

Universita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU LIDSKÉHO DEFENSINU VE
VZTAHU K BUNĚČNÉMU CYKLU VE SLIZNICI
DÝCHACÍCH CEST**

Autoreferát disertační práce

Obor: Experimentální chirurgie

Hana Pácová

Školitel: Doc. MUDr. Jaromír Astl, CSc.

Školitel specialista: Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc.

Praha, 2009

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku, 1. LF UK a FNM, V Úvalu 84,
150 06, Praha 5
Ústav pro histologii a embryologii, 1. LF UK, Albertov 4, 128 01, Praha 2

Autor: MUDr. Hana Pácová

Školitel: Doc. MUDr. Jaromír Astl, CSc.

Školitel-konsultant: Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc.

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: 16.9.2009 v **hod.**
kde
.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH

SOUHRN

SUMMARY

1. ÚVOD

2. HYPOTESY A CÍLE

3. MATERIÁL A METODY

4. VÝSLEDKY

4.1 Lidský beta-defensin 1

4.2 Lidský beta-defensin 2

4.3 Lidský beta-defensin 3

4.4 Endotelová syntasa oxidu dusnatého

4.5 Proliferační marker Ki-67

4.6 Apoptotický marker cleaved caspase 3

4.7 Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor

4.8 Transforming growth factor-beta

4.9 Kvantitativní shrnutí výsledků

5. DISKUSE

6. ZÁVĚRY

7. LITERATURA

SEZNAM PUBLIKACÍ

SOUHRN

Chronický zánět tonsil (chronická tonsilitis) a nosní sliznice (nosní polyposa) mají mnoho společných rysů. Chronický zánět a nádorová transformace jsou biologické procesy kontrolované mnoha cytokiny, které hrají úlohu v buněčné signalizaci a regulaci buněčného cyklu. Je také známo, že chronický zánět může usnadňovat nádorovou transformaci.

Cílem této práce bylo zjistit potenciální úlohu antimikrobiálních peptidů (beta-defensinů 1, 2, 3), eNOS (NO molekuly), VEGF, TGF- β , buněčné proliferace (marker Ki-67) a apoptosy (cleaved caspase 3) na vývoj nosní polyposy a chronické tonsilitis a zjistit vztahy mezi chronickým zánětem a nádorovými procesy v patrové tonsile.

Vzorky byly získány od pacientů podstupujících operační zákrok z důvodu deviace nosní přepážky, SAS – sleep apnoe syndrom (zdravé kontroly), nosní polyposy, chronické tonsilitis a karcinomu tonsily. Imunohistochemické postupy pro průkaz všech studovaných molekul či antigenních determinant byly prováděny na parafínových i zmrazených řezech.

Výsledky této práce lze shrnout tak, že HBD-1, 2, 3 byly intenzivněji syntetizovány ve zdravé nosní sliznici v porovnání se zdravými patrovými tonsilami. Nebyl potvrzen signifikantní rozdíl v jejich produkci v obou strukturách s chronickým zánětem, a to v nosních polypech bez přítomnosti *S. aureus* a v chronicky zánětlivé tonsile. Velmi malý, případně téměř žádný výskyt sledovaných defensinů byl zjištěn v nosních polypech s kultivačním nálezem *S. aureus*. HBD-1 je součástí přirozené slizniční imunity a jeho produkce není stimulována v reakci na infekci nebo nádorové bujení. HBD-2 byl zjištěn ve velmi malých množstvích v tonsilách s karcinomem, a to v porovnání se zdravou a zánětlivou tkání. Výskyt HBD-3 v karcinomové tonsile byl nižší v porovnání se zánětlivou situací. Rozdíl byl ve výskytu HBD-1, 2, 3 v karcinomové tkáni, s největším přírůstkem HBD-3. HBD-3 byl nalezen také v cytoplasmě endotelových buněk výstelky malých vén v nosních polypech, v tonsilární tkáni zdravé, zánětlivé i karcinomové.

Z výsledků mé práce vyplývá, že maligní transformace může být usnadňována sníženou lokální slizniční imunitou (omezená produkce beta-defensinů, zejména HBD-2), ale také hypoxií, kdy dochází ke zvýšené expresi VEGF, TGF- β a eNOS (zvýšení produkce molekuly NO) a tím k ovlivnění frekvence procesu apoptosy, buněčné proliferace, angiogeneze, cévní permeability a ovlivnění buněčného cyklu.

SUMMARY

The chronic inflammation in tonsillar (chronic tonsillitis) and nasal (polyposis nasi) tissue has quite a lot of similarities. The chronic inflammation and malignant transformation are biological processes controlled by many cytokines taking part in the process of cell to cell signaling and it is also known that chronic inflammation can be accepted as a factor facilitating the conversion of malignant process.

The aim of this project was to follow and prove a potential role of antimicrobial peptides, eNOS, VEGF, TGF- β and the level of cell proliferation (Ki-67 marker) and apoptosis (cleaved caspase 3) in the development of nasal polyposis and chronic tonsillitis and to determine the relationship between the inflammatory and malignant processes in tonsils.

Samples were obtained from patients with nasal septum deviation and SAS - sleep apnoe syndrom (as healthy controls), nasal polyposis, chronic tonsillitis and oropharyngeal carcinoma. Immunohistochemical procedures for detection of all studied substances and antigen determinants were carried out on cryostat and paraffin sections.

Obtained results of this project can be summarized as followed: HBD-1, 2, 3 are synthesized more intensively in the healthy nasal mucosa than in healthy palatine tonsils. During the chronic inflammation (nasal polyps and chronic tonsillitis) the synthesis of these defensins was approximately in the same levels. Interesting was the finding of very low, or nearly none levels of all three studied beta-defensins in the nasal polyps with the positive cultivation for *S. aureus*. The levels of HBD-1 are just about the same in healthy, inflamed and carcinoma samples. HBD-2 was proven in very low amounts in the tonsillar carcinoma in comparison to healthy and inflamed tonsils. The presence of HBD-3 in carcinoma samples was lower than its amounts during chronic inflammation. In the tonsillar carcinoma were found all three studied defensins but HBD-3 was in the highest levels. This defensin was also localized in the endothelial cell cytoplasm of small veins in studied inflamed nasal and tonsillar samples as well as in healthy and carcinomatous tonsil.

Summarizing it can be concluded that malign transformation can be facilitated by the attenuation of the local mucosal immunity (the reduction in beta-defensins synthesis – especially HBD-2) but also by hypoxia – the expression of some growth factors (VEGF, TGF- β) and eNOS (elevation of the production of NO molecule) increases and it can induce the processes such as apoptosis, cellular proliferation, angiogenesis, vascular permeability and affection of the cell cycle.

1. ÚVOD

Pro hodnocení nálezů v jednotlivých vzorcích je důležité znát stavbu jak zdravých tkání, tak i tkání patologických (polyposis nasi, chronic tonsillitis, tonsillar carcinoma). Ve tkáních patologických je vedle uspořádání buněčné složky důležité i složení a prostorové uspořádání mezibuněčné hmoty. Proto byly, zejména u vzorků nosních polypů, kromě přehledných barvicích metod použity také speciální metody barvení k průkazu jednotlivých komponent extracelulární matrix. V jednotlivých typech patologií je histologické uspořádání, které je charakteristické pro danou patologii.

Proto byly v práci popsány tyto charakteristické rysy zdravých i jednotlivých patologických vzorků. Zdravá nosní sliznice se skládá z víceřadého cylindrického epitelu s řasinkami a pohárkovými buňkami, pod kterým nacházíme vazivovou lamina propria mucosae. V ní se nacházejí seromucinosní žlázy. Podle složení a uspořádání lamina propria mucosae v polyposní tkáni rozlišujeme několik typů polypů - edematosní typ s eosinofilní infiltrací, žlazový typ, vazivový typ a atypický stromální polyp. Změny ve stromatu zejména edematosních polypů byly prokazovány speciálními barvicími metodami (alcianová modř, PAS reakce, orcein, Gömöriho impregnace).

Ve zdravých patrových tonsilách nacházíme vrstevnatý dlaždicový epitel nerohovějící s malým počtem prostupujících elementů lymfoidní řady, vazivové stroma pod epitelem a lymfatický kompartment. V průběhu chronického zánětu se epitel mění na rozvlákněný (větší množství penetrujících buněk lymfoidní řady), dochází ke zmnožení lymfatické složky, kdežto v tonsile s diagnostikovaným karcinomem nacházíme bujení epitelových struktur se pozměněným prostorovým uspořádáním a tvorbou tzv. „karcinomových perel“ jako projevu parakeratinisace. Současně dochází k utlačování a redukci lymfatického podílu tonsily, jednak proliferujícími epitelovými buňkami, jednak zmnožujícím se vazivem s cévami.

Je známo, že na slizničních površích se uplatňují různé mechanismy, které pomáhají zabránit průniku infekce do organismu. Všechny tyto mechanismy jsou součástí slizniční imunity. Patří mezi ně mukociliární clearance ve sliznici dýchacích cest, stejně jako produkce různých antimikrobiálních látek (mají povahu proteinů) na povrch sliznice. Mezi tyto antimikrobiální peptidy (AMP) patří lysozym, laktoferin, sekreční leukoperoxidasový inhibitor i defensiny. Obecným mechanismem účinku je porušení integrity stěny bakteriálních buněk (rozeznávají odlišné uspořádání stěny bakterií a membrány eukaryotických buněk) a tím smrt dané buňky.

Beta-defensiny tvoří důležitou skupinu těchto antimikrobiálních peptidů, které se uplatňují mimo jiné i na povrchu sliznic dýchacích cest i tonsil.

K ozřejmění a doplnění situace ve tkáních a orgánech zdravých i patologických (zánětlivých a nádorových), byly sledovány ještě další látky a děje jako jsou růstové faktory (VEGF, TGF- β), enzymů (eNOS), úroveň buněčné proliferace (Ki-67) a apoptosy (cleaved caspase3). Oba sledované růstové faktory, stejně jako eNOS ovlivňují buněčnou signalizaci a tím i buněčný cyklus, což má za následek mimo jiné i změny v úrovni proliferace a apoptosy různých typů buněk.

2. HYPOTESY A CÍLE

Cílem tohoto projektu bylo ukázat výskyt nebo absenci tří typů beta-defensinů (HBD-1, 2, 3), jakožto antimikrobiálních peptidů přítomných na povrchu sliznic, a tím se pokusit zhodnotit úroveň lokální slizniční imunity a její úlohu při vzniku chronického zánětu ve sliznici nosní a tonsilární.

Dalším úkolem bylo zjistit vztah a úlohu beta defensinů, některých růstových faktorů (VEGF, TGF- β) a enzymu eNOS na proliferaci a apoptosu buněk a tím i na možnou nádorovou transformaci v terénu zdravé a chronicky zánětlivé tonsily.

3. MATERIÁL A METODY

Materiál byl odebírán v průběhu operačních výkonů v celkové anestezii od pacientů s deviací nosní přepážky (zdravá nosní sliznice) a se syndromem SAS – sleep apnoe syndrom (zdravá tonsila), s nosními polypy, chronickou tonsilitis a s karcinomem tonsily. Pacienti s nosními polypy byly rozděleny na skupinu s pozitivním kultivačním nálezem *Staphylococcus aureus* a bez něj. Odebrané tkáně byly buď zmrazovány tekutým dusíkem nebo zality do parafinu. Trojstupňová imunohistochemická metoda s křenovou peroxidasou byla používána k průkazu přítomnosti jednotlivých molekul v daných tkáních. Pro zjišťování změn ve stromatu nosních polypů byly použity některé speciální barvicí metody – alciánová modř, PAS reakce, průkaz elastických vláken (orcein) a Gömöriho impregnace.

4. VÝSLEDKY

4.1 Lidský beta defensin 1

Tento defensin byl detekován ve všech studovaných tkáních. Nejvíce byl zastížen ve zdravé nosní sliznici, pravidelně byl nalézán také ve zdravé tonsilární tkáni. V zánětlivých tkáních byl zjišťován pouze nepravidelně na rozdíl od karcinomu, kde se vyskytoval pravidelně zejména v keratinových perlách.

4.2 Lidský beta defensin 2

Zatímco ve zdravé nosní sliznici byl HBD-2 detekován pravidelně a v relativně vysokých množstvích, ve zdravých tonsilách se vyskytoval pouze v některých vzorcích. V zánětlivých vzorcích byl tento defensin přítomen pravidelně ve vysokých hladinách na rozdíl od karcinomu, kde tento defensin nebyl prakticky vůbec přítomen.

4.3 Lidský beta defensin 3

HBD-3 byl zjištěn ve všech sledovaných tkáních, vysoké koncentrace reakčního produktu byly zjišťovány jak u zdravých tak u zánětlivých orgánů. V průběhu karcinomových změn byla jeho přítomnost nižší. Zajímavý byl nález tohoto defensinu v cytoplasmě endotelových buněk výstelky malých vén ve všech sledovaných vzorcích kromě zdravé nosní sliznice.

Všechny sledované defensiny (HBD-1, 2, 3) byly prokázány ve velmi nízkých až mizivých množstvích ve sliznici nosních polypů s kultivačně prokázaným *S. aureus*.

4.4 Endotelová NO syntasa

eNOS byla nalezena ve všech sledovaných tkáních a orgánech, její výskyt se lišil množstvím a lokalizací.

4.5 Proliferační marker Ki-67

Nejvíce proliferujících buněk bylo zjištěno během chronického zánětu jak nosní sliznice, tak i tonsil a v karcinomem postižené tonsile.

Apoptotický marker cleaved caspase 3

Apoptosa není příliš častý děj v žádné ze sledovaných struktur. Nejčastěji byla apoptotická tělíska nalézána v keratinových perlách tonsilárního karcinomu. V ostatních sledovaných vzorcích byla nacházena pozitivita průkazu cleaved caspase 3 jen ojediněle.

4.6 Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor

Tento růstový faktor byl nalézán ve všech sledovaných vzorcích v cytoplasmě endotelových buněk zejména malých vén, ve zdravé i zánětlivé nosní sliznici byl detekován v sekrečních i vývodných složkách žláz.

4.7 Transforming growth factor beta

V nosní sliznici zdravé i polyposní byl zjištěn tento růstový faktor jak v epitelu povrchovém, tak i žlázovém. Zajímavé lokalizace TGF- β byly prokázány v patrových tonsilách. Zatímco ve zdravé tonsile byla při povrchu stratum spinosum lokalizace tohoto cytokinu intracelulární a ve hlubších partiích stratum spinosum intercelulární, v průběhu karcinomových změn byl TGF- β prokázán v obou zmíněných oblastech epitelu intracelulárně. V zánětlivých tonsilách byla jeho přítomnost prokázána pouze při povrchu stratum spinosum epitelu.

4.8 Kvantifikace výsledků

EPITEL	ZDRAVÁ NOSNÍ SLIZNICE	NOSNÍ POLYP bez S. aureus	NOSNÍ POLYP se S. aureus	TONSILA zdravá	TONSILA chronický zánět	TONSILA karcinom
HBD-1	-	+	+-	+	+	++
HBD-2	-	++	+-	+-	+++	+-
HBD-3	+++	++	+-	+	+++	++
eNOS	-	++		-	+++	+++
VEGF	-	+		+	++	+++
TGF-β	+	++		++	+	+++
Ki-67	-	++		+-	++	++
caspase	-	+-		-	-	+

ŽLÁZKY	ZDRAVÁ NOSNÍ SLIZNICE	NOSNÍ POLYP bez S. aureus	NOSNÍ POLYP se S. aureus	TONSILA zdravá	TONSILA chronický zánět	TONSILA karcinom
HBD-1	++	+	+-	/	/	/
HBD-2	+++	-	+-	/	/	/
HBD-3	+++	++	+-	/	/	/
eNOS	++	-		/	/	/
VEGF	++	+++		/	/	/
TGF-β	++	+		/	/	/
Ki-67	+-	-		/	/	/
caspase	-	-		/	/	/

STROMA	ZDRAVÁ NOSNÍ SLIZNICE	NOSNÍ POLYP bez S. aureus	NOSNÍ POLYP se S. aureus	TONSILA zdravá	TONSILA chronický zánět	TONSILA karcinom
HBD-1	-	-	-	+	-	-
HBD-2	-	-	-	+	++	+-
HBD-3	++	+	-	+	++	-
eNOS	+++	++		++	++	+
VEGF	-	+++		-	-	+-
TGF-β	+	+		+	++	+
Ki-67	-	+		+-	+++	+++
caspase	-	+-		-	+-	+-

ENDOTEL	ZDRAVÁ NOSNÍ SLIZNICE	NOSNÍ POLYP se S. aureus	NOSNÍ POLYP bez S. aureus	TONSILA zdravá	TONSILA chronický zánět	TONSILA karcinom
HBD-1	-	-	-	-	-	-
HBD-2	-	-	-	-	-	-
HBD-3	-	++	-	++	++	++
eNOS	+++	+++		+++	+++	+
VEGF	+++	+++		++	++	++
TGF-β	-	-		+	-	+
Ki-67	-	+-		-	-	-
caspase	-	-		-	-	-

5. DISKUSE

Okolní prostředí obsahuje mnoho patogenů, které představují nebezpečí infekce. Nejjednodušší cesta, kterou patogenní mikroorganismy mohou vstoupit do organismu je systém dýchací a horní část trávicího systému – dutina ústní a orofarynx včetně tonsil. Potenciální patogeny jsou přítomny ve vdechovaném vzduchu i v polykané potravě. Proto je velmi důležité, že existuje celá řada mechanismů chránících organismus proti infekci. K těmto obraným mechanismům patří neporušená integrita povrchového epitelu, buňky imunitního systému ve sliznici, mukociliární aparát a antimikrobiální látky v povrchové tekutině dýchacích cest a na povrchu epitelu horní části trávicího systému. V horních cestách dýchacích se nalézá přímo ve sliznici mnoho lymfatické tkáně. V této souvislosti je nutno zmínit nasofaryngeální a faryngeální tonsilu, linguální tonsilu a tonsily patrové – jsou to nakupeniny lymfatické složky, řazené do tzv. Waldayerova lymfatického kruhu. Pokud jeden nebo více obranných mechanismů selže, je vstup patogenních mikroorganismů do organismu usnadněn (Hellings P et al., 2000).

Jako zástupce sliznice horních cest dýchacích je zde vybrána sliznice dutiny nosní. Tkáň patrové tonsily byla vybrána pro svou lokalizaci v orofaryngu – tzn. v křížení cest dýchacích a polykacích. Chronický zánět tonsil a nosní sliznice má mnoho společných mechanismů. Přestože je tonsila lymfatický orgán s mnoha přítomnými buňkami imunitního systému, můžeme mnoho těchto buněk nalézt i ve sliznici nosní. Polyposis nasi je příkladem

chronického zánětu nosní sliznice. Je to relativně časté onemocnění spojené s poruchami imunitní odpovědi organismu. Jsou známy některé etiopatologické faktory mezi které patří např. asthma bronchiale, chronická rhinitis nebo chronická sinusitis. V histologickém obrazu nosní polyposy dominuje “jelly-like” mezibuněčná hmota se zánětlivou infiltrací mononukleárů, eosinofilů, plazmatických a žírných buněk, jindy převaha seromucinosních žlázek na úkor stromatu. V tonsilárních vzorcích, získaných od pacientů s chronickou tonsilitidou, dominuje, díky četným migrujícím lymfocytům, značně rozvlákněný povrchový epitel. V karcinomatosis tonsile pak převládají značně zmnožené buňky všech vrstev dlaždicového epitelu, až po tvorbu keratinových perel z buněk terminálně postižených parakeratinisací. Dalším kritériem je úbytek lymfatické složky na úkor tkáně epitelové a vazivové (fibrosa). Je také známo, že chronický zánět může zvýšenou proliferací buněk usnadňovat vznik maligní transformace. Přesný mechanismus maligní transformace v zánětlivé tkáni není zatím plně objasněn. Předpokládá se souvislost vystupňované proliferace buněk s vyšším rizikem mutací v genomu a tím i nádorové transformace.

Jedním typem antimikrobiálních substancí, které pomáhají chránit povrch sliznice před infekcí jsou defensiny. Tyto látky fungují jako endogenní antibiotika. Jsou aktivní proti bakteriím, virům i plísním (Lee SH et al., 2002). Defensiny můžeme najít na kůži i na sliznici různých orgánů včetně sliznice nosní a tonsilární. Jsou zahrnuty k mechanismům přirozené slizniční imunity.

Z literárních údajů vyplývá, že **HBD-1** je produkován konstitutivně ve zdravých tkáních, a že jeho syntéza není zvyšována patogeny. Tento defensin je zahrnován do přirozené imunitní odpovědi organismu (Po-Hsu Ch and Sheen-Yie F, 2004, Klüver E et al., 2006, Dunsche A et al., 2001, Carothers DG et al., 2001). Někteří autoři referují o tom, že se produkce HBD-1 u různých typů tkání a různých patologií neliší (Lee SH et al., 2002). Na druhé straně jsou však publikována data, která udávají nižší hladiny tohoto defensinu v tonsilách u pacientů s diagnosou rekurentní akutní tonsilitidy (Ball SL et al., 2007).

Dle našich výsledků se HBD-1 vyskytuje jak ve zdravých, tak i v zánětlivě změněných oblastech. Zatímco v případě vzorků ze zdravých orgánů byl prokázán vyšší výskyt HBD-1 v nosní sliznici oproti tonsilám, v případě přítomného zánětu je množství tohoto defensinu nižší než v kontrolní zdravé skupině, ale množství přítomného HBD-1 v těchto dvou lokalitách se neliší. Ve vzorcích získaných od pacientů s diagnostikovaným karcinomem orofaryngu byl tento defensin nalézán zejména oblastech keratinových perel, a to v relativně vysokých množstvích.

Co se týče **HBD-2**, literární údaje se shodují v tom, že v zánětlivé nosní sliznici je tento defensin přítomen ve vyšších množstvích než ve sliznici zdravé (Lee SH et al., 2002, Po-Hsu Ch and Sheen-Yie F, 2004). To se nedá říci o tonsilách, kde se autoři ve svých výsledcích rozcházejí. Někteří udávají stejné množství HBD-2 ve zdravých i zánětlivých tonsilách, jiní udávají vyšší výskyt HBD-2 během chronického zánětu tonsil (Claeys S et al., 2003, Weise JB et al., 2002). Vysoké hladiny tohoto defensinu jsme v našich vzorcích zjistili jak ve zdravé, tak i zánětlivé nosní sliznici. Jeho přítomnost se lišila zejména lokalizací výskytu. Velmi zajímavým nálezem, který je v rozporu s údaji z literatury, je skutečnost, že výskyt HBD-2 ve vzorcích s karcinomem byl jen ve velmi malých úrovních. Reference udávají zvýšené hladiny HBD-2 během této patologie (Mizukawa N et al., 2000, Sawaki K et al., 2002, Yoshimoto T et al., 2003). **HBD-3**, podobně jako HBD-2 byl prokázán jak ve zdravých tak v patologických lokalizacích (Claeys S et al., 2003). Naše výsledky ukázaly, že jeho výskyt byl v těchto dvou skupinách vzorků vyrovnanější než v případě HBD-2. Bylo prokázáno pouze mírné zvýšení v průběhu zánětu. Velmi zajímavým zjištěním byl nález HBD-3 v cytoplasmě endotelových buněk ve všech typech vzorků, kromě zdravé nosní sliznice.

Za velmi závažný nález považuji minimální výskyt HBD-1, 2 i 3 ve sliznici nosní s kultivačně prokázaným *S. aureus*. I když byl mnoha autory prokázán bakteriostatický (Claeys S et al., 2003) nebo dokonce baktericidní (Po-Hsu Ch and Sheen-Yie F, 2004) účinek beta defensinů na *S. aureus*, jejich minimální výskyt u bacilonosičů *S. aureus* velmi omezuje možnost jejich působení nebo naopak je důsledkem této invaze.

Typická lokalizace reakčního produktu detekce **eNOS**, potvrzující konstitutivní přítomnost této syntasy, a potvrzující její aktivitu, byla v cytoplasmě endotelových buněk kapilár a malých cév ve všech typech vyšetřovaných vzorků. Její výskyt v různých strukturách (epitel, žlásky, stroma) jednotlivých nosních sliznic a tonsil se lišil v závislosti na přítomné patologii. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že se na zvýšení exprese eNOS může podílet hypoxie nebo snížení lokální slizniční imunity. eNOS se svým produktem (signální molekula NO) podílí na angiogenezi, vaskulogenezi, apoptose a proliferaci, invazivitě, regulaci buněčného cyklu i ovlivnění (zvýšení) cévní permeability (Blais V and Rivest S, 2001). Tyto děje jsou vystupňovány v průběhu zánětu i nádorového zvratu, kdy byla zjištěna vyšší exprese eNOS. Naše výsledky ukazují, že v nejvyšším množství byla tato syntasa potvrzena u karcinomu tonsily, kde je nejvíce zastoupena v oblasti karcinomových perel a pravděpodobně hraje roli v procesech programované buněčné smrti (apoptosy) a proliferace, jak již publikovali i jiní autoři (Fukumura D et al., 2006, Lancaster JR Jr. and Xie K, 2006, Li CQ and Wogan GN, 2005).

Co se týká apoptosy (marker **cleaved caspase 3**), zjistili jsme, že tento proces není častý ani v nosní sliznici, ani v tonsilách. Nejvíce byla apoptosa zastoupena v zárodečných centrech lymfatických folikulů v tonsilách s chronickým zánětem a v centru keratinových perel, ale i tak bylo jejich množství velmi nízké.

Na druhé straně mnoho proliferujících buněk (marker **Ki-67**) bylo nalezeno jak v epitelu, tak ve stromatu, endotelových buňkách i basálních partiích epitelu nosních polypů proti zdravé nosní sliznici. Tyto nálezy mohou svědčit pro vystupňovanou angiogenesu v této lokalizaci. Četné proliferující buňky byly pravidelně nalézány v zárodečných centrech lymfatických folikulů během chronického zánětu tonsil. Velmi překvapující byl nález velmi malého množství proliferujících buněk v zárodečných centrech lymfatických folikulů ve vzorcích tonsilárního karcinomu.

Součástí práce bylo také zjišťování výskytu dvou růstových faktorů – VEGF a TGF- β . **VEGF** je znám jako významný mitogen pro endotelové buňky, často také hraje roli v usnadňování cévní permeability (Joory KD et al., 2006, Leung DW et al., 1989, Unemori EN et al., 1992). Ve zdravých tkáních jsem VEGF nacházela zejména v cytoplasmě endotelových buněk a v povrchovém epitelu, ale výrazně vyšší výskyt VEGF byl prokázán v zánětlivých tkáních i karcinomatosisních tonsilách. VEGF spolu s eNOS a jejím produktem NO jsou důležité pro potenciaci růstu cév (endotelová lokalizace) z důvodu lokální tkáňové hypoxie (exprese VEGF a eNOS v povrchovém epitelu zejména v tumorosisních tkáních) a současně pro rozvoj stromálního edému a pro metastatické procesy i zvýšení permeability cév (Joory KD et al., 2006, Leung DW et al., 1989, Unemori EN et al., 1992, Jiang S et al., 2003). Tyto výsledky ukazují, že exprese VEGF a eNOS byla spojena se známkami intenzivních angiogenetických procesů a že exprese těchto faktorů může být příčinou odlišné stavby pojivové tkáně stromatu.

Někteří autoři uvádějí, že **TGF- β** je nejučinnějším růstovým inhibítorem pro epitelové, endotelové buňky a fibroblasty (Myoken Y et al., 1990, Roberts AB et al., 1980). Přestože se udává, že TGF- β inhibuje růst endotelových buněk, bylo prokázáno, že za určitých podmínek (hypoxie, lokální oslabení imunity) může mít účinek paradoxně opačný – podporuje angiogenesu. Někteří autoři uvádějí, že nadprodukce TGF- β nádorovými buňkami přispívá k vaskularisaci de novo a tím může podporovat růst nádoru (Logullo AF et al., 2003). Moje výsledky ukázaly přítomnost tohoto růstového faktoru v normálních tkáních zejména v povrchovém epitelu. Velmi zajímavé bylo zjištění, že ve zdravé tonsile byl TGF- β zjištěn v povrchnějších vrstvách stratum spinosum, kde připomíná charakter buněk stratum granulosum povrchového epitelu a je lokalizován intracelulárně, zatímco v hlubších vrstvách stratum spinosum byl TGF- β nalezen intercelulárně. Předpokládám, že TGF- β je produkován

povrchovějšími buňkami stratum spinosum, je uvolňován z buněk a transportován do hlubších vrstev stratum spinosum, kde hraje roli v buněčné diferenciaci. To je pravděpodobně fyziologický proces. Na druhé straně lokalizace TGF- β v zárodečných centrech lymfatických folikulů pouze během chronického zánětu tonsil napovídá, že tento faktor může působit i jako mitogen na lymfocyty (lymfoblasty), ale pouze za patologických podmínek. Během nádorových procesů můžeme zjistit výraznou mitotickou aktivitu v epitelu tonsil. Tato výrazná mitogenní aktivita v případě lokálního oslabení imunity a možná i lokální hypoxie v průběhu nádorového procesu, je velmi pravděpodobně potencována TGF- β . Velmi zajímavý je i rozdíl v lokalizaci TGF- β ve zdravé tkáni v porovnání s tkání karcinomovou. Ve zdravé tonsile byl tento růstový faktor nalezen ve stratum spinosum extracelulárně na rozdíl od tonsily s karcinomem, kde byl v celém rozsahu stratum spinosum TGF- β uložen intracelulárně.

6. ZÁVĚRY

Sumárně lze konstatovat, že HBD-1, 2, 3 byly intenzivněji syntetizovány ve zdravé nosní sliznici v porovnání se zdravými patrovými tonsilami. Nebyl potvrzen signifikantní rozdíl v produkci HBD-1, 2, 3 v nosních polypech bez přítomnosti *S. aureus* a v chronicky zánětlivé tonsile. Velmi malý, či téměř žádný výskyt HBD-1, 2, 3 byl zjištěn v nosních polypech s kultivačním nálezem *S. aureus*. HBD-1 je součástí přirozené slizniční imunity a jeho produkce se nezvyšuje v reakci na infekci nebo nádorové bujení. HBD-2 byl zjištěn ve velmi malých množstvích v tonsilách s karcinomem v porovnání se zdravou a zánětlivou tkání. Výskyt HBD-3 v karcinomové tkáni byl nižší v porovnání se zánětlivou tkání. Rozdíl byl ve výskytu HBD-1, 2, 3 v karcinomové tkáni, kde byla zjištěna nejvyšší exprese HBD-3. HBD-3 byl nalezen také v cytoplasmě endotelových buněk výstelky malých věn v nosních polypech, v tonsile zdravé, zánětlivé i karcinomové.

Z výsledků mé práce vyplývá, že maligní transformace může být usnadňována sníženou lokální slizniční imunitou (omezená produkce beta-defensinů, zejména HBD-2), ale také hypoxií, kdy dochází ke zvýšené expresi VEGF, TGF- β a eNOS (zvýšení produkce molekuly NO) a tím k ovlivnění procesu apoptosy, buněčné proliferace, angiogeneze, cévní permeability a ovlivnění buněčného cyklu.

7. LITERATURA

- Ball SL, Siou GP, Wilson JA, Howard A, Hirst BH, Hall J. (2007) Expression and immunolocalisation of antimicrobial peptides within human palatine tonsils. *J Laryngol Otol.* 121(10): 973-978
- Blais V. and Rivest S. (2001) Inhibitory action of nitric oxide on circulating tumor necrosis factor-induced NF- κ B activity and COX-2 transcription in the endothelium of the brain capillaries. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60: 893-905
- Claeys S de Belder T Holtappels G, Gevaert P, Verhasselt B, van Cauwenberge P, Bachert C. (2003) Human β -defensins and toll-like receptors in the upper airway. *Allergy.* 58: 748-753
- Carothers DG, Graham SM, Jia HP, Ackermann MR, Tack BF and McCray PB Jr. (2001) Production of beta-defensin antimicrobial peptides by maxillary sinus mucosa. *Am J Rhinol.* 15(3): 175-179
- Dunsche A, Acil Y, Siebert R, Harder J, Schröder JM, Jepsen S. (2001) Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med.* 30:154-158
- Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. (2006) The role of nitric oxide in tumor progression. *Nat Rev Cancer.* 6: 521-534
- Hellings P, Jorissen M, Ceuppens JL. (2000) The Waldeyer's ring. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 54(3): 237-241
- Jiang S, Dong Z, Zhu D, Yang Z. (2003) Local tissue hypoxia and formation of nasal polyps. *Chinese Medical Journal.* 116(2): 243-247
- Joory KD, Levick JR, Mortimer PS, Bates DO. (2006) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in normal human tissues. *Lymphatic Research and Biology.* 4(2): 73-92
- Klüver E, Adermann K, Schulz A. (2006) Synthesis and structure-activity relationship of β -defensins, multi-functional peptides of the immune system. *J Pept Sci.* 12: 243-257
- Lancaster JR. Jr, Xie K. (2006) Tumors face NO problems? *Cancer Res.* 66: 6459-6462
- Lee SH, Kim JE, Lim HH, Lee HM, Choi JO. (2002) Antimicrobial defensin peptides of the human nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 111(2): 135-141
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 246: 1306-1309
- Li CQ, Wogan GN. (2005) Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* 226: 1-15
- Logullo AF, Nonogaki S, Miguel RE, Kowalski LP, Nishimoto IN, Pasini FS, Federico MH, Brentani RR, Brentani MM. (2003) Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J Oral Pathol Med.* Mar, 32(3): 139-145

Mizukawa N, Sawaki K, Yamachika E, Fukunaga J, Ueno T, Takagi S, Sugahara T. (2000) Presence of human beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 20(3B): 2005-2007

Myoken Y, Kan M, Sato GH, McKeehan WL, Sato JD. (1990) Bifunctional effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF-beta binding sites. *Exp Cell Res.* Dec, 191(2): 299-304

Po-Hsu Ch, Sheen-Yie F. (2004) Expression of human β -defensin 2 in human nasal mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 216: 238-241

Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ. (1980) Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun, 77(6): 3494-3498

Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Yoshimoto T, Nakano M, Sugahara T. (2002) High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 22(4): 2103-2107

Unemori Ferrara EN, Bauer EA, Amento EP. (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology.* 153: 557-562

Weise JB, Meyer JE, Helmer H, Wittrock H, Maune S. (2002). A newly discovered function of palatine tonsils in immune defence: the expression of defensins. *Otolaryngol Pol.* 56(4): 409-413

Yoshimoto T, Yamaai T, Mizukawa N, Sawaki K, Nakano M, Yamachika E, Sugahara T. (2003) Different expression patterns of beta-defensins in human squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 23(6C): 4629-4633

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:

a) s **IF**

1. **Páková H**, Astl J, Martínek J. (2009) The pathogenesis of chronic inflammation and malignant transformation in the human upper airways - the role of beta-defensins, eNOS, cell proliferation and apoptosis. *Histology and Histopathology.* 24: 815-820 – **IF 2,007 (2007)**
2. Lukeš P, **Páková H**, Kučera T, Veselý D, Martínek J, Astl J. (2008) Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase and caspase-3 in tonsillar cancer, chronic tonsillitis and healthy tonsils. *Folia biologica.* 54: 141-145 – **IF 0,596 (2007)**

b) **bez IF**

1. **Páková H**, Kučera T, Astl J, Martínek J. (2004) Detection of beta-defensins and NOS in healthy and pathological nasal mucosa. *Biomedical papers*. 148(2): 239-240
2. Kučera T, **Páková H**, Veselý D, Astl J, Martínek J. (2004) Apoptosis and cell proliferation in chronic tonsillitis and oropharyngeal carcinoma: role of nitric oxide and cytokines. *Biomedical papers*. 148(2): 225–227,
3. Astl J, Veselý D, Kučera T, Martínek J, **Páková H**, Šterzl I, Betka J. (2006) Sérové hladiny IL-2, IL-4, IL-10 a TGFβ1 a jejich srovnání s markery angiogeneze a apoptózy u karcinomů a chronického zánětu patrové mandle. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 55 (2): 88–91
4. **Páková H**, Kuchynková Z. (2006) Funkční aspekty morfologie nosní sliznice. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 55(3): 174–177
5. Kuchynková Z, Nyč O, **Páková H**, Jandová Z. (2007) Chronická rinosinitida s nosními polypy a *Staphylococcus aureus*. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 56(4): 220–226
6. Kuchynková Z, **Páková H**. (2008) Defensiny - důležitá složka přirozené imunity v obraně proti infekci. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 57(1): 36–39
7. Kuchynková Z, **Páková H**, Balatková Z. (2008) Beta defensiny 2 a 3 ve sliznici nosních polypů u nemocných s chronickou rinosinitidou s nosními polypy a s kultivačním nálezem – *Staphylococcus aureus* na nosní sliznici. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 57(2): 74-78

Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace:

a) **s IF**

1. Kučera T, Veselý D, **Páková H**, Martínek J, Astl J. (2005) Expression of nitric oxide synthases in parathyroid gland adenoma and parathyroid gland hyperplasia. *Neuroendocrinology Letters*. 4(26): 373-376 – **IF 1,048 (2004)**

Konference - presentace:

- 1) Postery: 8
- 2) Přednášky: 5

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů a výzkumných záměrů:

- 1) FRVŠ 986/2004, hlavní řešitel MUDr. Hana Páková
- 2) IGA MZČR NR8440-3/2005, hlavní řešitel Doc. MUDr. Zdenka Kuchynková, CSc.
- 3) IGA MZČR NR9077, hlavní řešitel Doc. MUDr. Jaromír Astl, CSc.
- 4) Výzkumný záměr MSM 0021620807, hlavní řešitel Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.