je aktivace NK-buněk, které jsou schopny eliminovat ne-

specificky infikované nebo nádorově pozměněné buňky, což je základ jeho antitumorózního účinku. Působení IQ v místě aplikace vede k infiltraci lymfocytů, NK-buněk a DC (76). V našem případě jsme zaznamenali téměř dvojnásobné zvýšení exprese IFN- $\alpha$  v průběhu terapie a opět pokles na základní hodnoty jako před terapií (příloha 22). Potvrdili jsme tedy, že IQ hraje roli v ovlivnění produkce IFN- $\alpha$  již na úrovni mRNA.

Infiltrace epidermis buňkami imunitního systému působením IQ souvisí též se zvýšenou produkcí IL-6. Co je zajímavé, že IQ způsobuje indukci IL-6, IL-8 nezávisle na produkci IFN- $\alpha$  a *in vitro* studie dokázaly, že lidské KC jsou schopny produkce IL-6 po adekvátní stimulaci (58). V našem experimentu byla exprese IL-6 statisticky významně zvýšená (7x) v AK před terapií ve srovnání se zdravou kůží. Je otázkou, co stojí za zvýšenou hladinou prozánětlivého cytokinu v ložiscích AK. Vše může mít spojitost s dlouhodobým působením UV záření na kůži a únikem KC z kontroly apoptotických mechanismů v AK. Následná nekontrolovaná hyperproliferace je spojená se zvýšenou aktivitou NF- $\kappa$ B. Ta má za následek zvýšenou expresi prozánětlivých genů (55). Po aplikaci IQ došlo dále ke zvýšení (5x) exprese IL-6. Po terapii došlo opět k poklesu na hodnoty AK před léčbou (příloha 23). Klinicky pozorovaná zánětlivá reakce v místech aplikace IQ tedy koresponduje s významným zvýšením exprese IL-6, který sti-

muluje proteiny akutní fáze zánětu, růst B- lymfocytů, cytotoxicitu NK-buněk a reguluje růst KC. Je zajímavé, že IL-6 ovlivňuje též regulaci exprese TLR-7 (viz níže). Nabízí se otázka, proč při normalizaci exprese po léčbě IQ se tato spíše nepřiblíží hladinám v normální zdravé kůži. Je možné, že klinicky pozorovaný erytém v místech aplikace IQ (přetrvávající i několik týdnů) je odrazem změn na úrovni molekulární, tzn. přetrvávající aktivity imunitní odpovědi organismu. Histologicky byla zjištěna perzistující diskretní infiltrace imunitními buňkami, což také odpovídá obrazu dozívající zánětlivé reakce po aplikaci IQ.

Dalším analyzovaným genem byl TNF- $\alpha$ , jeden ze základních prozánětlivých cytokinů. Jeho funkce je různorodá, zahrnující nekrózu tumorů, aktivaci eosinofilů a makrofágů, indukci množství cytokinů a adhezivních molekul a antivirový efekt v dermálních fibroblastech (17). Hladiny mRNA ve zdravé tkáni a v AK před léčbou IQ byly statisticky významně rozdílné stejně jako u IL-6, což by potvrdovalo teorii zvýšené aktivity NF- $\kappa$ B v hyperproliferativní invazivní tkáni AK (55). V našich experimentech bylo překvapující, že na úrovni mRNA exprese byly hodnoty TNF- $\alpha$  v AK během a po terapii IQ bez signifikantních změn (příloha 24). Naše pozorování vlivu IQ na expresi TNF- $\alpha$  bylo v souladu s *in vitro* studiemi, kde v lidských KC byl prokázán přímý efekt IQ na zvýšení exprese IL-6 a IL-8, ale bez efektu na IL-1, IFN- $\alpha$  a TNF- $\alpha$  (58). Naproti tomu na zvířecích modelech po aplikaci IQ bylo zvýšení proteinů TNF- $\alpha$  signifikantní (45). Stejně tak Tyring a kol. prokázali vzestup exprese genu TNF- $\alpha$  během léčby condylomata accuminata (130). Též exprese mRNA TNF- $\alpha$  v lidských polymorfonukleárních leukocytech byla zvýšena po stimulaci IQ (127). Rozdíl mezi expresí mRNA

TNF- $\alpha$  v našich experimentech a mezi zvýšenou hladinou TNF- $\alpha$  proteinu, ukázaných v předchozích studiích, může být způsoben změnami na úrovni posttranskripční. Mnoho studií dokazuje, že exprese TNF- $\alpha$  je regulována prostřednictvím mRNA-stability (140) a mRNA-translace (149).

Kromě účinků IQ na Th1-cytokiny byl dalším zkoumaným genem v tomto experimentu IL-10R. Th2- specifický cytokin IL-10 je důležitý regulátor kožní imunitní odpovědi, účastní se imunosuprese indukované UVB zářením (11) a snižuje produkci větší části cytokinů, jako je IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$  (28). Exprese IL-10R je důležitá pro reakci buněk na IL-10 a zároveň modulace tohoto receptoru hraje důležitou roli pro děje imunostimulační nebo imunosupresivní *in vivo* (24). Další zajímavostí jsou protichůdné publikace o expresi IL-10R jen v buňkách imunitního systému nebo též na KC (77, 113). Vzhledem k tomu, že již bylo dokázáno, že IQ ovlivňuje expresi IL-10 v periferních polymorfonukleárních leukocytech, bylo zajímavé sledovat expresi jeho receptoru. Exprese tohoto receptoru byla srovnatelná ve zdravé tkáni a v AK před léčbou, dále byl pozorován vzestup exprese (1,2x) během terapie. Po léčbě se opět upravila exprese receptoru na hodnoty ve zdravé tkáni (příloha 25). Vzhledem k tomu, že IL-10 je pleiotropní imunosupresivní cytokin, jeví se jako logické, že protizánětlivý komplex IL-10/IL-10R představuje mechanismus kontroly udržování rovnováhy zánětlivé reakce zprostředkované Th1-cytokiny indukované působením IQ.

## Expresí TLR-7 a TLR-8:

Účinky IQ byly popsány na úrovni jak vrozené, tak získané imunitní odpovědi organismu (80). V našem výzkumu jsme se zaměřili na expresi mRNA TLR-7 a TLR-8, důležitých receptorů v iniciaci vrozené a získané imunitní odpovědi. V případě obou genů byla exprese v neléčené AK zvýšená (2x, resp. 1,6x) oproti zdravé nepostižené kůži. Další vzestup (2,5x) exprese během léčby AK IQ byl pozorován v případě TLR-7 a poté pokles na úroveň exprese v AK před léčbou. Oproti tomu exprese TLR-8 byla mírně, ale statisticky nevýznamně ovlivněna IQ (příloha 26). Do nedávné doby nebyly známy přirozené ligandy ani TLR-7 ani TLR-8. Výzkumy zaměřené na imidazochinoliny jako je IQ a resiquimod ověřily jejich imunostimulační aktivitu právě přes TLR-7 (4, 41), resp. u resiquimodu působením na TLR-7 a TLR-8 (51). Tím by mohla být vysvětlena jeho větší imunostimulační efektivita (112). Také byla úspěšně zkoumána syntetická nukleosidová analoga guaninu, která jsou schopna aktivovat TLR-7 (63). Nové poznatky získané za poslední 2 roky ukazují, že aktivace TLR-7 je způsobena virovou jednovláčkovou šroubovicí RNA (ssRNA), virem vezikulární stomatitidy a chřipkového viru (70). Heil a kol. uvádí, že ssRNA představuje přirozený ligand pro TLR-7 a TLR-8 v savčích buňkách (40).

Hlavními buňkami exprimujícími TLR-7 v kůži jsou plasmocytoidní dendritické buňky, antigen prezentující buňky. Vedle TLR-7 jsou též vybaveny TLR-1, TLR-6 a TLR-9, jsou schopny odpovídat na ligandy TLR-7 a TLR-9 výraznou produkcí IFN- $\alpha$  (42, 118). Pro doplnění TLR-8 je především exprimován na monocytech a jen okrajově na NK- buňkách a T-lymfocytech (42). Na povrchu KC byly detekovány TLR-2

a TLR-4, ale žádná interakce mezi těmito receptory a imidazochinoliny nebyla pozorována. Již v předchozích studiích byl popsán efekt, který má IQ na regulaci TLR (41, 51). V *in vitro* studii s buněčnou linií monocytických leukemických buněk THP-1 byl potvrzen efekt cytokinů na produkci mRNA TLR (150). Byla pozorována stimulace imunitních buněk IL-6 což vyústilo ve vzestup exprese TLR-7. To by vysvětlovalo náš poznatek zvýšené exprese TLR-7 indukované vzrůstajícím množstvím IL-6 v AK před léčbou a během léčby. Rozdílná exprese receptorů v buňkách zdravé tkáně a v AK může být příčinou selektivní indukce účinků IQ. Lze vyslovit hypotézu, že tato interakce IQ/TLR-7 je rozhodující ke spuštění lokální zánětlivé reakce, tzn. indukci cytokinů.

TLR-7 a TLR-8 hrají klíčovou roli při spuštění imunitní odpovědi jako reakce na přirozené patogeny virového původu, ale také na stimulaci syntetickými ligandy. Sledování jejich exprese při eliminaci tumorózních procesů je dalším krokem v objasnění přesného mechanismu účinku jejich ligandů.

## Skupina genů alterovaných při tumorózních procesech:

### Expres antiapoptotických genů a p53:

Procesy při eliminaci AK působením IQ lze popsat nejen z pohledu spuštění imunitních kaskád, ale také z pohledu blokády proliferace abnormálních, neoplastických KC a indukce apoptózy.

Význam hurpinu jako představitele inhibitoru serinových proteáz je velmi zajímavý. Protein hurpin je téměř z 59% aminokyselin indentický s antigenem 2 spinaliomu, jeho exprese je zvýšená v psoriatických ložiscích a exprese mRNA je snížena po působení UV záření v *in vitro* studiích (1). Naše výsledky ukazují, že v porovnání zdravé tkáně a AK před terapií byla exprese hurpinu 1,5x vyšší v AK.

Je prokázáno, že exprese serpinů (např. hurpinu) chrání buňky před náhodným uvolňováním proteáz. Během léčby IQ se předpokládá, že se zvýší aktivita proteáz v souvislosti se zánětlivou reakcí a následným procesem hojení. Snížení exprese inhibitorů proteáz jako je hurpin tyto procesy usnadňuje. To, že byl v našich experimentech hurpin ovlivněn léčbou IQ (příloha 27), je jeden z dalších zajímavých poznatků o tomto novém genu. Je otázkou dalších výzkumů zjistit, jak významnou roli hraje hurpin nejenom v hyperproliferativních kožních procesech, jako je psoriáza, ale také nádorových procesech aktivovaných chronickou expozicí UV záření, jako je AK a možná i SCC a BCC.

Charakteristika HAX-1 byla popsána v kapitole 2.3. Jeho funkce není ještě přesně objasněna, ale vzhledem k podobnosti sekvencí s Nip3 a s Bcl-2 lze předpokládat, že jeho role bude v regulaci apoptotických dějů (116). Z dalších poznatků o expresi HAX-1 v psoria-

tických ložiscích, kde je zvýšená, lze usuzovat na antiapoptotickou funkci tohoto genu. Co se týče exprese HAX-1 ve zdravé kůži a neléčené AK v našich experimentech, jsou jejich hodnoty srovnatelné, bez statisticky významné odchylky (příloha 27). Z toho lze usuzovat, že HAX-1 pravděpodobně nehraje přímou roli ve vzniku nádorového bujení v kůži. IQ působí na útlum exprese HAX-1, z čehož by mohlo vyplývat, že tímto vyvolá narušení rovnováhy mezi anti- a proapoptotickými procesy, které mají za následek eliminaci transformovaných, neoplastických KC v AK.

Jak již bylo řečeno, AK představuje proliferaci transformovaných neoplastických KC jako důsledek dlouhodobé expozice kůže slunečnímu záření. UV radiace indukuje nejen poškození DNA, ale i zásah do homeostázy apoptotických dějů v epidermis. V těchto procesech hraje nezastupitelnou roli p53.

Ztráta normální funkce p53 je spojená s mutacemi, vzniklé po expozici UV zářením. Frekvence mutací p53 v kožní tkáni vzrůstá ze 14% v normální kůži na 38,5% v kůži poškozené slunečním zářením až na 63% v AK (27). Avšak k dispozici není dostatečné množství informací o expresi p53 v AK na úrovni mRNA. V naší studii jsme zjistili, že exprese mRNA p53 ve zdravé a postižené tkáni je srovnatelná a dokonce i během terapie se nemění (příloha 28), což koreluje s výsledky, které prezentoval Vidal (136). Zvýšené množství proteinu p53, které popisují mnohé studie, je nejspíše výsledkem zpomalení degradace mutovaných forem p53 a následnou intracelulární akumulací (20).



V našich experimentech nebyla provedena analýza exprese mutovaných forem p53, nicméně

velký počet studií ukázal, že exprese mutací p53 v AK je od 50 do 80 % (88, 117).

### Expresie $\alpha$ - a $\beta$ - kateninů:

Tzv. adhezivní molekuly  $\alpha$ - a  $\beta$ - kateniny tvoří spolu s E-kadherinem a  $\gamma$ -kateninem komplex, který hraje důležitou roli v buněčné adhezi a v tkáňové architektuře. Kromě toho se alterace těchto genů zajímavým způsobem podílí na progresi epiteliálních neoplázií (47, 49, 143). Alterace a změna funkce těchto molekul způsobí ztrátu intercelulární adheze s možnou následnou transformací, rozvojem tumorózního procesu (31). V několika studiích byla prezentována abnormální exprese E-kadherinu a/nebo kateninu na úrovni proteinů v různých tumorózních tkáních, ale též v premaligních lézích (31, 49, 98, 143). Papadavid a kol. v rozsáhlé studii dokumentují, že abnormální exprese proteinu  $\alpha$ - a  $\beta$ - kateninu je v AK zastoupena v 16 %, resp. v 21 % případů (98), což by odpovídalo našim výsledkům. Našli jsme totiž individuální rozdíly v expresi  $\alpha$ - a  $\beta$ - kateninu, ale po statistickém zpracování nebyl pozorován signifikantní vliv IQ na expresi těchto adhezivních molekul, ani rozdíly v expresi ve zdravé tkáni a AK (příloha 29 a 30). Regulace těchto genů může probíhat

na úrovni posttranskripční, což potvrzuje *in vitro* studie, kde se v L-buňkách bez E-kadherinu objevila normální hladina mRNA  $\alpha$ -kateninu bez normální produkce proteinu  $\alpha$ -kateninu (87). Podle dostupných materiálů nejsou informace o genové expresi těchto 2 genů v AK, stejně tak nebyly publikovány experimenty o vlivu IQ na expresi  $\alpha$ - a  $\beta$ - kateninu. Z našich výsledků vyplývá, že antitumorózní efekt IQ nepostihuje přímo kontrolní systém epiteliální diferenciace, ve kterém komplex E-kadherin/kateniny hraje stěžejní roli.

**2. 6 Shrnutí**

Závěrem lze shrnout, že IQ byl úspěšně použit v léčbě AK díky jeho antiproliferativnímu a antitumoróznímu efektu. Byly sledovány rozdíly v expresi jednotlivých genů ve zdravé tkáni, v tkáni postižené AK a dále v AK během a po terapii IQ. Našli jsme rozdílně indukované zánětlivé cytokiny, což koresponduje s klinicky pozorovanou lokální zánětlivou reakcí. 2 antiapoptotické geny byly suprimovány, nejspíše díky množství buněk podléhajících apoptóze po aplikaci IQ. Oproti tomu nebyl pozorován žádný vliv na změny v expresi adhezivních molekul a p53. Exprese TLR-7, ale nikoliv TLR-8, byla indukována jeho exogenním ligandem - IQ, nejspíše též pod vlivem IL-6. Tento receptor pravděpodobně potencuje celý signální proces, což způsobí imunitní reakci v AK, ale ne ve zdravé tkáni.

### 3. ZÁVĚR

#### 3. 1 Význam studia genové exprese k objasnění patogeneze hyperproliferativních kožních chorob

Ovlivnění patologických změn přímo v jejich průběhu na molekulární úrovni je snahou mnohých výzkumných skupin. Je zajímavé sledovat, jakými cestami se vědecký výzkum ubírá. Studium IQ je typickým příkladem, jak se postupně získané informace uplatňují v praktické medicíně. Na počátku byla syntetická molekula, u které byly pozorovány účinky antivirové. Tato substance byla tedy poprvé použita k léčbě virového onemocnění condylomata accuminata v 90. letech minulého století. Výzkumem podstaty účinků IQ se zjistila souvislost mezi IQ a TLR-7, jehož byl syntetickým agonistou.

Rodina těchto receptorů je považována za stejně ve spuštění imunitních reakcí v organismu. Další experimenty s IQ, kdy byl prokázán i jeho antitumorózní vliv, na sebe nenechaly dlouho čekat. V současné době je v České republice přes různé úpravy spíše z důvodů ekonomických než medicínských IQ registrován jako lokální imunomodulans v léčbě superficiálního vícečetného BCC a condylomata accuminata. Jeho preskripce je ošetřena zvláštní smlouvou. V ostatních indikacích (aktinická keratóza...) si pacient lék plně hradí.

#### 3. 2 Nové přístupy v terapii hyperproliferativních kožních onemocnění

Vliv na imunitní systém, kterým by se potencovala vlastní obranyschopnost organismu, je v dermatologii aktuální myšlenka nejen v léčbě nádorů, ale i v léčbě většiny chorob, jejichž patogenetický základ tkví ve změnách imunitní odpovědi organismu. Příkladem těchto substancí, které zaznamenaly velký rozmach, jsou biologika. Příkladem jsou substance působící imunosupresivně, jako jsou inhibitory kalci-  
neurinu (pimecrolimus, tacrolimus), různé látky blokující funkci TNF- $\alpha$  (infliximab, etanercept) a jiných cytokinů (ABX-IL-8). Imiquimod může-

me směle zařadit mezi tyto nové látky, i když působí na jiném, imunostimulačním, principu.

Důkladné poznání působení těchto látek jako je imiquimod je základem pro další možnosti uplatnění a rozšíření terapeutických možností.

### 3. 1 Boj proti vzrůstající incidenci kožních nádorů preventivními opatřeními

Kožní nádory patří mezi nejčastější nádory vůbec. Např. ve Spojených státech amerických je incidence kožních nádorů odhadována na 900 000 - 1 200 000 ročně (79). Většinu případů tvoří BCC a asi 20% z tohoto množství připadá SCC (61). Úmrtí v důsledků metastatických procesů nemelanomových kožních nádorů bylo mezi 1300 a 2300 případů ročně (142). Přes 90 % všech kožních novotvarů připadá na nemelanomové kožní nádory, z nichž BCC je nejčastější. Jeho prevalence je v severní a střední Evropě mezi 20-50 případy na 100 tisíc obyvatel. V Austrálii je to 250 případů na 100 tisíc obyvatel. Co se týče SCC je ve střední Evropě prevalence 6 žen a 12 mužů na 100 tisíc obyvatel světlé pleti.

Obecně lze říci, že ovlivnění škodlivého exogenního působení vnějšího prostředí je základem boje proti patologickým stavům lidského organismu vyvolaných těmito vlivy. Úkol výzkumu vidím v detailním poznání a popisu změn odehrávajících se při expozici různým vlivům, v našem konkrétním případě při expozici UV záření. Dokonalé porozumění těchto změn dává prostor k jejich ovlivňování. Samozřejmě prevence jako první stupeň boje proti vzniku chorobných stavů je nejjednodušším a i ekonomicky nejméně náročným přístupem v medicíně. Informovanost veřejnosti a široká osvěta dává předpoklady k předcházení mnohých onemocnění. Typickým příkladem je osvěta a různé propagační akce např. v boji proti rakovině prsu, plic, tlustého střeva, taktéž postupu aterosklerózy a předcházení chorobám oběhového systému. V dermatologickém oboru jsou vidět též pokroky a to především v boji

proti malignímu melanomu. Také ostatní nádorová onemocnění kůže v našich geografických podmínkách se dostávají do popředí, takže můžeme být svědky široké kampaně na ochranu proti slunečnímu záření, resp. UV záření, která se k nám postupně dostává z USA, z Austrálie a ze zemí západní Evropy.

## Poděkování

Tato dizertační práce by nikdy nevznikla bez komplexní mezinárodní spolupráce Dermatovenerologické kliniky UK 3. LF a FNKV v Praze a Kožní kliniky při Univerzitě Heinricha Heineho v Düsseldorfu. Bez vydatné pomoci mých kolegů, kteří mě s nesmírnou trpělivostí zasvětili do zásad klinické a laboratorní výzkumné práce, kteří mě naučili základům laboratorních technik molekulární biologie, bych nikdy nenašla v sobě tolik odvahy k sepsání této práce. Ukázali mi správný směr a základní pravidla výzkumné činnosti a to jak praktická, tak i morální a etická. Co jsem si z této spolupráce odnesla, je náhled na vědeckou práci, kterou nelze dělat bez finančního zázemí, bez dobrého odborného vedení, bez neskonalého nadšení a hlavně bez kolektivní kooperace, protože jeden osamocенý, i když třeba i geniální, výzkumník nemůže za svůj život obsáhnout množství práce, která je třeba být k jednomu malému objevu. V době integrace naší země do Evropské unie je dle mého názoru tato spolupráce ještě aktuálnější.

Děkuji mému školiteli, profesoru Arenbergerovi, který mi dal nezbytné základy, šanci a kontinuální motivaci, profesoru Růžičkovi, který mi věřil a dal mi zázemí pro vědeckou činnost, a dále především doktoru Marku Walzovi, kterého považuji za vynikajícího učitele i člověka. Nesmím s poděkováním zapomenout ani na svou rodinu, která to se mnou tak dlouho vydržela.

## Seznam použité literatury

1. Abst HF, Welss T, Mirmohammadsadegh A, Koehrer K, Michel G, Ruzicka T: Cloning and characterization of hurpin (protease inhibitor 13): a new skin-specific, UV-repressible serine proteinase inhibitor of the ovalbumin serpin family. *J Mol Biol* 1999, 293: 29-39.
2. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998, 281: 1322-1326.
3. Akira S, Hemmi H: Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003, 85: 85-95.
4. Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004, 4: 499-511.
5. Ananthaswamy HN, Fourtanier A, Evans RL: p53 mutations in hairless SKH-hr1 mouse skin tumors induced by a solar simulator. *Photochem Photobiol* 1998, 67: 227-232.
6. Ansel J, Perry P, Brown J et al.: Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 1990, 95: 100-107S.
7. Ansel JC, Luger TA, Green I: The effect of in vitro and in vivo UV irradiation on the production of ETAF activity by human and murine keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1983, 81: 519-523.
8. Bates S, Vousden KH: Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 1999, 55: 28-37.
9. Beg AA, Baltimore D: An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$  induced cell death. *Science* 1996, 274: 784-787.
10. Belvin MP, Anderson KV: A conserved signaling pathway: the *Drosophila*, toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996, 12: 393-416.
11. Beissert S, Hosoi J, Kuhn R: Impaired immunosuppressive response to ultraviolet radiation in interleukin-10-deficient mice. *J Invest Dermatol* 1996, 107: 553-7.
12. Black AK, Greaves MW, Hensby CN, Plummer NA, Warin AP: The effects of indomethacin on arachidonic acid and prostaglandins e2 and f2alpha levels in human skin 24 h after u. v. B and u. v. C irradiation. *Br J Clin Pharmacol* 1978, 6:261-266.
13. Bowcock AM, Shannon W, Fenghe D, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Ferdandez-Vina MA, Menter A: Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genetics* 2001, 10: 1793-1805.
14. Brdička R: Lidský genom na rozhraní tisíciletí, Grada Publishing 2001. ISBN 80-2470-118-9: s. 38.

15. Breutner KR, Tyring SK, Troffatter KF JR, Douglas JM JR, Spotswood S, Owens ML, Fox TL, Hougham AJ, Schmitt KA: Imiquimod, a patient-applied immune-response modifier for treatment of external genital warts. *Antimicrobial Agents Chemother* 1998, 42: 789-794.
16. Buates S, Matlashewski G: Identification of genes induced by a macrophage activator, S-28463, using gene expression array analysis. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2001, 45: 1137-1142.
17. Clemens M J: *Cytokines*; BIOS Publishers 1991, Oxford:p.15.
18. Cockerell C J: Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma („ actinic keratosis“). *J AM Acad Dermatol* 2000, 42(S): 11-17.
19. Coldiron BM, et al.: Thinning of the Ozone Layer Facts and Consequences. *J Amer Acad Dermatol* 1992, 27: 653-666.
20. Colman MS, Afshari CA, Barrett JC: Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* 2000, 462: 179-188.
21. Daniels F, Brophy D, Lobitz WC: Histochemical response of human skin following ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 1961, 37: 351- 357.
22. De Panfilis G, Soligo D, Manara GC, Ferrari C, Torresani C: Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. I. Human resting Langerhans cells express two members of the adherence-promoting CD11/CD18 family, namely, H-Mac-1 (CD11b/CD18) and gp 150,95 (CD11c/CD18). *J Invest Dermatol* 1989, 93: 60-69.
23. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC: Release by ultraviolet B (u.v. B) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br J Pharmacol* 1995, 114: 1257-1265.
24. Ding Y, Qin L, Zamarin D, Kotenko SV, Pestka S, Moore KW, Bromberg JS: Differential IL-10R1 expression plays a critical role in IL-10-mediated immune regulation. *J Immunol* 2001, 167: 6884-6892.
25. Dlugosz A, Merlino G, Yuspa SH: Progress in cutaneous cancer research. *J Invest Dermatol* 2002, Symp. Proc. 7: 17-26.
26. Eckert RL, Broome A-M, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K: S100 Proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* 2004, 123: 23-33.
27. Einspahr JG, Alberts DS, Warneke JA, Bozzo P, Basye J, Grogan TM, Nelson MA, Bowden GT: Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis. *Neoplasia* 1999, 1(5): 468-475.
28. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR: IL-10inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991, 147: 3814-3822.

29. Freeman SE, Hacham H, Gange RW, Maytum DJ, Sutherland JC, Sutherland BM: Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 5605-5609.
30. Fujisawa H, Kondo S, Wang B, Shivji GM, Sauder DN: The expression and modulation of IFN-alpha and IFN-beta in human keratinocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1997, 17: 721-725.
31. Fuller LC, Allen MH, Montesu M, Barker JNWN, Macdonald DM: Expression of E-cadherin in human epidermal non-melanoma cutaneous tumours. *Br J Dermatol* 1996, 134: 28-32.
32. Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, et al.: The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet* 1996, 14: 78-8.
33. Glücksmann A: Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951, 26: 59-86.
34. Greene MI, Sy MS, Kripke M, Benaceraf B: Impairment of antigen-presenting cell function by ultraviolet radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76: 6591-6595.
35. Grossmann D, Leffell DJ: The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Arch Dermatol* 1997, 133: 1263-1270.
36. Haake AR, Polakowska RR: Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J Invest Dermatol* 1993, 101: 107-112.
37. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al.: Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996, 85: 841-851.
38. Hanisko J, Suskind RR: The effect of ultraviolet radiation on experimental cutaneous sensitization in guinea pigs. *J Invest Dermatol* 1960, 40: 183-191.
39. Hart RW, Setlow RB, Woodhead AD: Evidence that pyrimidine dimers in DNA can give rise to tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74: 5574-5578.
40. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004, 303: 1526-1529.
41. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunol* 2002, 3: 196-200.
42. Hornung V, Rothenfusser S, Brizsch S: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002, 168:4531-4537.
43. Hu Z, Bonifas JM, Aragon G, et al.: Evidence for lack of enhanced hedgehog target gene expression in common extracutaneous tumors. *Cancer Res* 2003, 63: 923-928.



44. Chaturvedi V, Qin J-Z, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ: Analysis of apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol Chem* 1999, 274: 23358-23367.
45. Imbertson LM, Beaurline JM, Couture AM, Gibson SJ, Smith RMA, Miller RL, Reiter M, Wagner TL, Tomai MA: Cytokine induction in hairless mouse and rat skin after topical application of the immune response modifiers imiquimod and S-28463. *J Invest Dermatol* 1998, 110: 734-739.
46. Itoh N, Yonehara S, Iihii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991, 66: 233-243.
47. Jankowski JA, Newman PM, Kandemir O, Hirano S, Takeichi M, Pignatelli M: Differential expression of E-cadherin in normal, metaplastic and dysplastic oesophageal mucosa: a putative biomarker. *Int J Oncol* 1994, 4: 441-448.
48. Janeway Jr CA, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2003, 21: 197-216.
49. Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ: Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology* 1997, 112: 46-54.
50. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al.: Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrom. *Science* 1996, 272: 1668-1671.
51. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S: Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunol* 2002, 3: 499.
52. Kerr JFR, Hormon BV: Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: Tomei LD, Cope FO (eds.). *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Current Communications in Cell and Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1991.
53. Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26: 239-257.
54. Kleibl Z, Raisová M, Novotný J, Pohlreich P, Matouš B: Apoptóza a její význam z hlediska vzniku a léčby nádorových onemocnění. *Sb Lek* 2002, 103(1): 1-13.
55. Kobiela A, Fuchs E: Links between alpha-catenin, NF-kappaB, and squamous cell carcinoma in skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 14: 2322-2327.

56. Kondo S, Jimbow K: Dose-dependent induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A *J Cell Physiol* 1998, 177: 493-498
57. Kondo S, Kono T, Sander DN, McKenzie RC: IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J Invest Dermatol* 1993, 101: 690-694.
58. Kono T, Kondo S, Pastore S, Shivji GM, Tomai MA, McKenzie RC, Sauder DN: Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. *Lymphokine Cytokine Res* 1994, 13: 71-76.
59. Kothny-Wilkes G, Kulms D, Poppelmann B, Luger TA, Kubin M, Schwarz T: Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 1998, 273: 29247-29253.
60. Kripke ML: Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* 1973, 53: 1333-1336.
61. Landis SH, Murray T, Bolden S, et al.: Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999, 49: 8-31.
62. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358: 15-16.
63. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB: Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 6646-6651.
64. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996, 86: 973-983.
65. Logan G, Wilhelm DL: The inflammatory reaction in ultraviolet injury. *Br J Exp Pathol* 1966, 47: 289-299.
66. Logan G, Wilhelm DL: Ultraviolet injury as an experimental model of the inflammatory reaction. *Nature* 1963, 198: 968-969.
67. Logan G, Wilhelm DL: Vaskular permeability changes in inflammation. I. The role of endogenous permeability factors in ultraviolet injury. *Br J Exp Pathol* 1966, 47: 300-314.
68. Logan G, Wilhelm DL: Vaskular permeability changes in inflammation. II. The effect of lecithinase antagonists in ultraviolet injury in the guinea-pig. *Br J Exp Pathol* 1966, 47: 324-330.
69. Luger TA, Schwarz T: Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol* 1990, 95: 100-104S.
70. Lund J M, Alexoupoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Falvell RA: Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:5598-55603.

71. Mackenzie-Wood A, Kossard S, de Launey J, Wilkinson B, Owens ML: Imiquimod 5% cream in the treatment of Bowen's disease. *J Am Acad Dermatol* 2001, 44: 462-70.
72. Majewski S, Marczak M, Mlynarczyk B, Benninghoff B, Jablonska S: Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Dermatol* 2005, 44: 14-19.
73. Marks R, Gebauer K, Shumack S, Amies M, Bryden J, Fox TL, Owens ML: The Australasian Multicentre Trial Group: Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results of multicenter 6-week dose-response trial. *J Am Acad Dermatol* 2001, 44: 807-813.
74. Matsuda G, Nakajima K, Kawaguchi Y, Yamanashi Y, Hirai K: Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) forms complexes with a cellular anti-apoptosis protein Bcl-2 or its EBV counterpart BHRF1 through HS1-associated protein X-1. *Microbiol Immunol* 2003, 47: 91-99.
75. McCall CA, Cohen JJ: Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. *J Invest Dermatol* 1991, 97: 111-114.
76. Megyeri K, Wei-chun AU, Rosztoczy I, Babu K, Raj N, Miller RL, Tomai MA, Pitha PM: Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by Sendai virus utilize similar signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 1995, 15: 2207-2218.
77. Michel G, Mirmohammadsadegh A, Olasz E, Jarzebska-Deussen B, Müschen A, Kemeny L, Abst HF, Ruzicka T: Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. *J Immunol* 1997, 159: 6291-6297.
78. Michel G, Gailis A, Jarzebska-Deussen B, Muschen A, Mirmohammadsadegh A, Ruzicka T: 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells. *Inflamm Res* 1997, 46: 32-34.
79. Miller DL, Weinstock MA: Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol* 1994, 50: 774-778.
80. Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA: Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 1999, 21: 1-14.
81. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann Hoffman B, Reed JC: Tumour suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994, 9: 1799-1805.
82. Miyashita T, Reed JC: Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995,80: 293-299.

83. Mohamadzadeh M, Takashima A, Dougherty I, Knop J, Bergstresser PR, Cruz Jr, PD: Ultraviolet B radiation upregulates the expression of IL-15 in human skin. *J Immunol* 1995,155: 4492-4495.
84. Morison WL, Parrish JA, Bloch KJ, Krugler JI: In vivo effect of UV-B on lymphocyte function. *Br J Dermatol* 1979,101: 513-519.
85. Morison WL, Paul BS, Parrish JA: The effects of indomethacin on long-wave ultraviolet-induced delayed erythema. *J Invest Dermatol* 1977, 68: 130-133.
86. Mortier L, Marchetti P, Delaporte E et al.: Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16 (INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett* 2002, 176: 205-214.
87. Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S: The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 1991, 65(5): 849-857.
88. Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS et al.: Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett* 1994, 85: 23-29.
89. Nemes Z, Steinert PM: Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 1999, 31: 5-19.
90. Nickoloff BJ, Denning MF: Life and death signaling in epidermis: Following a planned cell death pathway involving a Trail that does not lead to skin cancer. *J Invest Dermatol* 2001, 117: 1-3.
91. Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bonish B, Miele L: Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ* 2002, 9(8): 842-855.
92. Nishimura M, Naito S: Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Bio Pharm Bull* 2005,28: 886-892.
93. Norris DA, Lyons MB, Middleton MH, Yohn JJ, Kashihara-Sawami M: Ultraviolet radiation can either suppress or induce expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the surface of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1990, 95: 132-138.
94. Norris DA: Differential control of cell death in the skin. *Ach Dermatol* 1995, 131: 945-948.
95. Oren M: Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 1994, 5: 221-227.
96. Owens DM, Watt FM: Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer* 2003, 3: 444-451.

97. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deiseroth AB, Zhang WW, Kruzel E: Wild- type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 1995, 15: 3032-3040.
98. Papadavid E, Pignatelli M, Zakynthinos S, Krausz T, Chu AC: Abnormal immunoreactivity of the E cadherin/catenin (alpha-, beta- and gamma-) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumours. *J Pathol* 2002,196: 154-162.
99. Paukkoren K, Naukkerinen A, Horsmanheims M: The development of manifest psoriatic lesions is linked with the invasion of CD8+ T cells and CD11c+ macorphages into the epidermis. *Arch Dermatol Res* 1992, 284: 375-379.
100. Placek W, Haftek M, Thivolet J: Sequence of changes in psoriatic epidermis. *Acta Derm Venereol* 1988, 68: 369-377.
101. Perry LL, Greene MI: Antigen presentation by epidermal Langerhans cells: loss of function following ultraviolet (UV) irradiation in vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 1982, 24:129-137.
102. Persey P, Haran G, Hasic E, Edwards A: Alteration of T cell subsets and induction of suppressor T cell activity in normal subjects after exposure to sunlight. *J Immunol* 1983, 131: 171-174.
103. Pierceall WE, Kripke ML, Ananthaswamy HN: N-ras mutation in ultraviolet radiation-induced murine skin cancers. *Cancer Res* 1992, 52: 3946-3951.
104. Pinkus H: Keratosis senilis. A biologic concept of its pathogenesis and diagnosis based on the study of normal epidermis and 1730 seborrhoeic and senile keratoses. *Am J Clin Pathol* 1958, 29: 193-207.
105. Porter AG, Janicke RU: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Diffe* 1999, 6: 99-104.
106. Qin J-Z, Chaturvedi V, Bonish B, Nickoloff BJ: Avoiding premature apoptosis of normal epidermal cells. *Nat Med*, 2001, 7: 385-386.
107. Qin J-Z, Chaturvedi V, Denning MF, Choubey D, Diaz MD, Nickoloff BJ: Role of NF- $\kappa$ B in the apoptotic resistant phenotype of keratinocytes. *J Biol Chem* 1999, 274: 37957-37964.
108. Rosypal S: Úvod do molekulární biologie, Brno 2000, ISBN 80-902562-1-X. s. 484.
109. Rosypal S: Úvod do molekulární biologie, Brno 2000, ISBN 80-902562-2-8. s. 837.
110. Salasche SJ, Levine N, Morrison L: Cycle therapy of actinic keratoses of the face and scalp with 5% topical imiquimod cream: An open-label trial. *J Am Acad Dermatol* 2002, 47: 571-577.
111. Sanford ML, Searle JW, Kerr JFR: Successive waves of apoptosis in the rat prostate after repeated withdrawal of testosterone stimulation. *Pathology* 1984,16: 406-410.

112. Sauder DN, Smith MH, Senta-McMillian T, Soria I, Tze-Chiang Meng: Randomized, single-blind, placebo-controlled study of topical application of the immune response modulator resiquimod in healthy adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003, 47: 3846-3852.
113. Seifert M, Gruenberg BH, Sabat R, Donner P, Gruetz G, Volk HD, Wolk K, Asadullah K: Keratinocyte unresponsiveness towards interleukin-10: lack of specific binding due to deficient IL-10 receptor 1 expression. *Exp Dermatol* 2003, 12: 137-144.
114. Seitz CS, Deng H, Hinata K, Lin Q, Khavari PA: Nuclear factor  $\kappa$ B subunits induce epithelial cell growth arrest. *Cancer Res* 2000, 60: 4085-4092.
115. Seline PC, Norris DA, Horikawa T, Fujita M, Middleton MH, Morelli JG: Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 1996, 106: 1320-1324.
116. Sharp TV, Wang HW, Koumi A, Hollyman D, Endo Y, Ye H, Du MQ, Boshoff C: K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function. *J Virol* 2002, 76: 802-816.
117. Sim CS, Slater S, McKee PH: Mutant p53 expression in solar keratosis: an immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 1992, 19: 302-308.
118. Song PI, Park Y, M, Abraham T: Human keratinocytes express functional CD14 and Toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 2002, 119: 424-432.
119. Spellman CW, Anderson WL, Bernard EJ, Tomasi TB: Suppression of antibody responses to topically applied antigens by ultraviolet light irradiation. Induction of phototolerance. *J Exp Med* 1984, 160: 1891-1900.
120. Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, Salasche S, Papadopoulos L, Ulrich C, Christophers E: A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5 % imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2002, 138: 1498-1502.
121. Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, Takeshita H, Deuschle U, Watanabe T: Hax-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol* 1997, 158: 2736-2744.
122. Takashima A, Bergstresser PR: Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochem Photobiol* 1996, 63: 397-400.
123. Takeda K: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2005, 11(1): 51-55.
124. Takeda K, Akira A: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005, 17: 1-14.
125. Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors, *Annu Rev Immunol* 2003, 21: 335-376.

126. Teraki Y, Shiohara T: Apoptosis and the skin. *Eur J Dermatol* 1999, 9: 413-426.
127. Testerman TL, Gester JF, Imbertson LM, Reiter MJ, Miller RL, Gibson SJ, Wagner TL, Tomai MA: Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leuk Biol* 1995, 58: 365-372.
128. Trefzer U, Brockhaus M, Lotscher H et al: The 55-KD tumor necrosis factor receptor on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  and by ultraviolet radiation. *JCI* 1993, 927: 462-470.
129. Tsao H: Genetics of nonmelanoma skin cancer. *Arch Dermatol* 2001, 137: 1486-1492.
130. Tyring SK, Arany I, Stanley MA, Tomai MA, Miller RL, Smith MH, McDermott DJ, Slade HB: A randomized, controlled, molecular study of condylomata accuminata clearance during treatment with imiquimod. *J Infect Dis* 1998, 178: 551-555.
131. Ullrich SE: Does exposure to UV radiation induce a shift to a Th-2-like immune reaction? *Photochem Photobiol* 1996, 64: 254-258.
132. Ulrich SE, Azizi E, Kripke ML: Suppression of the induction of delayed-type hypersensitivity reactions in mice by a single exposure to ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol* 1986, 43: 633-638.
133. Urbanski A, Schwarz T, Neuner P et. al.: Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J Invest Dermatol* 1990, 94: 808-811.
134. Urosevic M, Dummer R: Role of imiquimod in skin cancer treatment. *Am J Clin Dermatol* 2004, 5(6): 453-458.
135. Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996, 93: 2239-2244.
136. Vidal D, Matias-Guiu X, Alomar A: Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. *Br J Dermatol* 2004, 151: 656-662.
137. Vink AA, Berg RJ, de Gruijl FR, Lochman PH, Roza L, Baan RA: Immunochemical detection of cyclobutane thymine dimers in epidermal Langerhans cells of ultraviolet B-irradiated hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1994, 10: 8-12.
138. Villa AM, Berman B: Immunomodulators for skin cancer. *J Drugs Dermatol* 2004, 3: 533-539.
139. Wang C-Y, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr: NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998, 281: 1680-1683.

140. Wang E, MA WJ, Aghajanian C, Spriggs DR: Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA. *Cancer Res* 1997, 57: 5426-5433.
141. Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE: Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol* 2000, 115: 141-148.
142. Weinstock MA: Death from skin cancer among the elderly: epidemiological patterns. *Arch Dermatol* 1997, 133: 1207-1209.
143. Williams HK, Sanders DSA, Jankowski JAZ, Landini G, Brown AMS: Expression of cadherins and catenins in oral epithelium dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998, 27: 308-317.
144. Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI et al: Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 4616-4621.
145. Wolf IH, Cerroni L, Kodama K, Kerl H: Treatment of lentigo maligna (melanoma in situ) with the immune response modifier imiquimod. *Arch Dermatol* 2005, 141: 510-514.
146. Wolf R, Mirmohammadsadegh A, Walz M, Lysa B, Tartler U, Remus R, Hengge U, Michel G, Ruzicka T: Molecular cloning and characterization of alternatively spliced mRNA isoforms from psoriatic skin encoding a novel member of the S100 family. *Faseb J* 2003, 17: 1969-1971.
147. Woodward DF, Owen DA: Effect of H1- and H2-receptor antagonists on cutaneous inflammation evoked by histamine analogues and UV radiation. *Eur J Pharmacol* 1982, 77: 103-112.
148. Young AR: The sunburn cell. *Photodermatology* 1987, 4: 127-134.
149. Young P, McDonnell P, Dunnington D, Hand A, Laydon J, Lee J: Pyridinyl imidazoles inhibit IL-1 and TNF production at the protein level. *Agents Actions* 1993, 39: 67-69.
150. Zarembek KA, Godowski PJ: Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002, 168: 554-561.