



2 6 8 1 0 5 8 4 7 7

Obsah

Strana

1.	<b>Úvod</b>	8
1.1.	Obecný úvod	8–9
1.2.	Eikosanoidy	10
1.2.1.	Eikosanoidový metabolismus	10
1.2.1.1.	Fosfolipázy	10–11
1.2.1.2.	Cyklooxygenáza	11–12
1.2.1.3.	Lipoxygenázy	12–14
1.2.1.4.	Biologické účinky lipoxygenázových metabolitů kyseliny arachidonové	15–17
1.3.	Psoriasis vulgaris	17
1.3.1.	Historické poznámky a prevalence choroby	17
1.3.2.	Patogenetické mechanismy	17–18
1.3.3.	Eikosanoidy a psoriáza	18–19
1.4.	Zpracování humorálně přenesené informace buňkou	19
1.4.1.	Eikosanoidová vazebná místa	20–22
1.4.2.	Efaktorová aktivita	22–23



---

DERMATOLOGIE

---

1.4.2.1.	Systém polyfosfoinositidový	23–24
1.4.2.2.	Systém adenylátcyklázový	24
1.5.	Hlavní poznatky úvodní kapitoly	24–25
<b>2.</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>26–27</b>
<b>3.</b>	<b>Materiál a metodika</b>	<b>28</b>
3.1.	Materiál	28
3.1.1.	Keratinocyty	28
3.1.1.1.	Normální keratinocyty	28
3.1.1.2.	Keratinocyty nemocných s psoriázou	28–29
3.1.1.3.	Keratinocyty pacientů s atopickým ekzémem	29
3.1.2.	Laboratorní chemikálie	29
3.1.2.1.	Fosfátový pufr bez kalciových a magnéziových iontů	29–30
3.1.2.2.	Fosfátový pufr s kalciovými a magnéziovými ionty	30
3.1.2.3.	Roztok trypsinu	30
3.1.2.4.	Kultivační médium pro keratinocyty	30–31
3.1.2.5.	Inkubační médium	31

---

DERMATOLOGIE

---

3.1.2.6.	TRIS – pufr	31
3.1.2.7.	Ligandy	31–32
3.1.2.8.	Další použité a dosud nejmenované látky	32
3.2.	Metodika	33
3.2.1.	Zpracování kůže	33–35
3.2.2.	Předběžné pokusy	35
3.2.2.1.	Krátkodobá a dlouhodobá kultivace buněk	35
3.2.2.2.	Charakterizace kultivovaných buněk	36
3.2.2.3.	Vliv teploty na vazbu kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocyty	37
3.2.2.4.	Vliv trypsinu na vazbu kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocyty	37–38
3.2.2.5.	Vazba kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocyty v suspenzi v závislosti na počtu buněk	38
3.2.3.	Vazebné studie s radioligandem	39
3.2.3.1.	Vazba 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové kyseliny v jednovrstevné kultuře	39–40

3.2.3.2.	Rychlost navázání kyseliny 12(S)-[ $^3$ H]-hydroxyeikosatetraenové na vazebné místo keratinocytů	41
3.2.3.3.	Reverzibilita vazby kyseliny 12(S)-[ $^3$ H]-hydroxyeikosatetraenové na vazebné místo keratinocytů	41
3.2.3.4.	Saturační isotermy	42
3.2.3.5.	Kompetiční křivky	42-43
3.2.3.6.	Vazba ligandu na keratinocyty v buněčné suspenzi	43-44
3.2.4.	Modulace vazby kyseliny 12(S)-[ $^3$ H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocyty	44
3.2.4.1.	Vliv buněčné hustoty na vazbu kyseliny 12(S)-[ $^3$ H]-hydroxyeikosatetraenové	44-45
3.2.4.2.	Redukce počtu vazebných míst kyseliny 12(S)-[ $^3$ H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocytech	45-46
3.2.4.3.	Preinkubace buněk interferonem gama s následnou vazbou kyseliny 12(S)-[ $^3$ H]-hydroxyeikosatetraenové	46
3.2.5.	Měření proliferace keratinocytů	46-47
3.2.6.	Zkoušky adhezivity	48
3.2.6.1.	Povlečení dna otvorů v destičkách kolagenem G	48

3.2.6.2.	Adheze keratinocytů na kolagen G a plastickou hmotu	48–49
3.2.7.	Internalizace vazebných míst s kyselinou 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenovou	49–50
3.2.8.	Analýza získaných dat	50
4.	<b>Výsledky</b>	<b>51</b>
4.1.	Charakterizace kultivovaných buněk	51
4.2.	Výzkumy vazby ligandu na receptor	51
4.2.1.	Předběžné pokusy	51
4.2.1.1.	Vliv teploty na vazbu kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocyty	51–52
4.2.1.2.	Vliv trypsinu na vazbu kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocyty	52–53
4.2.1.3.	Vazba kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na normální keratinocyty v suspenzi v závislosti na počtu buněk	53
4.2.2.	Charakterizace vazebného místa pro kyselinu 12(S)-hydroxyeikosatetraenovou na keratinocytech	53–54
4.2.2.1.	Rychlost navázání kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na keratinocyty	54



4.2.2.2.	Reverzibilita vazby kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroeikosatetraenové na keratinocyty	54
4.2.2.3.	Saturační isotermy	54–55
4.2.2.3.1.	Saturační isotermy normálních keratinocytů	55–56
4.2.2.3.2.	Saturační isotermy psoriatických keratinocytů	56–57
4.2.2.3.3.	Saturační isotermy keratinocytů z kůže nemocných s atopickým ekzémem	57–58
4.2.2.4.	Kompetiční křivky inhibice vazby kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové na normálních keratinocytech	58–59
4.2.2.5.	Vazba ligandu na normální keratinocyty v buněčné suspenzi	59
4.2.3.	Modulace vazby kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové	59
4.2.3.1.	Vliv buněčné hustoty na vazbu kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové	59–60
4.2.3.2.	Redukce počtu vazebných míst kyseliny 12(S)-hydroxyeikosatetraenové	60
4.2.3.3.	Vliv interferonu gama na vazbu kyseliny 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenové	60–62

4.3.	Vliv kyseliny 12(S)-hydroxyeikosatetraenové na růst keratinocytů	62–63
4.4.	Zkoušky adhezivity	63
4.5.	Internalizace vazebných míst s kyselinou 12(S)-[ <sup>3</sup> H]-hydroxyeikosatetraenovou	63–64
5.	<b>Diskuze</b>	<b>65–67</b>
5.1.	Metodika a problematika vazebných studií s radioaktivně značeným ligandem	67–68
5.2.	Cíle provedené studie	69
5.2.1.	Identifikace vazebných míst pro 12(S)-hydroxyeikosatetraenovou kyselinu na normálních lidských keratinocytech	69–70
5.2.2.	Modulace vazby kyseliny 12(S)-hydroxyeikosatetraenové různými faktory	70–73
5.2.3.	Role 12-hydroxyeikosatetraenové kyseliny za patologických podmínek	73–77
6.	<b>Shrnutí</b>	<b>78–79</b>