

Universita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Ústav pro histologii a embryologii

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

Disertační práce

Obor: Experimentální chirurgie

HANA PÁCOVÁ

Školitel: Doc. MUDr. Jaromír Astl, CSc.
Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF a FN v Motole

Školitel-konsultant: Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc.
Ústav pro histologii a embryologii 1. LF UK

Praha, 2009

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů a výzkumných záměrů:

- 1) FRVŠ 986/2004, hlavní řešitel MUDr. Hana Pácová
- 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.

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Jaromíru Astlovi, CSc. a školiteli-konsultantovi Prof. MUDr. Jinřichu Martínkovi, DrSc. za odborné vedení a vřelý přístup. Dále děkuji pracovníkům Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FNM za pomoc při odběru materiálu a také paní Blažkeové, paní Kratinové, paní Kolářové a slečně Kosové z Ústavu pro histologii a embryologii 1. LF UK za pomoc při technickém zpracování vyšetřovaných vzorků. Za jazykovou úpravu děkuji Martině Hořejší. Na konec bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu během mého postgraduálního studia.

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, angiogenese, 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 syndrome (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.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod | 13 |
| 1.1 Histologická stavba zdravých tkání | 13 |
| 1.1.1 Sliznice dýchacích cest | 13 |
| 1.1.2 Tonsily | 17 |
| 1.2 Histologický obraz patologických změn – základní pozorování | 19 |
| 1.2.1 Polyposis nasi | 19 |
| 1.2.2 Tonsilitis chronica | 28 |
| 1.2.3 Karcinom tonsily | 29 |
| 1.3 Antimikrobiální obrana slizničních povrchů | 31 |
| 1.3.1 Přirozené imunitní mechanismy sliznice dýchacích cest | 32 |
| 1.3.2 Obrana dýchacích cest před infekcí patogenními bakteriemi | 32 |
| 1.3.3 Antimikrobiální peptidy v sekretu dýchacích cest | 38 |
| 1.3.3.1 Lysozym | 38 |
| 1.3.3.2 Laktoferin | 38 |
| 1.3.3.3 Sekreční leukoperoxidázový inhibitor | 39 |
| 1.3.3.4 Defensiny | 39 |
| 1.3.3.4.1 Alfa-defensiny | 40 |
| 1.3.3.4.2 Beta-defensiny | 40 |
| 1.3.3.4.2.1 Stavba molekuly beta-defensinů | 40 |
| 1.3.3.4.2.2 Funkce beta-defensinů | 41 |
| 1.3.3.4.2.3 Vztah struktura - funkce na antimikrobiální aktivitu | 41 |
| 1.3.3.4.2.4 Působení beta-defensinů na neutrofile | 42 |
| 1.3.3.4.2.5 Vztah struktura - funkce na chemotaktickou aktivitu | 42 |
| 1.3.3.4.2.6 Vztah struktura - funkce na interakci s buněčnými membránami savců | 43 |
| 1.3.3.4.2.7 Beta-defensiny v dýchacích cestách a tonsilách | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 1.4 Zánět | 45 |
| 1.5 Nádorová transformace | 47 |
| 1.6 Molekuly a procesy ovlivňující fyziologické i patologické procesy | 49 |
| 1.6.1 Endotelová syntasa oxidu dusnatého | 49 |
| 1.6.2 Apoptosa | 50 |
| 1.6.3 Buněčná proliferace | 52 |
| 1.6.4 Transforming growth factor-beta | 53 |
| 1.6.5 Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor | 54 |
| 2. Materiál a metody | 57 |
| 3. Výsledky | 60 |
| 3.1 Lidský beta-defensin 1 | 60 |
| 3.1.1 Zdravá nosní sliznice | 60 |
| 3.1.2 Nosní polypy bez Staphylococcus aureus | 61 |
| 3.1.3 Nosní polypy s přítomným Staphylococcus aureus | 62 |
| 3.1.4 Zdravá tonsila palatina | 62 |
| 3.1.5 Tonsila palatina s chronickým zánětem | 63 |
| 3.1.6 Tonsila palatina s karcinomem | 63 |
| 3.2 Lidský beta-defensin 2 | 65 |
| 3.2.1 Zdravá nosní sliznice | 65 |
| 3.2.2 Nosní polypy bez Staphylococcus aureus | 66 |
| 3.2.3 Nosní polypy s přítomným Staphylococcus aureus | 67 |
| 3.2.4 Zdravá tonsila palatina | 67 |
| 3.2.5 Tonsila palatina s chronickým zánětem | 68 |
| 3.2.6 Tonsila palatina s karcinomem | 69 |
| 3.3 Lidský beta-defensin 3 | 71 |
| 3.3.1 Zdravá nosní sliznice | 71 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3.2 | Nosní polypy bez Staphylococcus aureus | 72 |
| 3.3.3 | Nosní polypy s přítomným Staphylococcus aureus | 72 |
| 3.3.4 | Zdravá tonsila palatina | 72 |
| 3.3.5 | Tonsila palatina s chronickým zánětem | 73 |
| 3.3.6 | Tonsila palatina s karcinomem | 74 |
| 3.4 | Endotelová syntasa oxidu dusnatého | 76 |
| 3.4.1 | Zdravá nosní sliznice | 76 |
| 3.4.2 | Nosní polypy | 77 |
| 3.4.3 | Zdravá tonsila palatina | 77 |
| 3.4.4 | Tonsila palatina s chronickým zánětem | 78 |
| 3.4.5 | Tonsila palatina s karcinomem | 79 |
| 3.5 | Proliferační marker Ki-67 | 81 |
| 3.5.1 | Zdravá nosní sliznice | 81 |
| 3.5.2 | Nosní polypy | 82 |
| 3.5.3 | Zdravá tonsila palatina | 82 |
| 3.5.4 | Tonsila palatina s chronickým zánětem | 83 |
| 3.5.5 | Tonsila palatina s karcinomem | 84 |
| 3.6 | Apoptotický marker cleaved caspase 3 | 85 |
| 3.6.1 | Zdravá nosní sliznice | 85 |
| 3.6.2 | Nosní polypy | 85 |
| 3.6.3 | Zdravá tonsila palatina | 86 |
| 3.6.4 | Tonsila palatina s chronickým zánětem | 86 |
| 3.6.5 | Tonsila palatina s karcinomem | 87 |
| 3.7 | Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor | 88 |
| 3.7.1 | Zdravá nosní sliznice | 88 |
| 3.7.2 | Nosní polypy | 88 |
| 3.7.3 | Zdravá tonsila palatina | 90 |
| 3.7.4 | Tonsila palatina s chronickým zánětem | 90 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.7.5 | Tonsila palatina s karcinomem | 91 |
| 3.8 | Transforming growth factor-beta | 93 |
| 3.8.1 | Zdravá nosní sliznice | 93 |
| 3.8.2 | Nosní polypy | 93 |
| 3.8.3 | Zdravá tonsila palatina | 94 |
| 3.8.4 | Tonsila palatina s chronickým zánětem | 95 |
| 3.8.5 | Tonsila palatina s karcinomem | 96 |
| 3.9 | Kvantitativní shrnutí výsledků | 98 |
| 4. | Diskuse | 100 |
| 5. | Závěr | 112 |
| 6. | Literatura | 113 |
| 7. | Přílohy | 126 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---------------|--|
| ABC | avidin biotin complex |
| ACTH | adrenocorticotropic hormone |
| AMP | antimikrobiální peptidy |
| AP | anionické antimikrobiální peptidy |
| ATP | adenosintrifosfát |
| Bcl-2 gen | B-cell leukemia gene |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| CCR6 | C-C chemokine receptor type 6 |
| cGMP | cyklický guanosinmonofosfát |
| CMV | cytomegalovirus |
| DAB | Diaminobenzidine |
| DNA | deoxyribonuclear acide (deoxyribonukleová kyselina) |
| DNES | diseminovaný neuroendokrinní systém |
| EGF | epidermal growth factor |
| eNOS | endothelial nitric oxide synthase |
| FPRL-1 | Formyl peptide receptor-like 1 |
| G+ | Gramm pozitivní |
| G- | Gramm negativní |
| GAG | Glykosaminoglykany |
| HBD-1, 2, 3 | human beta defensin 1, 2, 3 |
| HIF-1 | Hypoxia Inducible Factor 1 |
| HIV | human imunodeficiency virus |
| HNP | human neutrophil peptides (alfa defensiny) |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule |
| IL | interleukin |
| INF- γ | interferon gama |
| iNOS | inducible nitric oxide synthase |
| Ki-67 | proliferační marker (protilátka proti proteinům připravená v Kielu s pozitivitou v jamce 67) |
| LPS | Lipopolysacharid |
| MALT | mucosa associated lymphatic tissue |

| | |
|------------------|---|
| mM | milimol |
| NK | nature killer |
| NO | nitric oxide (oxid dusnatý) |
| PAS | periodic acid Schiff |
| PAF | platelet activator factor |
| PBS | phosphate buffer base-saline |
| PDGF | platelet-derived growth factor |
| PFA | paraformaldehyd |
| PGE ₂ | prostaglandin E ₂ |
| SAS | sleep apnoe syndrom |
| SLPI | sekreční leukoperoxidázový inhibitor |
| TGF- β | transforming growth factor beta |
| TNF- α | tumor necrosis factor alfa |
| TRIS | tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| TSH | thyroid-stimulating hormone |
| UV | ultraviolet |
| VEGF/VPF | vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor |

1. ÚVOD

Dýchací cesty se skládají z nosní dutiny, nosohltanu, hrtanu, trachey, bronchů, bronchiolů a terminálních bronchiolů. Tyto dýchací cesty dále pokračují do respiračního oddílu plic, představovaného systémem respiračních bronchiolů, ductus et sacus alveolares a alveoly.

Dýchací cesty slouží k transportu vzduchu do respiračního oddílu a zpět, přičemž je v nich vdechovaný vzduch upravován po stránce vlhkosti a teploty.

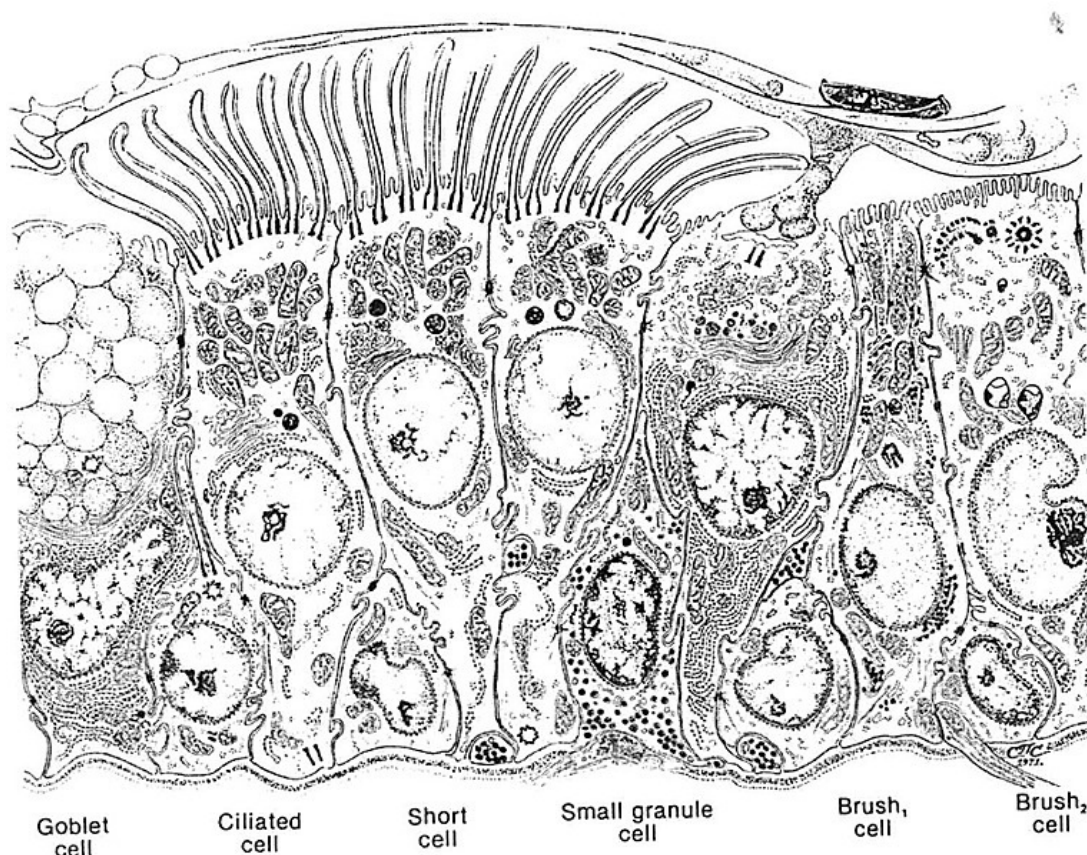
1.1 Histologická stavba zdravých tkání

1.1.1 Sliznice dýchacích cest

Sliznice dýchacích cest se skládá ze dvou vrstev – lamina epithelialis a lamina propria mucosae.

Lamina epithelialis je až na několik výjimek tvořena typickou výstelkou dýchacích cest – epitem víceřadým cylindrickým s řasinkami a pohárkovými buňkami. Tento epitel obsahuje 5 typů buněk. Největší podíl mají buňky řasinkové – ty postupně ubývají, ale vyskytují se až po terminální bronchioly. Řasinkové buňky mají velmi důležitou úlohu – řasinky jsou zanořeny do sekretu, se kterým tvoří funkční celek. Pohybem řasinek je tato tekutina se zachycenými nečistotami včetně patogenů posunována směrem do orofaryngu, což brání hromadění hlenu s cizorodými částicemi v dýchacích cestách. Pohárkové buňky představují sekreční složku v epitelu. V jejich supranukleární cytoplasmě se tvoří, hromadí a splývají mucinosní granula. Jsou odpovědné za produkci povrchové značně gelifikované a zároveň lepkavé mucinosní vrstvy na povrchovém filmu sekretu dýchacích cest. Kartáčové buňky jsou cylindrické buňky s četnými, pravidelně uspořádanými mikroklyky. Na bazálním pólu kontaktují aferentní nervová zakončení – fungují jako specializované receptory. Malé granulární buňky ležící při lamina basalis obsahují v cytoplasmě četná osmiofilní granula. Představují součást diseminovaného neuroendokrinního

systému (DNES). Bazální buňky jsou malé pyramidové buňky, které leží na lamina basalis a nedosahují apikálního povrchu epitelu. Jsou to germinativní buňky, které se diferencují v jiné buněčné typy.



Schema 1: Víceřadý cylindrický epitel s řasinkami a pohárkovými buňkami – typy buněk

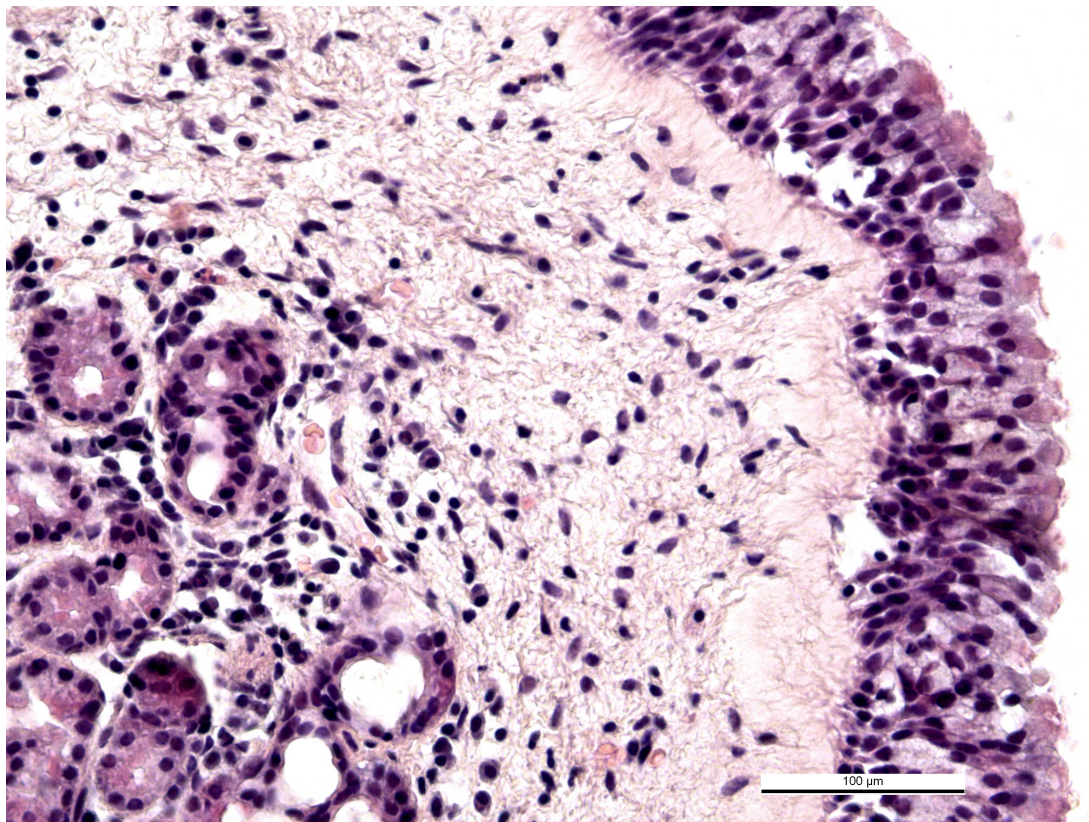
Na stropu dutiny nosní, na horní ploše horní skořepy a na horní části septa nacházíme specializovaný smyslový epitel – čichový.

Epitel víceřadý cylindrický s řasinkami a pohárkovými buňkami respektuje zmenšující se průměr dýchacích cest tak, že se zmenšuje jeho celková výška, klesá počet řad jader tak, až z něj nakonec resultuje typický jednovrstevný cylindrický až kubický epitel terminálních bronchiolů. Postupně klesá také četnost pohárkových buněk, které jsou nahrazovány buňkami Clarovými (terminální bronchioly).

V místech dýchacích cest, kde dochází k významnějšímu mechanickému dráždění výstelky (vestibulum nasi, nosohltan, orofarynx, epiglottis, hlasové vazy, ba i místa

bifurkací) je běžný epitel dýchacích cest nahrazován epitelem vrstevnatým dlaždicovým nerohovějícím.

Lamina propria mucosae je tvořena řídkým kolagenním vazivem, ve kterém se nacházejí seromucinosní žlázy (produkují řidší, spodní vrstvu povrchové tekutiny dýchacích cest), nervy a bohaté cévní zásobenění ve formě komplikovaných žilních a kapilárních pletení (důležité pro nosní cyklus a ohřívání vdechovaného vzduchu). Směrem od nosní dutiny k plicím přibývá v lamina propria mucosae elastických vláken a také se tu objevují buňky hladké svaloviny (Janqueira LC, 1992).

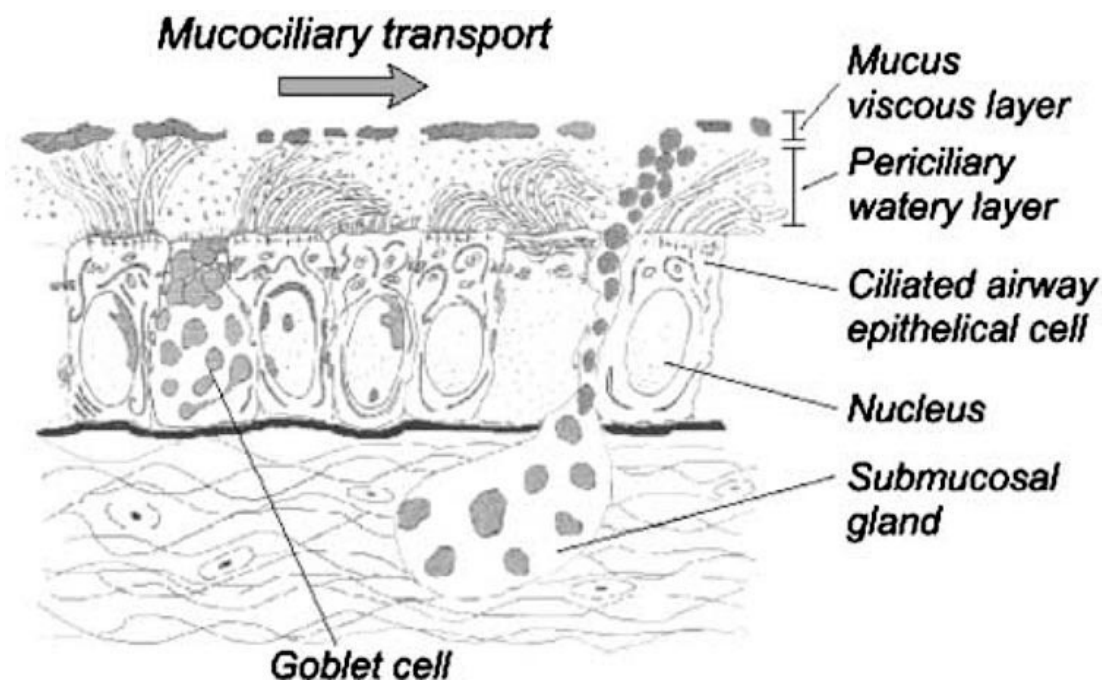


Obr. 1: Dolní skořepa nosní – zdravá sliznice. Víceřadý cylindrický epitel s řasinkami a pohárkovými buňkami. Lamina propria mucosae, tvořená řídkým kolagenním vazivem ve kterém jsou přítomny seromucinosní žlázy. Hematoxylin-eosin. Obj. 40x.

Povrchová tekutina dýchacích cest se skládá ze dvou vrstev. Z vazké povrchní vrstvy mucinosní a řidší periciliární tekutiny. Povrchová, značně gelifikovaná vrstva obsahuje vysokomolekulární glykosylované molekuly mukopolysacharidů, tvořící spleť prostoro- vou síť. Ta se uplatňuje při vychytávání vdechovaných cizorodých

částic. Periciliární tekutina vyplňuje prostor mezi apikálním povrchem epitelových buněk a mucinosní vrstvou povrchového povlaku dýchacích cest. V periciliární tekutině se nacházejí řasinky epitelových buněk. Tato vrstva je rozhodující pro plynulý pohyb povrchového sekretu v závislosti na směru „bití“ řasinek. Svou konsistencí totiž umožňuje posun hlenu v rychlé fázi pohybu řasinek (frekvence cca 8 – 15Hz), kdežto v jejich zpětné relaxační fázi se řasinky stačí ze sekretu jakoby vyvléknout. Tak chrání zároveň povrch epitelových buněk před povrchovou mucinosní vrstvou, kontaminovanou případnými produkty rozpustné komponenty cizorodých částic.

Mukociliární clearance zahrnuje transport mucinosní vrstvy i vrstvy periciliární tekutiny pohybem řasinek od nejmenších dýchacích cest směrem k laryngu. Zajímavou složkou mukociliární clearance je vertikální pohyb struktur uvnitř mucinosní vrstvy. Tyto vertikální turbulence zajišťují vtažení cizorodých částic z povrchu do vlastní mucinosní vrstvy a tím jejich účinnější transport z dýchacích cest. Výzkumy ukázaly, že pohyb mucinosní vrstvy vyvolává tření mucinosní a periciliární vrstvy o sebe a tento mechanismus zajišťuje pohyb periciliární tekutiny s rozptýlenými hydrofilními cizorodými látkami směrem z dýchacích cest (Knowles MR and Boucher RC, 2002).

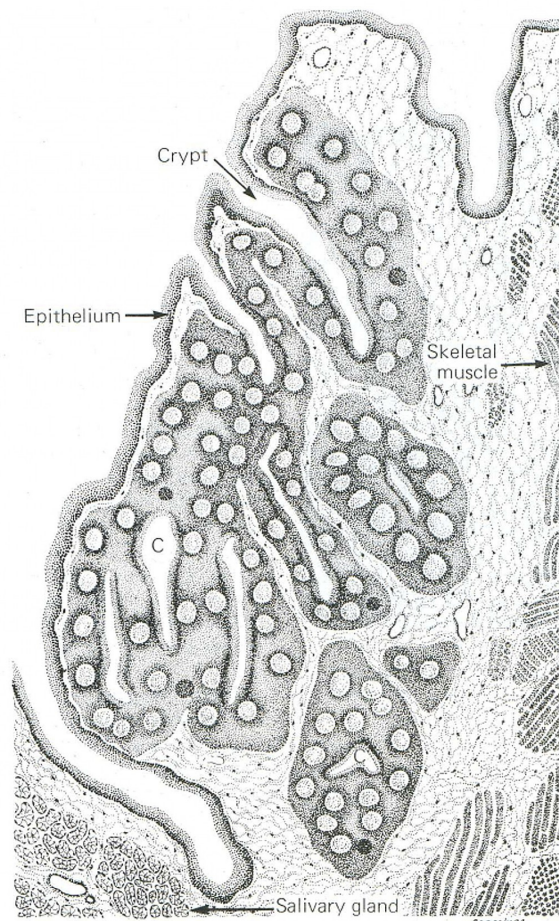


Schema 2: Mukociliární clearance (Kalhof H., 2003)

V nosní dutině je hlen transportován směrem k orofaryngu, kde je následně spolknut. U zdravého jedince je hlenová vrstva v nosní dutině kompletně obměněna každých 10 – 20 minut. Nejvíce hlen stagne v přední části nosní dutiny, kde důležitější úlohu v eliminaci patogenů hrají AMP (Cole AM et al, 1999).

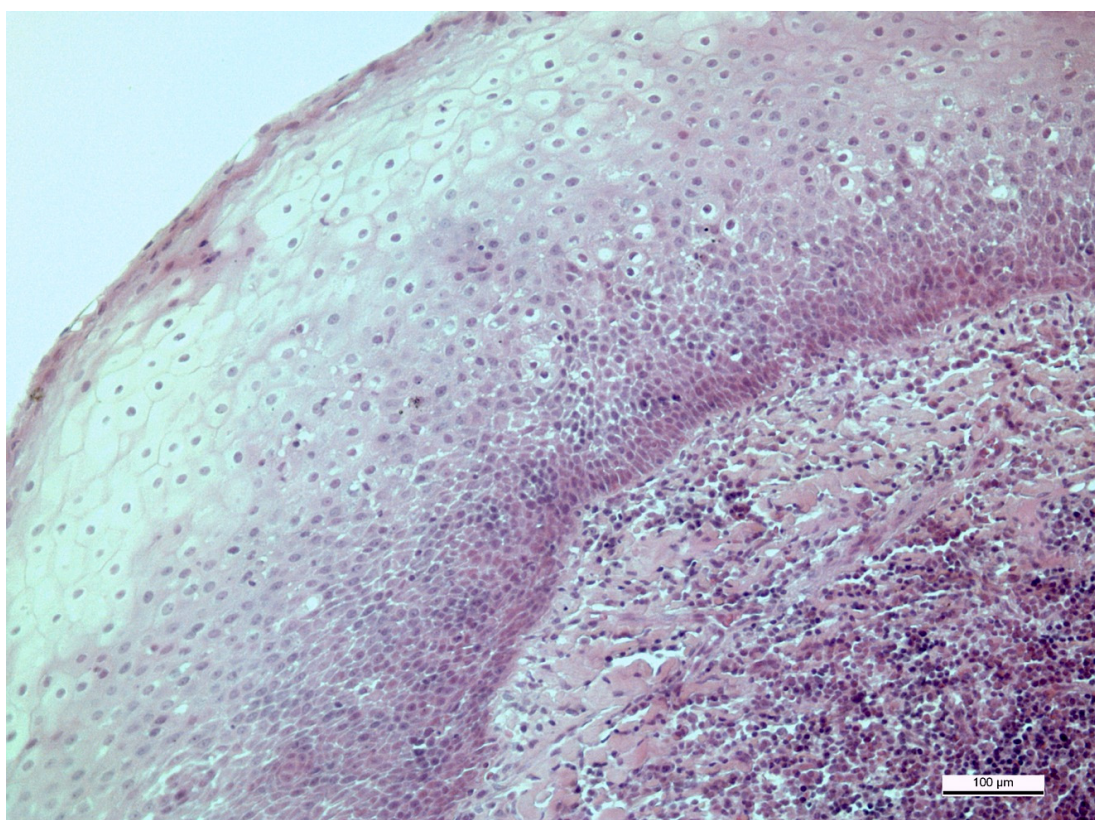
1.1.2 Tonsily

V oblasti faryngu dochází ke křížení cest dýchacích s cestami polykacími. Sliznice faryngu je pokryta epitelem vrstevnatým dlaždicovým nerohovějícím a pod ním uložená lamina propria mucosae má povahu řídkého vaziva, ve kterém nacházíme četné mucinózní žlázy. Zevně od sliznice nacházíme příčně pruhovanou svalovinu – svěrače a podélné svaly faryngu.



Schema 3: *Tonsila palatina* – četné lymfatické folikuly v blízkosti vrstevnatého dlaždicového epitelu. Světlé oblasti – zárodečná centra. C – šikmý průřez kryptou (Janqueira LC, 1992)

Z důvodu obrovského mikrobiálního zatížení této oblasti (patogeny jsou obsaženy jak ve vdechovaném vzduchu, tak i v polykané potravě) je zde velké množství lymfatické složky. Nacházíme jednak výraznou infiltraci buňkami lymfatické řady ve sliznici (MALP) a dále jsou tu lymfatická seskupení, patřící k míznímu okruhu kolem polykacích a dýchacích cest – tonsila palatina, tonsila lingualis, tonsila pharyngea a tonsila nasalis a tubaria. Tomuto nakupení lymfatických nekompletně opouzdrěných orgánů říkáme Waldayerův mízní okruh.



Obr. 2: Zdravá tonsila palatina. Vrstevnatý dlaždicový epitel nerohovějící, buňky uspořádány typicky pro epitel – těsně u sebe, pouze na několika místech jsou epitelové buňky rozestoupeny díky procházejícím lymfocytům. Mezi epitelem a lymfatickým kompartmentem je vazivová lamina propria mucosae s četnými lymfocyty, ale lymfatická složka nedosahuje až k epitelu. Hematoxylin – eosin. Obj. 20x.

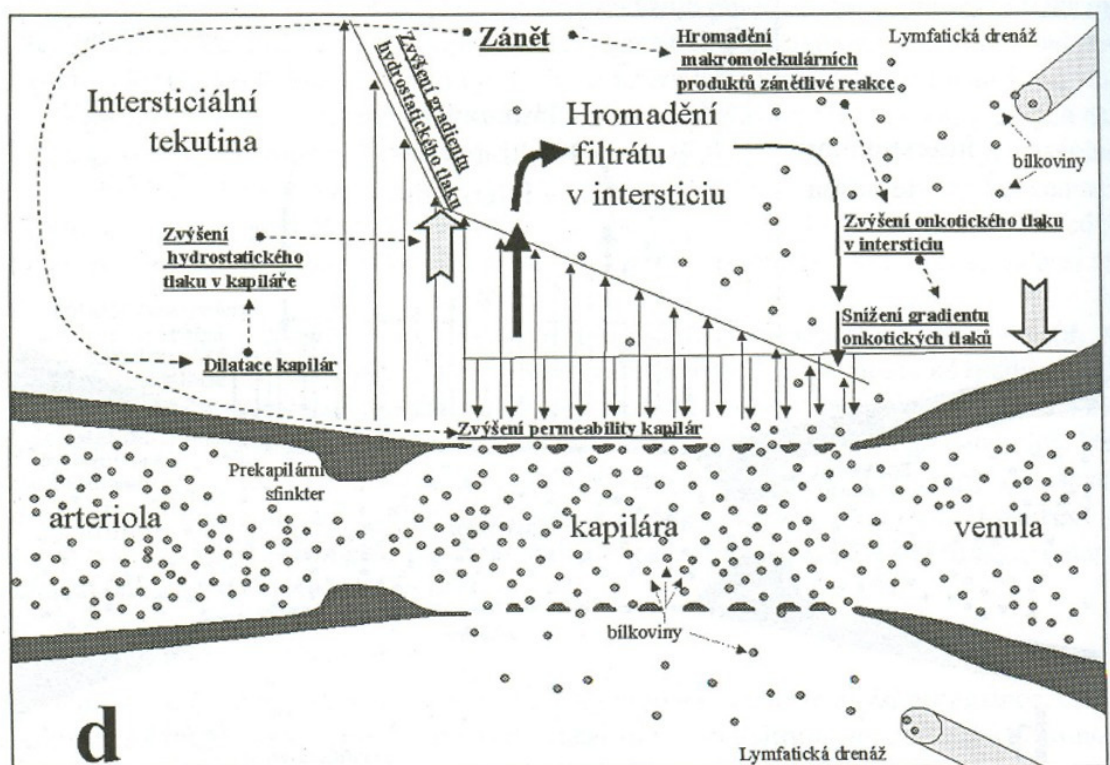
Tonsily jsou orgány složené z agregovaných B- a T-lymfocytů jako primárních lymfatických folikulů, u nichž presentace antigenu vyvolává přeměnu ve folikuly sekundární s často rozměrnými germinativními centry. Lymfatická buněčná

komponenta, ležící pod, ale i v bezprostředním kontaktu s povrchovým epitelem, je pak příčinou transformace vrstevnatého dlaždicového epitelu na povrchu tonsil v epitel rozvlákněný. Jeho široké intercelulární prostory jsou vyplněny různě četnými převážně T-lymfocyty. Epitelové záhyby na povrchu tonsily se vchlipují hluboko do parenchymu tonsily a vytvářejí tonsilární krypty. V kryptách nacházíme v detritu odloupané epitelie, lymfocyty, zbytky potravy, ale také živé bakterie (Janqueira LC, 1992).

1.2 Histologický obraz patologických změn – základní pozorování

1.2.1 Polyposis nasi

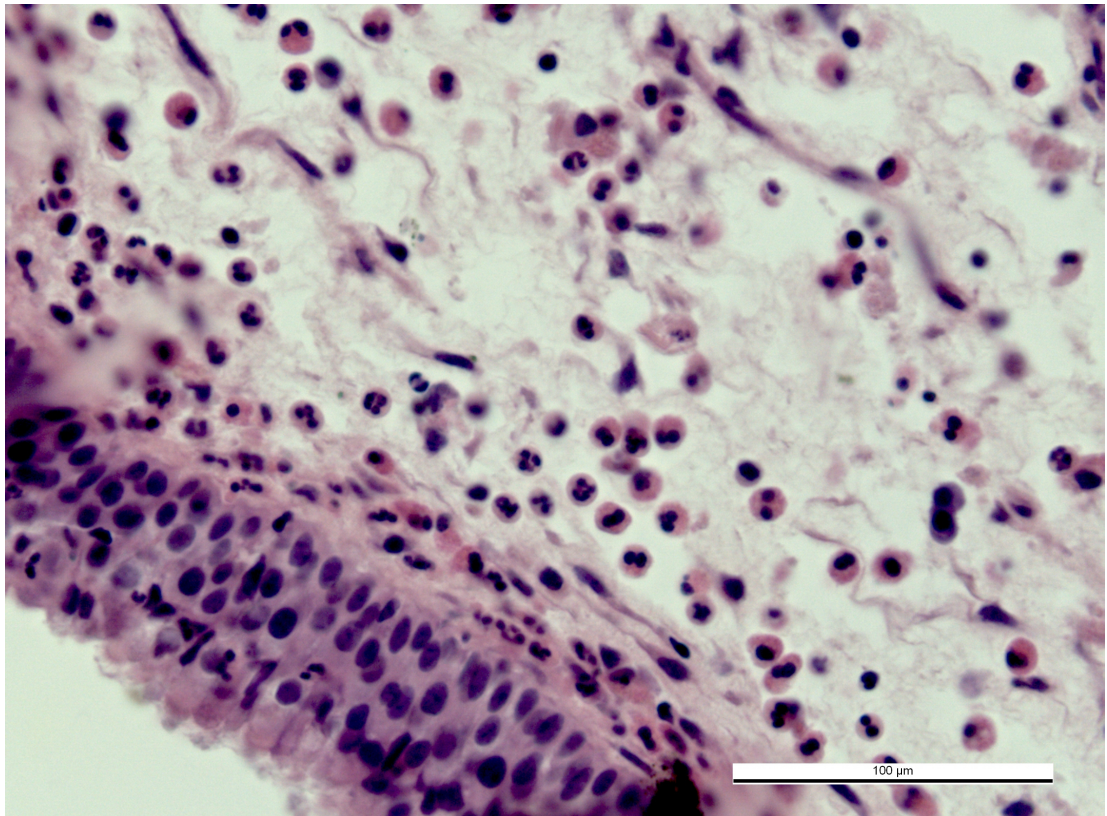
Polyposis nasi vzniká nejčastěji na podkladě chronického zánětu nosní sliznice (infekčního nebo neinfekčního).



Schema 4: Patofyziologie vzniku edému při zánětu (Nečas E et al, 2007f).

V průběhu zánětu (infekčního nebo alergického) dochází k lokálnímu zvýšení propustnosti cévní stěny. Díky zvýšené permeabilitě kapilár dochází k usnadnění přestupu bílkovin následovaných vodou do intersticiálního prostoru (lamina propria mucosae nosní sliznice). Kromě přestupu makromolekulárních látek z cév se tu však hromadí rozpadové produkty zánětlivé reakce, což opět vede ke vzestupu onkotického tlaku. Gradient tlakových poměrů mezi cévním řečištěm a mezibuněčnou hmotou se tak snižuje. Dilatované kapiláry (případně poškozené kapilarotoxickým účinkem bakteriálních toxinů) v zánětlivém ložisku mají pak zvýšený tlak na mebránových rozhraních. Současně dochází k přetížení lymfatické drenáže, která nestačí odvádět makromolekulární produkty zánětu z intersticiálního prostoru. Všechny tyto děje přispívají ke zvýšené filtraci tkáňového moku do intersticia a k tvorbě otoku – viz schema 4 (Nečas E et al, 2007f).

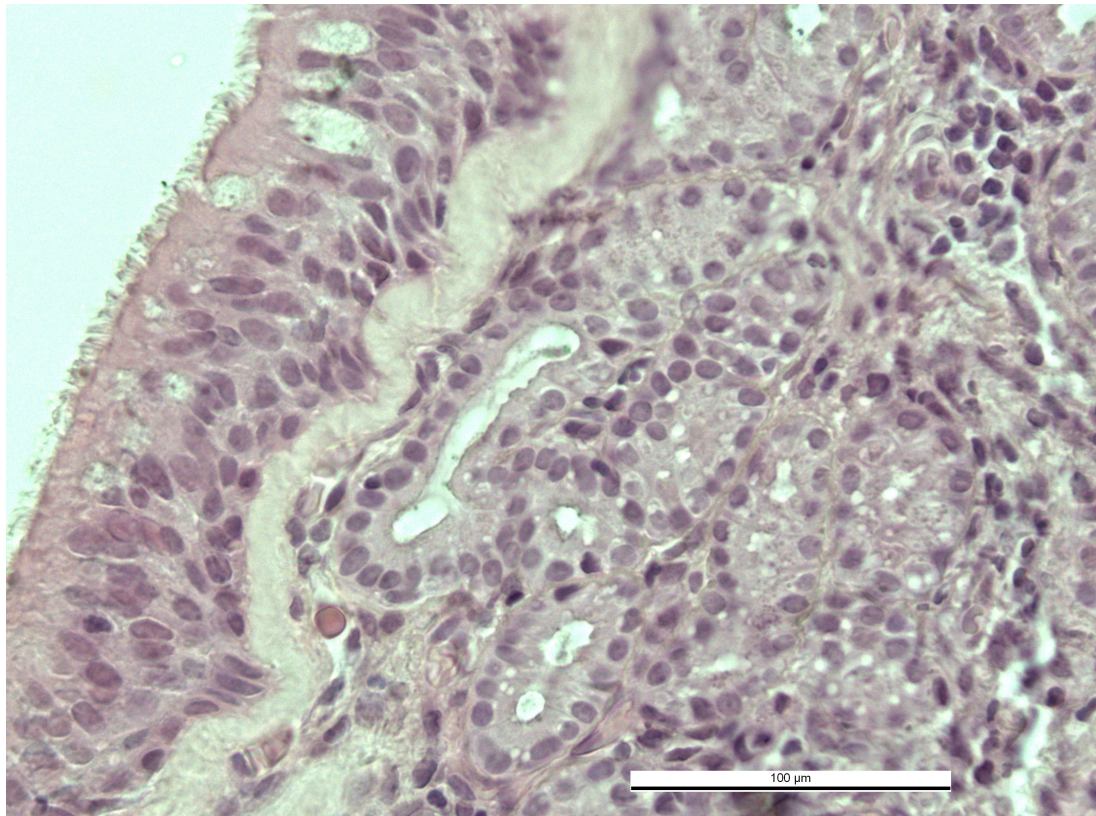
Uvedené mechanismy způsobí následně edém lamina propria mucosae a tím vyklenování nosní sliznice. Při dlouhodobém přetrvávání zánětu může docházet k dysregulaci reparačních procesů, a to např. nadprodukcí mitogenních cytokinů. Výsledkem pak bývá hyperproliferaace fibroblastů, ale i hladkých svalových buněk.



Obr. 3: Nosní polyp – edematosní typ s eosinofilní infiltrací (“jelly-like” stroma). Hematoxylin-eosin. Obj. 63x.

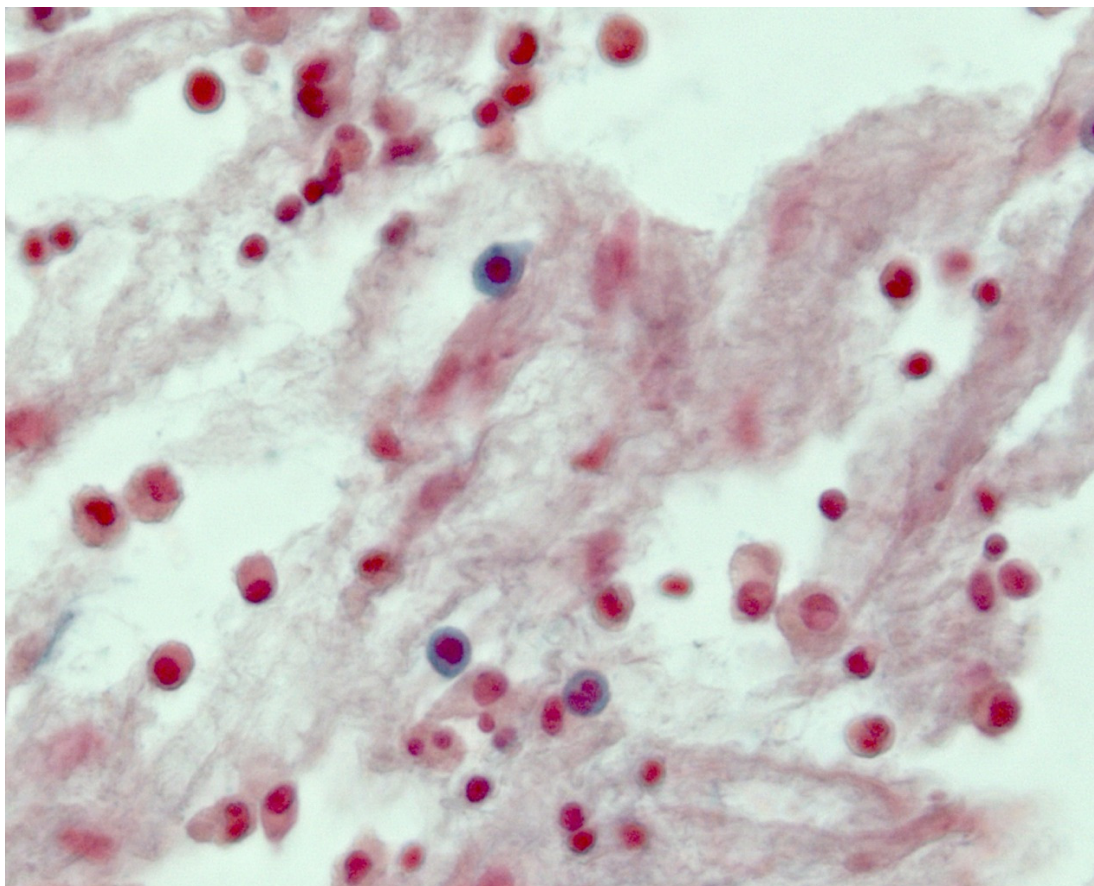
Hyperproliferace, vyvolaná na jedné straně akcelerací buněčného cyklu, na druhé pak stimulací cytodiferenciace, vede k nadprodukcí extracelulární složky stromatu polypu, a to na straně jedné jeho amorfní složky (zejména glykosaminoglykany), což má za následek přeměnu v „jelly like stroma“. Na druhé straně při nadprodukcí vláknité složky (zejména kolagenu I) se vyvíjí tuhý polyp s výrazně fibrilárním uspořádáním stromatu. Stimulace žlazového epitelu vede rovněž ke zvýšené proliferaci buněk v sekrečních i vývodných oddílech žláz, a to vyvolává jejich výrazné zbytnění a také zvýšenou produkci jak serosní, tak i mucinosní složky sekretu (Nečas E et al., 2007c). Mezi další příčiny vzniku nosní polyposy řadíme vrozené vady – např. poruchy transportu iontů či nosní deformity.

Rozlišujeme několik histologických typů nosních polypů – 1) edematosní typ s eosinofilní infiltrací, který má typickou histologickou stavbu nosního polypu - velmi řídké edematosní “jelly-like” stroma, 2) žlazový seromucinosní typ, charakterizovaný hyperplasií žlázek a hojnou infiltrací eosinofily, 3) vazivový (chronicky zánětlivý) typ polypu, který má vedle zmnožených fibroblastů a nadprodukce vláknité složky, neutrofilní a lymfocytovou infiltraci a nakonec 4) atypický polyp stromální, který bývá považován za prekancerósní stav.



Obr. 4: Nosní polyp – žlazový seromucinosní typ charakterizovaný hyperplasií žlázek. Hematoxylin-eosin. Obj. 63x.

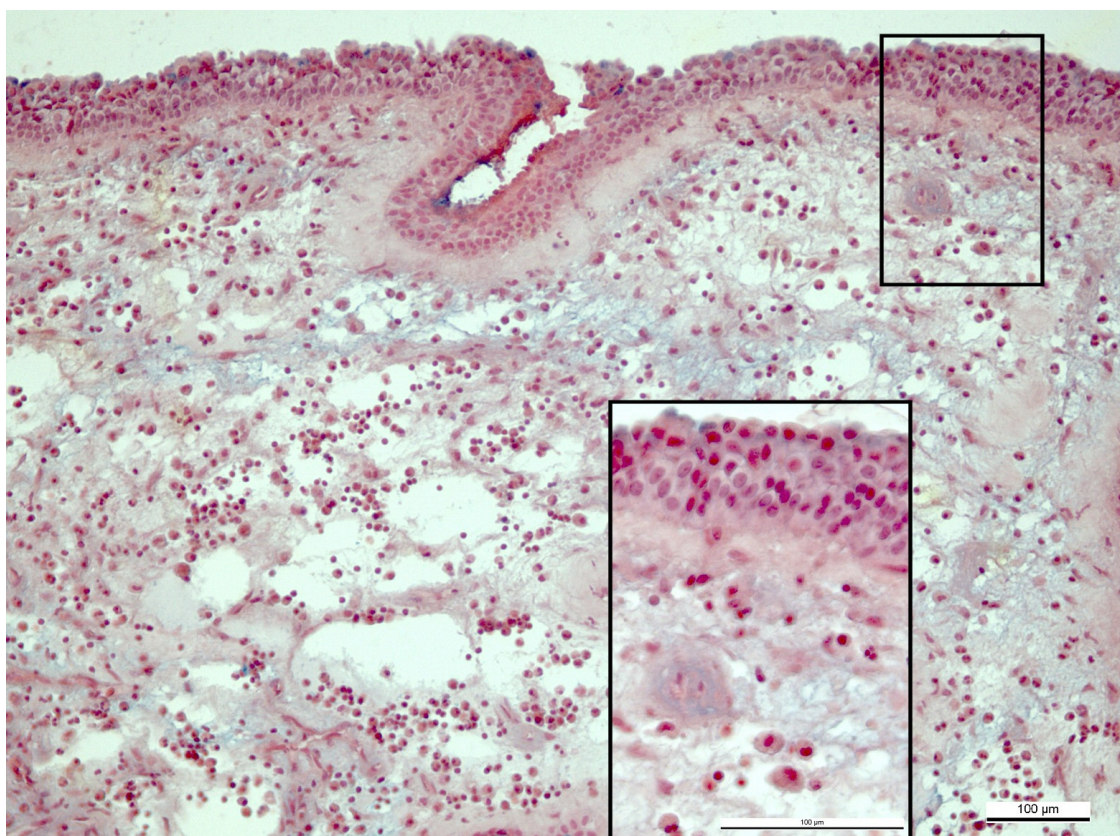
Nejčastějším typem nosního polypu je edematosní typ s eosinofilní infiltrací, který má velmi řídké edematosní “jelly-like” stroma. Ve stromatu je kromě buněčné složky – buňky fixní (fibroblasty, fibrocyty) i buňky bloudivé (makrofágy, polymorfonukleáry, lymfocyty, heparinocyty) zastoupena extracelulární matrix, a to jak fibrilární složka, tak i amorfnní složka.



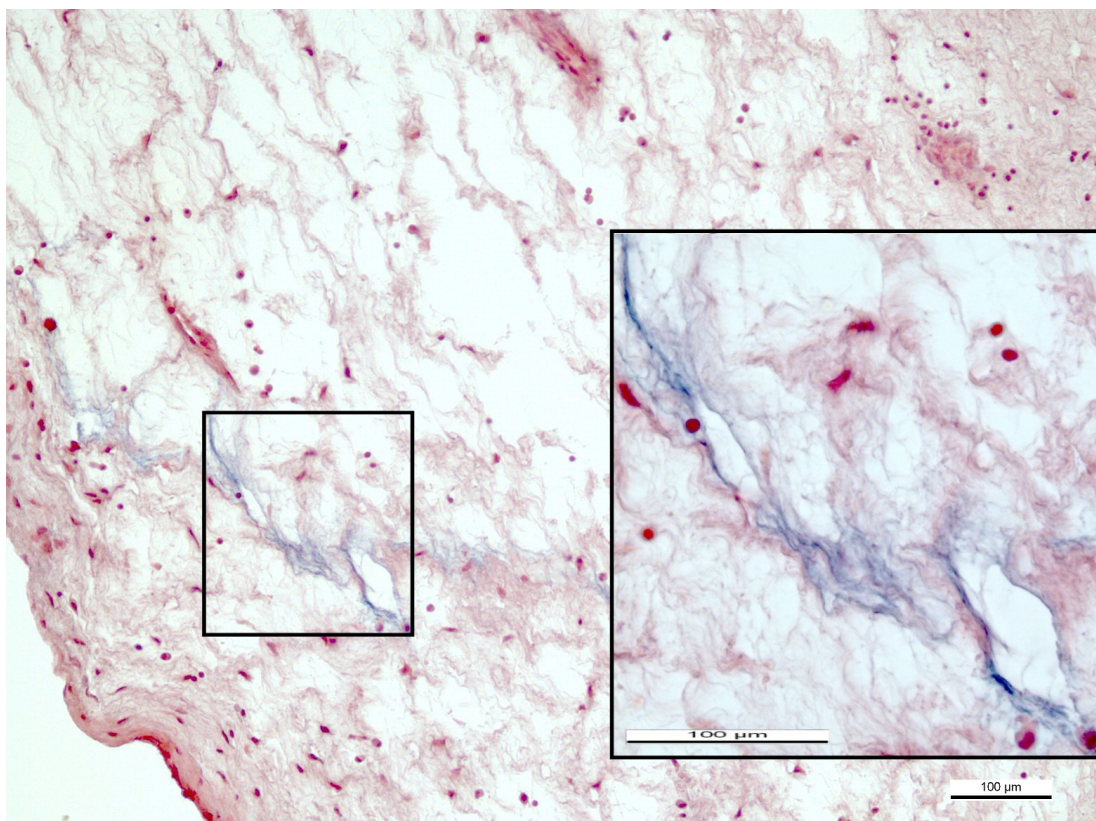
Obr. 5: Nosní polyp – různé typy vazivových buněk ve stromatu. Alciánová modř. Jádra dobarvena jádrovou červení. Obj. 63x.

V polypech od různých pacientů je poměr fibrilární a amorfnní složky rozdílný. Jejich zastoupení se může lišit i v různých částech téhož polypu. Fibrilární složka je zastoupena ve formě kolagenních vláken, ale i vlákny retikulárními. Vláknnitá složka, a to jak kolagenní tak i retikulární, je zmnožena zejména v oblastech probíhajících cév, žláz a jejich vývodů. V dutině nosní je také až nezvykle malé zastoupení vláken elastických. Kolagenní vlákna je možno vizualizovat běžným přehledným barvením hematoxylinem-eosinem, či efektivněji elektivním barvením Massonovými

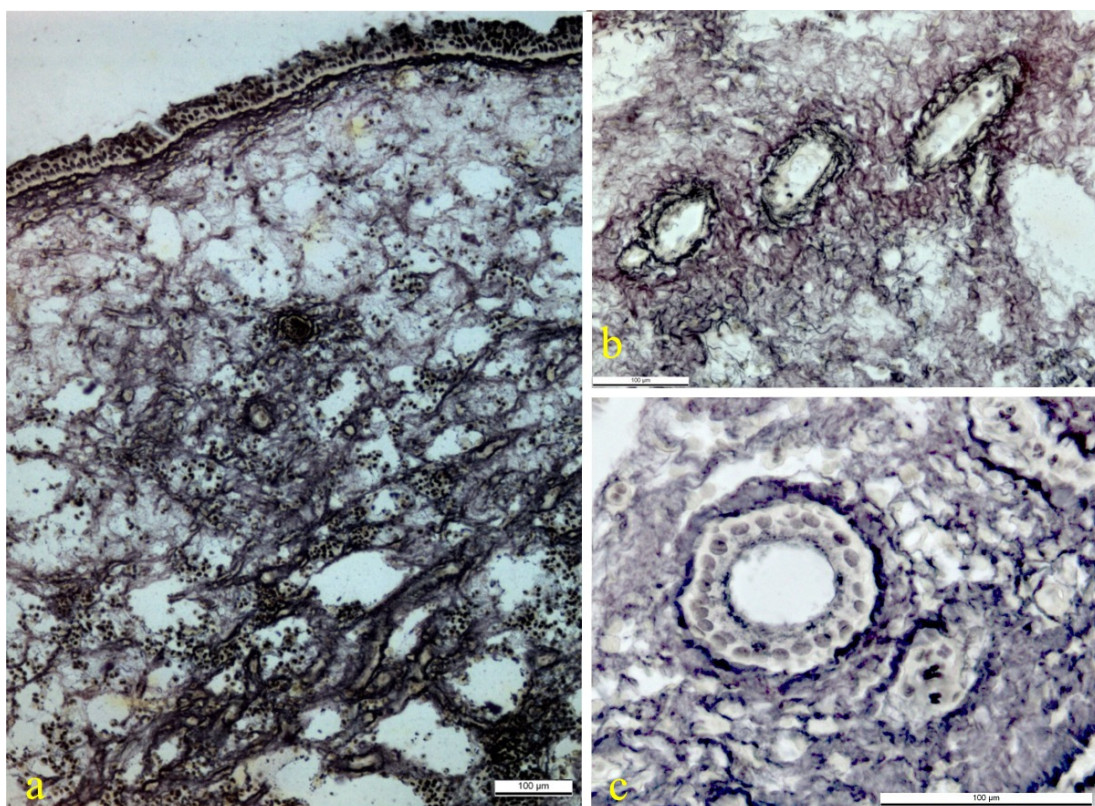
trichromy. Vlákna retikulární je nutno zviditelnit Gömöriho impregnací stříbrem, PAS reakcí, nebo alciánovou modří.



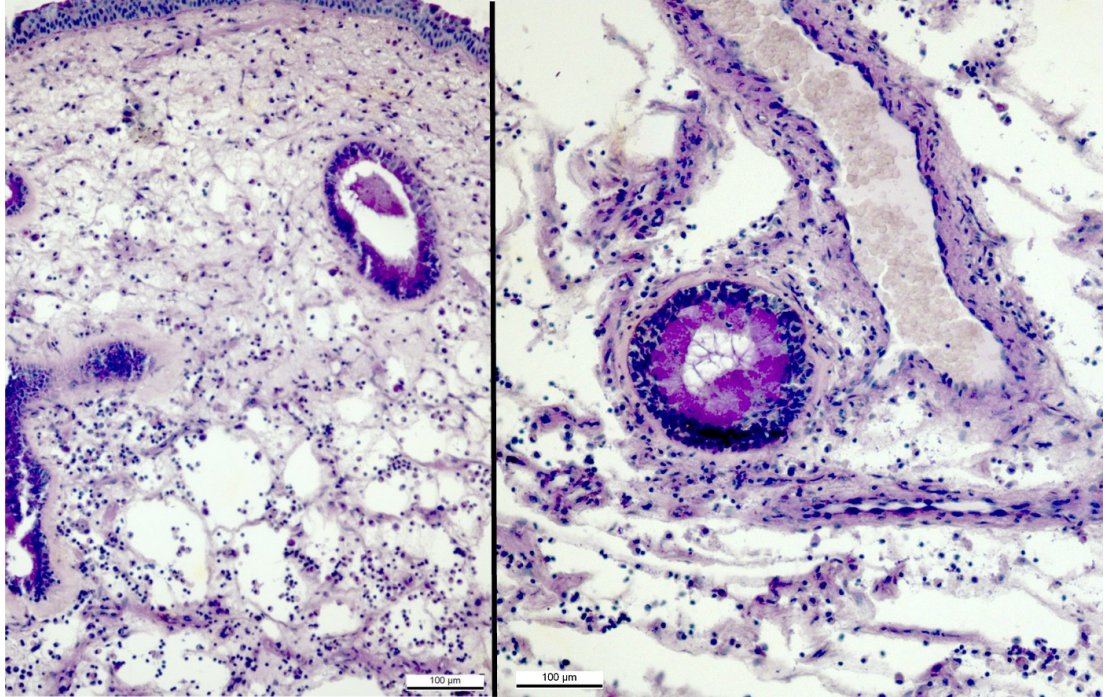
Obr. 6: Nosní polyp – přehledné zvětšení znázorňující různou strukturu vazivového stromatu v jednotlivých částech polypu. Subepiteliálně má struktura klasickou stavbu vaziva lamina propria mucosae, hlubší vrstvy stromatu mají odlišné uspořádání vláknité složky, která je akumulována v okolí probíhajících cév, prostory mezi fibrilární složkou jsou částečně vyplněny amorfni strukturou mezibuněčné hmoty, částečně edematosní tekutinou. Alciánová modř prokazuje především kyselé mukopolysacharidy a glykosaminy zejména ve změněné extracelulární matrix vaziva. Jádra dobarvena jádrovou červení. Obj. 20x, Ve výřezu vegetativní mikroganglion (dva neurony a kolem nich satelitové buňky) těsně pod epitelem. Obj. 63x.



Obr. 7: Nosní polyp – různá struktura vazivového stromatu – část s hustším uspořádáním vláknité složky, část s vyšším výskytem složky amorfni a edematosní tekutiny, v této části prokázány alciánová modř pozitivní vláknité struktury. Obj. 20x. Detail – alciánovou modří prokazovaná retikulární vlákna v edematosní oblasti stromatu. Obj. 63x.

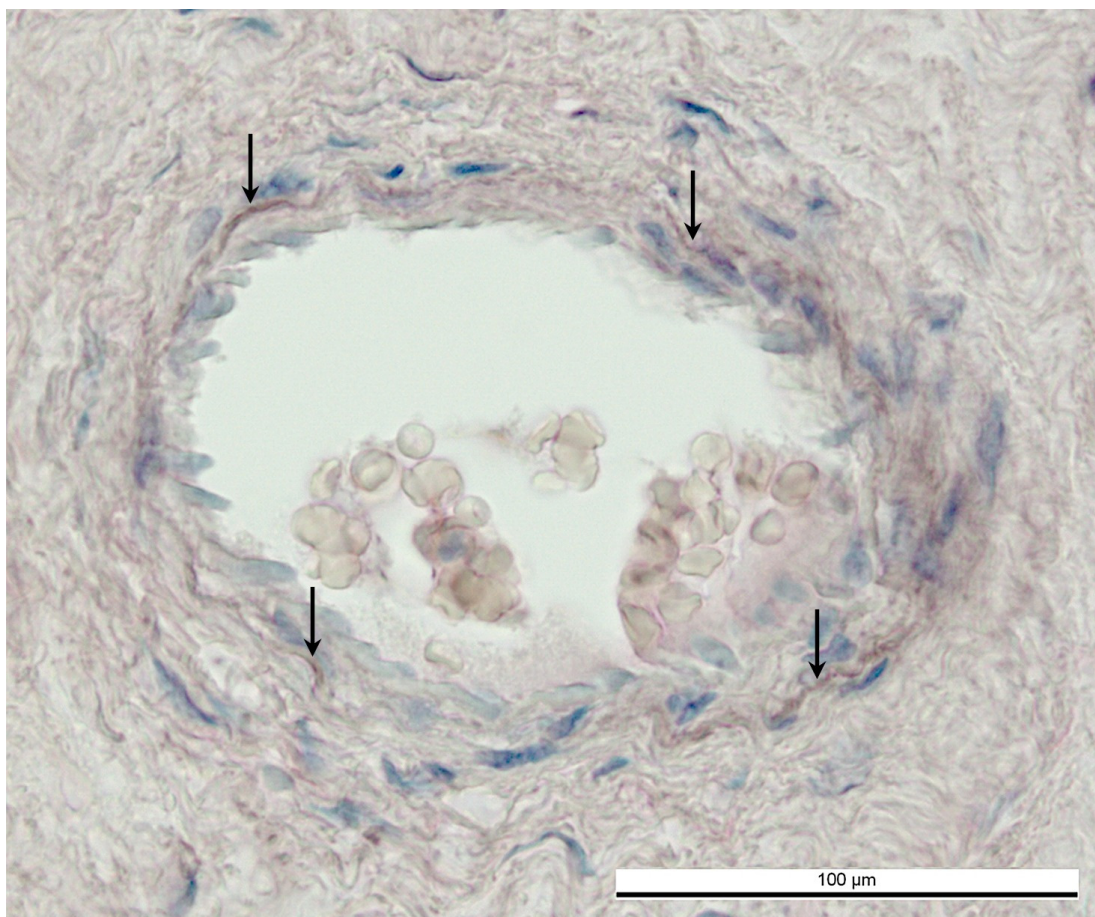


Obr. 8: Nosní polyp. Gömöriho impregnace. a) Přehledný snímek ukazuje rozdílné uspořádání vláknité složky ve stromatu polypu. Více retikulárních vláken je přítomno v edematózních oblastech stromatu zejména v okolí a ve stěnách cév proti subepitelovému kompartmentu. Četná retikulární vlákna v těsném sousedství basální laminy. Obj. 20x. b) Retikulární vlákna ve stěnách malých arterií a v jejich těsném okolí, se vzrůstající vzdáleností okolní tkáně je vidět postupný úbytek retikulárních vláken. Obj. 40x. c) Průkaz retikulárních vláken v lamina basalis vývodu slizniční žlázy, jakož i v jeho okolí a okolí cév; průkaz redukujících látek (především RNA) v jádrech, ale také v apikálních oddílech buněk vývodu. Obj. 63x.



Obr. 9: Nosní polyp – vazivové stroma s různě rozloženou vláknitou složkou, PAS pozitivní granula jsou přítomna v apikálních částech jak buněk sekrečních (vpravo) tak i ve vývodech (vlevo), stejně jako v tunica media ve stěnách arteriol (buňky hladkého svalstva) i venul (méně). Kondensace vláknité složky v okolí cév. PAS reakce. Obj. 20x.

Elastická vlákna, která je možno prokázat např. orceinem, jsou zastoupena pouze ve stěnách arteriol svalového typu – v tunica media (membrana elastica interna) v adventici pak jako příčně proříznutá vlákna. Volně ve stromatu nejsou prakticky zastižitelná.

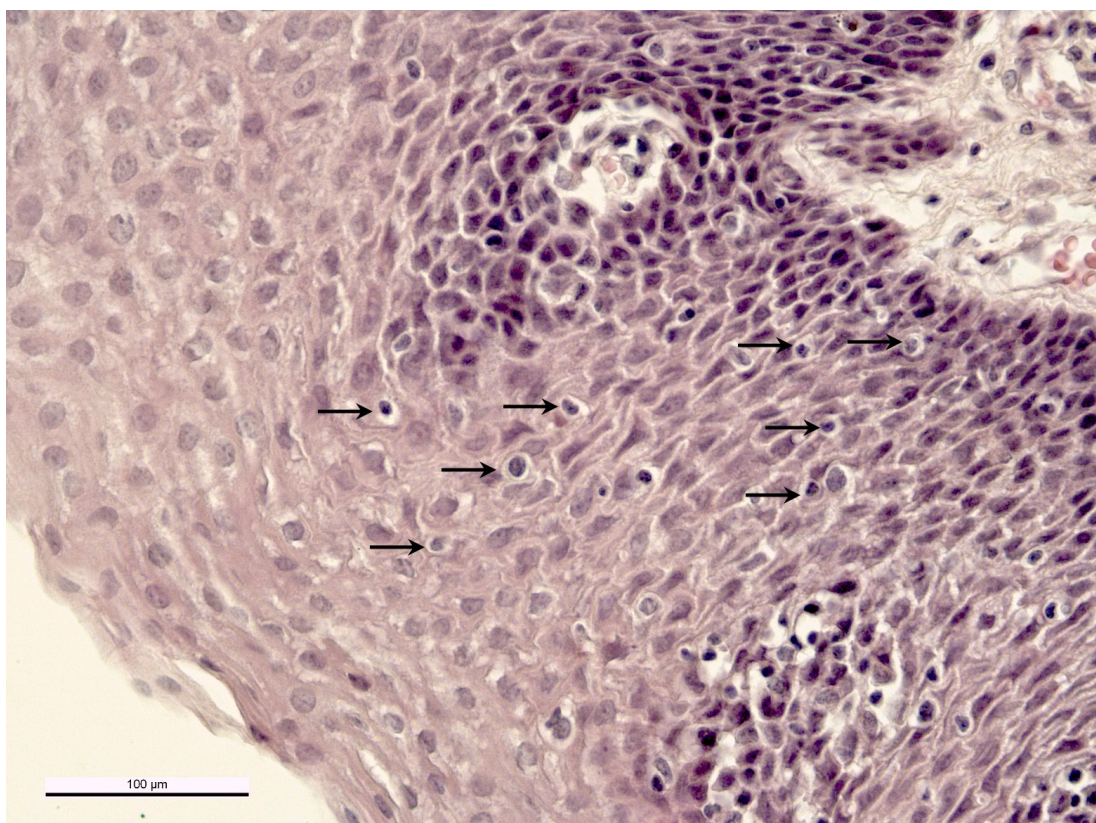


Obr. 10: Nosní polyp – průkaz elastických vláken orceinem. Elastická vlákna byla vizualizována v tunica media arterioli svalového typu. Ve stromatu polypu jsou jen poměrně vzácná. Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

Amorfní složka je ve stromatu zastoupena v různém množství i uspořádání. V některých polypech je distribuce vláknité a amorfní složky rovnoměrná, v jiných je možno zachytit oblasti s převahou fibrilární složky (zejména v okolí cév a žláz) a na druhé straně místa, kde převažuje složka amorfní. Amorfní komponenta je složena v různých oblastech polypů z různých molekul – proteoglykany, glykoproteiny, kyselý mukopolysacharidy. Toto je možné s výhodou znázornit použitím speciálních metod stavební histochemie – PAS reakcí a alcianovou modří.

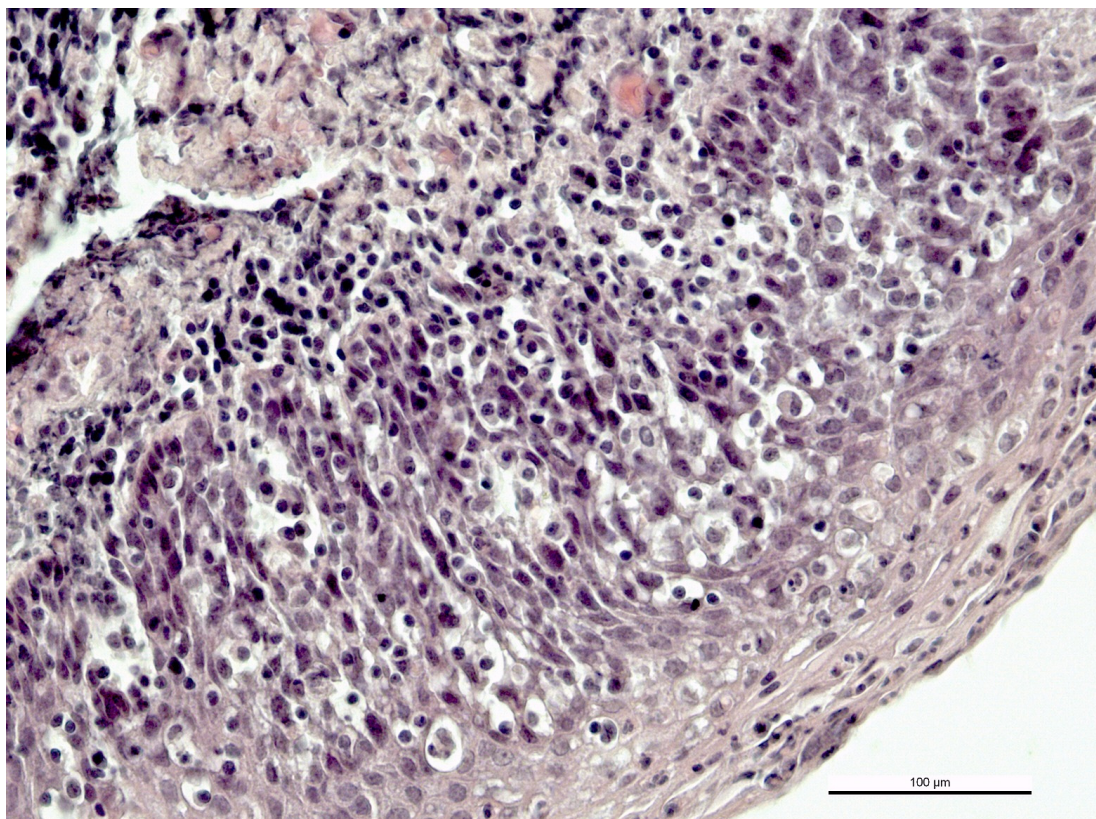
1.2.2 Tonsilitis chronica

Histopatologický obraz chronického zánětu v patrových tonsilách je charakterizován změnami v lymfatické komponentě, jakož i změnami v uspořádání vrstevnatého dlaždicového nerohovějícího epitelu. Charakteristika je doplněna i změnami ve stavbě vazivového stromatu. Změny v lymfatické složce tonsily dokumentují antigenní hyperstimulaci lymfatických folikulů. V průběhu chronického zánětu je patrna infiltrace vrstevnatého dlaždicového nerohovějícího epitelu lymfocyty, především pak vznikem intraepitelového „Ugrasova“ abscesu a/nebo difuzní lymfocytovou infiltrací. Penetrace lymfocytů do epitelu v průběhu infiltrace vyvolává rozestup epitelových buněk a rozšíření mezibuněčných prostorů, které lymfocyty vyplňují. Díky lymfocytární infiltraci se epitel vrstevnatý dlaždicový nerohovějící mění na epitel rozvlákněný.



Obr. 11: Tonsila palatina s chronickým zánětem. Povrchový vrstevnatý dlaždicový epitel s četnými prostupujícími lymfocyty (→), které roztláčují epitelové buňky od sebe, proto tento epitel je nazýván „rozvlákněný epitel“. Vazivové stroma tonsily pod basální membránou epitelu. Hematoxylin – eosin. Obj. 40x.

Také vazivové stroma se v průběhu zánětu zmnožuje a nastupují fibrotické změny ve stromatu. Současně jsou tonsilární krypty zpravidla dilatovány (Ugras S and Kutluhan A., 2008, Bieluch VM et al., 1989, Friedmann I., 1986, Woodruff C., 1980, Alvi A and Vartanian AJ., 1998).

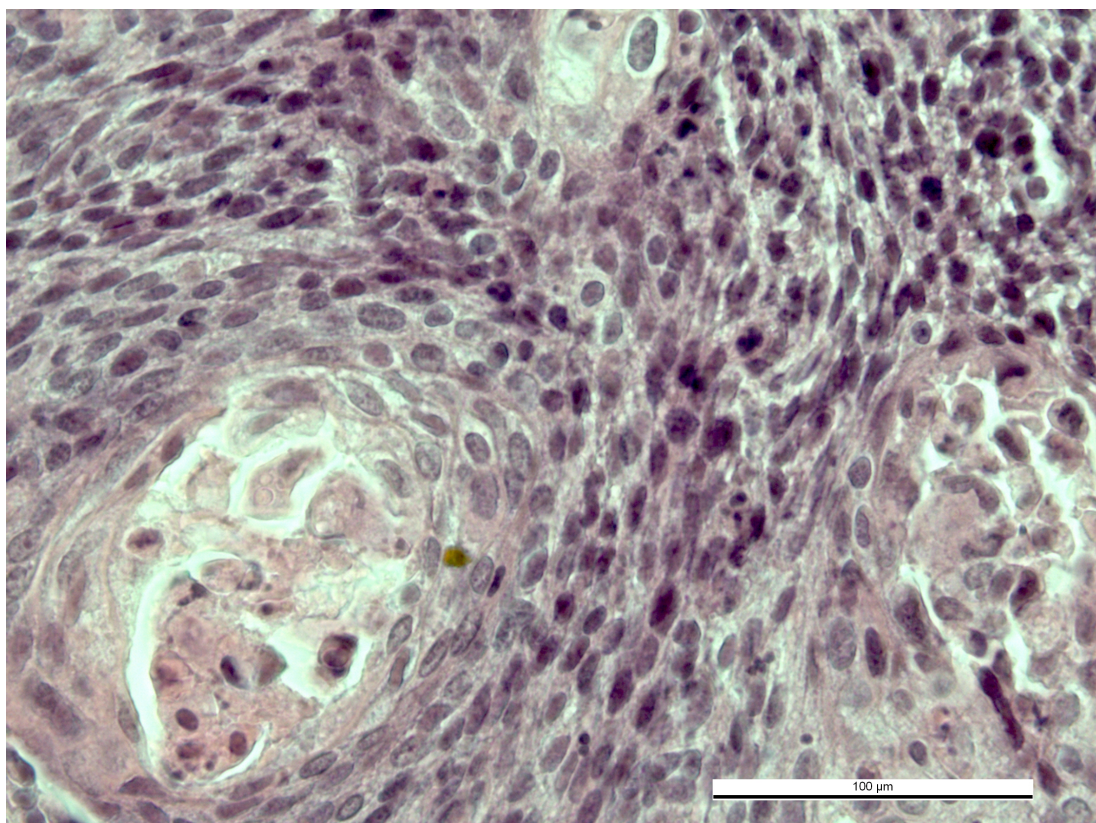


Obr. 12: *Tonsila palatina s chronickým zánětem. Vrstevnatý dlaždicový – „rozvlákněný“ epitel s četnými procházejícími lymfocyty, je silně prostoupen vazivovými papilami, které s sebou nesou četné malé krevní cévy. Vazivové stroma i intraepitelové papily jsou silně infiltrovány volnými buňkami lymfoidní řady. Hematoxylin-eosin. Obj. 40x.*

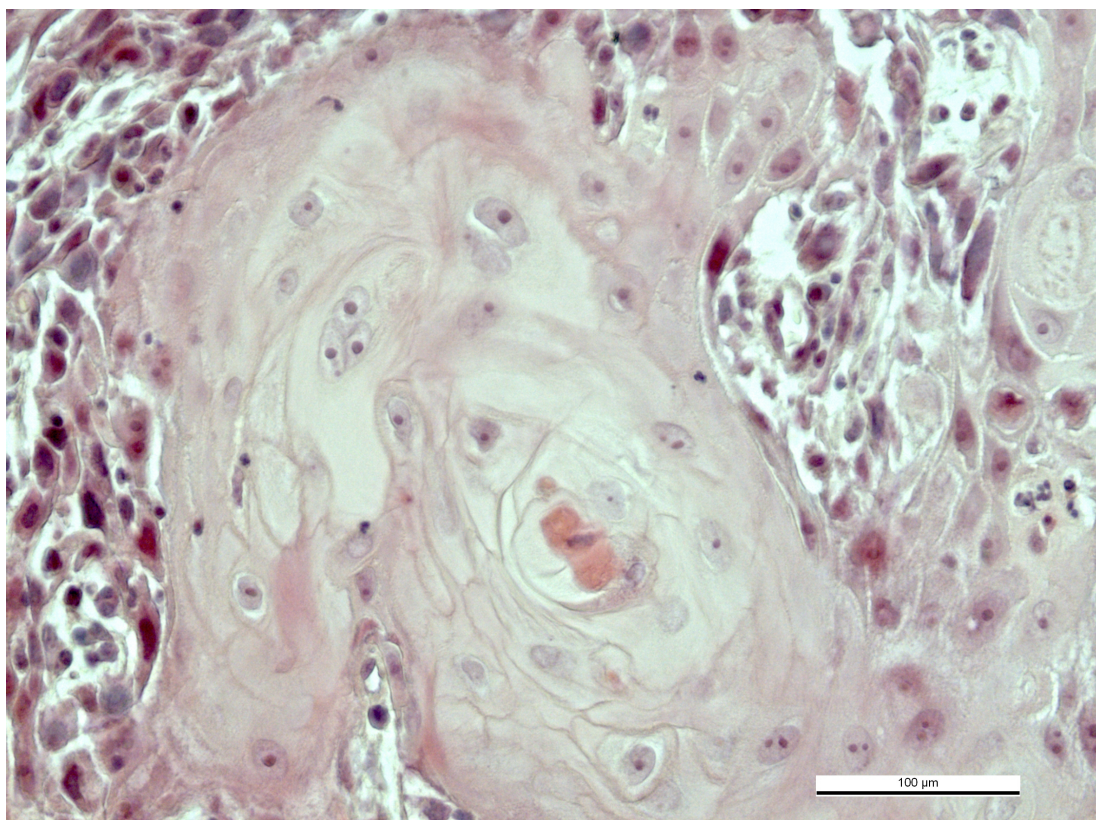
1.2.3 Karcinom tonsily

Karcinom patrové tonsily je charakterizován výraznou proliferací epitelové složky tonsily, epitelové buňky porušují kontinuitu basální membrány a penetrují do hlubších oddílů tonsily – do složky vazivové a lymfatické. Asynchronie buněčného cyklu je relativně často provázena nálezy keratinizovaných buněk v hlubších vrstvách epitelu, často ve stratum spinosum, kde pak imitují struktury i transversálně

proříznutých vazivových papil. Je tomu tak i proto, že vazivová a lymfatická komponenta tonsily jeví známky prolomení bariéry basální membrány. Vznikají tak útvary, charakteristické pro tonsilární karcinom, nazývané „keratinové perly“. Prorůstáním epitelových buněk do oblastí lymfatické složky tonsily dochází k jejímu útlaku a tím nejen k jejímu úbytku, ale někdy dokonce ke kompletní absenci elementů lymfoidní řady. Současně může být redukce lymfatické složky podmíněna i stimulovanou proliferací stromálního vaziva.



Obr. 13: *Tonsila palatina s karcinomem. Chaotické uspořádání buněk epitelu, porušení až vymizení bazální membrány epitelu. Četné keratinizované buňky se zachovanými jádry obklopeny epitelovými buňkami germinativních vrstev. Hematoxylin-eosin. Obj. 63x.*



Obr. 14: *Tonsila palatina s karcinomem. Keratinová perla. Četné keratinizované buňky se zachovanými jádry obklopeny epitelovými buňkami germinativních vrstev a vazivovým stromatem s četnými epitelovými a lymfoidními buňkami. Hematoxylin – eosin. Obj. 40x.*

1.3 Antimikrobiální obrana slizničních povrchů

Antimikrobiální obrana mnohobuněčných organismů je tvořena přirozenou imunitou a získanou imunitou. Získaná imunita zahrnuje systém T- a B- lymfocytů, které zprostředkovávají a zesilují antigen-specifickou humorální a buněčnou imunitu. Tato odpověď zahrnuje změnu genetické informace, nastupuje až za několik dní až týdnů a vytváří imunologickou paměť. Získaná imunita je těsně spojena s evolučně starší imunitou přirozenou. Přirozená imunita tvoří první linii obrany organismu proti infekci. Rozeznává mikroby jako cizí, zneškodňuje je a odstraňuje z organismu. Mezi složky přirozené imunity patří fyzikální mechanismy (mukociliární clearance), anorganické látky (NO), fagocytosa nebo NK buňky. Mechanismy přirozené imunity působí bezprostředně po napadení organismu infekcí. Působí zejména na kožních a

slizničních povrchů, které jsou neustále vystaveny patogenům (Huttner KM and Beving CL, 1999).

1.3.1 Přírodní imunitní mechanismy sliznice dýchacích cest

Prvním krokem přirozené obrany dýchacích cest před patogeny a cizorodými látkami jsou mechanické faktory, jako je mukociliární clearance, fagocytární clearance, kašel nebo kýchání. Všechny tyto mechanismy urychlují odsun patogenů ze sliznice dýchacích cest a tím omezují čas, který by patogeny měly na adaptaci v pro ně škodlivém prostředí (Cole AM et al, 1999).

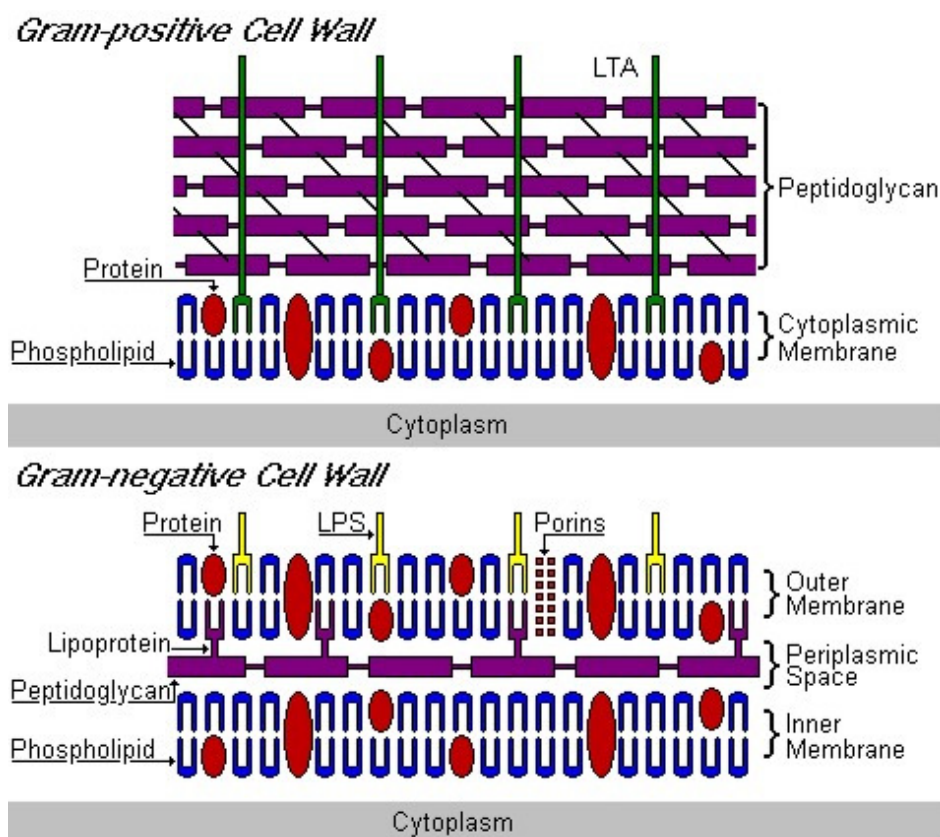
Nejrozsáhlejší složku přirozené imunity v dýchacích cestách představuje mukociliární clearance. Úlohou povrchového epitelu v přirozené imunitě dýchacích cest je komplexní soubor dějů, potřebných pro transport hlenu a zahrnuje aktivitu řasinek a regulaci transportu solí na povrch dýchacích cest transepitelovým transportem iontů. Epitelové buňky produkují na jedné straně antimikrobiální peptidy, např. defensiny. Protože většina AMP je citlivá na vysokou koncentraci solí, je významné, že produkty epitelových buněk jsou na straně druhé charakterizovány nízkým obsahem solí (< 50 mM NaCl), které tak neinhibují jejich antimikrobiální aktivitu.

1.3.2 Obrana dýchacích cest před infekcí patogenními bakteriemi

Bakteriální clearance z distálních dýchacích cest pomocí mukociliárního transportu trvá asi 6 hodin. Za optimálních podmínek by se totiž množství bakterií zdvojnásobilo asi za 20 minut (Knowles MR and Boucher RC, 2002). Sekrety z dutiny nosní i dalších oddílů dýchacích cest mají endogenní antimikrobiální aktivitu. Účinnost antimikrobiálního efektu závisí na hostiteli i na cílové bakterii a je často časově omezena - nový růst přeživších bakterií obvykle začíná do 24 hodin. Zředěním nosního sekretu je antimikrobiální aktivita oslabována (Cole AM et al., 1999). AMP jsou klíčovými elementy pro inhibici mikrobiální proliferace před nástupem specifické buněčné imunitní odpovědi (Gallo RL and Nizet V, 2003). Proto, aby se zpomalil růst bakterií, produkují dýchací cesty antimikrobiální látky

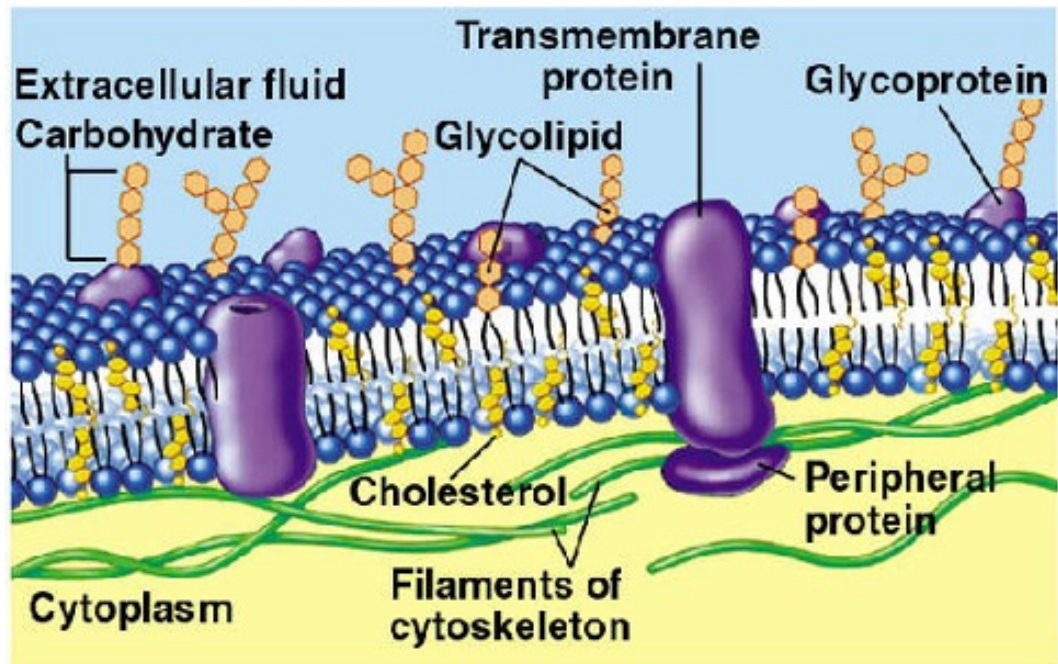
jako např. laktoferin, lysozym, sekreční leukoperoxidasový inhibitor nebo defensiny. Všechny tyto látky zpomalují růst bakterií, ale bylo zjištěno, že bakterie, které nebyly zlikvidovány antimikrobiálními peptidy, se stávají rezistentními k endogenním antimikrobiálním peptidům a do 24 hodin po průniku do dýchacích cest obnovují svůj růst. Z toho vyplývá, že antimikrobiální peptidy působí zpomalení růstu bakterií na asi 2 – 6 hodin, ale tato doba stačí k vyloučení vdechnutých patogenních bakterií mukociliárním transportem (Knowles MR and Boucher RC, 2002).

Antimikrobiální peptidy jednoznačně rozeznávají membrány mikrobus a mnohobuněčných mikroorganismů. Bakteriální membrány mají v povrchové vrstvě výrazně zastoupeny lipidy s negativním nábojem (fosfolipidy - polyanionty) na rozdíl od eukaryotických buněk mnohobuněčných organismů, které na vnější vrstvě buněčné membrány mají lipidy převážně bez elektrického náboje, lipidy s negativním nábojem jsou u nich umístěny hlavně na vnitřní straně membrány.

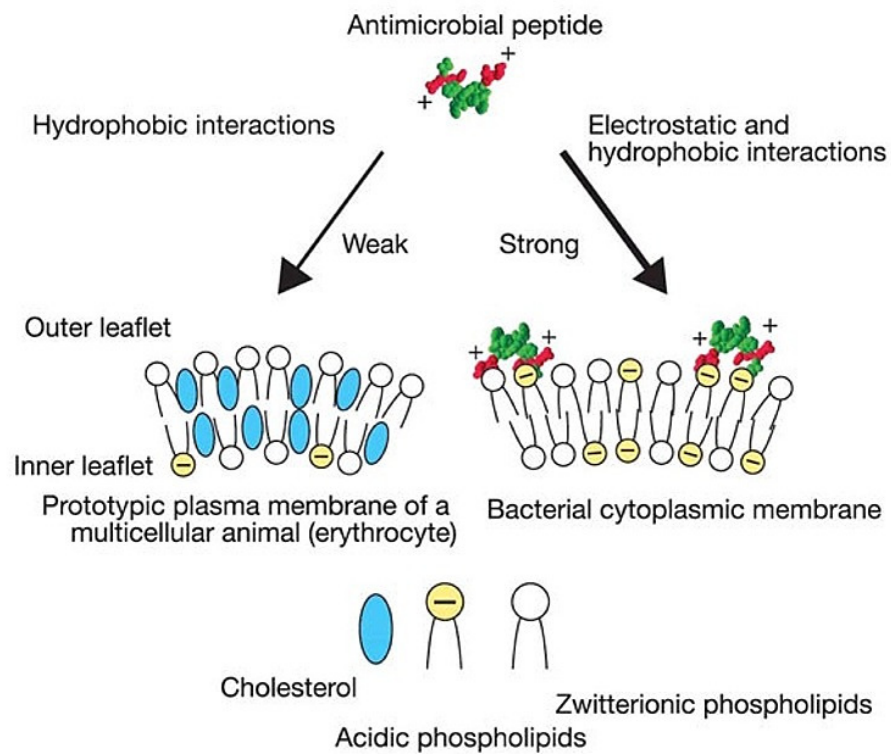


Schema 5: Buněčná stěna G+ a G- bakterií

Fluid Mosaic Model

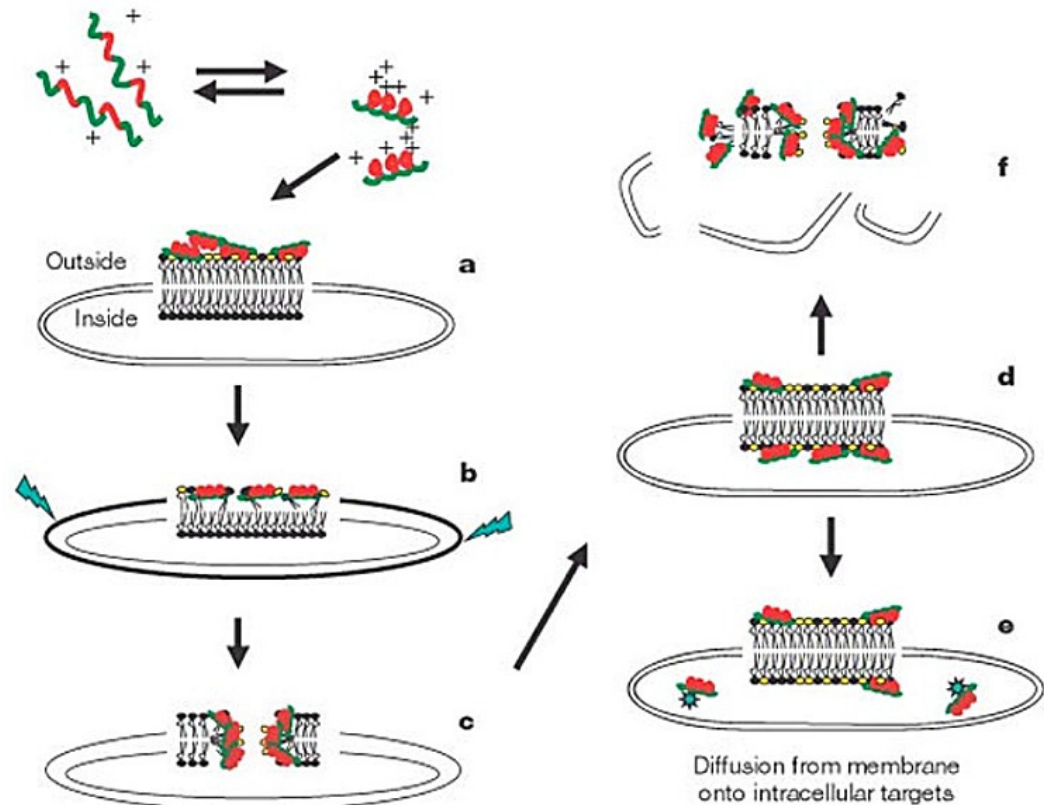


Schema 6: Plasmatická membrána eukaryotických buněk



Schema 7: Účinek antimikrobiálních peptidů na buňku bakteriální a buňku eukaryotickou (Zaslhoff M, 2002)

Interakce AMP s bakteriální buněčnou membránou je následována přesunem lipidů, alterací struktury membrány a v některých případech vstupem AMP do bakteriální buňky a zasažení vnitřních struktur. Přítomnost cholesterolu v buněčné membráně snižuje účinek AMP stabilizací lipidové dvojvrstvy (Zaslhoff M, 2002).



Schema 8: Účinek antimikrobiálních peptidů na buněčnou stěnu bakterií. a) Pokrytí (carpeting) vnější strany membrány AMPs, b) Integrace peptidů do membrány a zeslabení jejího vnějšího listu (povrchová část membrány se v porovnání s vnitřní oblastí membrány roztáhne, což způsobí napětí ve fosfolipidové dvojvrstvě /modré šipky/), c) Tvorba přechodných pórů v membráně, d) Transport lipidů a peptidů do vnitřní vrstvy membrány, e) Translokace peptidů intracelulárně (napadení intracelulárních cílů), f) Kolaps membrány a rozpad buňky

Žlutá – acidické lipidy (negativně nabitě), Černá – neutrální lipidy (Zaslhoff M, 2002)

Mechanismy účinku AMP na bakteriální membránu mohou být různé: fatální depolarizace membrány, vytvoření „děr“ v membráně s následným únikem celulárních komponent, aktivace smrtících procesů v buňce, jako např. aktivace

hydroláz, které degradují buněčnou stěnu, porušení normální distribuce membránových lipidů, jež způsobí změnu funkcí membrány, internalizaci AMP a zničení intracelulárních struktur (Zasloff M, 2002).

Antimikrobiální polypeptidy (AMP) (laktoferin, lysozym, sekreční leukoperoxidasový inhibitor, alfa a beta defensiny) v sekretu dýchacích cest mají antimikrobiální účinek pouze v prostředí s nízkou koncentrací solí. Zvýšená koncentrace solí (NaCl, KCl, Na-glukonát) v sekretu dýchacích cest inhibuje funkci AMP snížením elektrostatického přitahování kationtových polypeptidů a aniontových mikrobiálních povrchů (kompetice kationických peptidů a kationtů ve vazbě na aniontové mikrobiální povrchy). Dvojmocné kationty (Ca^{2+} , Mg^{2+}) inhibují antimikrobiální aktivitu v signifikantně nižších koncentracích než monovalentní (K^+ , Na^+) ionty (Travis SM et al., 1999, Ganz T, 2002, Ganz T, 2004, Zasloff M, 2002). Dalším zajímavým jevem je vazba dvojmocných kationtů na vnější membrány G-bakterií; tím dojde ke stabilizaci membrány a znemožnění průniku kationtových polypeptidů do buněk. Naopak mucin a elastáza neutrofilů nemají na funkci AMP vliv (Ganz T, 2002, Ganz T, 2004). Inhibice AMP v prostředí s vyšší koncentrací kationtů (Travis SM et al., 1999) je ovlivněna i koncentrací AMP (zvýšená koncentrace AMP v sekretu – nižší inhibice AMP vyšší koncentrací kationtů).

Kromě klasických kationických AMP byly v sekretu dýchacích cest zjištěny také anionické peptidy s antimikrobiální aktivitou, které jsou produkovány epitelovými buňkami plic (byly nalezeny v surfaktantu), ale byly nalezeny i v nosní sliznici a průdušnici. Anionické antimikrobiální peptidy (AP) jsou malé molekuly, které z důvodu homopolymerických oblastí aspartátu mají charakter aniontů, a ke své antimikrobiální aktivitě potřebují zinek jako kofaktor. Mají baktericidní účinky proti G+ i G- mikroorganismům. Mechanismus jejich účinku není ještě plně objasněn, ale soudí se, že účinkují až po kotransportu zinku a AP do bakterie. Aktivita AP je inhibována přítomností fosfatáz a naopak potencována zvýšenou koncentrací NaCl. Bylo zjištěno, že AP jsou produkovány konstitutivně a jsou rychle secernovány během počínající mikrobiální kolonizace. Tím mohou zajišťovat důležitou antimikrobiální aktivitu v počátečních fázích infekce. Na rozdíl od kationických AMP anionické peptidy však nemohou, v důsledku své malé molekuly a záporného náboje, inhibovat nastupující zánětlivou odpověď v průběhu infekce (Fales-Williams AJ et al., 2002).

Nosní sekret zdravých jedinců inhibuje růst *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, naproti tomu nosní sekret nosičů *S. aureus* umožňuje růst této bakterie. Bylo zjištěno, že *P. aeruginosa* obnovuje svou schopnost růstu po 24 hodinové inkubaci s nosním sekretem. To poukazuje na schopnost adaptace bakterií na antimikrobiální složky nosního sekretu.

Tyto výsledky ukazují, že sekret dýchacích cest má širokospektré antimikrobiální účinky a že tato antimikrobiální aktivita je zajišťována zejména kationickými polypeptidy. Výsledky také potvrzují, že antimikrobiální aktivita sekretu může být ovlivňována ba dokonce až zcela zrušena zvyšující se iontovou silou, adaptací bakterií a možná též ještě nezjištěnou abnormalitou sekretu pacientů - nosičů *S. aureus*.

Expres AMP je lokálně ovlivňována zánětem. Zánětlivé stimuly uvolňují chemoatraktanty, které přitahují neutrofilny obsahující velké množství lysozymu, laktoferinu a alfa-defensinů. Současně tyto stimuly zvyšují syntézu beta-defensinů v epitelových buňkách a v případě chronického zánětu dokonce indukují cytodiferenciaci buněk epitelu dýchacích cest na sekreční buňky (Ganz T, 2002, Ganz T, 2004). Poruchy v expresi nebo funkci AMP mohou vysvětlovat základní aspekty patofyziologie různých onemocnění, počínaje atopickým ekzémem a cystickou fibrosou, gastroenteritidu způsobenou shigellami, až po rozvoj zubního kazu (Gallo RL and Nizet V, 2003).

Některé patogenní bakterie jsou rezistentní vůči AMP. Jejich rezistence je realizována různě. Jedním z charakteristických mechanismů obrany patogenních bakterií proti AMP je modifikace povrchových aniontů normální bakteriální stěny molekulami kationtů. Cílem této modifikace je snížení přitahování pozitivně nabitých AMP k negativně nabitému povrchu bakterií. Změny v elektrickém náboji bakteriální stěny Gram-negativních bakterií a tím zajištění jejich rezistence vůči AMP jsou způsobeny acetylací lipopolysacharidů (LPS) nebo expresí LPS asociovaného s fosfatidylcholinem. Rezistence Gram-pozitivních bakterií (např. *S. aureus*) vůči AMP je zajišťována inkorporací L-lysinu do fosfatidylglycerolu (Peschel A et al., 2001). Některé bakterie (např. *Neisseria gonorrhoeae*) využívají pumpy, které vylučují AMP z buňky a tím zabraňují hromadění AMP v baktericidních koncentracích (Shafer WM et al., 1998). Jiné druhy bakterií (např. *P. aeruginosa* nebo *Proteus mirabilis*) produkují proteázy, které inaktivují AMP buď přímou degradací, nebo zahájením uvolňování neutralizujících glykosaminů

z hostitelských proteoglykanů (Park PW et al., 2000, Schmidtchen A et al., 2001, Schmidtchen A et al., 2002).

1.3.3 Antimikrobiální peptidy v sekretu dýchacích cest

Exprese AMP je modulována lokálně zánětem. Zánětlivé stimuly uvolňují chemoatraktanty, které přilákají neutrofilů, obsahující ve svých granulech velké množství AMP a hydrolytických enzymů.

Lysozym spolu s laktoferinem jsou nejvíce zasoupenými AMP v sekretu dýchacích cest. Jejich účinná koncentrace je cca 0,1-1 mg/ml (Ganz T, 2004).

1.3.3.1 Lysozym

Lysozym je 14 kDa enzym štěpící glykosidickou vazbu β 1→4 peptidoglykanů v bakteriální stěně. Kromě toho, že působí enzymatickou lýzu bakteriální stěny, může zabíjet bakterie i neenzymatickými mechanismy (Laible NJ and Germaine GR, 1985). Lysozym je vysoce aktivní AMP proti mnoha Gram-positivním kmenům, ale je prakticky neúčinný proti Gram-negativním bakteriím, pokud není potencován jinými kofaktory (např. laktoferinem, kyselinou askorbovou). Bylo prokázáno, že proti G- bakteriím je aktivní pouze při specifické iontové koncentraci a osmolaritě. Tyto kofaktory poruší zevní membránu Gram-negativních bakterií a tím umožní lysozymu zasáhnout citlivou peptidoglykanovou vrstvu. Lysozym je bazický protein, který je součástí fagosomů a specifických granul neutrofilů a je produkován také v monocytech, makrofázích i v epitelových buňkách. Největším producentem lysozymu v dýchacích cestách je povrchový epitel a žlázy ve sliznici a submukose dýchacích cest (Laible NJ and Germaine GR, 1985, Rogan MP et al., 2006).

1.3.3.2 Laktoferin

Laktoferin je kationický, železo vážící glykoprotein bohatý na arginin (80 kDa), existuje však ve formě s železem i bez něj. Ve formě bez navázaného železa je biologicky aktivnější. Má protizánětlivé i antimikrobiální účinky. Je obsažen ve specifických granulech neutrofilů (odtud je uvolňován během zánětu) a v sekretu epitelových buněk (součást slizniční imunity). Laktoferin inhibuje mikrobiální růst navazováním železa, které je nezbytné pro respirační pochody mikrobů, ale zároveň

může destabilizovat povrchovou membránu G- bakterií a tím porušit její permeabilitu a způsobit tak smrt mikrobu. Působí synergicky s jinými složkami přirozené imunity, jako je lysozym nebo sekreční leukoperoxidasový inhibitor (SLPI). Bylo také zjištěno, že laktoferin potencuje účinek některých antibiotik. Laktoferin je účinný nejen proti infekci bakteriální, ale také virové (HIV, CMV, hepatitis B, C) i plísňové (Candida). Je současně také protizánětlivým proteinem. Snižuje např. vazbu IL-8 na endotelové buňky, snižuje také expresi adhezni molekuly E-selektinu a ICAM-1 na endotelových buňkách a tím významně modifikuje imunitní odpověď. Laktoferin se vyskytuje ve vysokých koncentracích v mateřském mléku, slzách, vaginálním sekretu, slinách, produktech exokrinních žláz, jakož i v sekretech dýchacích cest (Rogan MP et al., 2006).

1.3.3.3 Sekreční leukoperoxidasový inhibitor

Sekreční leukoperoxidasový inhibitor je silně bazický neglykosylovaný protein (11,7 kDa), produkován makrofágy, neutrofily a epitelovými buňkami. Je třetím nejvíce zastoupeným AMP v sekretu dýchacích cest (po lysozymu a laktoferinu). Chrání tkáň před účinkem elastázy neutrofilů a je uvolňován při degranulaci neutrofilů během infekce a zánětu. SLPI má významné antibakteriální (G+ i G-), antivirové (např. HIV) i protizánětlivé (např. snížení exprese TNF- α) účinky (Rogan MP et al., 2006).

1.3.3.4 Defensiny

Defensiny jsou ve srovnání s předchozími charakterizovány poměrně malými kationickými molekulami peptidů (3-5 kDa). Jsou bohaté na cystein, vyskytují se v říši rostlinné i živočišné. Tyto peptidy se navzájem liší v délce molekuly, v umístění cysteinových zbytků a sulfidických vazeb, které stabilizují strukturu β -listů. Vykazují cytotoxické působení na bakterie, viry, parazity a plísně. Dělí se do 3 skupin: α -defensiny, β -defensiny a θ -defensiny. θ -defensiny se nevyskytují u lidí. Koncentrace lidských defensinů v sekretu dýchacích cest je silně ovlivňována zánětem (Martin E et al., 1995, Taylor K et al., 2007).

1.3.3.4.1 Alfa-defensiny

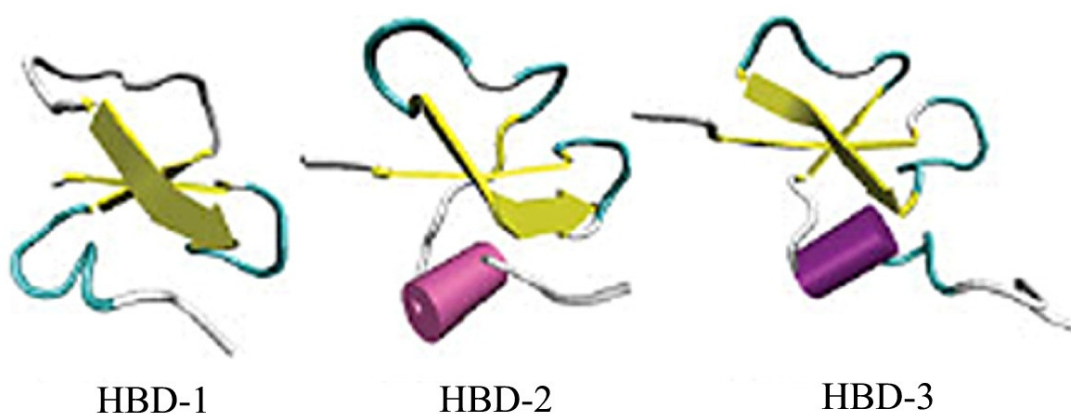
Alfa-defensiny jsou známé také jako *human neutrophil peptides* (HNPs). Mají několik podskupin. HNPs 1-4 jsou důležitou součástí azurofilních granul neutrofilů, kde tvoří až 50% jejich obsahu (Harwig SS et al., 1994). HNPs 5 a 6 byly identifikovány v Panethových buňkách tenkého střeva a také v ženském pohlavním systému. Alfa-defensiny mají různé účinky, včetně mitogenních a chemotaktických. Zvýšením buněčné proliferace přispívají k opravám plicního epitelu (Murphy CJ et al., 1993, Aarbiou J et al., 2002).

1.3.3.4.2 Beta-defensiny

Beta-defensiny (HBD) jsou peptidy složené ze 36-42 aminokyselin, opět bohaté na cystein a navzájem se liší v délce molekuly, v umístění cysteinových zbytků a sulfidických vazeb. Jsou syntetizovány jako 64-68 aminokyselinové řetězce prepropeptidů, které mají na N-konci molekuly 26-32 aminokyselin čítající signální segment (Huttner KM and Bevinf CL, 1999).

1.3.3.4.2.1 Stavba molekuly beta-defensinů

Sekvence aminokyselin je stejná pro všechny β -defensiny. Terciární struktura β -defensinů podskupin 1, 2 a 3 je si nápadně podobná.



Schema 9: Terciární struktura β -defensinů. Diagramy HBD-1, 2, 3 demonstrující podobnost terciární struktury. Antiparalelní β -listy znázorněny žlutě, α -spirálové segmenty fialově (Taylor K et al., 2007).

Tyto tři lidské β -defensiny se skládají ze 3 β -řetězců, které jsou uspořádány do antiparalelních β -listů a jsou navzájem drženy 3 disulfidickými vazbami. β -listy jsou lemovány α -spirálovým segmentem, který tvoří N-konec molekuly β -defensinu. α -spirálový segment je připojen k β -listu disulfidovou vazbou.

1.3.3.4.2.2 Funkce beta-defensinů

Dříve se předpokládalo, že β -defensiny jsou klasické AMPs. V poslední době se ukazuje, že β -defensiny mají imunomodulační účinky, které aktivují různé buněčné typy k produkci různých cytokinů a chemokinů. Dále tvoří propojení mezi přirozenou a získanou imunitou a působí jako chemoatraktanty pro $CD4^+$ T-lymfocyty, nezralé dendritické buňky, monocyty a neutrofilů. β -defensiny (zejména HBD-3) nemají pouze cytotoxické účinky na bakterie, ale také ovlivňují (většinou potlačují) apoptosu neutrofilů působením na CCR6 receptor, tím prodlužují jejich životnost a přispívají tak k posílení obrany organismu proti bakteriální invazi (Nagaoka I et al., 2008).

1.3.3.4.2.3 Vztah struktura - funkce na antimikrobiální aktivitu

Antimikrobiální aktivita je hlavní popisovanou funkcí β -defensinů. Jejich antimikrobiální aktivita byla potvrzena jak proti G+, tak i G- bakteriím, stejně tak i proti virům, jednobuněčným parazitům a plísním. Kationické antimikrobiální peptidy (např. defensiny) nepůsobí na cílové buňky přes receptory, ale jejich mechanismus účinku je zprostředkováván méně specifickými reakcemi, založenými na záporném náboji povrchových membrán mikroorganismů (jsou složeny zejména z anionických peptidů, jako je např. fosfatidyl glycerol). Na rozdíl od povrchové membrány mikroorganismů jsou buněčné membrány buněk savců složeny hlavně z elektroneutrálních fosfolipidů (jako např. fosfatidylcholin, sfingomyelin), kterým mají kationické AMPs nízkou afinitu (Brogden KA, 2005, Taylor K et al., 2007, Nagaoka I et al., 2008, Matsuzaki K, 1999).

Přesný mechanismus účinku defensinů není dosud jednoznačně prokázán, ale bezpochyby zahrnuje zvýšení permeability buněčné membrány. Byly navrženy a v současné době jsou akceptovány dva modelové účinky (viz sch. 8): 1. Carpet model – několik molekul nasedne na povrch membrány a způsobí nekrosu, 2. Pore model – oligomerizace peptidů a vytvoření pórů v buněčné membráně, což způsobí

únik buněčného obsahu (Brogden KA, 2005, Taylor K et al., 2007). Primární struktura HBD-1, 2, 3 ukazuje, že v náboji molekul jsou rozdíly mezi jednotlivými defensiny. Také umístění kationtových zbytků ovlivňuje aktivitu molekuly proti jednotlivým patogenům. Změny v peptidové sekvenci, které nezměnily náboj a hydrofobicitu molekuly neovlivňovaly antimikrobiální vlastnosti defensinů. Ale tyto změny mohou ovlivnit citlivost bakterií vůči antimikrobiálním látkám (Hoover DM et al., 2003).

1.3.3.4.2.4 Působení defensinů na neutrofilů

Neutrofilů jsou důležité efektorové buňky v průběhu zánětu, poškození tkání a při mikrobiální infekci (Smith JA, 1994). Přežívání aktivovaných neutrofilů je relativně krátké (v krvi 6-7 hodin, ve vazivu 1-4 dny) a poté dochází k jejich destrukci apoptosou. Tato spontánní apoptosa neutrofilů může být inhibována působením substancí produkovaných bakteriemi (lipopolysacharidy G- bakterií) nebo vlastními buňkami (cytokiny, chemokiny – IL-1 β , IL-8). Prodloužené přežívání aktivovaných neutrofilů posiluje obranyschopnost organismu proti patogenům, na druhou stranu může způsobit nekontrolovatelné uvolňování cytotoxických metabolitů a prozánětlivých substancí (např. kyslíkové radikály, protheasy), což může vést k zesílení zánětu a prohloubení tkáňového poškození (Whyte M et al., 1999, Simon HU, 2003, Colotta F et al., 1992, Oberholzer C et al., 2001, Cohen J, 2002).

1.3.3.4.2.5 Vztah struktura - funkce na chemotaktickou aktivitu

β -defensiny hrají úlohu jak v přirozené tak i v získané imunitní odpovědi. Chemotaktické působení na různé buněčné typy vykazují defensiny již v nanomolárním množství. HBD-3 indukuje migraci monocytů, CD 4⁺ T-lymfocytů a nezralých dendritických buněk, ale nebyla prokázána migrace neutrofilů a zralých dendritických buněk. Působení defensinů na neutrofilů je diskutováno. Někteří autoři uvádějí vcestování neutrofilů do místa zánětu chemotaktickým efektem HBD-3 na neutrofilů a s tím související upregulaci anti-apoptotických genů a downregulaci pro-apoptotických genů (Theilgaard-Monch K et al., 2004). Chemotaktickým receptorem, na který β -defensiny působí je chemokine receptor 6 (CCR6) a Formyl peptide receptor-like 1 (Yang D et al., 1999, Taylor K et al., 2007). Pro chemotaktické působení defensinů jsou důležité cysteinové zbytky a stabilizace

molekuly defensinu ve specifické konformaci, která umožňuje její interakci s receptory na povrchu buněk (Taylor K et al., 2007).

1.3.3.4.2.6 Vztah struktura - funkce na interakci s buněčnými membránami savců

Interakce β -defensinů s buněčnými membránami eukaryotů není ještě zcela objasněna. Povrch buněčných membrán má hydrofobní charakter. Bylo zjištěno, že čím více hydrofobních aminokyselin je v molekule defensinů, tím větší je jejich hemolytická aktivita. Cytotoxická a hemolytická aktivita HBD-3 závisí více na sekvenci aminokyselin než na disulfidových vazbách. Změny v sekvenci aminokyselin, které způsobí snížení hydrofobicity defensinu (např. výměna cysteinového zbytku za alanin) způsobuje snížení cytotoxicity defensinu (Wimley WC et al., 1994, Harder J et al., 2001).

1.3.3.4.2.7 Beta-defensiny v dýchacích cestách a tonsilách

β -defensiny jsou produkovány epitelovou výstelkou různých orgánů. Jejich koncentrace v sekretu dýchacích cest je asi 1000 x nižší než koncentrace lysozymu, to znamená kolem 1 $\mu\text{g/ml}$ (Cole AM et al., 1999). HBD-1 byl prokázán v největším množství v ledvinách, HBD-2 a 3 v zánětlivé kůži, ale všechny tři HBD-1, 2 a 3 byly prokázány v dýchacím traktu (Singh PK, et al., 1998, Harder J et al., 2001, Zhao CQ et al., 1996, Bals R et al., 1998). Sekrece HBD-2 a 3 je regulována dvojitým způsobem; přímou odpovědí epitelových buněk na lipopolysacharidy a jiné bakteriální stimuly, druhý způsob je regulace cytokiny. V prostředí s nízkou koncentrací solí jsou defensiny baktericidní v mikromolárních ($\mu\text{mol/ml}$) koncentracích proti mnoha Gram-positivním i Gram-negativním baktériím, kvasinkám, plísním a některým virům. Zvýšená koncentrace solí inhibuje aktivitu defensinů. Mechanismem účinku defensinů na bakterie je zvýšení permeability jejich povrchové membrány bohaté na fosfolipidy s relativní ochranou cholesterolových a neutrálních fosfolipidů v membránách hostitele (Ganz T, 2002, Ganz T, 2004).

Některé defensiny „in vitro“ přispívají k zánětlivým a reparačním pochodům, což zahrnuje inhibici adrenokortikotropním hormonem stimulované sekrece kortizolu, inhibici fibrinolýzy, mitogenní efekt na fibroblasty (Ganz T and Lehrer RI, 1995) a indukci sekrece IL-8 epitelovými buňkami (Van Wetering S et al., 1997). Funkce defensinů jako chemoatraktantů pro nezralé dendritické buňky a paměťové T-

lymfocyty je důležitá v iniciálních fázích přirozené imunitní odpovědi organismu na infekci a pro následné rozvinutí specifické imunitní odpovědi. Jednotlivé AMP působí na rozdílné cílové struktury bakteriálních stěn (fosfolipidová membrána, peptidoglykany, ionty železa atd.) a jejich mechanismus účinku je také různý (enzymatické rozrušování stěny, formování pórů v bakteriální stěně). Předpokládá se, že jednotlivé antimikrobiální peptidy spolupracují napadáním různých struktur bakteriální stěny, a že svým působením jsou schopné odhalit citlivé struktury pro účinek jiného AMP (Ganz T, 2002, Ganz T, 2004).

HBD-1, 2 a 3 byly nalezeny jak ve sliznici dýchacích cest, tak v oblasti tonsil, jejich exprese závisí na stavu sliznice – zdravá, zánětlivá nebo tumorosní (Chae SW et al., 2001, Wang C et al., 2004, Weise JB et al., 2002).

HBD-1 je produkován permanentně a jeho produkce není ovlivňována mikrobiálními a zánětlivými stimuly (Po-Hsu Ch and Sheen-Yie F, 2004, Klüver E et al., 2006, Dunsche A et al., 2001), exprese ostatních (HBD-2 a 3) je indukována infekčními okolnostmi (Klüver E et al., 2006). HBD-2 a 3 představují defensiny, které jsou produkovány epitelovými buňkami v reakci na mikrobiální infekci. Jejich produkce je zvyšována různými typy patogenů (Schibli DJ et al., 2002). HBD-2 vykazuje výraznou antimikrobiální aktivitu proti G- bakteriím a plísním (*Candida*) a pouze bakteriostatický efekt proti *Staphylococcus aureus* (Claeys S et al., 2003). Účinek HBD-2 na *Staphylococcus aureus* je diskutován více autory. Někteří z nich ukazují, že HBD-2 má baktericidní efekt jak na G-, tak i na G+ bakterie včetně *S. aureus* (Po-Hsu Ch and Sheen-Yie F, 2004). Někteří autoři uvádějí, že HBD-3 má baktericidní účinky proti G- i G+ bakteriím včetně *S. aureus*, jiní udávají jeho baktericidní efekt pouze na G- bakterie kdežto na G+ včetně *S. aureus* pouze slabý bakteriostatický vliv. Byl zjištěn silný antimykotický efekt HBD-3 (Claeys S et al., 2003, Harder J et al., 1997).

Velmi zajímavým nálezem je zjištění rozdílného množství HBD-2 a 3 v zánětlivé nosní sliznici s prokázaným *S. aureus* a bez jeho přítomnosti. HBD-2 a 3 jsou v nosní sliznici nosičů *S. aureus* produkovány v zanedbatelném množství oproti sliznicím s akutní infekcí *S. aureus*. To ukazuje, že chronická infekce *S. aureus* (přenašeči) potlačuje produkci HBD-2 a 3 a tak oddaluje přirozenou imunitní odpověď organismu na infekci, což umožňuje snadnější kolonizaci epitelu (Quinn GA and Cole AM, 2007).

HBD-1 byl prokázán ve všech vzorcích nosní sliznice na rozdíl od HBD-2, který byl některými autory prokázán pouze ve sliznici nosních polypů, jinými pak i v některých vzorcích zdravé nosní sliznice. Nejčastěji a v největším množství byl prokazován v bazální části povrchového epitelu (Lee SH et al., 2002, Po-Hsu Ch and Sheen-Yie F, 2004). Ve výskytu HBD-2 a 3 v zánětlivé a zdravé nosní sliznici někteří autoři nenašli rozdíl (Claeys S et al., 2003).

Na výskyt β -defensinů v tonsilární lokalizaci jsou různé názory. HBD-2 a 3 byly nalezeny jak v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu, tak i v epitelu tonsilárních krypt. Množství HBD-2 a 3 bylo srovnatelné v tkáni idiopatických tonsil a rekurentních tonsilitid. Výraznější produkce inducibilních AMPs (HBD-2 a 3) v tonsilách je přičítána hlubokým kryptám a vysoké mikrobiální kolonizaci různými kmeny patogenů (Claeys S et al., 2003). Jiní autoři zjistili zvýšenou hladinu HBD-2 pouze v tonsilách s chronickým zánětem (Weise JB et al., 2002).

Podle jiného zdroje byly HBD-1 a 3 v povrchovém epitelu tonsil od pacientů s chronickou tonsilitidou nalezeny v nízkém množství. To by mohlo být důvodem zvýšené vnímavosti těchto pacientů k infekci (Ball SL et al., 2007).

Ve tkáni tonsilárního karcinomu nebyl HBD-1 pravidelně nacházen na rozdíl od HBD-2, který byl pravidelně zjišťován ve vyšších hladinách v keratinocytech povrchového epitelu. Z toho vyplývá, že HBD-2 by mohl hrát významnou roli ve vzniku tonsilárního karcinomu (Mizukawa N et al., 2000, Sawaki K et al., 2002, Yoshimoto T et al., 2003).

Protože předmětem této práce byl výzkum na tkáních zdravých, zánětlivých a karcinomatálních, byla také sledována úroveň apoptosy (pomocí aktivované kaspasy 3), proliferace (Ki-67), některých růstových faktorů (TGF- β , VEGF) a enzymů (eNOS) k ozřejmění a doplnění situace v daných tkáních a orgánech.

1.4 Zánět

V průběhu zánětu dochází v dané tkáni ke zvýšení metabolických procesů (nekrosa, apoptosa, odstraňování nevratně poškozených tkání, regenerační nebo reparační

pochody - proliferace), které jsou náročné na dodávku kyslíku do dané oblasti. Proto cévní zásobení, které ve zdravé tkáni bylo dostačující, nemá dostatečnou kapacitu pro dodávání potřebného množství krve a tím kyslíku (a odvod metabolitů) do zánětlivého ložiska a tak vzniká určitý stupeň hypoxie až ischemie v zánětlivém ložisku. Vaskulární endotel proto sehrává klíčovou regulační úlohu při zánětu. Endotel má vazodilatační a antitrombotický potenciál. Endotelové buňky uvolňují řadu mediátorů různé povahy. Mediátory s vazodilatačním účinkem působí také antitromboticky (antiadhezivně a antiagregačně). Nejvýznamějším mediátorem této skupiny je oxid dusnatý (Nečas E et al., 2007b).

NO je malý peiotropní volný radikál s hydrofobní molekulou. Je klíčovou signální molekulou v onemocněních souvisejících s chronickým zánětem, kterými jsou i nádorová onemocnění (Ying L and Hofseth LJ, 2007). NO vzniká ve formě reaktivního radikálu působením NO-syntázy (nitric oxide synthase) při přeměně L-argininu na L-citrulin. Radikál NO proniká do různých buněk (např. hladkého svalstva) a aktivuje zde rozpustnou guanylátcyklázu. Působením cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) dojde ke snížení koncentrace Ca^{2+} v cytoplasmě a tím je docíleno relaxačního účinku. Za fyziologického stavu je NO produkován konstitutivní NOS – endotelovou NO-syntázou (eNOS – NOS3). V průběhu zánětu a ischemie dochází v endotelu, leukocytech i v jiných buňkách k expresi indukované NO-syntázy (iNOS – NOS2). Děje se tak po stimulaci prozáněťovými cytokiny – interferon gama ($INF-\gamma$), interleukiny 1, 6 (IL-1, 6), tumor necrosis factor alfa ($TNF-\alpha$) a lipopolysacharidy nebo faktorem aktivujícím destičky (PAF). Snížení exprese iNOS působí protizánětlivé cytokiny – interleukiny 4, 8, 10 (IL-4, 8, 10). Radikál NO má velmi silný cytotoxický efekt. Ten může být spolu se systémovou vazoparalýzou způsobenou dysregulovanou produkcí NO příčinou autoagresivní povahy zánětu (Nečas E et al., 2007b). Bylo zjištěno, že reaktivní dusíkové radikály (např. NO) mohou mít jak protizánětlivé/protitumorosní, tak i prozánětlivé/protumorosní účinky. Jejich karcinogenní efekt závisí na genetické výbavě cílové tkáně, okolním mikroprostředí, na aktivitě a lokalizaci NOS izoform, ale tím také na hladině NO (Ying L and Hofseth LJ, 2007, Li CQ and Wogan GN, 2005).

Mediátory s vazokonstrikčním účinkem mají opačný efekt, působí protromboticky (proadhezivně a proagregačně na trombocyty). Mezi tyto mediátory řadíme např. tromboxan A₂, destičky aktivující faktor (Nečas E et al., 2007b).

V průběhu zánětlivé (ale i jiné – např. tumorosní) ischemie jsou aktivovány geny zvyšující expresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), který je zodpovědný za zvýšení angiogeneze ve tkáni málo zásobené kyslíkem.

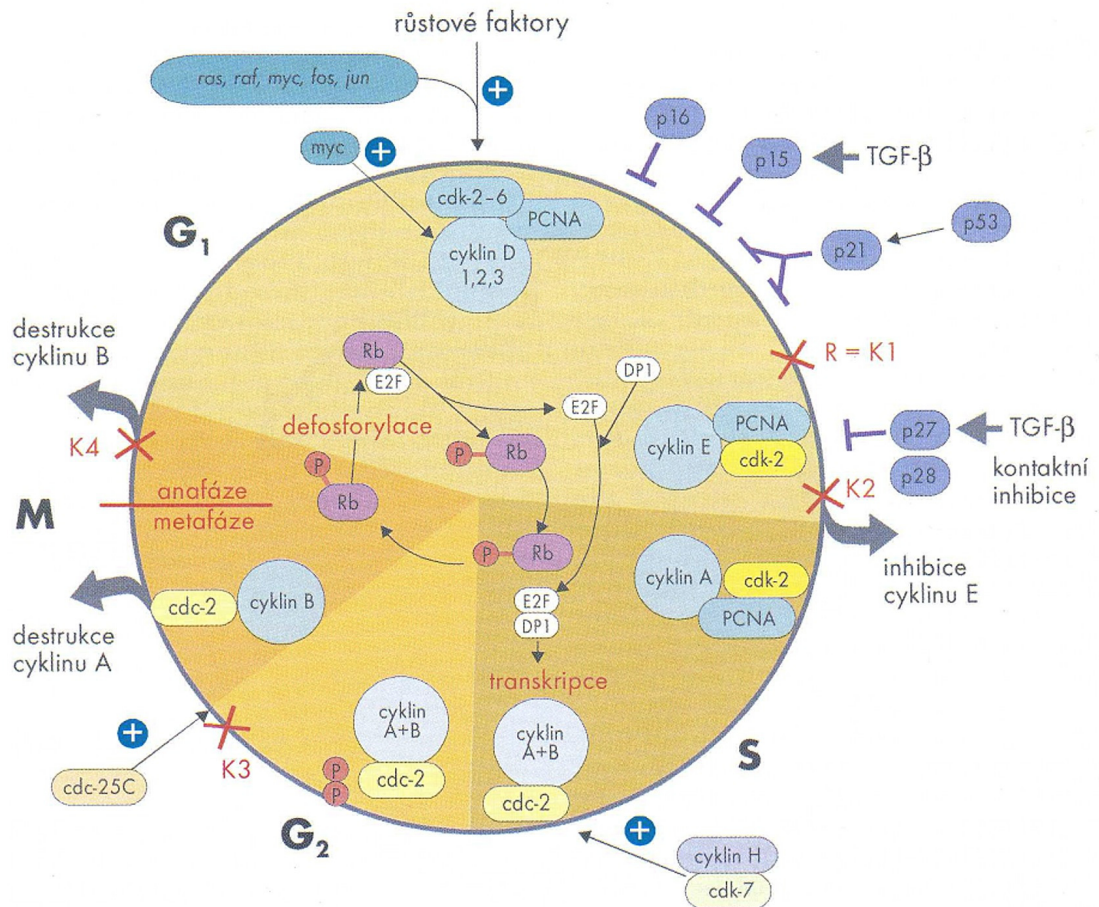
Transforming growth factor beta (TGF- β) je produkován eosinofilními granulocyty, je skladován v malých granulech v cytoplasmě a uplatňuje se při chronickém zánětu a také při rozvoji fibrosy. Jeho nadměrná produkce má za následek opakované záněty s přechodem do chronicity, zmnožení mezibuněčné hmoty a progresi fibrotických změn (Nečas E et al., 2007c).

1.5 Nádorová transformace

Etiologických faktorů (mutagenů) nádorového zvrhnutí buněk je celá řada. Jsou to jednak vlivy zevní, které rozdělujeme na vlivy fyzikální (záření UV, rentgenové, gama, ionizující), chemické (kancerogeny) a biologické (onkogenní viry). Mezi vnitřní vlivy patří zděděné faktory (genetická predispozice) a získané faktory – zvýšení náchylnosti organismu ke vzniku nádoru (snížená nebo zvýšená funkce imunitního systému, nadměrná hormonální stimulace, stavy chronicky zvýšené proliferace buněk). K chronickému poškozování tkáně a tím i k chronicky zvýšené proliferaci buněk dochází i v průběhu chronických zánětů. Proto v průběhu těchto dějů dochází jednak ke změnám buněčného typu (tzv. metaplasii) a jednak k usnadnění vzniku nádorového bujení. Proto je možné říci, že je chronický zánět prekancerosou. V průběhu maligní transformace buňky dochází ke genetickým změnám. Tyto genetické změny ovlivňují regulaci buněčného cyklu (setrvání v G_0 fázi nebo zahájení buněčného cyklu), dohled nad správností genomu a účinností reparačních procesů, náchylnost k apoptose i interakcemi buňky s okolím (adhezivita, invazivita).

Velmi důležitým genem a jeho produktem je gen pro protein p53, nazývaný „strážce genomu“. Jeho nedostatek nebo nefunkčnost může způsobit genetickou nestabilitu (hromadění dalších mutací) a vznik či eventuální malignizaci nádoru. Buňka, která podlehlá nádorové transformaci může přetrvávat v G_0 fázi po mnoho let než se začne dělit. Existuje několik stupňů nádorového růstu. Iniclace (počáteční mutace buňky),

promoce (zahájení dělení nádorově přeměněné buňky) a progrese (akcelerace nádorového růstu).



Schema 10: Interakce hlavních stimulačních a inhibičních faktorů v průběhu buněčného cyklu (Klener P et al., 2002a)

Mezi změny, které nádorový růst zpomalují patří: prodlužování buněčného cyklu, vznik tzv. neproliferující frakce buněk (v G₀ fázi nebo terminálně diferencované buňky), zánik části buněk nádorového klonu (nedostatečná výživa, cytotoxické faktory) a ztráty nádorových buněk odlupováním z povrchu do lumina nebo vně organismu. Důležitým parametrem růstu nádoru je jeho výživa. Maximální velikost nádoru, který může být ještě vyživován difúzí je cca 1 mg. Po dosažení této velikosti se růst nádoru výrazně zpomalí. Další jeho vývoj již je podmíněn vznikem vlastního stromatu, kde velmi důležitou roli hraje vznik vlastní kapilární sítě napojené na vyživující cévu. V tomto procesu se výrazně uplatňují angiogenní faktory (např. VEGF, molekula NO). Po vytvoření vlastní mikrocirkulace růst nádoru výrazně akceleruje, buňky se překotně množí, takže rozvoj mikrocirkulace většinou nestačí

sledovat rychlý růst nádorové masy a tak vznikají v nádoru hypoxické oblasti. V nich dochází k apoptose nebo i nekrose nádorových buněk, nádor přechodně omezuje, až zastavuje svůj růst (díky zániku buněk se může i zmenšit). Po vytvoření hustší mikrocirkulace se růst nádoru opět obnoví. Kromě tohoto účinku na rychlost růstu nádoru má hypoxie účinek i na selekci buněk odolnějších a agresivnějších s nestabilnějším genomem. Tím dochází k další malignizaci tumoru. Další důležitou vlastností v šíření tumorů je jejich invazivní růst a tvorba metastáz. Invazivní růst nádoru je dán ztrátou kontaktní inhibice růstu buněk. Při šíření nádoru lymfatickou nebo krevní cestou dochází k narušení cévní stěny, interakcím nádorových buněk s krevními elementy a k opětovnému zachycení nádorových buněk k cévní stěně při mikroembolizaci nádorových buněk (Nečas E et al., 2007d).

1.6 Molekuly a procesy ovlivňující fyziologické i patologické procesy

1.6.1 Endotelová syntasa oxidu dusnatého

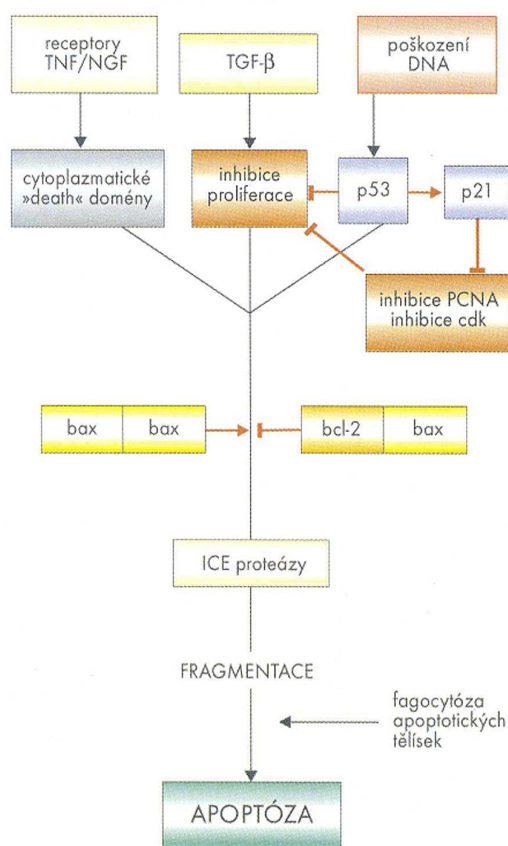
Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) produkuje NO molekuly v nanomolárních množstvích na rozdíl od iNOS, která produkuje NO v mikromolárním množství. Taková množství poškozují DNA a mění strukturu a funkci proteinů (Ying L and Hofseth LJ, 2007). NO je zahrnut do pochodů zánětlivých, ale i tumorosních. Moduluje vznik a progresi nádoru působením na různé procesy (angiogeneze, apoptosa, buněčný cyklus, invazivitu a metastasování). Zánětlivých dějů se neúčastní pouze svým vazodilatačním a antiagregačním účinkem, ale také reguluje expresi různých (např. cyklooxygenasy-2) prozánětlivých molekul (Blais V and Rivest S, 2001). Bylo zjištěno, že jak buňky slizniční, stromální tak i endotelové v tumorosní tkáni vykazovaly dysregulaci eNOS a bylo prokázáno, že angiogeneze je základním předpokladem pro růst a invazi nádoru. eNOS se účastní jak procesu angiogeneze (vznik nových cév z cév existujících), tak i vaskulogeneze, tj. formování nových cév z progenitorových buněk de novo (Duda DG et al., 2004, Brouet A et al., 2005).

eNOS hraje důležitou roli v proliferaci endotelových buněk a současně je klíčovým mediátorem pro některé růstové faktory ovlivňující endotel, jako je VEGF a prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 podporuje pučení endotelových buněk, což představuje první krok k neoangiogenezi (Duda DG et al., 2004, Namkoong S et al., 2005). Na druhé straně některé zánětlivé cytokiny a růstové faktory (např. VEGF) mohou ovlivňovat expresi eNOS. Z toho vyplývá, že eNOS může mít funkci jak prozánětlivou, tak protizánětlivou. eNOS je klíčovou molekulou pro aktivaci a proliferaci endotelových buněk. To je důležité pro angiogenesu, jak bylo uvedeno výše. Účinky eNOS na proliferaci epitelových buněk závisí na typu a genetické výbavě cílové buňky a také na koncentraci NO. Některé práce uvádějí, že nízké koncentrace (srovnatelné s těmi, které jsou uvolňovány eNOS, mohou stimulovat buněčný cyklus nádorových buněk a tím jejich proliferaci. Enzymatická aktivita eNOS spíše přispívá k regeneraci tkání - hojení ran (Ying L and Hofseth LJ, 2007). eNOS a s ní asociovaná molekula NO zvyšují permeabilitu bariéry nádor-krev a tím usnadňují invazi nádorových buněk. Různé studie ukázaly, že vysoká exprese eNOS může být spojena s invazivitou nádorových buněk (Wang I et al., 2005). Molekula NO může mít jak proapoptotický, tak antiapoptotický efekt. Některé práce uvádějí, že nižší koncentrace NO mají antiapoptotický efekt. Jiné práce uvádějí, že eNOS snižuje apoptosu a zvyšuje přežití buněk působením na Bcl-2 (antiapoptotický gen). Ukazuje se, že eNOS by mohla být faktorem, který hraje centrální úlohu v inhibici apoptosy růstovými faktory (Ying L and Hofseth LJ, 2007).

1.6.2 Apoptosa

Apoptosa, neboli programovaná buněčná smrt, je mechanismus zániku buňky jak v průběhu fyziologických dějů (remodelace tkání zvláště v průběhu embryonálního a fetálního vývoje nebo buněčná dynamika různých tkání), tak i během dějů patologických (nádorová onemocnění, záněty, autoimunitní onemocnění, ischemie, hojení ran atd.). Jak název programovaná buněčná smrt napovídá, ke svému sebezničení buňka uplatňuje vlastní mechanismy, které jsou zakotveny v jejím genomu. Příčiny, které apoptosu vyvolávají, jsou různorodé: aktivace specifických receptorů (např. pro TNF- α) nebo naopak nedostatečná aktivace (tonisace) buňky různými stimuly (např. růstové faktory), poškození DNA a jiných struktur buňky

např. ionizujícím zářením nebo viry a v neposlední řadě průnik většího množství Ca^{2+} do buňky. Apoptosa je uskutečňována prostřednictvím nitrobuněčných proteáz – kaspas. Kaspasy jsou cysteinové proteasy se specifitou vůči aspartátu. V průběhu apoptosy jsou aktivovány proteolytickým štěpením. Jejich substráty jsou funkční buněčné proteiny, cytoskelet, jaderné membrány atp. Buňka se nakonec rozpadne na několik různě velkých segmentů – apoptotická tělíčka, která jsou kryta plasmatickou membránou, a proto nevyvolávají zánětlivou reakci. Apoptotická tělíčka jsou následně fagocytována okolními buňkami (Nečas E et al., 2007a).



Schema 11: Zjednodušené schema mechanismu vzniku apoptosy (Klener P et al., 2002c)

Je to právě štěpená kaspasa 3 (**cleaved caspase 3**), která reprezentuje tzv. „cytoplasmatické death domény“ a je tak jedním z významných markerů pro imunohistochemickou detekci apoptosy v řezové technice (parafinové nebo kryostatové řezy). Pro tkáňové kultury (případně různé typy bioreaktorů), kde figurují buňky „in toto“ je pak jednodušší detekce externalizovaného fosfatidylserinu pomocí Annexinu V/FITC.

eNOS se účastní i apoptotických dějů. Molekula NO může mít proapoptotický i antiapoptotický (nižší koncentrace NO) efekt (Fukumura D et al., 2006, Lancaster JR Jr. and Xie K, 2006, Li CQ and Wogan GN, 2005). Apoptosa byla studována sledováním apoptotického markeru – štěpené kaspasy 3 (cleaved caspase 3) pomocí imunohistochemické detekce.

1.6.3 Buněčná proliferace

V průběhu fyziologických a hlavně patologických (zánět, nádor) pochodů ve tkáních nalézáme proliferující buňky. Buněčná proliferace je velmi důležitý děj pro obnovu tkání a samozřejmě se velmi uplatňuje v průběhu nádorového bujení a během reparace tkání poškozených zánětem. Exprese proteinu Ki-67 je striktně spojována právě s tímto dějem. Protože **Ki-67** je exprimován během aktivních fází buněčného cyklu (G_1 , S, G_2), ale chybí u buněk v G_0 fázi, proto je výborným proliferáčním markrem (Scholzen T and Gerdes J, 2000). Pro G_1 fázi bylo zjištěno, že množství exprimovaného Ki-67 se může zvyšovat (buňky přecházející následně do S fáze), snižovat (buňky přecházející následně do G_0 fáze) nebo jeho množství může být stabilní (při optimálních lokálních růstových podmínkách). Jeho lokalizace je omezena na několik fokusů v karyoplasmě. V průběhu S fáze dochází ke zvýšení exprese Ki-67, někteří autoři uvádějí jeho výskyt pouze v nukleolu, jiní jej nacházejí i v karyoplasmě. V průběhu G_2 fáze dochází k dalšímu zvyšování exprese Ki-67, jeho lokalizace je uváděna difuzně v jádře (duManoir S et al., 1991, Bruno S et al., 1992). Nejvyšší intenzita Ki-67 je nalézána během metafáze, zatímco v anafázi a telofázi začíná jeho exprese klesat. Je uváděna redistribuce Ki-67 během mitosy – v profázi je Ki-67 nalézán v oblasti kondenzovaných chromosomů, v metafázi pokrývá povrch jednotlivých chromosomů a po rozpuštění jaderné membrány může být Ki-67 nalezen i difusně v cytoplasmě (Braun N et al., 1988, Starborg M et al., 1996, Scholzen T and Gerdes J, 2000).

Proliferující buňky jsou nalézány téměř ve všech tkáních těla. Ovšem na rozdíl od tkání zdravých se v průběhu některých patologických dějů proliferáční aktivita zvyšuje, což je možno sledovat pomocí proliferáčního markeru Ki-67. Proliferační marker Ki-67 je využíván u některých nádorů prognosticky. Proliferace byla

sledována u různých typů nádorů, mimo jiné také v dlaždicobuněčném karcinomu orofaryngu (Grabenbauer GG et al., 2000).

1.6.4 Transforming growth factor-beta

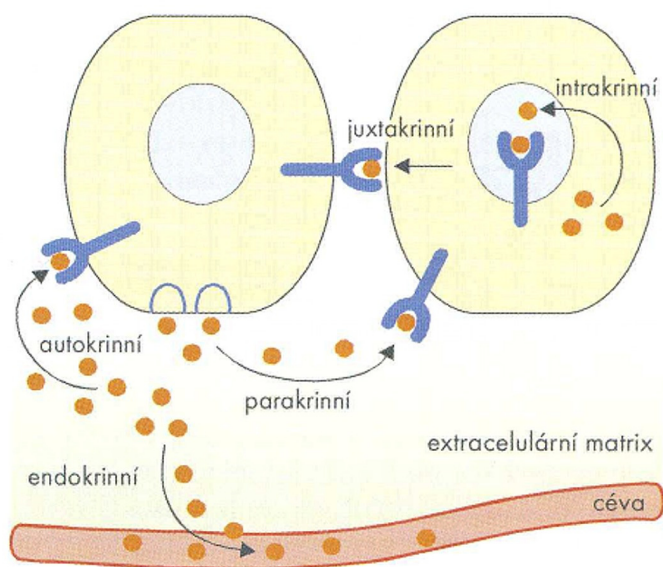
Prakticky každá buňka v těle včetně epitelových, endotelových, hemopoetických, nervových a vazivových, produkuje transforming growth factor beta (**TGF- β**) nebo pro tento růstový faktor mají receptory. TGF- β reguluje proliferaci a diferenciaci buněk, embryonální vývoj, hojení ran a angiogenezu (Blobe GC et al., 2000). TGF- β reguluje ve specifických případech buněčnou proliferaci. Ve většině epitelových, endotelových a hemopoetických buněk působí TGF- β jako výrazný inhibitor buněčné proliferace. Zastavuje buněčný cyklus ve fázi G1. Dále působí indukci buněčné diferenciace a navozuje apoptosu (Raviz MJ and Wenner CE, 1997). TGF- β je významným regulátorem produkce a exocytosy mezibuněčné hmoty. Stimuluje fibroblasty i jiné buňky k produkci proteinů mezibuněčné hmoty a proteinů pro adhezi buněk, včetně kolagenu, fibronektinu a integrinů. Současně také snižuje produkci enzymů, které mezibuněčnou hmotu odbourávají (např. kolagenasa, heparinasa, stromelysin) a zvyšuje produkci proteinů, které inhibují tyto enzymy (např. aktivátor plazminogenu). Cílem těchto změn je zvýšení produkce proteinů mezibuněčné hmoty a buněčných adhezních proteinů. V nádorových buňkách byly popsány mutace signální dráhy TGF- β . Tyto mutace způsobují rezistenci těchto buněk k inhibici růstu zprostředkovanou TGF- β a tím umožnění nekontrolované proliferace buněk. Zvýšení produkce TGF- β v nádorových buňkách zvyšuje jejich proteolytickou aktivitu a tím i jejich invazivitu. TGF- β přímo stimuluje angiogenezu. Tato vlastnost může být dalším mechanismem, kterým tento růstový faktor stimuluje růst nádoru (Blobe GC et al., 2000, Machara Y et al., 1999). Bylo zjištěno, že TGF- β má také imunosupresivní účinky. Je produkován leukocyty a podporuje jejich diferenciaci, na druhé straně inhibuje jejich proliferaci a aktivaci. TGF- β má i chemotaktický účinek na migraci leukocytů a reguluje umístění těchto buněk prostřednictvím adhezních molekul. Má významnou úlohu v útlumu aktivace a proliferace zánětových buněk (Shull MM et al., 1992). Jeho nadměrná produkce má za následek opakované akutní záněty s přechodem do chronicity, s tím související množení mezibuněčné hmoty i progresi fibrotických změn (Nečas E et al., 2007c). Produkce a sekrece tohoto růstového faktoru některými nádorovými buňkami

způsobuje potlačení aktivace migrujících imunitních buněk (Norgaard P et al., 1995). Tento imunosupresivní efekt může být dalším důležitým mechanismem, kterým TGF- β podporuje růst nádoru (Blobe GC et al., 2000). V normálních buňkách působí TGF- β protinádorově tím, že inhibuje proliferaci buněk nebo že podporuje buněčnou diferenciaci a apoptosu. V úvodních fázích kancerogeneze ztrácí buňky citlivost k TGF- β a tím k inhibici svého růstu. Poté, co se nádorové buňky stanou rezistentními k inhibici svého růstu TGF- β , začnou jak samotné nádorové buňky, tak i buňky stromatu zvýšeně produkovat tento faktor. Následkem jeho zvýšené produkce se nádorové buňky (jejichž růst již nemůže být inhibován TGF- β) stanou invazivnějšími a začnou metastazovat do vzdálených orgánů. Toto chování nádorových buněk je způsobeno ztrátou jejich citlivosti k TGF- β , tím je stimulována angiogeneza a zvýšena schopnost migrace buněk. Podílí se na tom potlačení imunitní odpovědi, jakož i zvýšená interakce mezi nádorovými buňkami a mezibuněčnou hmotou. Z toho vyplývá, že rezistence buněk k TGF- β usnadňuje vznik nádoru a že takové buňky jsou invazivnější. U různých typů nádorů byla zjištěna souvislost mezi zvýšenou produkcí TGF- β a zvýšenou invazivitou nádoru. Byly uvedeny i výsledky, které ukazují, že TGF- β přispívá ke vzniku a progresi dlaždicobuněčného karcinomu v oblasti hlavy a krku (Xie W et al., 2003, Blobel GC et al., 2000, Machara Y et al., 1999, Picon A et al., 1998). Přestože je TGF- β nezbytný pro hojení ran, jeho nadprodukce může vyústit v nadměrné ukládání vazivových komponent v jizvách a ke vzniku keloidu. Tyto mechanismy byly podpořeny tím, že byla prokázána zvýšená produkce TGF- β v poškozených tkáních ještě před zvýšenou produkcí mezibuněčné hmoty. Tento faktor je výrazným stimulatorem produkce a ukládání mezibuněčné hmoty a je ve větších množstvích nalézán ve fibrotických orgánech. Inhibitory vazby TGF- β na jeho specifické receptory snižují nebo úplně zabraňují vzniku fibrosy (Border WA and Noble NA, 1994, Sandreson N et al., 1995).

1.6.5 Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor

VEGF/VPF (Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor) je vysoce specifický mitogen pro endotelové buňky. Tento faktor má schopnost podporovat růst endotelových buněk (arterií, vén i lymfatických cév) a větvení cév.

Mezi jeho další účinky se řadí zvyšování permeability cévní stěny a výrazná angiogenní aktivita (Joory KD et al., 2006, Unemori EN et al., 1992). Účinek VEGF/VPF na cévní permeabilitu ukazuje na důležitou roli této molekuly během zánětu i jiných patologických podmínek. Bylo zjištěno, že VEGF je silně exprimován např. v kožních keratinocytech během hojení ran, to znamená za podmínek, které jsou charakterizovány zvýšenou cévní permeabilitou a angiogenesí. Experimentálně bylo zjištěno, že nadprodukce VEGF v kůži způsobuje vznik hustší kapilární sítě, kroužení leukocytů a jejich adhezi ke stěnám postkapilár, tzn. dějů vyústujících v projevy chronického zánětu. Dalším účinkem VEGF je omezení apoptosy endotelových buněk indukci exprese antiapoptotických proteinů (např. Bcl-2). Výsledkem inhibice VEGF jsou výrazné změny v cévách. VEGF nepůsobí mitogenně pouze na endotelové buňky, ale i na mnoho dalších buněčných typů, např. fibroblasty, buňky pankreatických vývodů a Schwanovy buňky. Dále VEGF také zvyšuje produkci surfaktantu sekrečními pneumocyty. Velmi zajímavý je vztah mezi molekulou NO a VEGF. Byla prokázána významná role NO na zvyšování permeability zprostředkované VEGF. Angiogeneze, průměr cév, míra průtoku krve a permeabilita cévní stěny byly úměrné hladině NO. Také další faktory z rodiny cytokinů mají vztah k VEGF. Patří mezi ně např. TGF- α , TGF- β (zvyšuje produkci VEGF), EGF, keratinocyte growth factor, PDGF nebo bFGF. Je velmi pravděpodobné, že tyto faktory působí parakrinně nebo autokrinně spolu s hypoxií na produkci VEGF (Coste A et al., 2000, Ferrara N, 2004).



Schema 12: Různé způsoby účinku signálních molekul (Klener P et al., 2002b)

Některé práce uvádějí, že existuje vztah mezi cévní permeabilitou a angiogenesí. Bylo zjištěno, že zvýšení cévní permeability je základním krokem pro angiogenesu tím, že dojde k extravasaci fibrinu, po němž následně migrují proliferující endotelové buňky. Na druhou stranu ne každé zvýšení permeability je následováno angiogenesí (Ferrara N, 2004). VEGF je produkován buňkami jako odpověď na tkáňovou hypoxii. Během hypoxie dochází ke změně exprese některých genů účinkem transkripčního faktoru HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1). Díky těmto změnám jsou v buňce aktivovány pochody, které ji adaptují na prostředí s nízkou tenzí kyslíku. Mezi ně patří zvýšený příjem glukosy do buňky (využívá se k produkci ATP anaerobní glykolýzou), indukce genu pro p53, erythropoetin. Mimo jiné dochází i ke zvýšené expresi genu pro VEGF (Nečas E et al., 2007e). Kromě růstových faktorů a NO molekuly ovlivňují expresi VEGF také některé zánětlivé cytokiny (např. IL-1 α , IL-6) nebo některé hormony, jako např. TSH, ACTH a gonadotropiny (Ferrara N, 2004).

Tento faktor hraje roli při neovaskularizaci za fyziologických i patologických (zánět, tumor) podmínek (Brown LF et al., 1992, Clauss M et al., 1990). Jak bylo uvedeno dříve, exprese VEGF je indukována tkáňovou hypoxií a právě tento děj může být velmi důležitý v časných stádiích vzniku nosních polypů (Jiang S et al., 2003). Některé studie ukazují, že VEGF je produkován nádorovými buňkami a hromadí se v krevních cévách. Velmi důležitým místem jeho účinku jsou krevní cévy (Dvorak HF et al., 1991, Kondo S et al., 1993). Kromě cév působí VEGF na mnoho dalších buněčných typů (např. stimulace migrace makrofágů, nádorové buňky, epitelové buňky). Imunohistochemicky byla prokázána jeho masivní přítomnost v endoteliích krevních cév, ve fibroblastech a buňkách perivaskulárního infiltrátu ve tkáni nosních polypů, na rozdíl od zdravé sliznice dolní skořepy nosní, kde byl VEGF prokázán pouze sporadicky ve endoteliálních buňkách malých arterií a vén (Wittekindt C et al., 2002). Bylo zjištěno, že mnoho nádorových buněk produkuje VEGF a z toho vyplývá, že takový faktor může být mediátorem nádorové angiogenese. V tumorech s výraznými nekrotickými oblastmi byla zjištěna nejvyšší exprese VEGF právě v nekrotických oblastech (Shweiki D et al., 1992, Ferrara N, 2004). Přestože nádorové buňky většinou představují hlavní zdroj VEGF, stroma nádoru je také důležitým producentem tohoto cytokinu. Tyto stromální buňky jsou k produkci VEGF stimulovány buňkami nádorovými (Gerber HP et al., 2000, Ferrara N, 2004).

2. MATERIÁL A METODY

Pro tuto práci byly pro možnost porovnání různých částí horních cest dýchacích použity vzorky nosní sliznice a patrových tonsil. Materiál byl získáván jen od předem kontaktovaných pacientů, kteří podepsali informovaný souhlas. Vzorky nosní sliznice byly odebírány ze zadní části dolní skořepy nosní během endoskopického výkonu v celkové anestezii u pacientů s diagnosou deviace nosní přepážky. Tyto vzorky sloužily jako kontrolní skupina – pacienti s deviací nosní přepážky bez klinických příznaků patologie nosní sliznice (chronické rhinitidy). Bylo tak získáno 15 vzorků zdravé nosní sliznice. Vzorky patologické (zánětlivé) nosní sliznice byly odebírány v průběhu endonasálních operací od pacientů s diagnosou polyposis nasi. Před operací byla pacientům s nosní polyposou provedena mikrobiální kultivace. Podle výsledků kultivace byli pacienti rozděleni na dvě podskupiny – první s pozitivním nálezem *Staphylococcus aureus* na nosní sliznici (n=10) a druhá s negativní kultivací (n=20). Celkem takto bylo získáno 30 vzorků. Vzorky tonsil byly odebírány v průběhu operací v celkové anestezii u pacientů s diagnosou sleep apnoe syndrom (SAS) – kontrolní skupina zdravých tonsil (n=7). Vzorky zánětlivých tonsil pocházely z tonsilektomií z důvodu chronické tonsilitidy (n=10) a vzorky nádorového postižení se podařilo zajistit během výkonů pro karcinom tonsil (n=8). Uvedené soubory byly vybrány jako reprezentativní z celkového souboru materiálu pro histologické vyšetření.

Část získaných vzorků tkání byla ihned na operačním sále upravena na velikost přibližně 1 cm³ a fixována ve 4 % depolymerovaném paraformaldehydu (PFA) ve fosfátovém pufru (phosphate buffer base-saline – PBS, pH 7,4), další část byla po úpravě velikosti vzorku rychle zmrazena ponořením do tekutého dusíku a v termosce s tekutým dusíkem transportována do laboratoře.

Zmražené vzorky byly uchovávány zabalené v alobalu ve značených odběrových nádobkách při teplotě – 80 °C až do definitivního zpracování – krájení na kryostatu na řezy o tloušťce 7 μm. Nakrájené zmražené řezy byly před použitím pro imunohistochemickou detekci fixovány 5 min použitím lázně v kyvetě se 4 % PFA v PBS.

Vzorky byly fixovány „in toto“ ve 4 % PFA v PBS byly po 24 hod vyprány v pufru a zpracovány pro zalití do parafinu (odvodnění – projasnění – prosycení parafinem –

zalití do parafinu). Parafinové bloky byly uchovávány v chladničce. Před provedením příslušné metody byly na mikrotomu připraveny řezy o tloušťce 7 µm.

Imunohistochemické metody

Po deparafinaci (2 x xylén – 2 x 96 % etanol a převedení do vody) byly řezy použity k imunohistochemickému průkazu různých antigenních determinant.

Po deparafinaci řezů bylo provedeno cílené odhalení antigenních struktur v TRIS pufru (Tris-hydroxymethylaminomethan), pH 9.5 použitím mikrovlnné trouby (1 min 560W a 5 min 240W). Tento postup byl vynechán při použití zmrazených řezů. Endogenní peroxidasová aktivita byla v deparafinovaných i zmrazených řezech blokována 70 % metanolem s 1 % H₂O₂ po dobu 10 min. Po oplachu řezů v PBS byla po dobu 30 min blokována nespecifická vazebná místa pro imunoglobulin překápáním 2 % roztokem telecího séra (Biosera, UK) v PBS. Po oplachu řezů ve 3 lázních PBS byla aplikována primární protilátka proti specifickým antigenním determinantám [Anti-Human-HBD-1 Rabbit Polyclonal Antibody v PBS (Alpha-Diagnostic, Inc., USA) 1:400, Anti-Human-HBD-2 Rabbit Antiserum v PBS (Peptide Institute, Inc., Japan) 1:200, Anti-Human-HBD-3 Rabbit Polyclonal Antibody v PBS (Orbigen, USA) 1:100, Anti-Human-VEGF Mouse Monoclonal antibody v PBS (Biotechnology, Santa Cruz, USA) 1:100, Anti-Human-TGF-β Mouse Monoclonal Antibody v PBS (Quantikine, USA) 1:100, Anti-Human-NOS-3 Rabbit Polyclonal Antibody (eNOS) v PBS (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:100, Anti-Human-Cleaved Caspase-3 Rabbit Monoclonal Antibody v PBS (Cell Signaling Technology, USA) 1:200, Anti-Human-Ki-67 Mouse Monoclonal Antibody v PBS (Immunotech, France) 1:100]. Inkubace řezů s primární protilátkou probíhala po dobu 60 min ve vlhké komoře při pokojové teplotě. Po důkladném opláchnutí ve 3 lázních PBS byly řezy inkubovány při pokojové teplotě po dobu 30 min s biotinizovanou sekundární protilátkou Goat-Anti-Rabbit IgG v PBS (Sigma-Aldrich, USA) 1:200 nebo Goat-Anti-Mouse IgG v PBS (Sigma-Aldrich, USA) 1:400. Opět následovalo důkladné vyprání ve 3 lázních PBS (v každé po dobu 5 minut) a poté byly řezy inkubovány s Vectastain ABC Elite kit peroxidase (VECTOR lab., USA) ředěném v PBS pro ABC (1:50) po dobu 30 min v humifikované atmosféře při pokojové teplotě. Po oplachu řezů v lázni PBS byly řezy vystaveny působení substrátu peroxidasové detekce – Diaminobenzidine (DAB) peroxidase substrate solution (DAKO Cytomation, Denmark) až do objevení hnědé sraženiny (kontrola pod mikroskopem) v místě detekované specifické antigení struktury. Jádra

některých řezů byla dobarvena hematoxylinem (5 sekund) pro lepší orientaci na cytologické úrovni.

Po zamontování řezů do Permafloru byly výsledky odečítány v mikroskopu Leica LM a digitálně snímány s použitím kamery Leica DC 300 s využitím možností kalibrace a archivace v programu IM 500.

Průkaz retikulárních vláken (Gömöriho impregnace)

Deparafinované řezy po vyprání se oxidují 0,5 % roztokem manganistanu draselného (3–5 min), poté se bělí 2 % pyrosiřičitanem draselným po dobu 1–2 min. Po oplachu se moří cca 1 min 2 % kamencem železitoamonným. Ve vodě opláchnuté řezy se impregnují čerstvě připraveným roztokem amoniakálního stříbra. Po oplachu ve vodě jsou řezy redukovány 10 % neutrálním formolem. Dalším krokem je zlacení řezů – provádí se 10 – 15 min v 0,1 % roztoku chloridu zlatitého (změna hnědého tónu v černý). Poté je nutno řezy znovu opláchnout ve vodě a pak 1 min fixovat v 1 % roztoku sirnatanu sodného.

Průkaz elastických vláken (orcein)

Deparafinované řezy se důkladně vyperou ve vodě a poté se barví cca 30 min roztokem orceinu při teplotě 38 – 40° C. Poté se řezy opláchnou v destilované vodě a diferencují se v 70 % alkoholu až červenohnědě zbarvená elastická vlákna ostře vyniknou. Po oplachu v destilované vodě jsou jádra dobarvena hematoxylinem (asi 1 min).

PAS reakce

Deparafinované řezy se oxidují v 1 % kyselině jodisté po dobu asi 10 - 60 min. Po oplachu ve vodě na ně necháme ve tmě působit Schiffovo reagens po dobu 20 min. Po 10 minutovém prání řezů v tekoucí vodě se objeví červenofialové zbarvení v místě přítomných polysacharidů. Jádra se dobarví Harrisovým hematoxylinem.

Barvení alcianovou modří

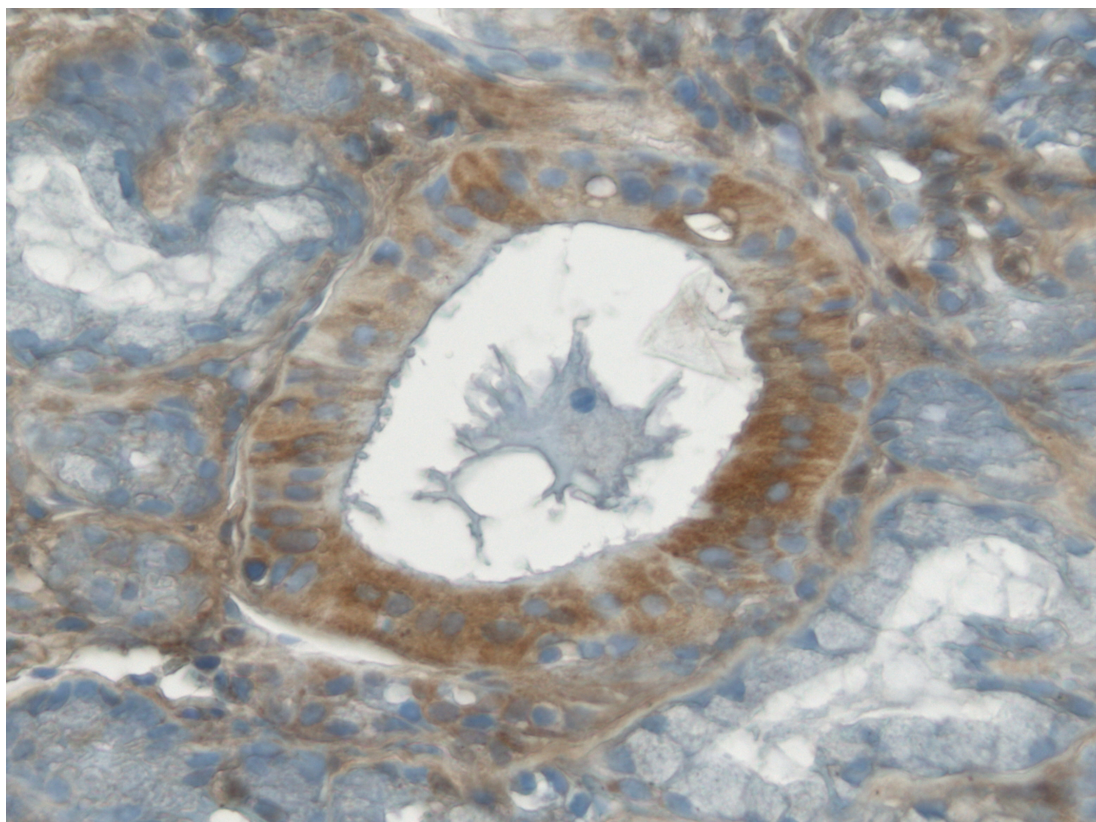
Deparafinované a ve vodě vyprané řezy jsou barveny 1 – 2 hod 1 % roztokem alcianové modří v 3 % kyselině octové. Po důkladném oplachu ve vodě dobarvíme roztokem jádrové červeně (kolem 10 min). Slouží k elektivnímu průkazu kyselých mukopolysacharidů. (Vacek Z, 1972)

3. VÝSLEDKY

3.1 Lidský beta defensin 1 (HBD – 1)

3.1.1 Zdravá nosní sliznice

HBD-1 byl ve zdravé nosní sliznici nalezen ve větším množství. Jeho přítomnost

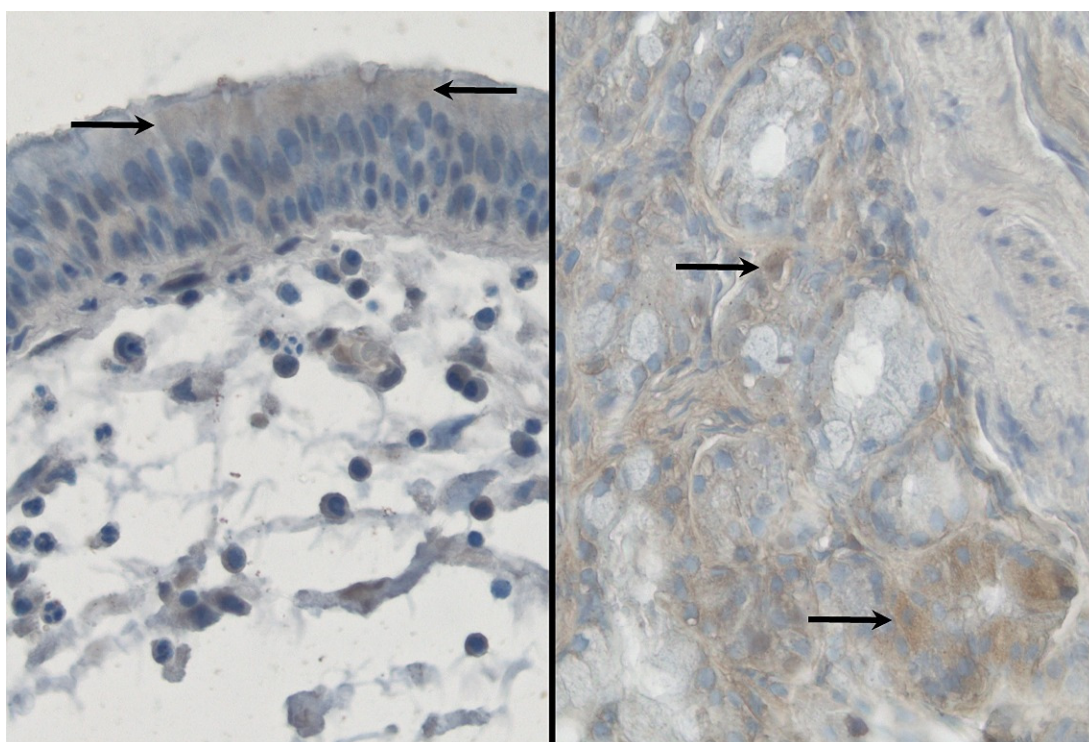


Obr. 15: Zdravá nosní sliznice – průkaz přítomnosti HBD-1 v serosních lunulách sekrečních oddílů žláz. Ve vývodech je patrna disociovaná distribuce. Reakční produkt vyplňuje některé buňky od bazálního oddílu až po apikální povrch, v jiných prakticky chybí, a to zvláště při přechodu vývodu do povrchového řasinkového typu výstelky (vlevo). Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

byla potvrzena v buňkách výstelky žlázových vývodů i v serosních elementech sekrečních oddílů žláz (tj. především v serosních lunulách terminálních partií mucinosních tubulů). Naproti tomu však nebyl ve sledované zdravé sliznici HBD-1 zachycen v povrchovém epitelu.

3.1.2 Nosní polypy bez *Staphylococcus aureus*

V tomto materiálu nebyla přítomnost HBD-1 zachycována pravidelně. Mírná pozitivita byla pozorována pouze v apikální oblasti cytoplasmy některých buněk povrchového víceřadého cylindrického epitelu. V některých vzorcích byl tento defensin prokazován také v cytoplasmě serosních buněk sekrečních oddílů žláz.



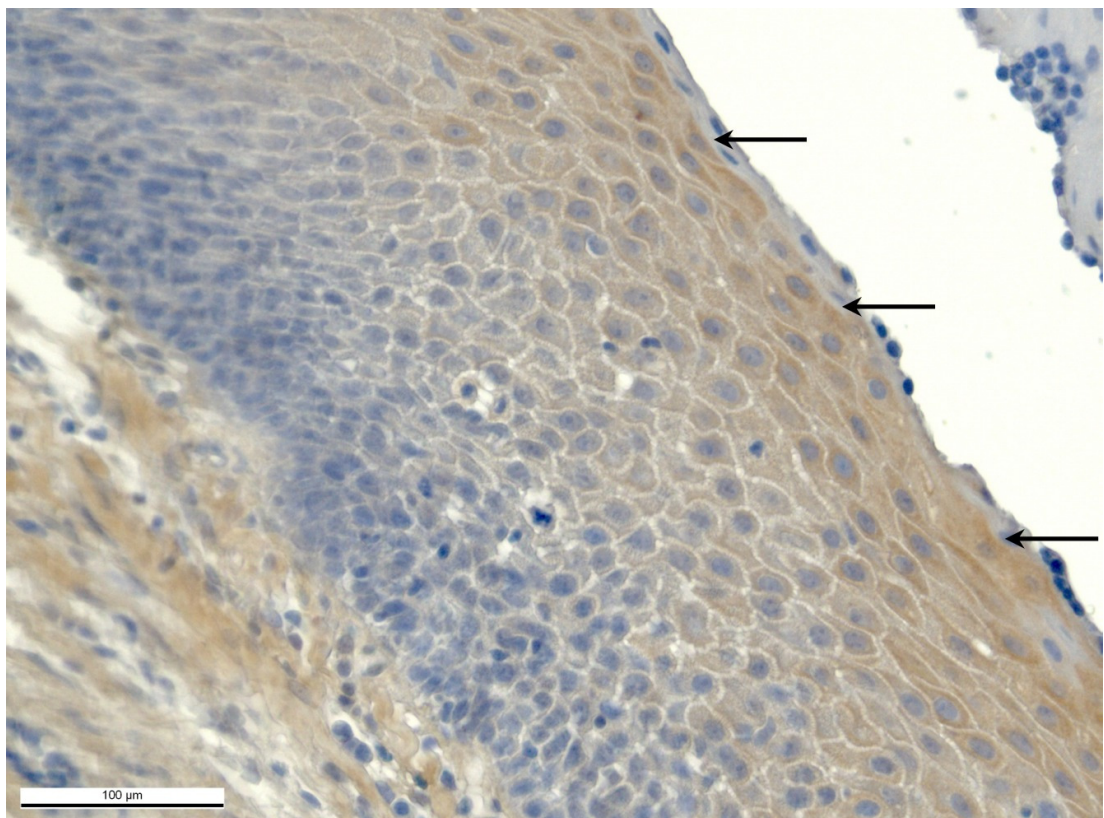
Obr. 16: Nosní polyp – průkaz HBD-1 v apikálních částech buněk povrchového víceřadého cylindrického epitelu a v serosních buňkách seromucinosních žláz. Také cytoplasmu řady plasmatických buněk i některých makrofágů vykazuje přítomnost reakčního produktu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.1.3 Nosní polypy s přítomným *Staphylococcus aureus*

Prokazovaná produkce HBD-1 ve tkáni nosních polypů s prokázanou infekcí *S. aureus* byla velmi sporadická, pozitivita byla nalézána pouze ojediněle v povrchovém víceřadém cylindrickém epitelu a spíše v jednotlivých buňkách vývodů žláz. Precipitát v cytoplasmě buněk měl maximálně jemně granulární charakter.

3.1.4 Zdravá tonsila palatina

Pravidelně, ale v poměrně malém množství, byl HBD-1 zachycován zejména v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu.



Obr. 17: Zdravá tonsila palatina – přítomnost HBD-1 v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu nerohovějícím. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

Reakční produkt vyplňoval povrchnější vrstvy stratum spinosum v granulární podobě, nikoliv však v povrchnějších výrazněji oploštělých buňkách. Také nebyla

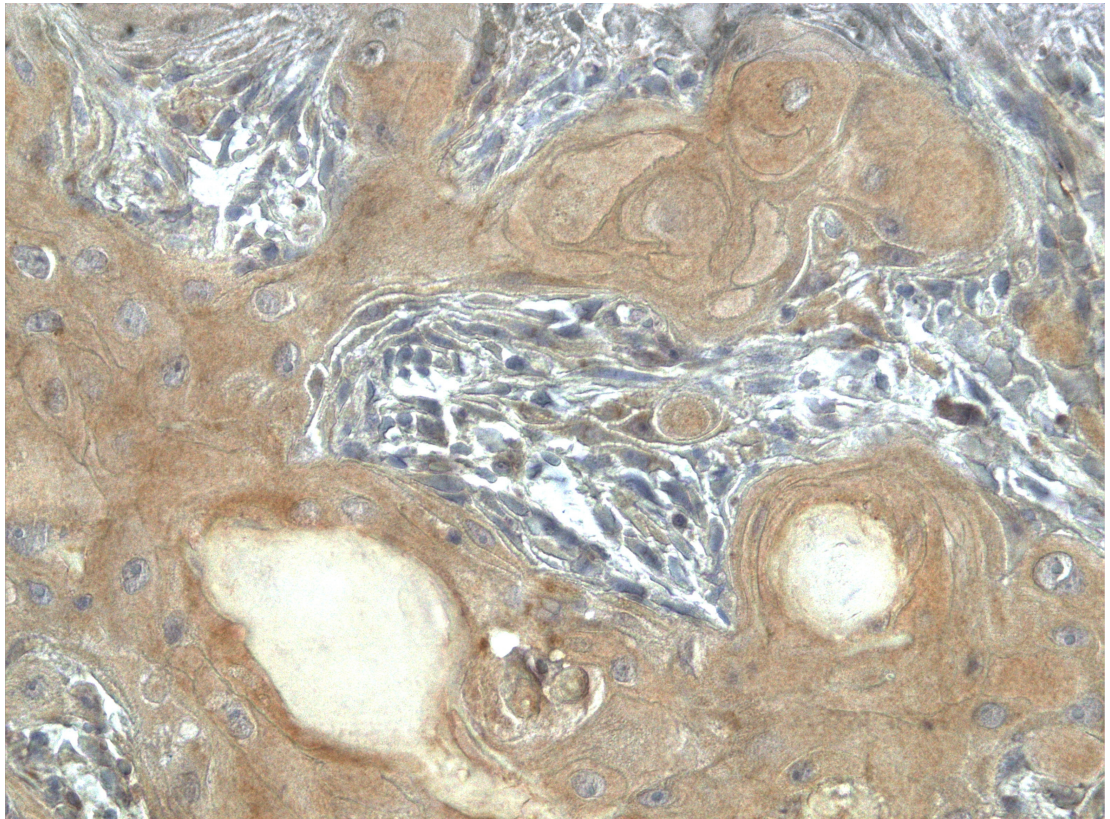
dokumentována exprese HBD-1 ve celém stratum germinativum, naproti tomu se sraženina pozitivního výsledku průkazu objevovala v subepitelové partii lamina propria mucosae. Na základě detailnějších pozorování lze soudit, že část popisované detekce tohoto defensinu může být lokalizována i extracelulárně.

3.1.5 Tonsila palatina s chronickým zánětem

V zánětlivě změněných tonsilách byl výskyt HBD-1 pozorován nepravidelně, a to zejména v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu prakticky ve vrstvách buněk dlaždicových od povrchu až po polyedrické elementy stratum spinosum.

3.1.6 Tonsila palatina s karcinomem

V karcinomové tkáni byl HBD-1 detekován v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu. Významné byly nálezy vysoké hustoty reakčního produktu v keratinových perlách, které představují prakticky konstantní morfologické figury terminálně diferencovaných buněk s masivními projevy keratinizace na straně jedné, kdežto jindy se jeví jako elementy s prakticky chromofobní cytoplasmou. Podle toho se také liší úroveň exprese sledovaného defensinu.

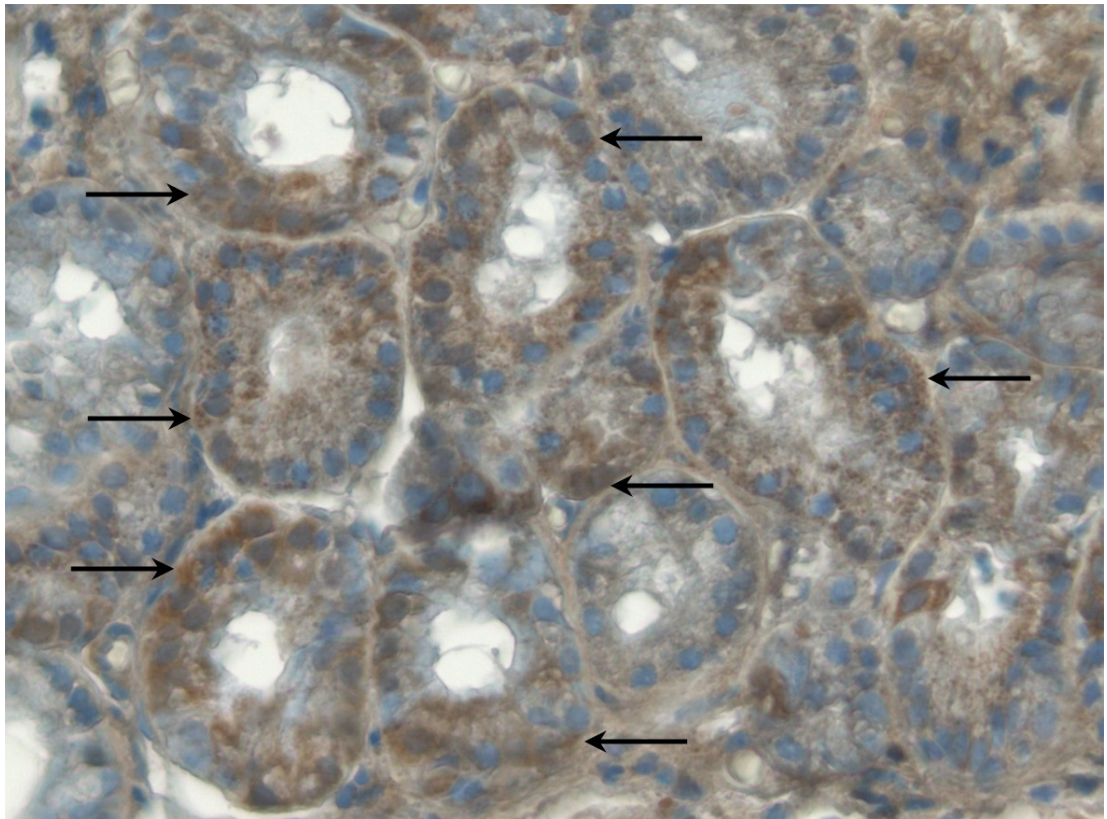


Obr. 18: Karcinom tonsila palatina – HBD-1 v rozdílných úrovních exprese v epitelových karcinomových perlách. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 40x.

3.2 Lidský beta defensin 2 (HBD – 2)

3.2.1 Zdravá nosní sliznice

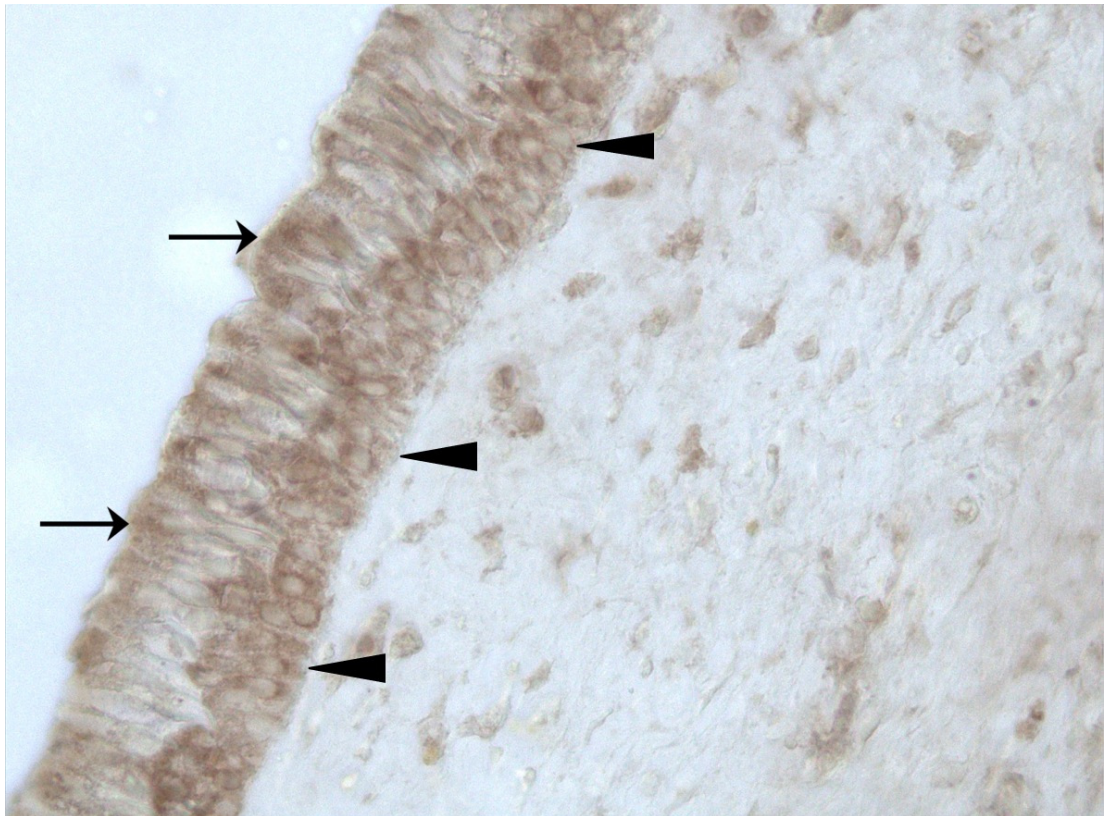
Defensin HBD-2 představuje v porovnání s HBD-1 podstatně rozšířenější expresi finálního antibiotického peptidu. Vyskytoval se ve vysoké densitě precipitátu zejména ve žláзовých formacích, a to jak v sekrečních oddílech (v basálních i supranukleárních oblastech cytoplasmy serosních buněk), tak i v cytoplasmě buněk výstelky vývodů žláz.



Obr. 19: Zdravá nosní sliznice – průkaz HBD-2 v serosních buňkách sekrečních oddílů žláz. Distribuce reakčního produktu zasahuje jak basální, tak i apikální zóny cytoplasmy. Některé nálezy naznačují i basoapikální gradient uspořádání. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.2.2 Nosní polypy bez *Staphylococcus aureus*

HBD-2 byl pravidelně nalézán v apikální cytoplasmě buněk povrchového víceřadého cylindrického epitelu. Reakční produkt měl víceméně granulární charakter. Difuzní uspořádání tohoto defensinu bylo zachyceno v bazálních partiích povrchového epitelu, tedy v buňkách basálních, případně elementech nedosahujících povrchu epitelu. V jejich sousedství jsou pak patrné i buňky, které jsou rozprostřeny od basální membrány, jejichž jádra konstituují nejhornější řady, po luminální povrch a v nich je pak granulární struktura precipitátu histochemické markerové reakce až v apikálním oddílu.



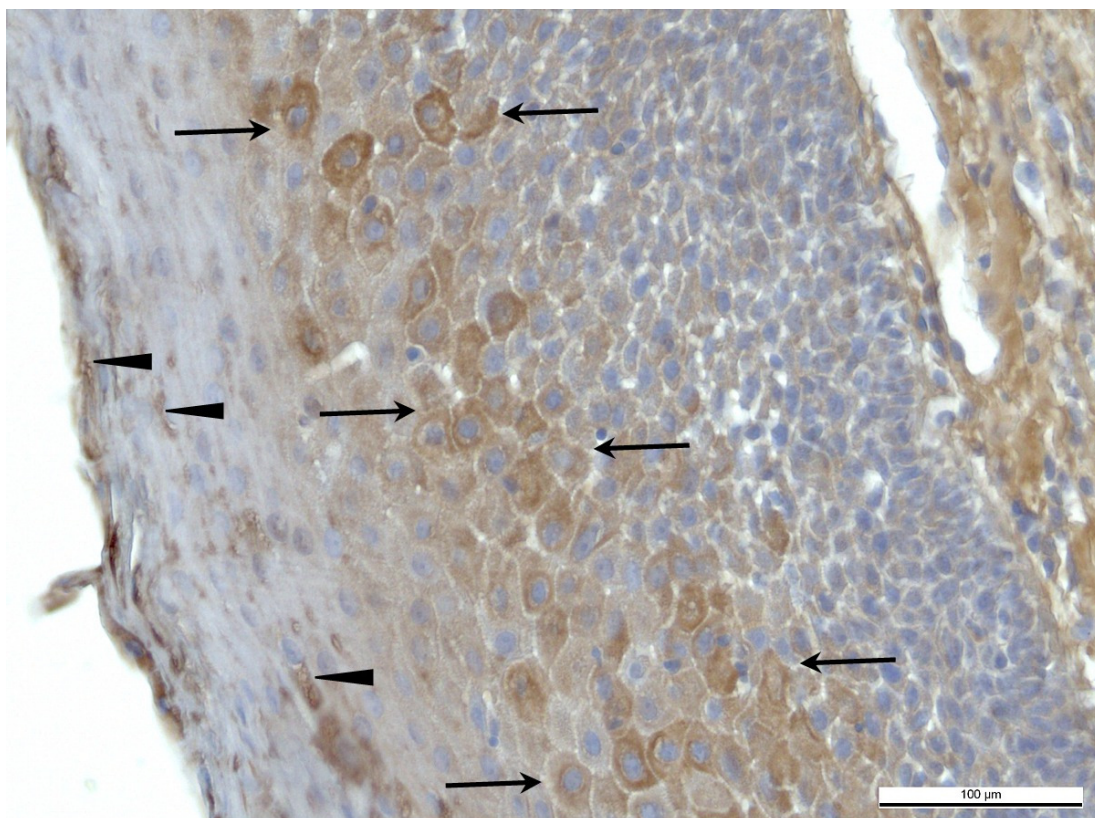
Obr. 20: Nosní polyp – HBD-2 v povrchovém víceřadém cylindrickém epitelu. Difuzní uspořádání defensinu v buňkách basálních a elementech nedosahujících povrchu epitelu (◄), Druhým predilekčním místem je lokalizace v apikálním oddílu lumina dosahujících buněk (→). Imunoperoxidasová reakce (DAB). Obj. 63x.

3.2.3 Nosní polypy s přítomným *Staphylococcus aureus*

V materiálu s prokázanou infekcí *S. aureus* byla obecně úroveň průkazu HBD-2 velmi nízká, pozitivita byla pozorována pouze ojediněle ve víceřadém cylindrickém epitelu pokrývajícím povrch polypu a v jednotlivých buňkách vývodů žláz. Precipitát v cytoplasmě buněk měl jen velmi difusně granulární charakter, jehož dokumentace byla vzhledem k jejich superposici prakticky nereálná.

3.2.4 Zdravá tonsila palatina

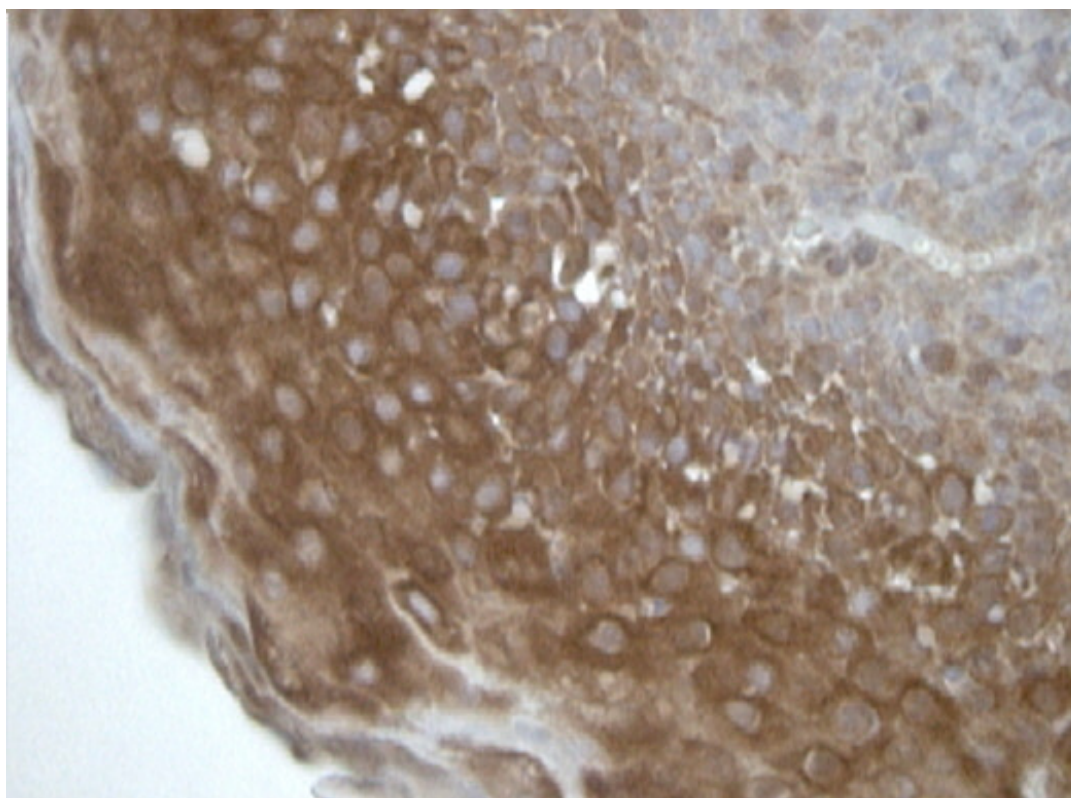
Nálezy HBD-2 ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu zdravé tonsily jsou poněkud nesourodé. Zatímco v některých tonsilách se precipitát pozitivního průkazu defensinu objevuje v jednotlivých polyedrických buňkách stratum spinosum v podobě relativně rovnoměrné distribuce v cytoplasmě s vynecháním oblastí Golgiho komplexu v paranukleární pozici, jiné vzorky zdravých tonsil jsou pak zcela bez značky průkazu křenové peroxidasy. Bezesporně zajímavým pozorováním jsou nálezy hutných agregací reakčního precipitátu ve značně oploštělých buňkách povrchních vrstev, které naznačují, že v souvislosti s terminální diferenciací nedošlo k exocytose syntetizovaného defensinu. Zda je to proces universální nebo vázaný jen na ojedinělé buňky, nemohlo být dosud spolehlivě prokázáno. Naproti tomu extracelulární výskyt reakčního produktu v subepitelové lokalizaci, jakož i v cytoplasmě mononukleárních elementů počínaje plasmatickými buňkami a konče makrofágy, dokresluje situaci zdravé tonsily.



Obr. 21: Zdravá tonsila palatina – výskyt HBD-2 v podobě relativně rovnoměrné distribuce v cytoplasmě jednotlivých polyedrických buněk ve stratum spinosum vrstevnatého dlaždicového epitelu (→). Zajímavé jsou nálezy hutných agregací reakčního precipitátu ve značně oploštělých buňkách povrchných vrstev epitelu (◄). Subepitelově je reakční produkt uložen extra- i intracelulárně. Immunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.2.5 Tonsila palatina s chronickým zánětem

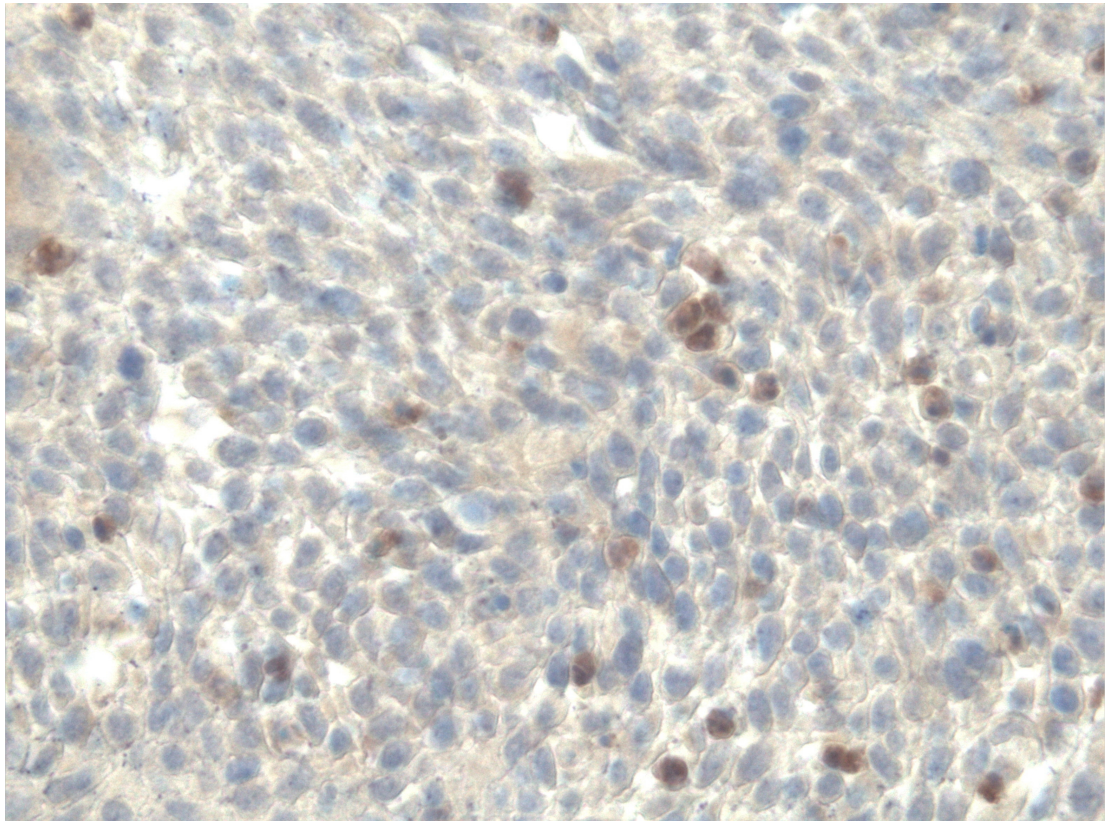
Vliv chronického zánětu na morfologický obraz produkce HBD-2 byl vyjádřen zejména v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu, a to od povrchu, přes stratum spinosum až po suprabasální buňky, ale také kromě již popsaného intra- i extracelulárního výskytu v lamina propria mucosae rovněž v marginálních zónách lymfatických folikulů.



Obr. 22: Tonsila palatina s chronickým zánětem – HBD-2 je přítomen v masivním množství v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu od suprabasálních buněk až po apikální vrstvy. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.2.6 Tonsila palatina s karcinomem

Karcinomatózní zvrát tonsila palatina se odráží ve značně markantní podobě inhibované produkce HBD-2. Reakční produkt byl rozprostřen zcela nepravidelně v cytoplasmě jen ojedinělých buněk stratum spinosum dlaždicového epitelu, dále byl zachycen v jednotlivých makrofázích v intraepitelové lokalizaci, ale pouze ve stopových množstvích. HBD-2 byl naproti tomu dobře registrován v některých buňkách tonsilárního stromatu, kde jej pravděpodobně exprimují makrofágy i mikrofágy.

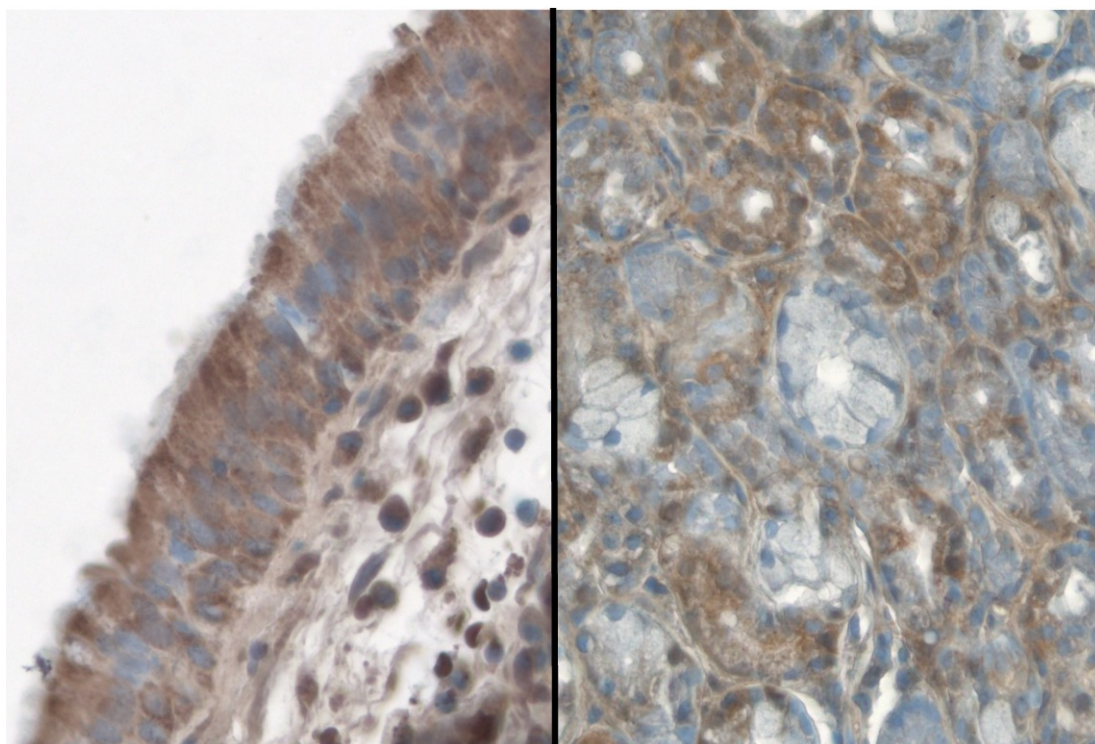


Obr. 23: *Karcinom tonsila palatina – HBD-2 v některých buňkách stromatu, pravděpodobně v makrofázích i mikrofázích. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.*

3.3 Lidský beta defensin 3 (HBD – 3)

3.3.1 Zdravá nosní sliznice

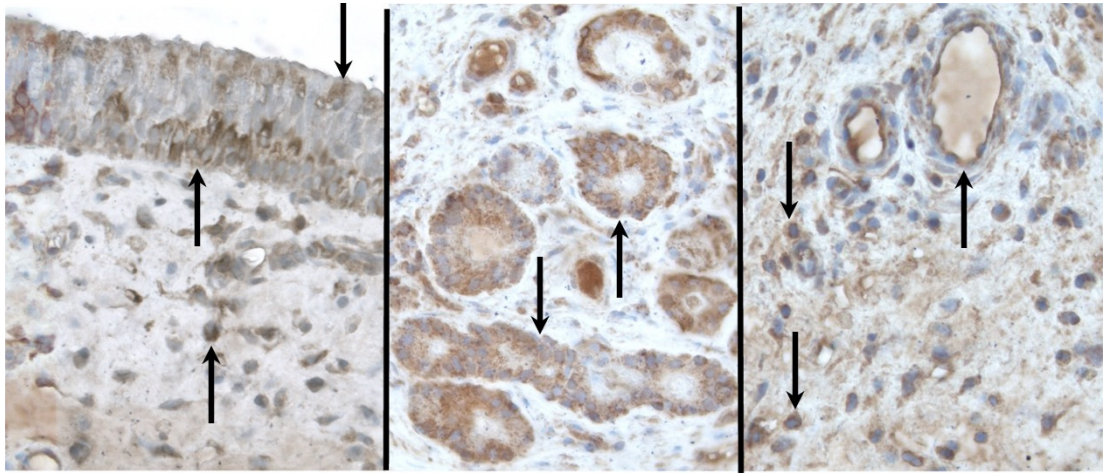
HBD-3 byl nalézán ve velmi vysokých hladinách zejména v oblastech žláz a to jak v sekrečních částech (v cytoplasmě serosních buněk), tak i v cytoplasmě buněk žlázových vývodů. Tento defensin byl nalezen ve vysokých hladinách také difusně v cytoplasmě buněk povrchového víceřadého cylindrického epitelu.



Obr. 24: Zdravá nosní sliznice – přítomnost HBD-3 v povrchovém víceřadém cylindrickém epitelu a v serosních buňkách žlázových oddílů. Také mononukleáry v lamina propria vykazují expresi vyšetřovaného defensinu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.3.2 Nosní polypy bez *Staphylococcus aureus*

HBD-3 byl v tomto materiálu detekován difusně v perinukleární oblasti cytoplasmy buněk povrchového víceřadého cylindrického epitelu, granulární charakter měl jeho výskyt v apikálních částech cytoplasmy těchto buněk stejně jako v buňkách sekrečních oddílů žláz. Positivita reakce byla zjištěna také v některých fibroblastech a makrofázích edematosního stromatu polypů. Zvláštní pozornost zasluhují nálezy reakčního produktu v cytoplasmě endotelových buněk malých cév.



Obr. 25: Nosní polyp – detekce HBD-3 v povrchovém víceřadém cylindrickém epitelu, serosních buňkách žláz, endotelových buňkách malých vén i v buňkách intersticia. Immunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

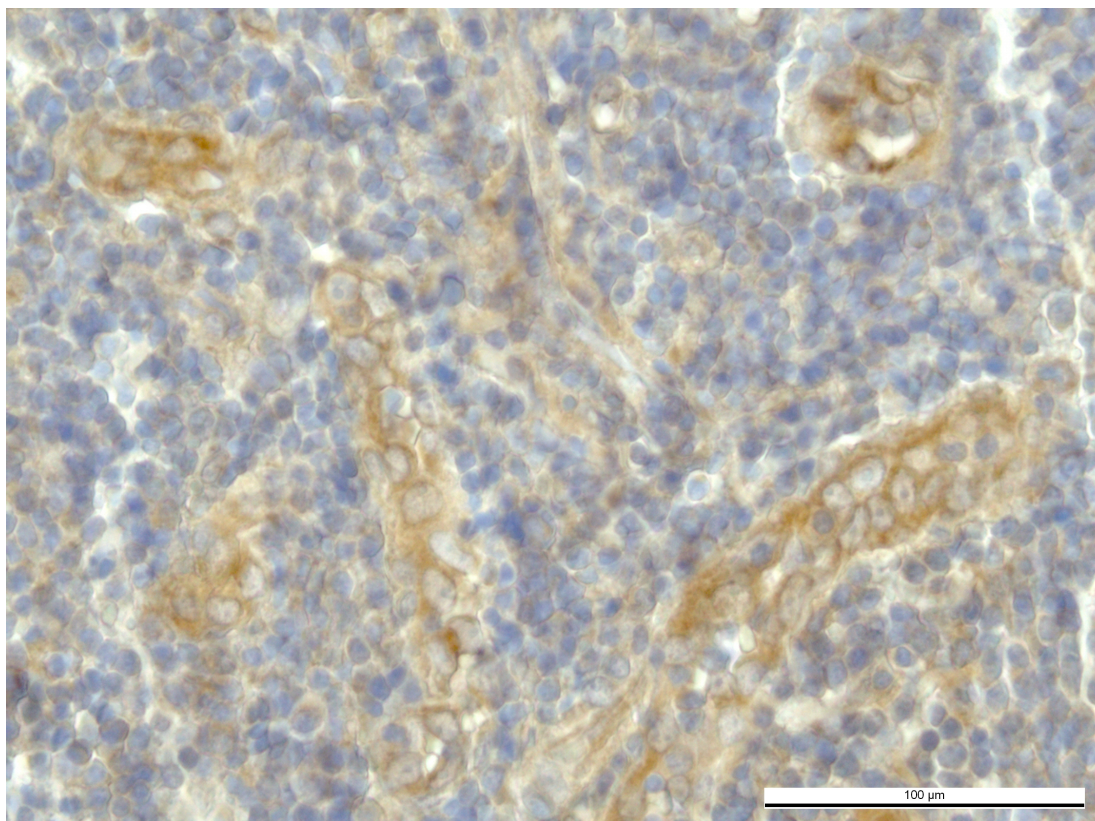
3.3.3 Nosní polypy s přítomným *Staphylococcus aureus*

Produkce HBD-3 ve tkáni nosních polypů s prokázanou infekcí *S. aureus* byla velmi nízká, pozitivita imunohistochemického průkazu byla nalézána pouze ojediněle v povrchovém víceřadém cylindrickém epitelu a v izolovaných buňkách vývodů žláz. Precipitát v cytoplasmě buněk měl jemně granulární charakter.

3.3.4 Zdravá tonsila palatina

HBD-3 byl zjištěn ve stejných lokalizacích jako HBD-2, tj. především ve stratum spinosum vrstevnatého dlaždicového epitelu zdravé tonsilární tkáně, ale ve větším

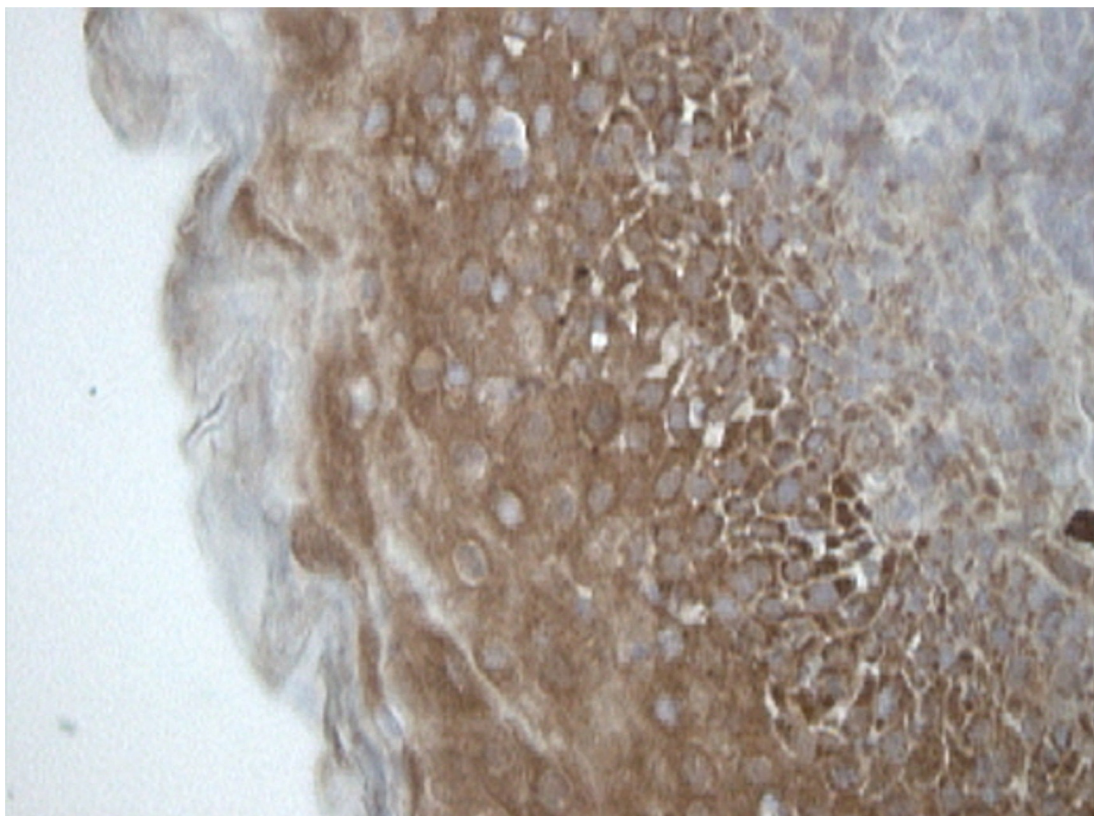
množství. Další lokalizací, ve které byl HBD-3 pravidelně nalézán ve vysoké densitě reakčního produktu, byla cytoplasma endotelových buněk malých vén, jakož i ve vénách s vysokým endotelem (HEV).



Obr. 26: Zdravá tonsila palatina – výskyt HBD-3 v endotelových buňkách malých vén ve stromatu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.3.5 Tonsila palatina s chronickým zánětem

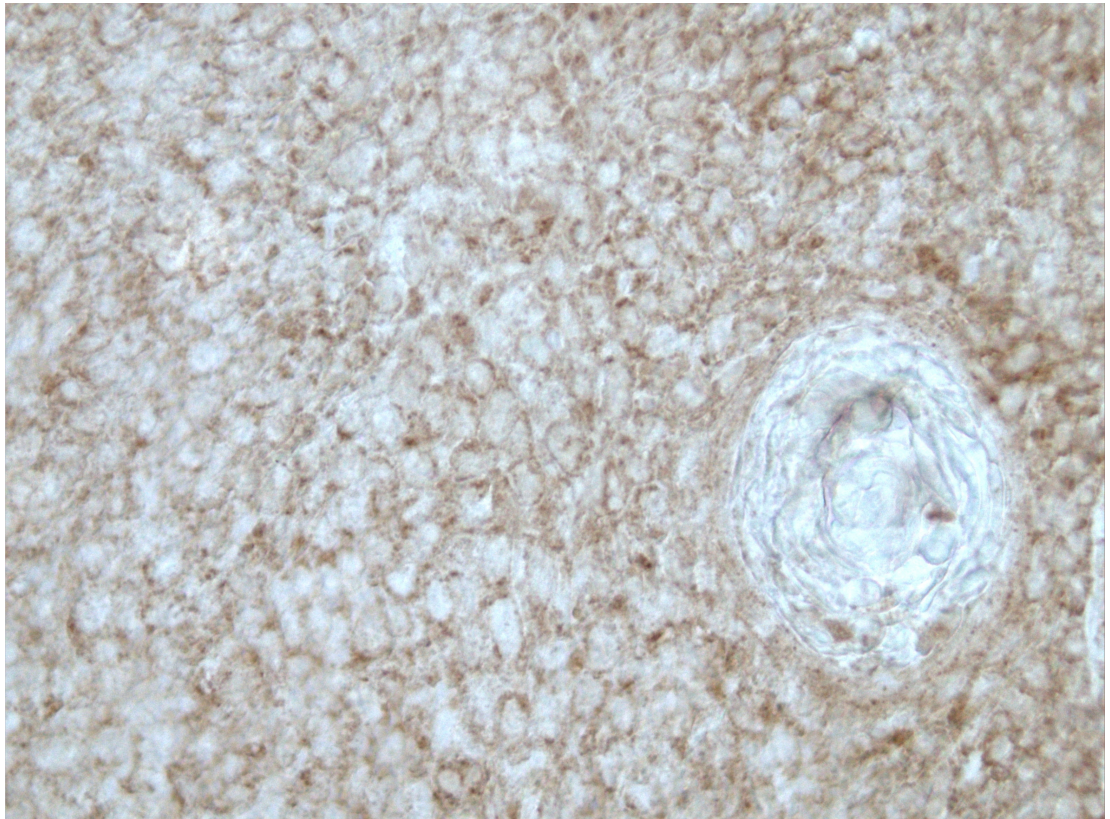
HBD-3 byl detekován ve vysokých hladinách v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu od povrchu až do stratum spinosum. Reakční produkt byl také nalézán v cytoplasmě buněk v marginálních oblastech lymfatických uzlíků stejně jako v buňkách endotelových.



***Obr. 27:** Tonsila palatina s chronickým zánětem – detekce HBD-3 ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.*

3.3.6 Tonsila palatina s karcinomem

HBD-3 byl zjištěn v cytoplasmě buněk stratum spinosum povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu, ale nebyl přítomen v keratinových perlách. Také zde byl reakční produkt zachycen opakovaně v cytoplasmě endotelových buněk.

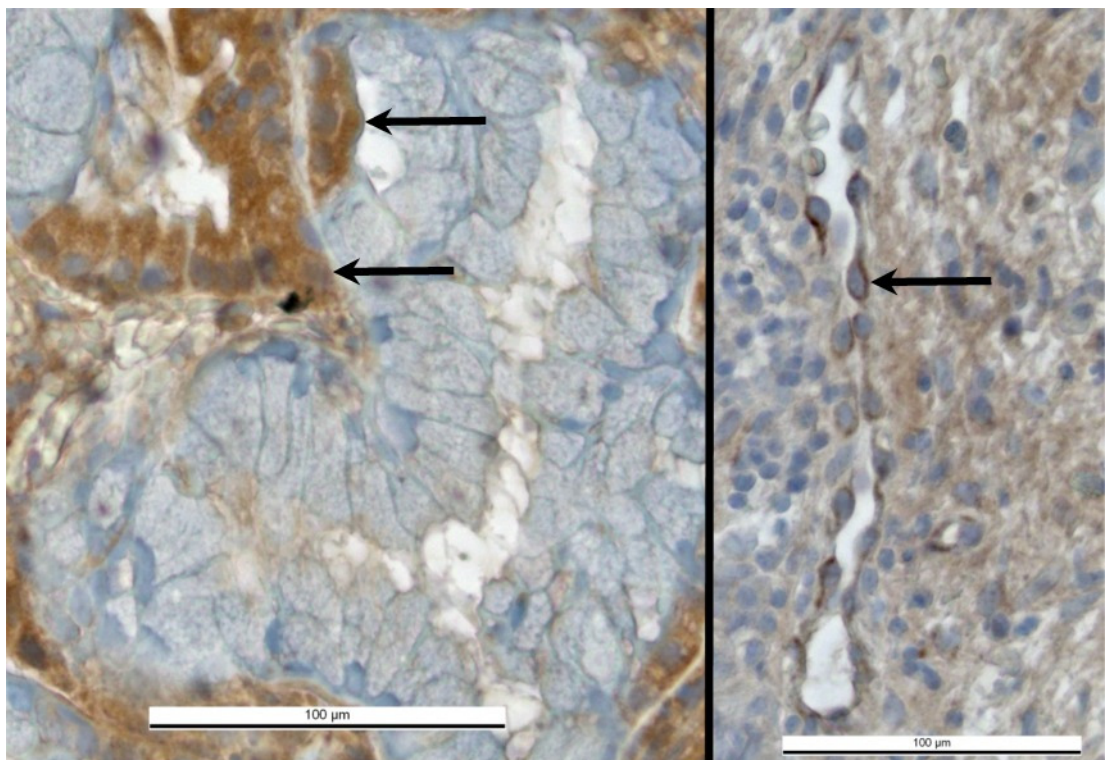


Obr. 28: *Tonsila palatina s karcinomem – přítomnost HBD-3 v cytoplasmě buněk stratum spinosum vrstevnatého dlaždicového epitelu. Keratinová perla bez přítomnosti HBD-3. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Obj. 63x.*

3.4 Endotelová syntasa oxidu dusnatého (eNOS)

3.4.1 Zdravá nosní sliznice

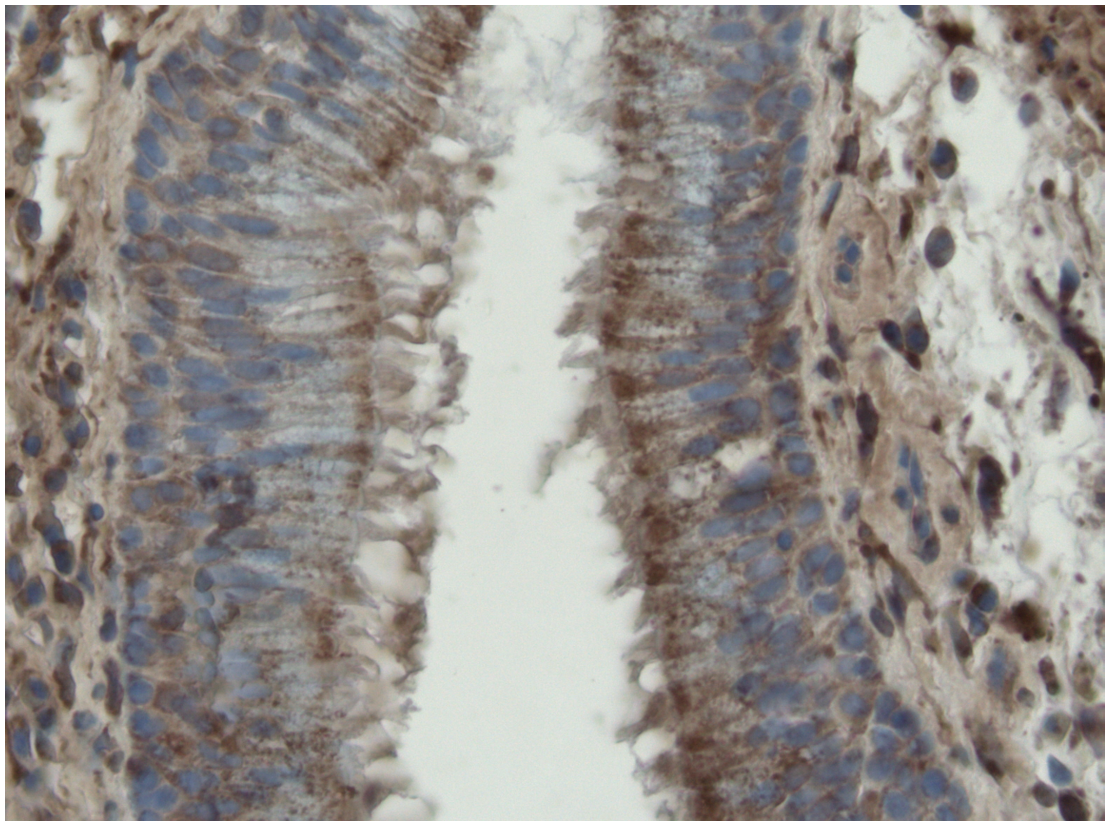
Endotelová syntasa oxidu dusnatého byla ve zdravé nosní sliznici prokazována zejména v cytoplasmě buněk v serosních lunulách žlázek a v pozoruhodně vysoké hustotě byl také reakční produkt zachycován v cytoplasmě endotelových buněk malých, tenkostěnných vén. Je zajímavé, že distribuce enzymu v serosních buňkách pokrývá prakticky většinu cytoplasmy a vynechává prakticky jen malou supranukleární lokalitu, která odpovídá umístění formací Golgiho komplexu (Obr. 29).



Obr. 29: Zdravá nosní sliznice – přítomnost reakčního produktu eNOS v serosních buňkách žláz a v cytoplasmě endotelových buněk malých vén. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.4.2 Nosní polypy

Přítomnost eNOS byla pravidelně potvrzována v apikální části cytoplasmy blízké basálním tělískům řasinek víceřadého cylindrického epitelu, na některých místech se dokonce jeví granulární precipitát diaminobenzidinu dokonce i v samotných řasinkách. Rovněž v perinukleární cytoplasmě basálních buněk byla zachycována distribuce reakčního produktu. Výrazná a prakticky konstantní byla přítomnost této syntasy v metaplasticky přeměněném povrchovém epitelu, ale také ve fibroblastech lamina propria mucosae. Zvláště vysoká úroveň exprese byla potvrzena především v cytoplasmě buněk výstelky vén s vysokým endotelem (HEV).

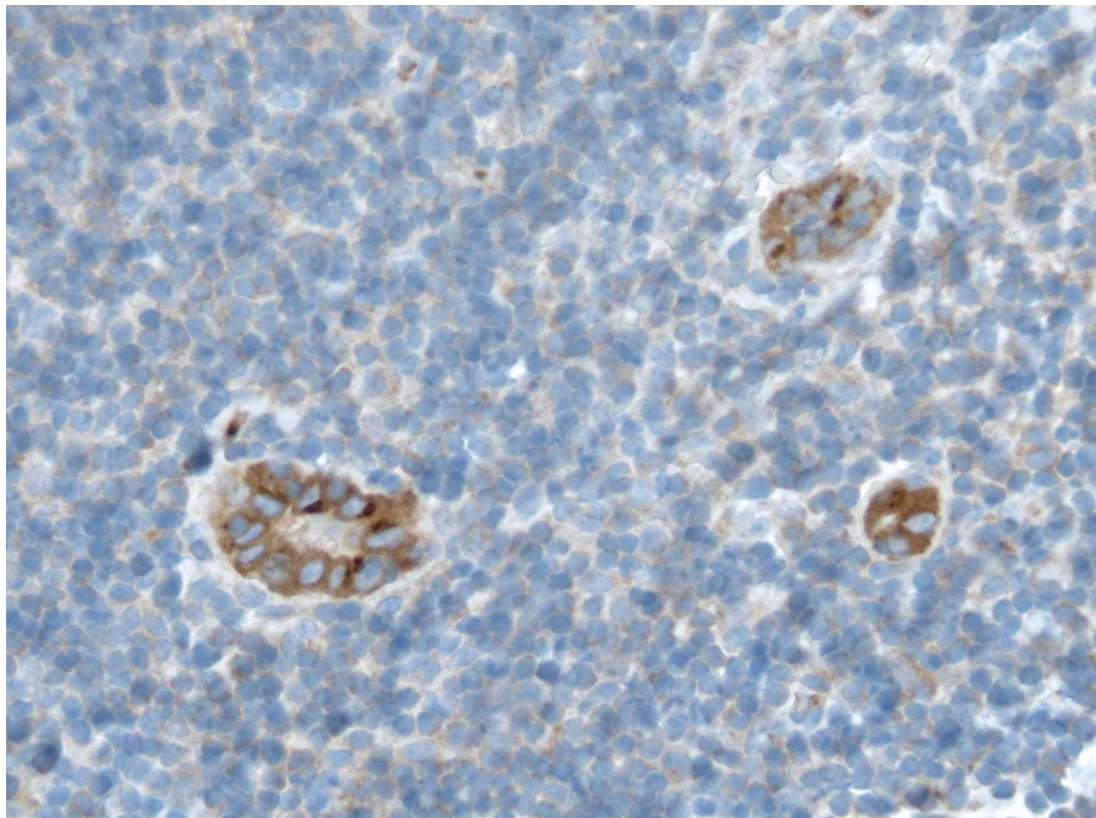


Obr. 30: Nosní polyp - eNOS v apikální části cytoplasmy buněk víceřadého cylindrického epitelu. Immunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.4.3 Zdravá tonsila palatina

Ve zdravé tonsile byla eNOS obvykle pozorována zejména v cytoplasmě endotelových buněk vén s vysokým endotelem. Další lokalizací eNOS byla

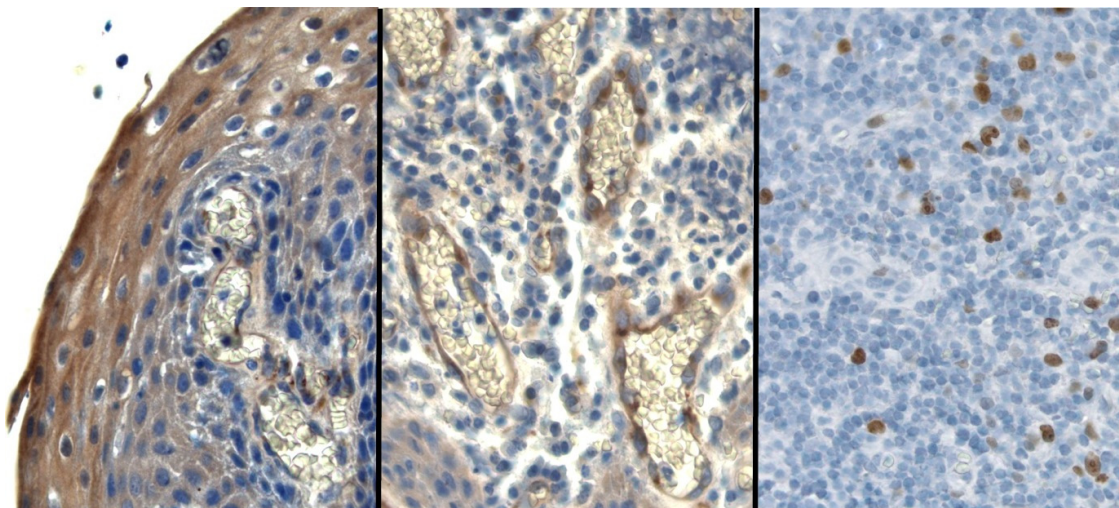
cytoplasma výběžků buněk v zárodečných centrech sekundárních lymfatických folikulů, kde se jako exprimující nabízejí jednak fibroblasty, jednak i dendritické buňky.



Obr. 31: Zdravá tonsila palatina – vysoká pozitivita průkazu eNOS v cytoplasmě endotelových buněk vén s vysokým endotelem. V lymfatické složce vykazují přítomnost reakčního produktu i výběžky jednotlivých buněk stromatu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.4.4 Tonsila palatina s chronickým zánětem

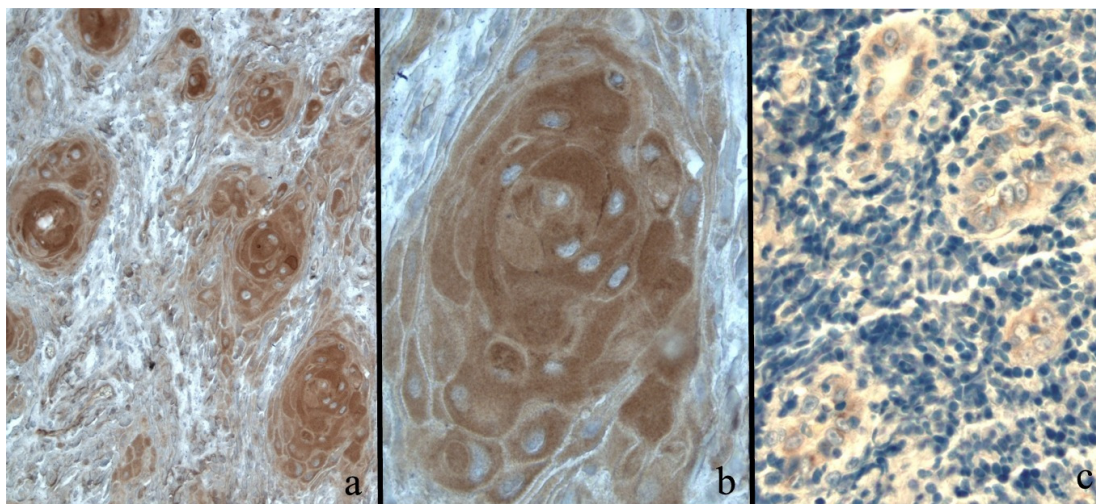
Vysokou pozitivitu průkazu eNOS bylo možno pozorovat v cytoplasmě buněk povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu, a to především v povrchnějších oblastech stratum spinosum. Dále pak byla zachycována přítomnost prokazovaného enzymu i v některých mononukleárech tonsilárního stromatu a opět v zárodečných centrech lymfatických folikulů. Konstantně byla eNOS prokazována v cytoplasmě endotelových buněk malých vén.



Obr. 32: Tonsila palatina s chronickým zánětem – přítomnost eNOS ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu, v cytoplasmě mononukleárů ve stromatu a v endotelových buňkách malých vén. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.4.5 Tonsila palatina s karcinomem

eNOS byla detekována zpravidla ve velkém množství zejména v keratinových perlách povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu.



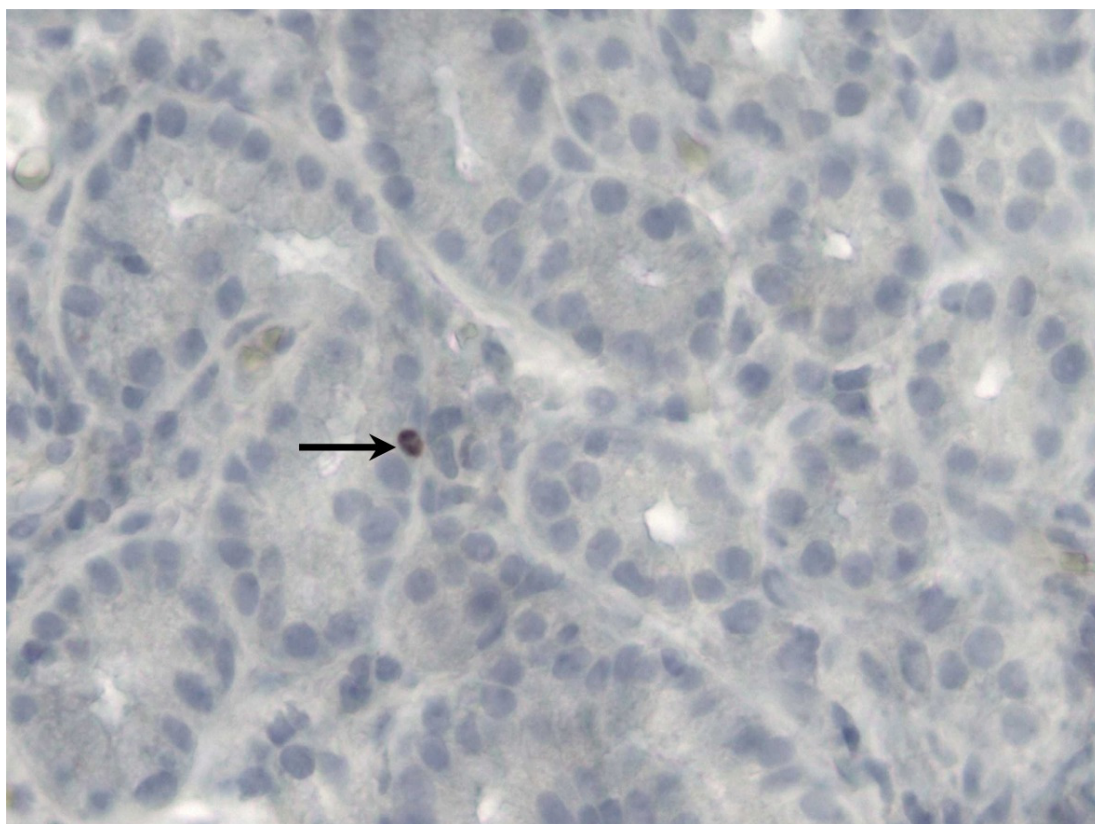
Obr. 33: Tonsila palatina s karcinomem. a) Výskyt eNOS v keratinových perlách karcinomem postižené tonsily. Obj. 20x, b) Pozitivita eNOS v elementech keratinové perly. Ve většině buněk jsou patrna zachovaná jádra. Obj. 63x, c) Výskyt eNOS v cytoplasmě endotelových buněk vén s vysokým endotelem. Obj. 63x. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem.

Naproti tomu v cytoplasmě endotelových buněk cév ve stromatu tonsily bylo množství reakčního produktu evidentně v nižší hustotě než v nepostižených orgánech (obr. 33c versus obr. 32).

3.5 Proliferační marker Ki-67

3.5.1 Zdravá nosní sliznice

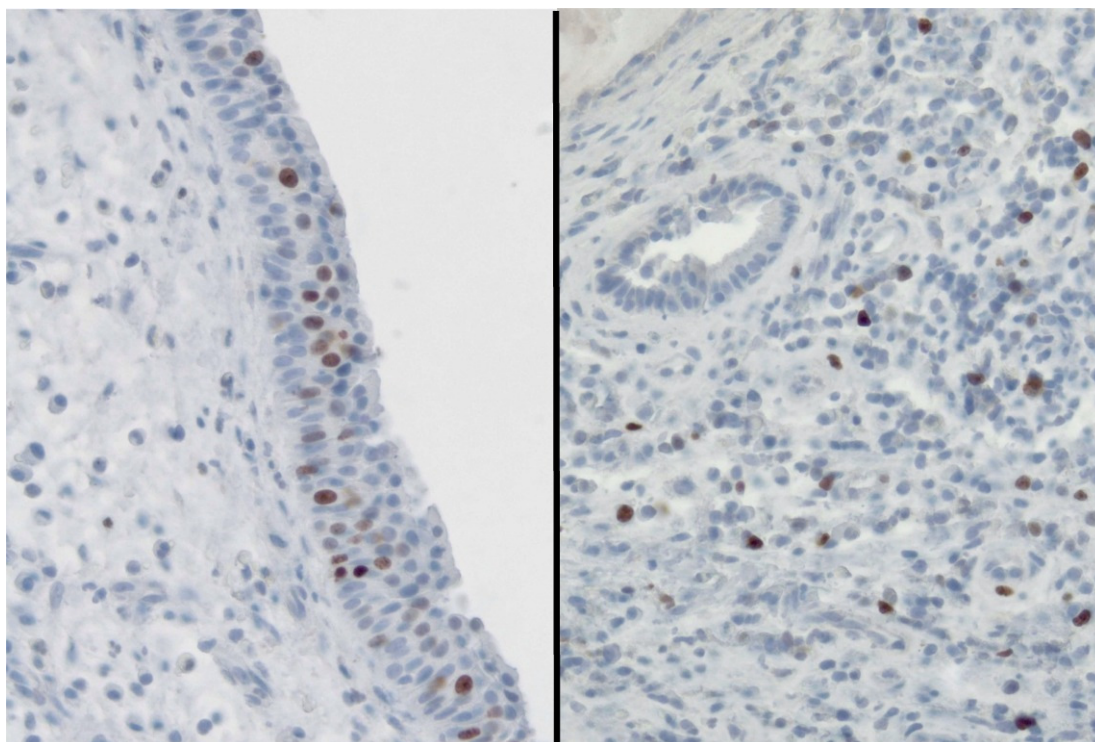
Ve zdravé nosní sliznici poskytuje použití proliferačního markeru Ki-67 překvapivě sporadické výsledky. Prakticky jen ojedinělé proliferující buňky byly pozorovány v sekrečních oddílech seromucinosních žláz.



Obr. 34: Zdravá nosní sliznice – průkaz proliferačního markeru v ojedinělé buňce sekrečního oddílu žlázy. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.5.2 Nosní polypy

Proliferační marker byl nalézán v basálních buňkách, ale především vyšších elementech povrchového víceřadého cylindrického epitelu. Ojedíněle byly pozorovány proliferující endotelové buňky ve stromálních cévách nosních polypů. Rovněž nepravidelně byla potvrzována proliferace buněk stromatu.



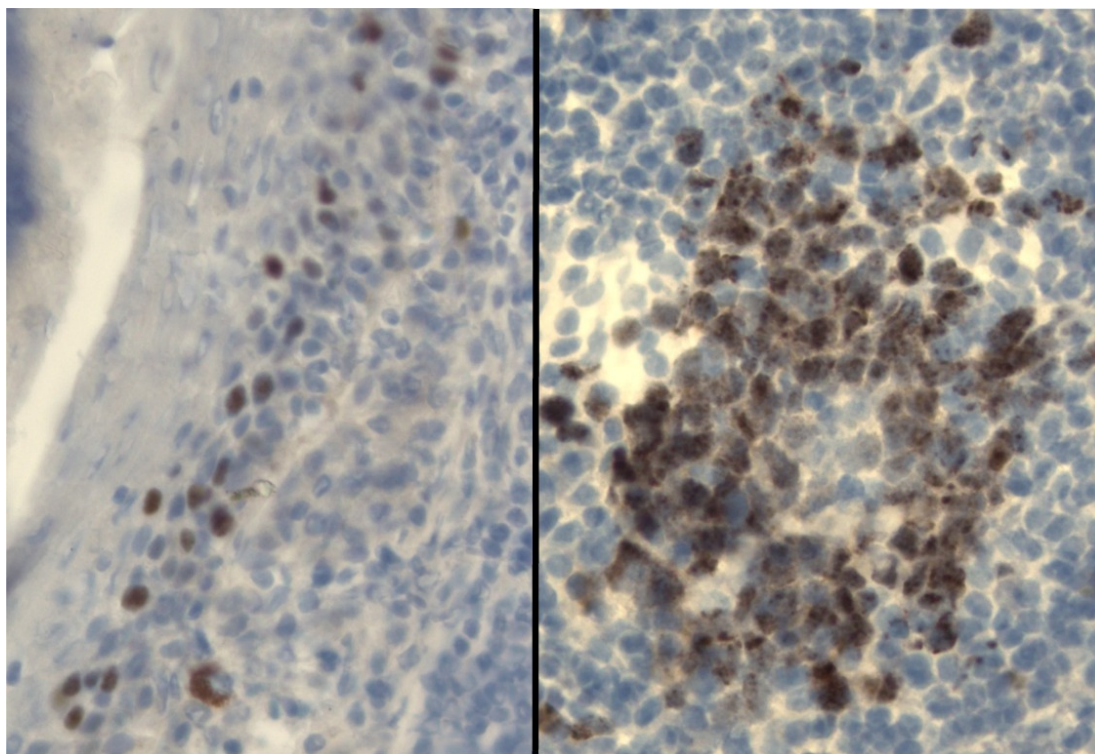
Obr. 35: Nosní polypy – nálezy proliferujících buněk (marker Ki-67) ve víceřadém cylindrickém epitelu a ve vazivovém stromatu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 40x.

3.5.3 Zdravá tonsila palatína

Zpravidla jen ojedinělé proliferující buňky byly nalézány v zárodečných centrech lymfatických folikulů, v některých vzorcích také v basálních buňkách vrstevnatého dlaždicového epitelu.

3.5.4 Tonsila palatina s chronickým zánětem

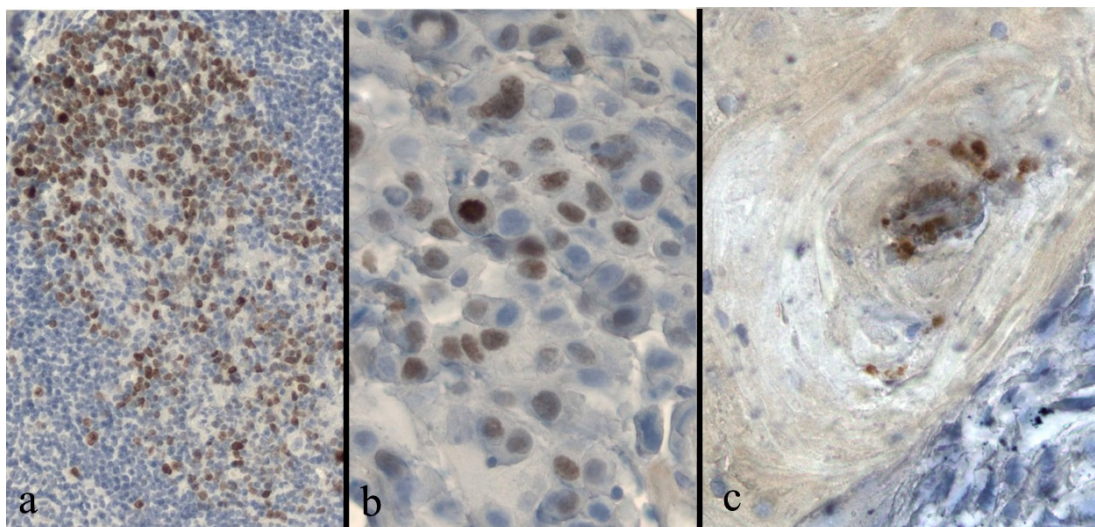
Početné proliferující buňky byly nalezeny v zárodečném centru lymfatických folikulů, stejně jako v basálních vrstvách povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu.



Obr. 36: Tonsila palatina s chronickým zánětem. Proliferační marker Ki-67. Výskyt proliferujících buněk v parabasální zóně vrstevnatého dlaždicového epitelu a v zárodečném centru lymfatického folikulu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.5.5 Tonsila palatina s karcinomem

Proliferující buňky byly lokalizovány zejména v zárodečných centrech lymfatických folikulů, ve stromálních buňkách a vzácněji také v centru keratinových perel epitelu.



Obr. 37: Tonsila palatina s karcinomem. a) Přítomnost proliferujících buněk v zárodečném centru lymfatického folikulu. Obj. 40x, b) Proliferující buňky ve stromatu. Obj. 63x, c) Pozitivita Ki-67 v centru keratinové perly. Obj. 63x. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem.

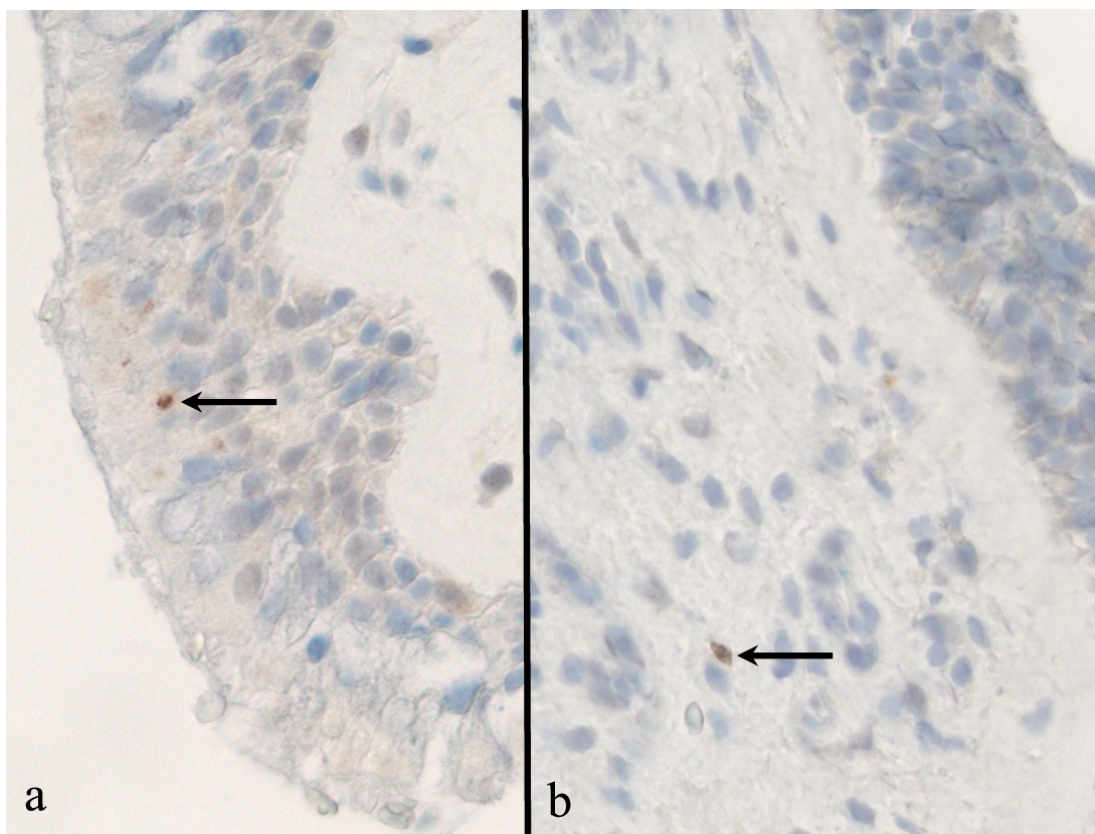
3.6 Apoptotický marker „cleaved caspase 3“

3.6.1 Zdravá nosní sliznice

Ve zdravé nosní sliznici nebyla nalezena pozitivita apoptotického markeru „cleaved caspase 3“, což dovoluje představu o velmi limitovaném výskytu apoptotických procesů, což lze zvláště dobře pochopit u výstelky. Zde totiž podobně jako v jiných dutých orgánech mohou buňky při vstupu do apoptosy tak rychle ztrácet integrinové vazby na sousední elementy, že překotně opouštějí epitel, což ovlivňuje i četnost záchytu.

3.6.2 Nosní polypy

V nosních polypech byla apoptotická tělíska ojediněle nalézána v povrchovém víceřadém cylindrickém epitelu. V několika vzorcích byla zjištěna v lamina propria mucosae nosních polypů.



Obr. 38: *Polyposis nasi – „cleaved caspase 3“.* a) *Apoptotické tělísko v povrchovém víceřadém cylindrickém epitelu,* b) *Apoptotické tělísko v edematosním stromatu.* *Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.*

3.6.3 Zdravá tonsila palatina

Ve zdravé tonsile nebyla doposud pozorována pozitivita průkazu aktivované kaspázy 3, což lze pochopit u buněk lymfatické řady s relativně dlouhým biologickým poločasem, ale překvapivá je tato skutečnost v oblasti tonsilárních krypt. V této lokalitě by se totiž u terminálně diferencovaných povrchových dlaždicových buněk dala bezesporu očekávat.

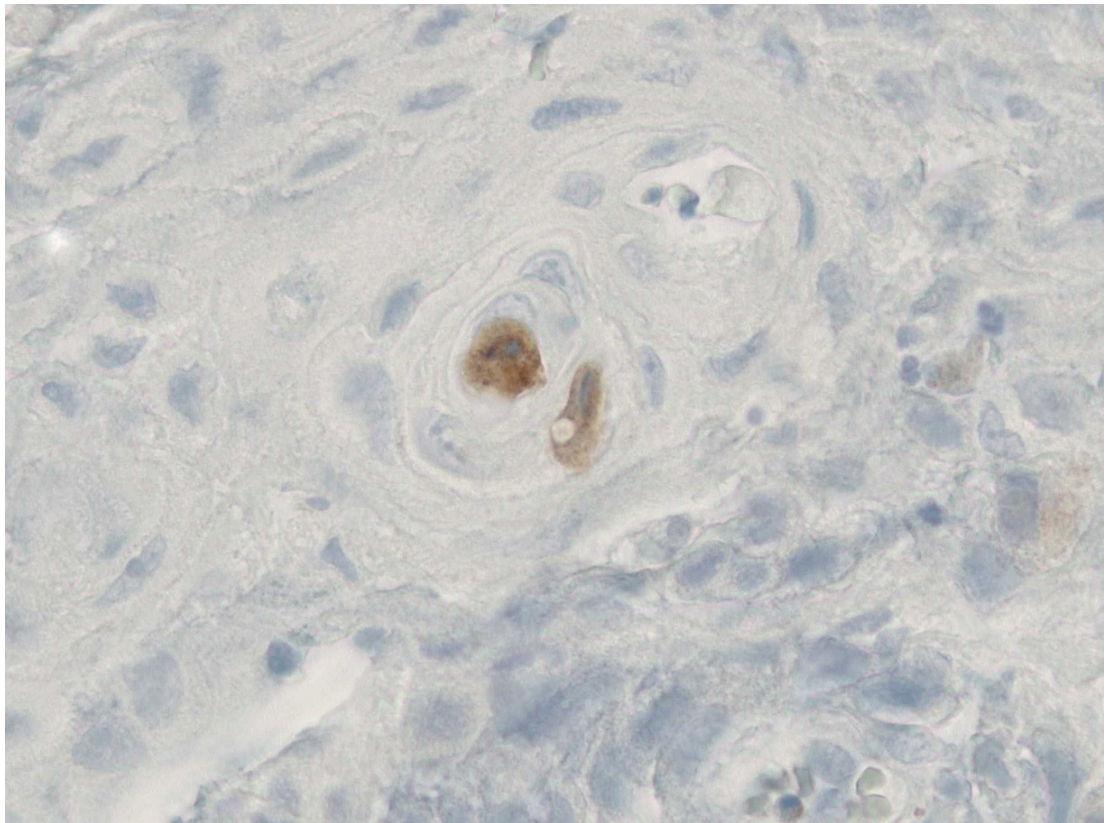
3.6.4 Tonsila palatina s chronickým zánětem

V tonsile postižené chronickým zánětlivým procesem byla apoptotická tělíška nalezena spíše ojediněle. Jejich výskyt však byl vázán zejména na oblast

zárodečných center sekundárních lymfatických folikulů.

3.6.5 Tonsila palatina s karcinomem

Apoptotický proces byl potvrzen nálezy štěpené, tedy aktivované, kaspasy 3 v jednotlivých polyedrických buňkách s jádry v některých keratinových perlách vrstevnatého dlaždicového epitelu. Precipitát reakčního produktu má granulární povahu a je distribuován prakticky po celém rozsahu cytoplasmy, z čehož lze soudit na ubikvitní charakter nastartované programované buněčné smrti. Daleko řídkěji byly pozorovány známky apoptosy v zárodečných centrech lymfatických folikulů.

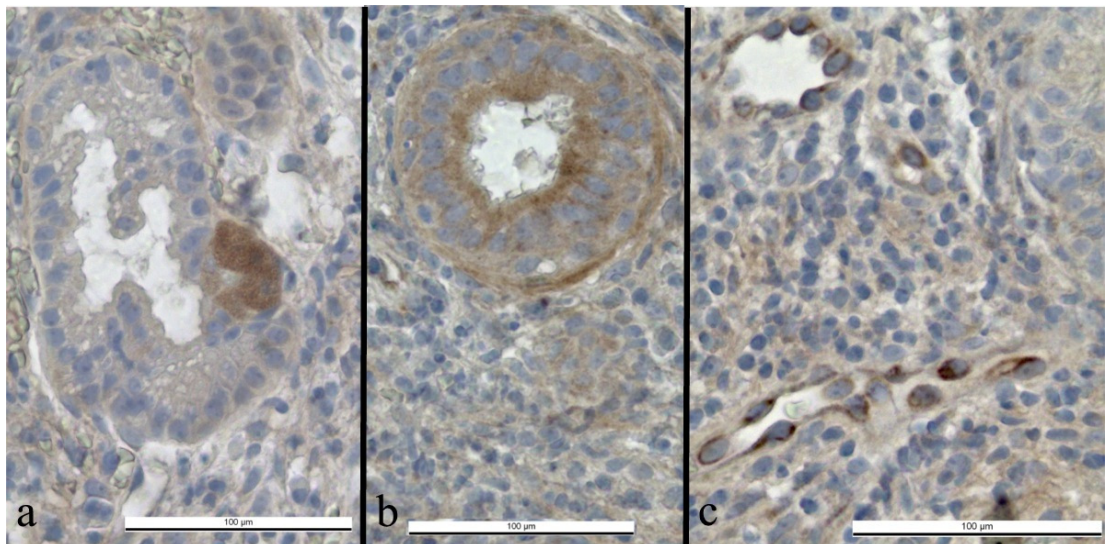


Obr. 39: Tonsila palatina s karcinomem. Detekce „cleaved caspase 3“ v centru keratinové perly. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.7 Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF)

3.7.1 Zdravá nosní sliznice

VEGF byl prokazován v cytoplasmě serosních buněk serosních lunul žláz, v nichž měl precipitát granulární charakter a byl rozptýlen prakticky po celém rozsahu cytoplasmy. Naproti tomu v cytoplasmě buněk žlázových vývodů bylo možno pozorovat vyšší expresi tohoto růstového faktoru v supranukleárních oddílech a k pravidelným nálezům patřila distribuce reakčního produktu o vysoké hustotě v cytoplasmě endotelových buněk především vén o malém průměru.

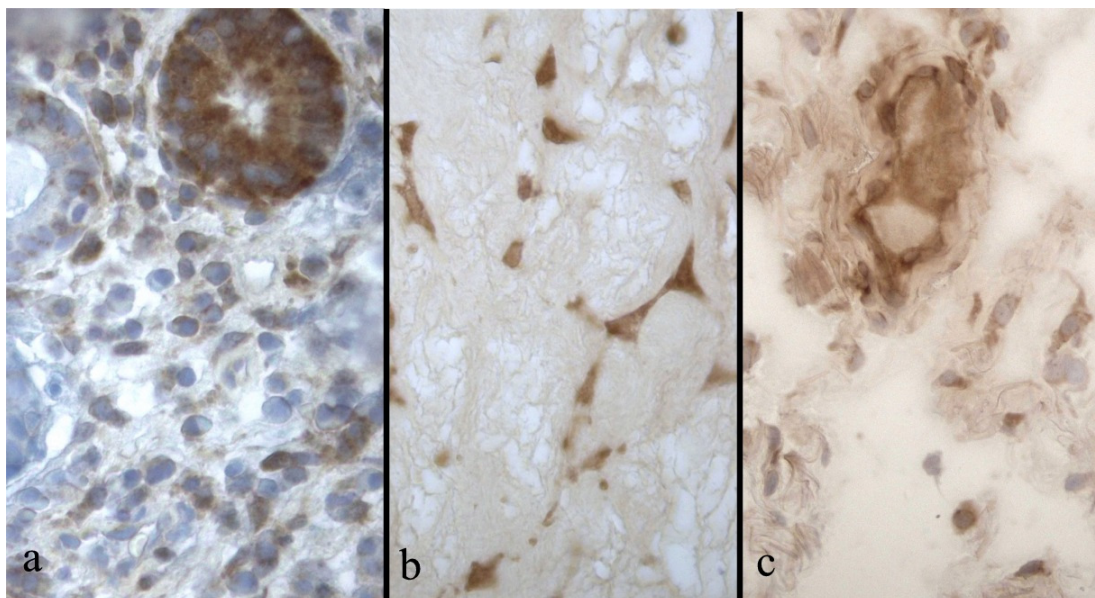


Obr. 40: Zdravá nosní sliznice – VEGF. a) Přítomnost VEGF v serosních buňkách sekrečních oddílů žláz, b) Průkaz VEGF v cytoplasmě buněk žlázových vývodů, c) VEGF v cytoplasmě endotelových buněk venul. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.7.2 Nosní polypy

Také v nosních polypech dominovaly nálezy VEGF v cytoplasmě serosních buněk smíšených žláz (i zde měl barevný precipitát granulární charakter), jakož i

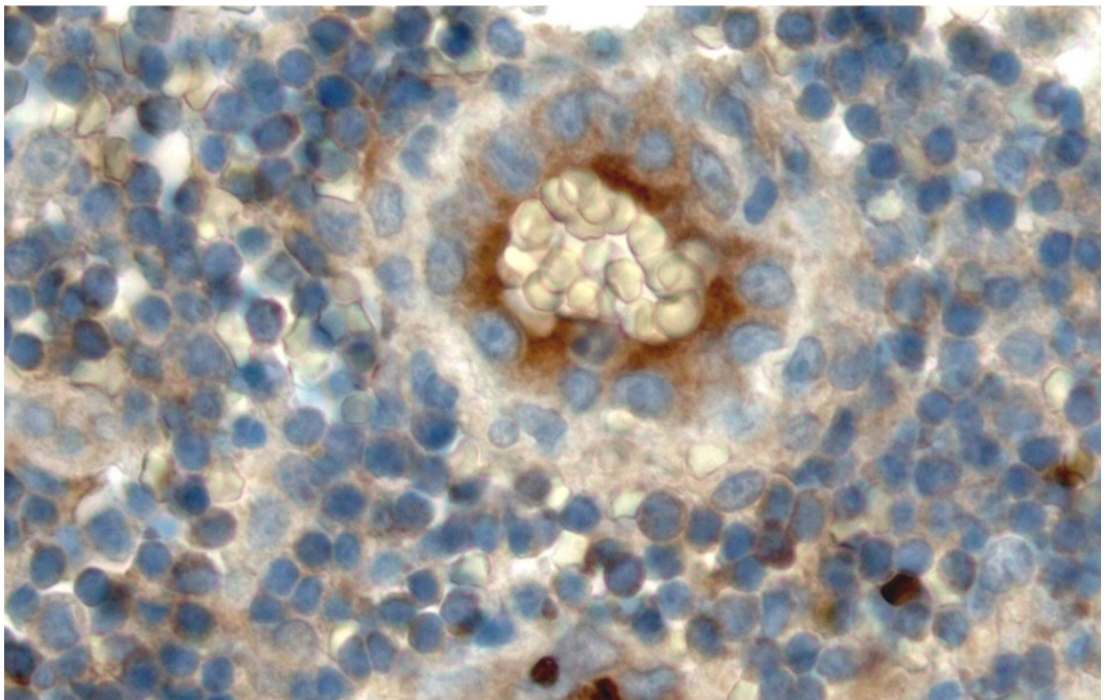
v cytoplasmě buněk žlázových vývodů a v endotelových buňkách malých vén. Dále byla exprese VEGF zachycena v basálních partiích povrchového víceřadého cylindrického epitelu. Pozoruhodným nálezem pak byla vysoká hustota reakčního produktu v cytoplasmě početných fibroblastů v „jelly like“ stromatu.



Obr. 41: Nosní polyp. Imunoperoxidasová reakce (DAB) a) Průkaz VEGF v serosních buňkách sekrečního oddílu žlázy. Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x, b) Nález VEGF v cytoplasmě fibroblastů v edematosním stromatu. Obj. 63x, c) VEGF v cytoplasmě endotelových buněk malých vén. Obj. 40x.

3.7.3 Zdravá tonsila palatina

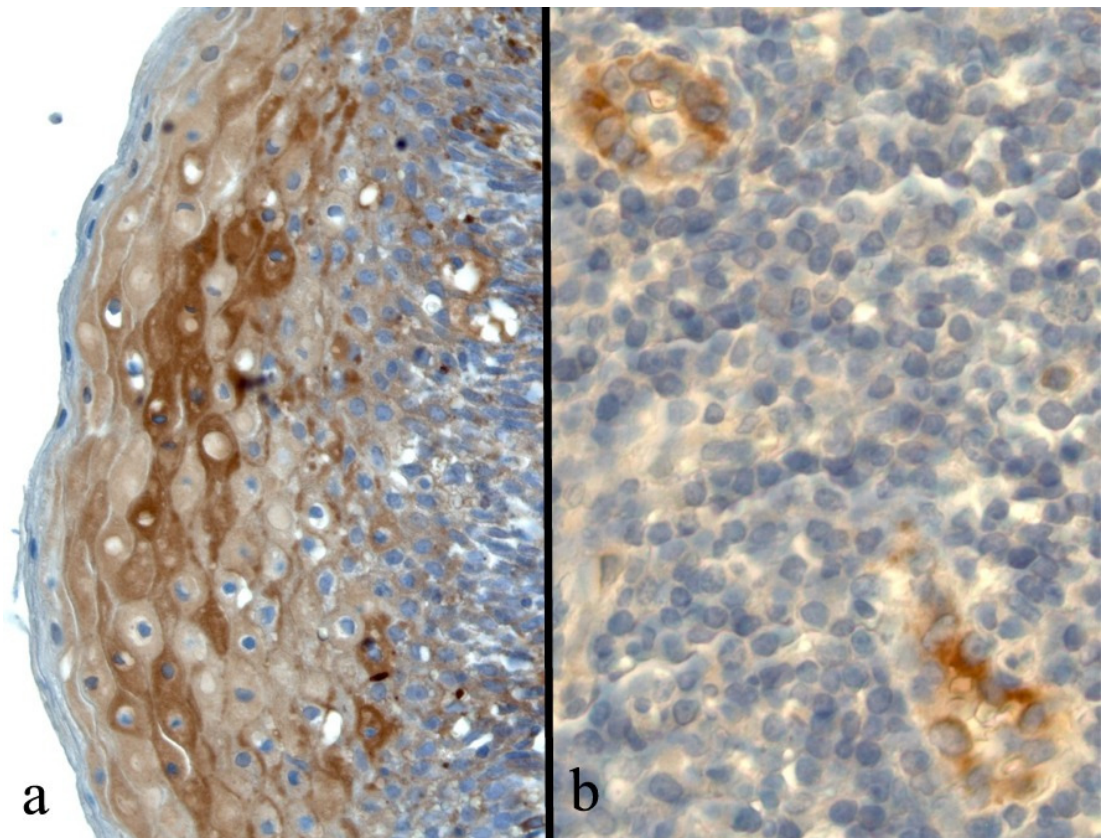
VEGF byl nalézán v cytoplasmě endotelových buněk malých vén, vén s vysokým endotelem (HEV), ale stejně tak v cytoplasmě epitelových buněk stratum spinosum povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu. Pro úplnost je třeba poznamenat, že i v tonsile lze zjistit expresi VEGF v jednotlivých buňkách stromatu, podle poměrně dlouhých výběžků patrně rovněž fibroblastů, podobně jako tomu bylo u nosních polypů.



Obr. 42: Zdravá tonsila palatina. Průkaz VEGF v cytoplasmě endotelových buněk vén s vysokým endotelem. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.7.4 Tonsila palatina s chronickým zánětem

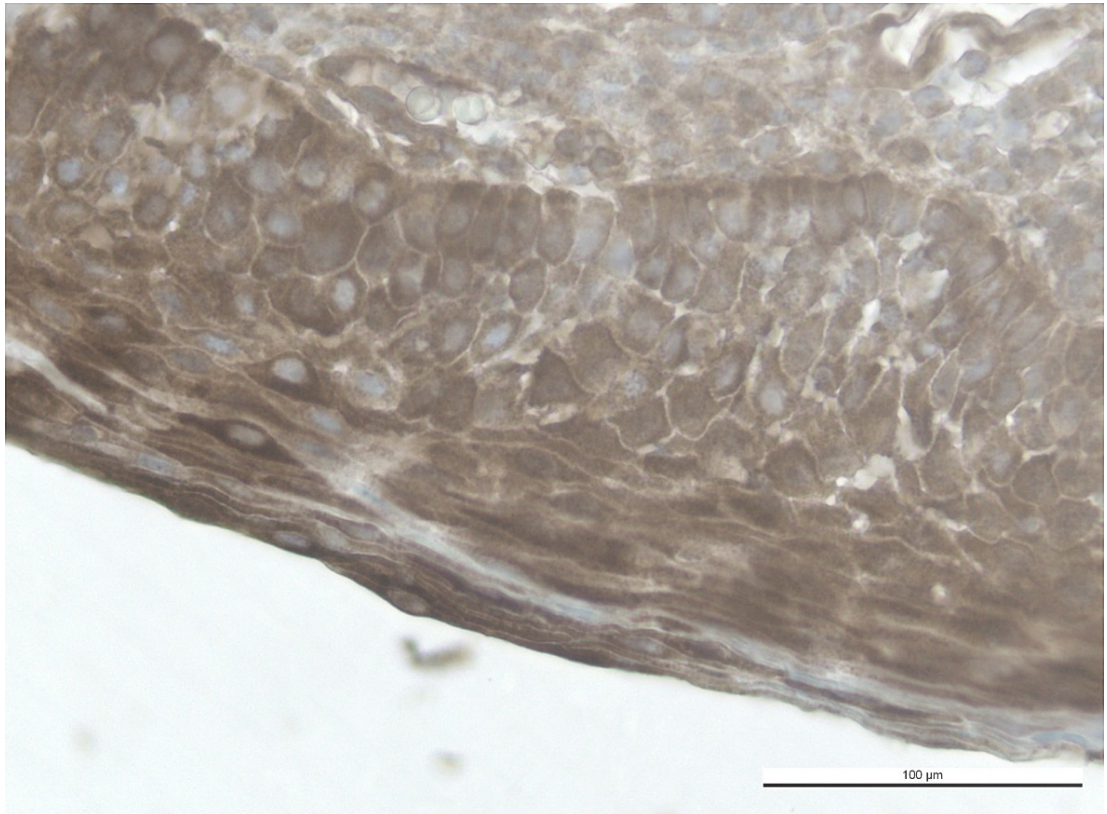
Přítomnost VEGF byla zjištěna v cytoplasmě endotelových buněk malých cév (arteriol i vén) a v povrchních vrstvách stratum spinosum vrstevnatého dlaždicového epitelu.



Obr. 43: *Tonsila palatina s chronickým zánětem. Průkaz VEGF. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. a) VEGF distribuován nerovnoměrně zejména v povrchní zóně stratum spinosum vrstevnatého dlaždicového epitelu, Obj. 40x, b) VEGF v cytoplasmě endotelových buněk vén s vysokým endotelem, Obj. 63x.*

3.7.5 Tonsila palatina s karcinomem

Karcinomatózní proces je v tonsile provázen velmi výraznou pozitivitou průkazu VEGF, a to prakticky ve všech buňkách povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu. Reakční produkt diaminobenzidínové hnědi má granulární texturu a často lze pozorovat určitý baso-apikální gradient s maximem exprese v nejpovrchnějších dlaždicových elementech. Cytoplasma těchto buněk vykazuje často až homogenní precipitát. Také v cytoplasmě endotelové výstelky malých cév včetně kapilár lze detekovat přítomnost peroxidasového markeru imunohistochemického průkazu VEGF.

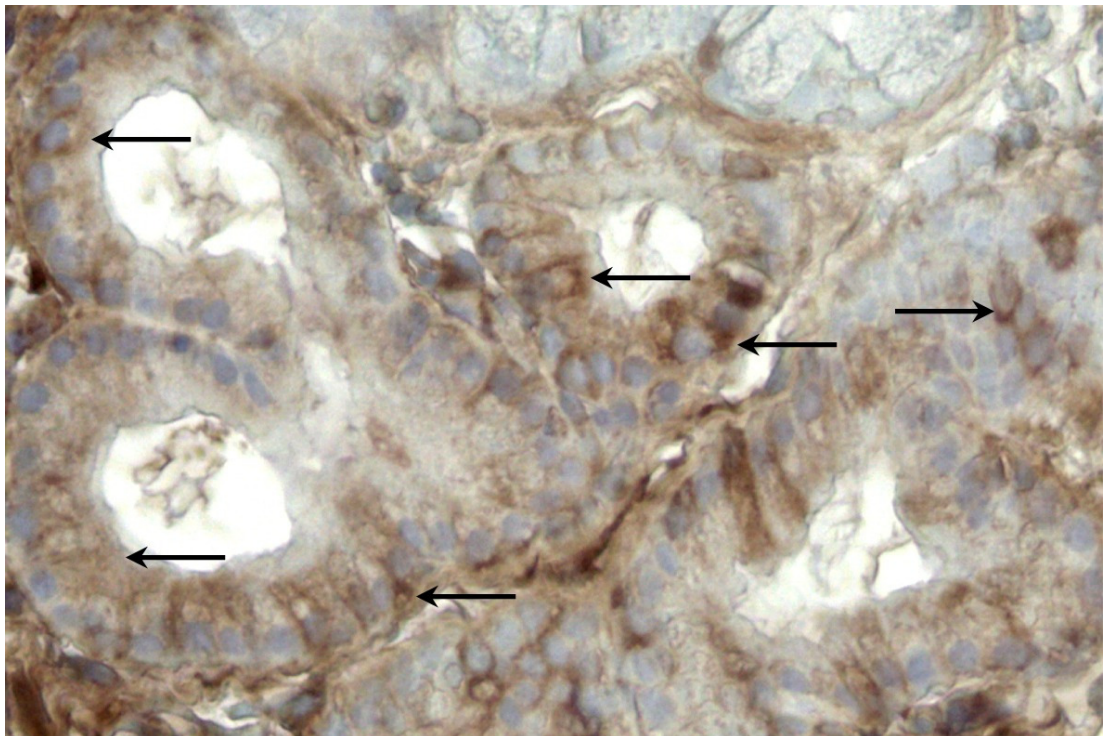


Obr. 44: *Tonsila palatina s karcinomem. Nález VEGF v celém rozsahu vrstevnatého dlaždicového epitelu i v cytoplasmě endotelových buněk subepitelových vén. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.*

3.8 Transforming growth factor beta (TGF- β)

3.8.1 Zdravá nosní sliznice

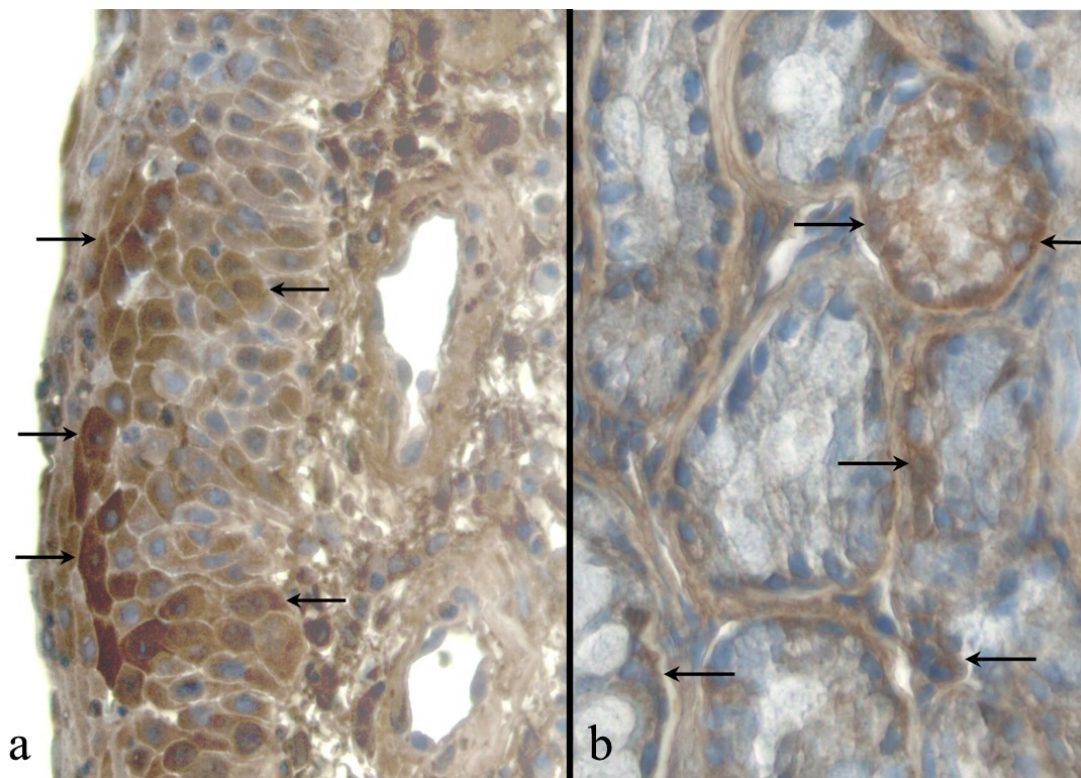
TGF- β byl prokazován v basálních partiích víceřadého cylindrického epitelu, který pokrývá povrch sliznice. Kromě toho byl nerovnoměrně distribuován v cytoplasmě serosních buněk tuboalveolárních žlázek.



Obr. 45: Zdravá nosní sliznice. Průkaz TGF- β v serosních buňkách tuboalveolárních žlázek. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 40x.

3.8.2 Nosní polypy

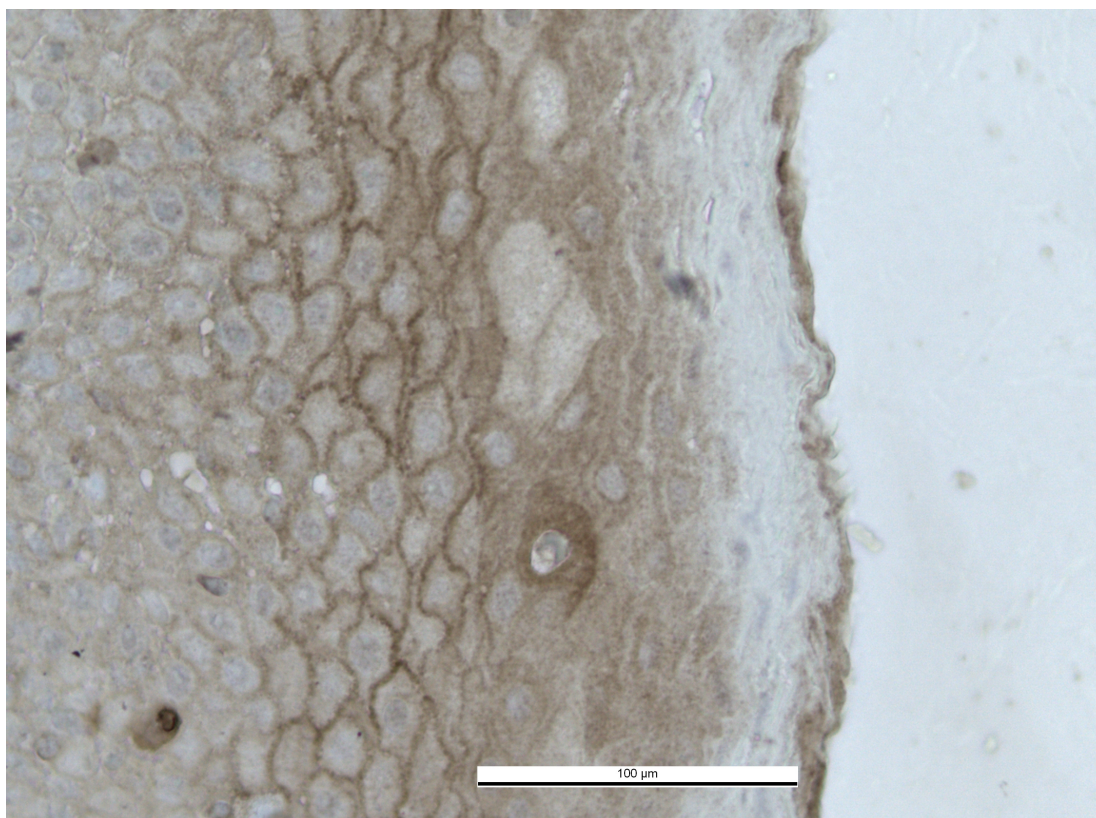
Výskyt TGF- β byl pozorován především v epitelových komponentách, a to v basálních oddílech víceřadého cylindrického epitelu, který kryje povrch polypů, jakož i v cytoplasmě serosních buněk sekrečních lunul žláz. Nejvyšší exprese tohoto růstového faktoru byla pozorována v nerovnoměrném rozložení v metaplasticky transformovaném povrchového epitelu.



Obr. 46: Nosní polyp, průkaz TGF- β . Immunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 40x. a) Nerovnoměrné nálezy TGF- β v metaplastickém povrchovém epitelu, b) Detekce TGF- β v serosní linii buněk sekrečních oddílů žláz.

3.8.3 Zdravá tonsila palatina

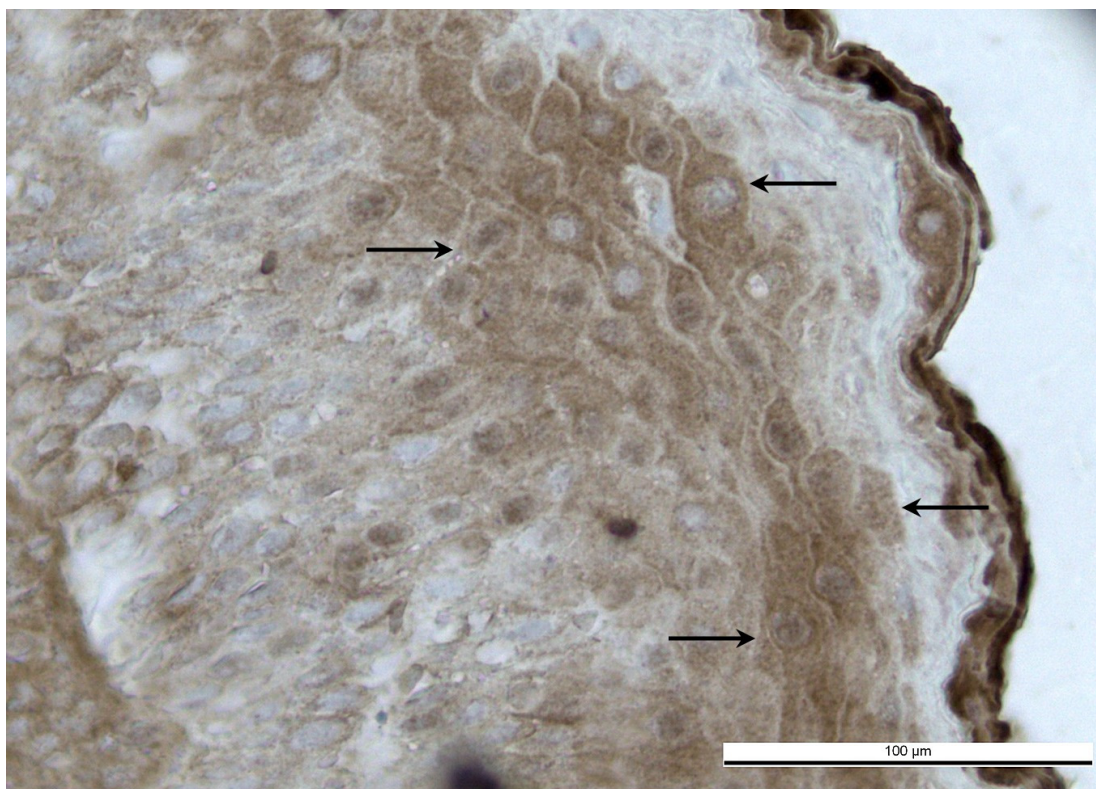
TGF- β byl zachycován v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu, a to v různém uspořádání v horních partiích stratum spinosum (zde byl lokalizován intracelulárně v cytoplasmě oploštělých polyedrických buněk) ve srovnání s hlubšími oblastmi stratum spinosum, kde průkaz tohoto růstového faktoru zřetelně lemoval intercelulární prostory s typickými periodickými projasněními v místech desmosomových kontaktů (byl přítomen extracelulárně). Dále byl pozorován v cytoplasmě endotelových buněk malých cév. Přítomnost TGF- β nebyla prokázána v lymfatické složce tonsily.



Obr. 47: Průkaz $TGF-\beta$ v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu zdravé tonsila palatina. V horním oddílu stratum spinosum byl pozorován intracelulárně v cytoplasmě buněk, kdežto v hlubších partiích extracelulárně. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.8.4 Tonsila palatina s chronickým zánětem

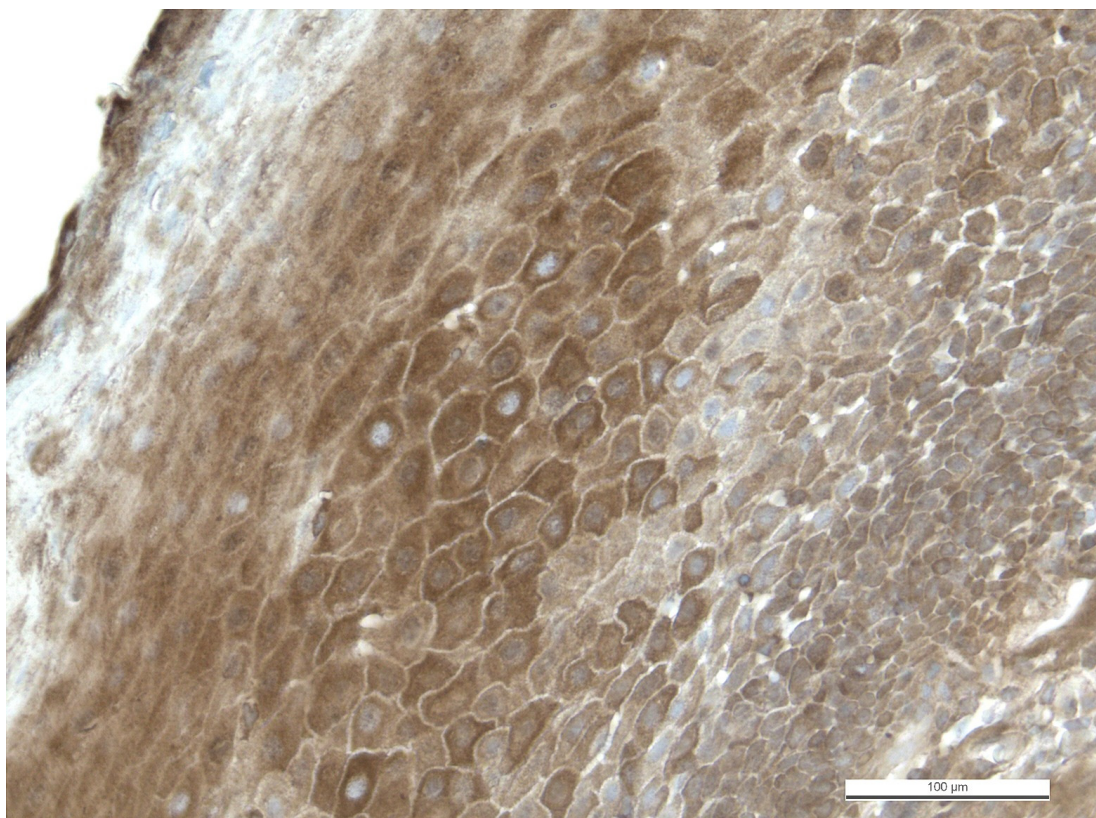
Zánětlivý proces modifikoval výskyt $TGF-\beta$ ve stratum spinosum vrstevnatého dlaždicového epitelu takovým způsobem, že v granulární podobě je reakční produkt přítomen v oploštěle polyedrických buňkách (šipky směřující vlevo) povrchních oblastí, kdežto směrem k lamina basalis byla extracelulární distribuce v intercelulárních prostorech zcela potlačena (šipky směřující vpravo). V zárodečných centrech lymfatických folikulů byla prokázána exprese jen v menší míře.



Obr. 48: Průkaz TGF- β ve stratum spinosum povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu zánětlivě postižené tonsily (šipky směřující vlevo). Intercelulární štěrbiny ve stratum spinosum jsou zřetelně transparentní (šipky směřující vpravo). Vysoká koncentrace reakčního produktu v nej povrchnějších plochých buňkách epitelu. Immunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.

3.8.5 Tonsila palatina s karcinomem

Positivita TGF- β byla výraznější v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu a to ve stratum spinosum. V celém rozsahu stratum spinosum byla zjištěna intracelulární lokalizace.



Obr. 49: *Tonsila palatina s karcinomem. Intracelulární pozitivita TGF- β ve stratum spinosum povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu. Imunoperoxidasová reakce (DAB). Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x.*

3.9 Kvantitativní shrnutí 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 | - | ++ | | +- | ++ | ++ |
| Caspase3 | - | +- | | - | - | + |

| 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 | +- | - | | / | / | / |
| Caspase3 | - | - | | / | / | / |

| 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 | - | + | | +- | +++ | +++ |
| Caspase3 | - | +- | | - | +- | +- |

| 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 | - | +- | | - | - | - |
| Caspase3 | - | - | | - | - | - |

4. DISKUSE

Okolní prostředí obsahuje nepřeberné množství patogenů, které představují reálné nebezpečí infekce. Nejprostší cesta, kterou patogenní mikroorganismy mohou vstoupit do organismu, jsou vstupní brány komunikace vnitřních kompartmentů organismu s okolím, a to permanentně fungující systém dýchací, intermitentně fungující horní část trávicího systému – dutina ústní a orofarynx včetně tonsil při příjmu potravin a konečně vylučovací cesty, především močové a pohlavní. Potenciální patogeny jsou přítomny ve vdechovaném vzduchu i v polykané potravě. Je obecně přijímáno, že jedno z nejjednodušších míst vstupu infekce do organismu je sliznice dýchacích cest. Proto je velmi důležité, že existuje celá řada mechanismů chránících organismus proti infekci. K těmto obranným mechanismům patří neporušená a průběžně obnovovaná integrita povrchového epitelu, distribuce buněk imunitního systému ve sliznici, mukociliární aparát a jeho specifická clearance a konečně antimikrobiální látky endogenního původu v povrchové tekutině dýchacích cest a na povrchu epitelu horní části trávicího systému. V horních cestách dýchacích se nalézají přímo ve sliznici mnoho elementů lymfatické řady. Patří k nim nasofaryngeální tonsily, faryngová tonsila, linguální tonsila a tonsily patrové – jsou to specialisované agregace buněk lymfatické linie, které svým uskupením patří do tzv. Waldayerova lymfatického okruhu, působícího jako významný detektor aktuální antigenní zátěže organismu a tím i moderátor imunitních odpovědí.

Pokud jeden nebo více obranných mechanismů selže, je usnadněn vstup patogenních mikroorganismů do organismu a rozvoj infekčního onemocnění nejrůznějšího rozsahu (Hellings P et al., 2000).

Jako zástupce horních cest dýchacích, kromě jiného i kvůli dostupnosti vzorků pro zpracování a studium, zde byla vybrána sliznice dutiny nosní. Patrová tonsila byla vybrána pro svou lokalizaci v orofaryngu – tzn. v místě křížení cest dýchacích a polykacích a samozřejmě opět pro časté klinicky indikované operační zákroky, při nichž bylo možno získat vzorky. Navíc pak, chronický zánět tonsil a nosní sliznice má mnoho společných mechanismů. Přestože je tonsila lymfatickým orgánem se seskupením mnoha buněk imunitního systému, můžeme podobně ovšem spíše v diseminované podobě mnoho takových 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 něž patří např. astma bronchiale, rhinitis chronica nebo sinusitis chronica. V histologickém obrazu nosní polyposy dominuje “jelly-like” mezibuněčná hmota se zánětlivou infiltrací mononukleáry, eosinofily, plazmatickými a žírnými buňkami (viz obr. 3, 5 a 6), jindy převaha seromucinosních žlázek na úkor stromatu (obr. 4). Ve vzorcích tonsil získaných od pacientů s chronickou tonsilitidou dominuje v kryptách, díky četným migrujícím lymfocytům, zřetelně rozvlákněný transformovaný povrchový epitel. V karcinomatosiských tonsilách vystupuje obvykle do popředí stimulovaná proliferace buněk vrstevnatého dlaždicového epitelu, často s alterací epitelu-vazivových vztahů, a to i narušením basální membrány. V mase intermediárních vrstev epitelu (stratum spinosum), někdy až s penetrací do stromatu, je konečně prakticky konstantním nálezem tvorba keratinových perel (obr. 14, 28, 33 a 39), průvodním znakem také úbytek lymfatické složky na úkor tkáně epitelové i vazivové, v níž přibývá vláknité složky (fibrosa). Je také známo a má podporu v literárních datech, že chronický zánět může upregulovanou stimulací buněčné proliferace usnadňovat, ne-li dokonce přímo iniciovat maligní zvrát. 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.

K antimikrobiálním substancím, které pomáhají chránit povrch sliznice před infekcí, patří defensiny. Tyto látky působí jako endogenní antibiotika (endogenní antibiotické polypeptidy). Jsou účinné proti bakteriím, virům i plísním (Lee SH et al., 2002). Defensiny můžeme prokázat na kůži i na sliznici různých orgánů včetně sliznice nosní a tonsilární. Jsou zahrnovány do přirozené slizniční imunity.

Základním cílem této práce bylo přispět k objasnění imunologické situace (výskyt defensinů) v daných lokalitách v definovaně zdravé konstelaci a v průběhu chronického zánětu; u tonsil pak i za nádorového postižení. S výše uvedeným cílem byla spojena snaha zjistit úroveň proliferace a apoptosy ve tkáních zdravých a patologických, zjistit možnosti a ověřit produkci, přítomnost a případně i vazbu některých růstových faktorů a jejich možný příčinný vztah k patogenezi patologických stavů, ale i jejich možnou roli v nádorové transformaci.

Výskyt některých potenciálních faktorů, které mohou přispívat ke vzniku nosní polyposy, chronické tonsilitidy a jejich možné propojení se vznikem tonsilárního

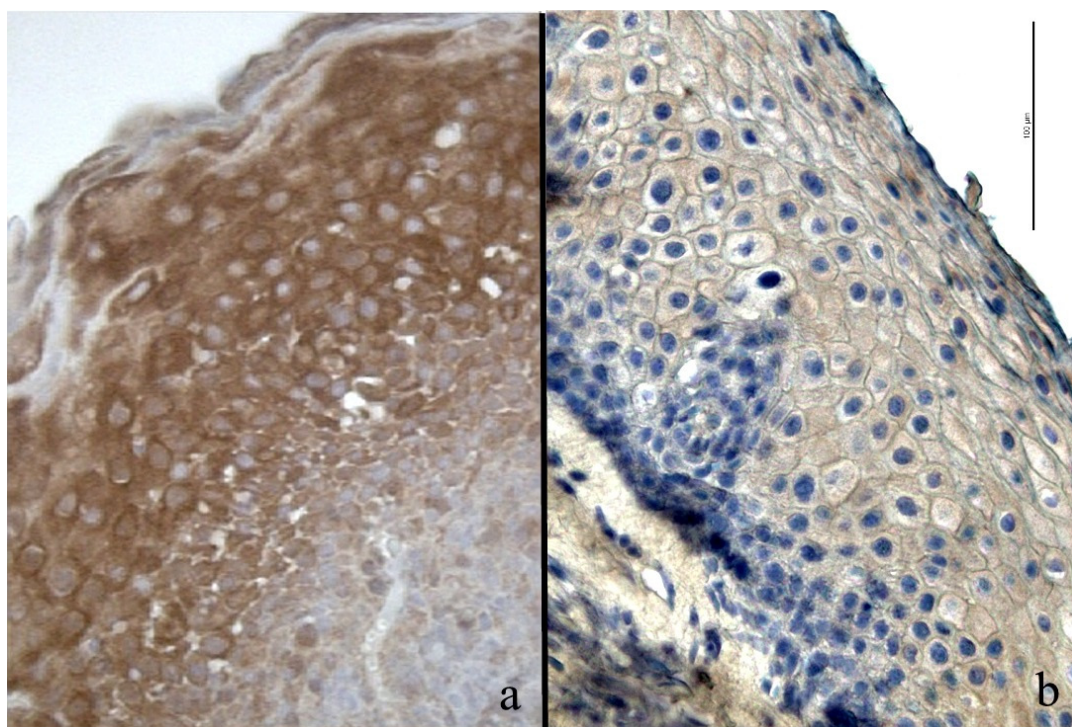
karcinomu podporují komplikované patofyziologické vztahy, zjištěné komplexní analýzou klinických a laboratorních dat jednotlivých pacientů.

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 et Sheen-Yie F, 2004, Klüver E et al., 2006, Dunsche A et al., 2001, Carothers DG et al., 2001). Někteří autoři referují, že produkce HBD-1 u různých typů tkání a různých patologií se neliší (Lee SH et al., 2002), jiní udávají nižší hladiny tohoto defensinu v tonsilách u pacientů s diagnosou rekurentní akutní tonsilitidy (Ball SL et al., 2007). Naše výsledky prokázaly, že HBD-1 je exprimován ve větším množství ve zdravé nosní sliznici než ve zdravých tonsilách. Vysvětlením rozdílné produkce HBD-1 v těchto dvou lokalitách může být skutečnost, že v nosní sliznici se na přirozené imunitní odpovědi více podílí solubilní antimikrobiální látky přítomné v povrchové tekutině sliznice, kdežto v tonsilách představuje hlavní mechanismus imunitní odpovědi proti patogenům buněčná složka obranné reakce (lymfocyty, leukocyty, atd.). Přestože HBD-1 je znám jako defensin, který se vyskytuje ve zdravé tkáni, podle našich výsledků může být přítomen i v zánětlivé nebo karcinomatózní tkáni. Jeho hladina je však v těchto patologických situacích relativně nízká. Naproti tomu se však exprese HBD-1 v zánětlivé nosní sliznici (nosní polypy) nelišila od chronicky zánětlivých tonsil. Pouze v nosní sliznici s prokázaným *S. aureus* byla přítomnost tohoto defensinu velmi nízká.

Produkce HBD-2 a 3 může být naproti tomu zahájena pod vlivem různých zánětlivých stimulů. Podle literatury byl **HBD-2** nacházen ve zdravé nosní sliznici nepravidelně (Po-Hsu Ch et Sheen-Yie F, 2004), na rozdíl od nosních polypů, kde byl jeho výskyt pravidelný (Lee SH et al., 2002). Při kvalifikovaném srovnání zdravých a zánětlivých vzorků tonsil se množství HBD-2 nelišilo (Claeys S et al., 2003). Jiné publikace uvádějí výrazně vyšší produkci HBD-2 v zánětlivých tonsilách v porovnání s tonsilami zdravými (Weise JB et al., 2002). Exprese HBD-2 však může být stimulována rozdílně různými druhy patogenů (Klüver E et al., 2006, Schibli DJ et al., 2002). Naše vlastní výsledky tuto skutečnost potvrzují, neboť prokazují, že HBD-2 je produkován ve všech studovaných vzorcích, ale v různém množství. Vysoké hladiny byly zjištěny ve zdravé nosní sliznici, stejně jako v zánětlivých tkáních (polypy, chronická tonsilitis). Výskyt i distribuce ve zdravé tkáni tak naznačuje, že HBD-2 se podílí i na přirozené imunitní odpovědi. Naopak zvýšená

exprese ve tkáních zánětlivých ukazuje na zvýšení produkce tohoto defensinu na základě působení patogenního stimulu. Výjimkou byly nosní polypy od pacientů s kultivačně prokázaným *S. aureus* na nosní sliznici. Z literatury je známo, že HBD-2 je schopen přímo působit proti *S. aureus* (Claeys S et al., 2003, Weise JB et al., 2002), což by korespondovalo s našimi výsledky, které v případě osídlení nosní sliznice *S. aureus* skutečně ověřily jen velmi omezenou produkci tohoto defensinu. Tedy HBD-2 za situace nízké exprese nedokáže zabránit kolonizaci sliznice tímto bacilem.

Ve zdravých tonsilách byla přítomnost tohoto defensinu prokazována nepravidelně a nerovnoměrně v buňkách stratum spinosum. Při zánětlivých procesech však byl HBD-2 nalézán ve vysokých množstvích v povrchovém epitelu, kdežto v tonsilách karcinomatosiských byl naopak jeho výskyt velmi omezený, někdy dokonce i neprůkazný.



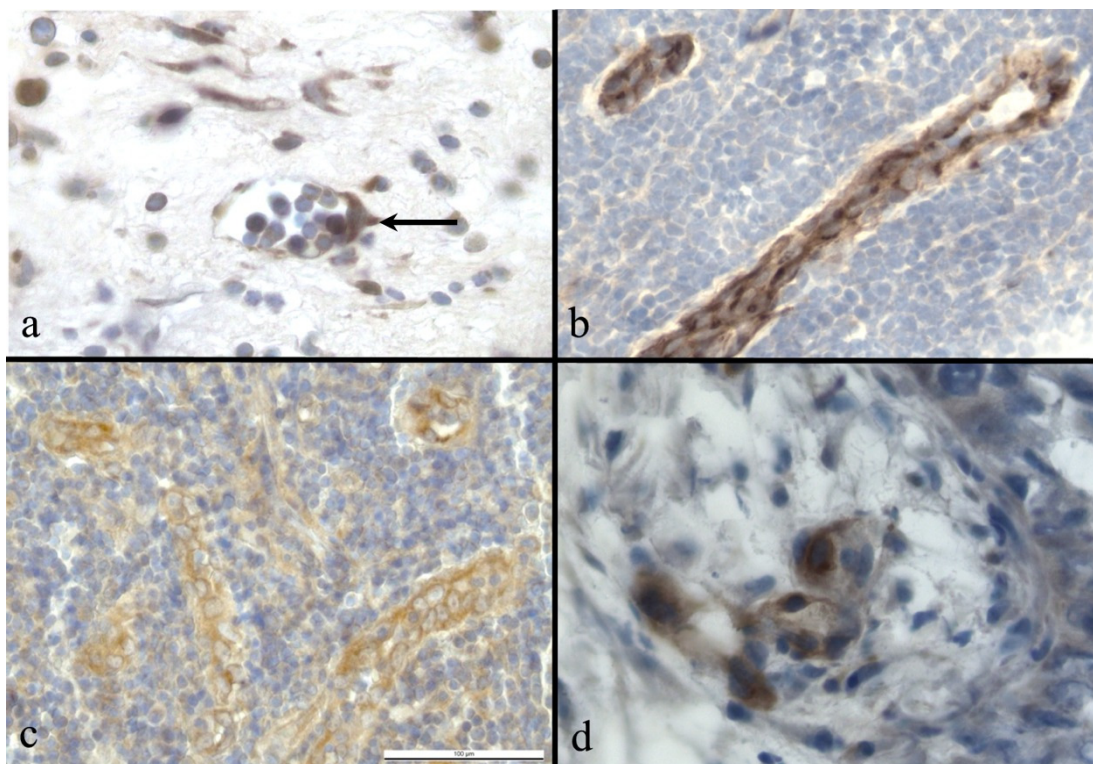
Obr. 50: Průkaz HBD-2. Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x. a) HBD-2 v tonsila palatina s chronickým zánětem. b) HBD-2 v tonsila palatina s karcinomem.

Naše pozorování se však liší od řady údajů v literatuře, kde je často referováno o HBD-2 ve vysokých hladinách v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu

tonsilárního karcinomu (Mizukawa N et al., 2000, Sawaki K et al., 2002, Yoshimoto T et al., 2003). Proto naše výsledky spíše podporují představu, že vznik karcinomu může být facilitován v místech oslabené slizniční imunity v důsledku nedostatečné produkce či dokonce absence tohoto defensinu.

V souladu s literárními daty byl také **HBD-3**, podobně jako HBD-2, prokazován ve zdravé nosní sliznici i v nosních polypech. Nebylo však potvrzeno zvýšení výskytu tohoto defensinu v přímé souvislosti s chronickým zánětem. Další autoři popisují výskyt HBD-3 rovněž ve zdravých i chronicky zánětlivých tonsilách (Claeys S et al., 2003). Z mých výsledků vyplývá, že HBD-3 patří k typické výbavě jak zdravé nosní sliznice, tak zdravých tonsil v množství větším, než tomu bylo u HBD-2. Ve zdravé nosní sliznici byl nalézán dokonce až v neobvykle vysoké expresi. Jeho výskyt ve zdravé tkáni naznačuje, že také HBD-3 se podílí na přirozené imunitě v nosní dutině. Jeho zvýšené množství ve tkáních zánětlivých naznačuje mechanismus potenciace syntesy tohoto defensinu na základě možného působení patogenního stimulu. Jeho produkce v chronicky zánětlivých nosních sliznicích a tonsilách byla totiž poměrně vysoká, kromě vzorků reprezentujících chronický zánět nosní sliznice (polypy) s kultivačně prokázaným *S. aureus*. Velmi zajímavá byla lokalizace reakčního produktu HBD-3 v cytoplasmě endotelových buněk malých vén polyposní nosní sliznice, ale zejména ve vazivovém stromatu zdravých i patologických tonsil.

Endotelová lokalizace (obr. 51a, b, c, d) by dokonce mohla podporovat představu o možném transportu HBD-3 do oběhového systému a tak i do vzdálenějších oblastí organismu nebo opačným z krve do tonsilárních struktur (viz sch. 12). Zjištění, že se HBD-3 může nalézat v cytoplasmě endotelových buněk je velmi významné proto, že potvrzuje možný efekt tohoto produktu nejen v místě jeho produkce (tedy auto-, či parakrinní), ale dokonce i na vzdálenějších místech organismu (endokrinní). HBD-3 byl dále prokázán v povrchovém vrstevnatém dlaždicovém epitelu karcinomem postižených tonsil ve vyšších množstvích než HBD-1 a 2, ale při podrobnějším porovnávání byly tyto hladiny nižší než exprese tohoto defensinu v zánětlivých tkáních. Z toho je možné usuzovat, že během nádorové transformace je omezena produkce nejenom HBD-2, ale také HBD-3 a tím je omezena i lokální imunitní odpověď organismu.



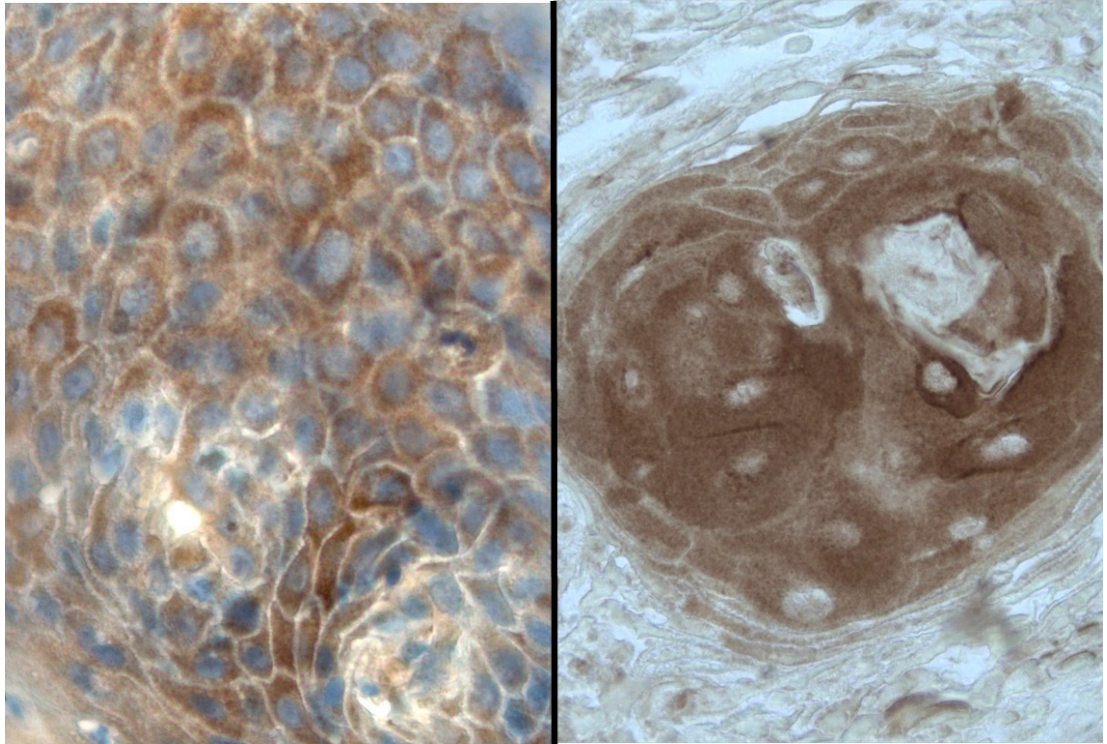
Obr. 51: HBD-3 v cytoplasmě endotelových buněk. Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x. a) Nosní polyp, b) Tonsila palatina s chronickým zánětem, c) Zdravá tonsila palatina, d) Tonsila palatina s karcinomem

Jak je patrné z dokumentovaných výsledků, přítomnost *S. aureus* ve sliznici je velmi závažným ukazatelem deficitního vybavení sliznice defensiny, protože účinek HBD-2 a 3 proti *S. aureus* byl experimentálně prokázán. Někteří autoři dokonce rozlišují bakteriostatické (Claeys S et al., 2003), jiní pak i baktericidní (Po-Hsu Ch and Sheen-Yie F, 2004) působení HBD-3 na *S. aureus*. Protože z předkládaných výsledků vyplývá, že v případě kolonizace *S. aureus* mají buňky dané sliznice velmi omezenou schopnost produkce všech tří zkoumaných typů beta-defensinů (HBD-1, 2 a 3), znamená to významnou podporu již vyslovené představy o omezení lokální slizniční imunitní odpovědi organismu.

Získané výsledky mohou být také vysvětlovány tak, že v tonsilární lokalizaci se účastní na antigenní determinaci patogenů přítomných v potravě zejména v této lokalizaci výrazně zastoupené buňky imunitního systému, na rozdíl od nosní sliznice, která je vystavena velmi silnému náporu patogenů obsažených ve vzduchu během každého nádechu. Nejefektivnějším způsobem, kterým se nosní sliznice brání proti

invazi patogenů je přítomnost antimikrobiálních peptidů v povrchové tekutině sliznice.

Pro reaktivitu slizničních komponent ve smyslu proliferace, systetické aktivity i buněčný cyklus je však třeba zmínit i další faktory, a to ať již s přímým, nebo zprostředkovaným účinkem. K nim na prvním místě patří signální molekuly a jejich producenti, tady i syntasa oxidu dusnatého. Přestože je uváděno, že **eNOS** je produkována konstitutivně, podle některých literárních údajů může být za určitých podmínek (jako je zánět nebo karcinogenesa) její aktivita zvýšena. eNOS je přítomna nejen v endotelu, jak uvádí její označení, ale také v cytoplasmě buněk povrchového vrstevnatého dlaždicového epitelu, a to jak v tonsile se zánětlivým procesem, tak i karcinomasní. Samozřejmě typická byla lokalizace reakčního produktu, potvrzující přítomnost této syntasy, v cytoplasmě entotelových buněk kapilár a malých cév, již proto, že oxid dusnatý patří k vasoregulačním signálním molekulám. Je pravděpodobné, ale bylo rovněž prokázáno, že eNOS a její produkt NO jsou exprimovány ve větším množství v průběhu hypoxie (nastává v průběhu zánětlivých procesů – zvýšení metabolické aktivity buněk i v průběhu růstu nádoru – rychlejší růst nádorových buněk než cév). Dalším možným stimulem ke zvýšení exprese eNOS může být oslabení lokální imunitní odpovědi v karcinomové tkáni (přítomnost velmi malého množství HBD-2). Nález eNOS v této lokalizaci ukazuje na potencovanou angiogenesi. Kromě angiogenese se eNOS a její produkt molekula NO podílí na vaskulogenesi, apoptose a proliferaci, invazivitě, regulaci buněčného cyklu i ovlivnění (zvýšení) cévní permeability (a tím ovlivnění metastatických procesů). (Blais V and Rivest S, 2001). Výsledky disertační práce potvrdily výskyt eNOS ve tkáních s chronickým zánětem, ale stejně tak i ve tkáních s diagnostikovaným karcinomem. V nejsilnější expresi byla tato syntasa zjištěna v karcinomu tonsily, kde je nejmarkantněji detekována v oblasti karcinomových perel a v souladu s literárními představami hraje roli v procesech programované buněčné smrti (apoptosy) a proliferace, jak o tom svědčí především dosis dependentní pro- a antiapoptotický efekt (Fukumura D et al., 2006, Lancaster JR Jr. and Xie K, 2006, Li CQ and Wogan GN, 2005).



Obr. 52: Tonsila palatina s karcinomem. Obj. 63x. Vlevo je zachycen epitel s chaotickým uspořádáním buněk, patřících do různých vrstev, ale u všech je výrazná difusní pozitivita eNOS v cytoplasmě. Dobarveno hematoxylinem. Vpravo je zachycena výrazná densita reakčního produktu v epitelových buňkách keratinové perly. Okolní vazivové stroma je prosté eNOS s výjimkou oblastí cév, kde je eNOS detekována v cytoplasmě endotelových buněk. Obj. 63x.

V naší studii jsme poukázali na přítomnost obou procesů. K detekci apoptozy jsme použili apoptotický marker **cleaved caspase 3**. Zjistili jsme, že apoptosa není častým dějem v nosní sliznici, ani v tonsilách. Apoptosa byla nejvíce zastoupena v zárodečných centrech lymfatických folikulů v tonsilách s chronickým zánětem, dále ve středových partiích keratinových perel, ale i tak byla četnost programované buněčné smrti velmi nízká. V zánětlivé tkáni dochází k infiltraci buňkami lymfoidní řady, jejichž biologický poločas je přirozeně dosti dlouhý, a při poškození buněk epitelových a stromálních zánětem je jejich destrukce většinou důsledkem nekrotického děje. V průběhu maligní transformace dochází ke změnám v genomu buněk, a tím většinou i ke ztrátě kontroly buněčného cyklu, zahrnující v mnoha případech i apoptosu (viz sch. 10 a 11). Domnívám se, že v tonsilách s karcinomem převažuje nekrotický zánik buněk nad zánikem buněk apoptosou, o čemž svědčí i

klinické obrazy tohoto onemocnění, probíhajícího v koincidenci se zánětem v této oblasti. Dokonce nezřídka může být klinický obraz počínajícího karcinomu tonsily mylně považován za zánět patrových mandlí.

Naproti tomu bylo mnoho proliferujících buněk (marker **Ki-67**) nalezeno jak v epitelu, tak ve stromatu nosních polypů. Četnější nálezy Ki-67 v endotelových buňkách zánětlivé nosní sliznice v porovnání se sliznicí zdravou, znovu potvrdily stimulovanou angiogenesu v této situaci. Dostí vysoká frekvence proliferujících buněk pravidelně provázela obrazy zárodečných center lymfatických folikulů během chronického zánětu tonsil. V porovnání s tím byly překvapující nálezy velmi malého množství proliferujících buněk ve vzorcích tonsilárního karcinomu. V této tkáni bylo obvykle jen několik Ki-67 pozitivních buněk zachyceno v zárodečných centrech lymfatických folikulů. I za fyziologického stavu jsou samozřejmě buňky většiny tkání stále obměňovány (výjimku představuje např. myokard, či nervová tkáň ve své neuronové linii, apod.). Jak vyplývá z vyhodnocení výsledků, je v zánětlivých regionech vyšší výskyt proliferujících buněk, což je především spojeno s mitotickou stimulací buněk imunitního systému, ale i nosného substrátu. Z toho lze dovozovat, že patologická tkáň je často pod vlivem mitogenních faktorů, ale i „death“ signálů, aktivnější a díky rychle se opakujícím buněčným dělením i náchylnější k neopraveným změnám genomu, a tím i ke vzniku nádorové transformace.

eNOS je současně centrálním mediátorem pro některé růstové faktory, jako je vaskulární endotelový růstový faktor (Duda DG et al., 2004).

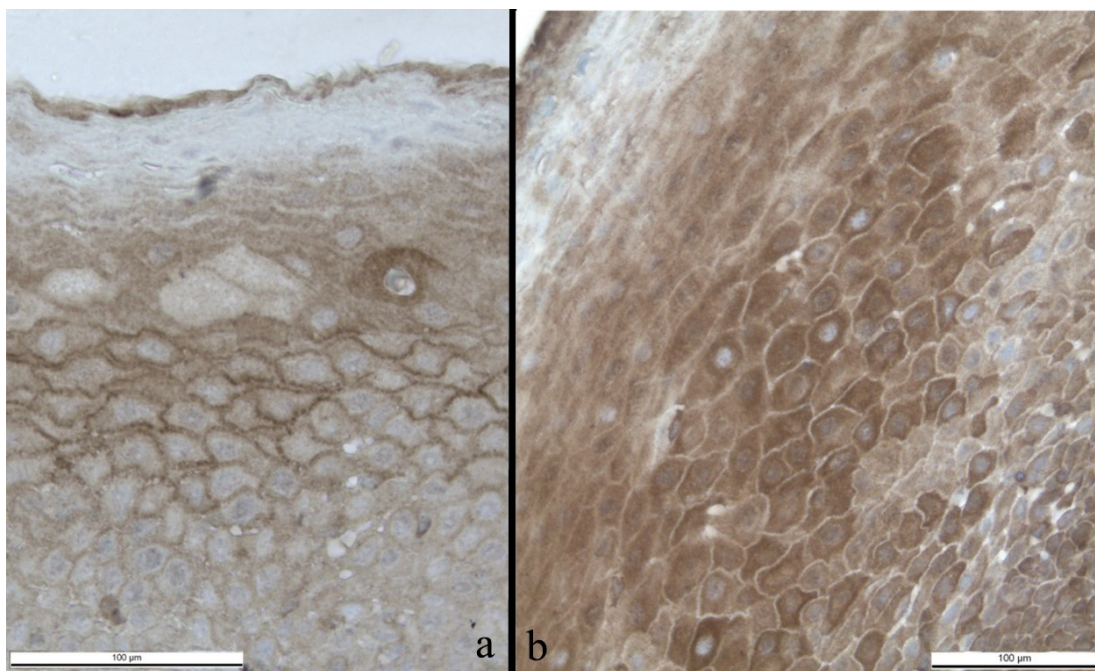
Růstový faktor **VEGF** je znám jako výrazný mitogen pro endotelové buňky, často však také hraje roli v potencování cévní permeability (Joory KD et al., 2006, Leung DW et al., 1989, Unemori EN et al., 1992). Je známo, že exprese VEGF je zvyšována hypoxií (Jiang S et al., 2003). Všechny funkce VEGF jsou velmi důležité v patogenesi chronického zánětu a karcinogeneze. Produkce této molekuly může být zvyšována, jak již bylo uvedeno, nejen hypoxií, ale také zeslabením lokální slizniční imunity během karcinomatosisní transformace. Ve zdravých tkáních jsem VEGF nacházela zejména v cytoplasmě endotelových buněk, a také v povrchovém epitelu, ale výrazně vyšší výskyt VEGF byl prokázán v podmínkách zánětu. Při zánětu nosní sliznice byl VEGF zjišťován také ve stromálních buňkách, což poukazuje na jejich zvýšenou syntetickou aktivitu jak proliferační, tak i v produkci mezibuněčné hmoty. Jeho pravděpodobná role v nádorových procesech, kde bylo prokázáno snížení lokální imunity (snížený výskyt beta-defensinů v karcinomové tonsile), se projevuje

jeho výraznou přítomností nejenom v endotelových buňkách, ale také v buňkách povrchového epitelu. Tyto výsledky ukazují, že 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 tumorosních tkáních) a současně pro rozvoj stromálního edému a pro metastatické procesy (endotelová lokalizace – zvýšení permeability cév). Tyto výsledky jsou kromě toho doloženy tím, že exprese VEGF a eNOS byla zpravidla spojena se známkami intenzivních angiogenetických procesů na straně jedné a že exprese těchto faktorů může být na druhé straně příčinou odlišné stavby pojivové komponenty stromatu.

Ze souhrnné interpretace výsledků studia exprese pak vyplývá významná role eNOS při patologických procesech v horních cestách dýchacích.

Pro pochopení složité rovnováhy pro podporu proliferačních (často zároveň protiapoptotických) vlivů a naopak inhibičních účinků jsme hledali možného reprezentanta této skupiny růstových faktorů či inhibičních cytokinů. Řada autorů uvádí, že **TGF- β** je jedním z nejúčinnějších růstových inhibitorů pro epitelové a endotelové buňky i fibroblasty (Myoken Y et al., 1990, Roberts AB et al., 1980). Přestože se však obecně udává, že TGF- β inhibuje růst endotelových buněk, bylo prokázáno, že za určitých podmínek (hypoxie, lokální oslabení imunity) podporuje angiogenesu. Proto není překvapením, že někteří autoři referují, že nadprodukce TGF- β nádorovými buňkami přispívá k vaskularisaci de novo, a tím může podporovat růst nádoru (Logullo AF et al., 2003). Moje výsledky prokázaly přítomnost tohoto růstového faktoru v normálních tkáních, a to zejména v povrchovém epitelu. Velmi zajímavé bylo zjištění, že ve zdravé tonsilární tkáni byl TGF- β zjištěn v povrchních oblastech stratum spinosum povrchového epitelu intracelulárně, zatímco v jeho hlubších partiích byl TGF- β lokalizován především extracelulárně. Předpokládám, že TGF- β je produkován povrchními buňkami stratum spinosum, je uvolňován z buněk a transportován do stratum spinosum, kde hraje roli v buněčné diferenciaci. Toto je pravděpodobně fyziologický proces. Na druhou stranu lokalizace TGF- β v zárodečných centrech lymfatických folikulů pouze během chronického zánětu tonsil napovídá, že tento faktor může působit i jako mitogen na lymfocyty, 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 tonsilární tkáni byl tento růstový faktor nalezen ve stratum spinosum převážně extracelulárně, na rozdíl od tonsily s karcinomem, kde ve většině rozsahu stratum spinosum byl reakční produkt jeho detekce intracelulárně (obr. 53a a 53b).



Obr. 53: Průkaz TGF- β v tonsila palatina. Porovnání lokalizace tohoto růstového faktoru ve zdravé tonsile (a) a tonsile s karcinomem (b). Ve zdravé tkáni byl zjištěn TGF- β při povrchu stratum spinosum intracelulárně a jeho hlubších vrstvách extracelulárně, naproti tomu v tonsile s diagnostikovaným karcinomem byla lokalizace TGF- β ve stratum spinosum převážně intracelulárně. a) Dobarveno hematoxylinem. Obj. 63x. b) Dobarveno hematoxylinem. Obj. 40x.

Získané výsledky korespondují s literárními daty, že poruchy v produkci a působení TGF- β mohou přispívat ke vzniku a progresi dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku (Xie W et al., 2003). Výskyt a distribuci TGF- β jsem studovala také v nosní sliznici. Za fyziologických podmínek byla exprese tohoto růstového faktoru nízká, byl nalézán zejména v serosních buňkách žláz. Naproti tomu v polyposní tkáni byl TGF- β zastoupen ve větším množství, zejména v oblastech metaplastických změn

povrchového epitelu. Jeho lokalizace tak naznačuje důležitou roli v růstu, ale hlavně pak v diferenciaci epitelových buněk.

5. ZÁVĚR

1. Na základě sumarizace výsledků lze konstatovat, že HBD-1, 2 a 3 byly exprimovány výrazněji ve zdravé nosní sliznici než ve zdravých patrových tonsilách.
2. Nebyl potvrzen signifikantní rozdíl v produkci HBD-1, 2, 3 v nosních polypech bez přítomnosti *S. aureus* a v chronicky zánětlivé tonsile. Naproti tomu velmi malý, či dokonce téměř žádný výskyt HBD-1, 2, 3 byl zjištěn v nosních polypech s kultivačním nálezem *S. aureus*.
3. HBD-1 je součástí konstitutivní složky přirozené slizniční imunity a jeho produkce se nezvyšuje v reakci na infekci nebo nádorové bujení.
4. HBD-2 byl zjištěn v minimálních úrovních v tonsilách s karcinomem v porovnání se zdravou a zánětlivou tkání.
5. Výskyt HBD-3 v karcinomové tkáni byl nižší v porovnání se situací při zánětu. Naproti tomu při komplexním hodnocení všech tří defensinů byl HBD-3 v karcinomové tkáni zjišťován v největším množství.
6. HBD-3 byl nalézán poměrně konstantně v cytoplasmě endotelových buněk malých vén, a to jak v nosních polypech, ve zdravém i zánětlivém tonsilárním stromatu, ale i v karcinomově transformované tonsile.
7. Maligní transformace může být potencována 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 signální molekuly NO) a tím k ovlivnění procesů řízení buněčného cyklu, proliferace buněk a angiogeneze. S tím může korespondovat změna permeability cév a v neposlední řadě i ovlivnění nástupu apoptosy, jako mechanismu programované buněčné smrti.

6. LITERATURA

Aarbiou J, Ertmann M, van Wetering S, van Noort P, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JH, de Boer WI, Hiemstra PS. (2002) Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J Leukoc Biol.* 72(1): 167-174

Alvi A and Vartanian AJ. (1998) Microscopic examination of routine tonsillectomy specimens: is it necessary? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 119: 361-3

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

Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest.* 102: 874-880

Bieluch VM, Martin ET, Chasin WD, Tally FP. (1989) Recurrent tonsillitis: Histologic and bacteriologic evaluation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 98: 332-335

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

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. (2000) Role of transforming growth factor β in human disease. *The New England Journal Of Medicine.* 342 (18): 1350-1358

Border WA, Noble NA. (1994) Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 331: 1286-1292

Braun N, Papadopoulos T, Muller-Hermelink HK. (1988) Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 56: 25-33

Brogden KA. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3: 238-250

Brouet A, deWever J, Martinive P, Havaux X, Bouzin C, Sonveaux P, Feron O. (2005) Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *FASEB J.* 19: 602-604

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF and van de Water L. (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *Journal of Experimental Medicine.* 176: 1375-1379

Bruno S, Gorczyca W, Darzynkiewicz. (1992) Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PNCA and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry.* 13: 496-501

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

Chae SW, Lee SH, Cho JH, Lee HM, Choi G and Hwang SJ. (2001) Expression of human beta defensin 1 mRNA in human palatine tonsil. *Acta Otolaryngol.* 121(3): 414-418

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

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT and Stern D. (1990) Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *Journal of Experimental Medicine.* 172: 1535-1545

Cohen J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 420(6917): 885-891

Cole AM, Dewan P, Ganz T. (1999) Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infection and immunity*. 67(7): 3267-3275

Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 80(8): 2012-2020

Coste A, Brugel L, Maitre B, Boussat S, Papon JF, Wingerstmann L, Peynegre R, Escudier E. (2000) Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur Respir J*. 15: 367-372

Duda DG, Fukumura D, Jain RK. (2004) Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med* 10(4): 143-145

duManoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. (1991) Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*. 12: 455-463

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

Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L and Senger DR. (1991) Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *Journal of Experimental Medicine*. 174: 1275-1278

Fales-Williams AJ, Brogden KA, Huffman E, Gallup JM, Ackermann MR. (2002) Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary infection. *Vet Pathol*. 39: 706-711

Ferrara N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Rev.* 25(4): 581-611

Friedmann I. (1986) *Systemic Pathology: Nose, Throat and Ears.* Singapore, Churchill Livingstone: 161-71

Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. (2006) The role of nitric oxide in tumor progression. *Nat Rev Cancer.* 6: 521-534

Gallo RL, Nizet V. (2003) Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Current Allergy and Asthma Reports.* 3: 402-409

Ganz T, Lehrer RI. (1995) Defensins. *Pharmacol Ther.* 66: 191-205

Ganz T. (2002) Antimicrobial polypeptides in host defence of the respiratory tract. *J Clin Invest.* 109(6): 693-697

Ganz T. (2004) Antimicrobial peptides. *Journal of leukocyte biology.* 75: 34-38

Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N. (2000) Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 60: 6253-6258

Grabenbauer GG, Mühlfriedel C, Rödel F, Niedobitek G, Hornung J, Rödel C, Martus P, Iro H, Kirchner T, Steininger H, Sauer R, Weidenbecher M, Distel L. (2000) Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Nov 1, 48(4): 1041-1050

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroeder JM. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 387: 861

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. (2001) Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J Biol Chem*. Vol. 276 (8): 5707-5713

Harwig SS, Ganz T, Lehrer RI. (1994) Neutrophil defensins: purification, characterization and antimicrobial activity. *Methods Enzymol*. 236: 160-172

Hellings P, Jorissen M, Ceuppens JL. (2000) The Waldeyer's ring. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 54(3): 237-241

Hoover DM, Wu Z, Tucker K, Lu W, Lubowski J. (2003) Antimicrobial Characterization of Human β -Defensin 3 Derivatives *Antimicrob. Agents Chemother*. 47: 2804-2809

Huttner KM, Bevilacqua CL. (1999) Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatric Research*. 45(6): 785-794

Janqueira LC. (1992) *Základy histologie*. Nakladatelství a vydavatelství H&H. 319-330

Janqueira LC. (1992) *Basic histology*. Appleton and Lange. 279

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

Kalhof H. (2003) Mild dehydration: a risk factor of broncho-pulmonary disorders? *European Journal of Clinical Nutrition*. 57(2): S81-S87

Klener P, Abrahámová J, Fait V, Mališ J, Matějovský Z, Petruželka L, Žaloudík J. (2002) *Klinická onkologie*. Nakladatelství Galén. 18.

Klener P, Abrahámová J, Fait V, Mališ J, Matějovský Z, Petruželka L, Žaloudík J. (2002)b *Klinická onkologie*. Nakladatelství Galén. 21.

Klener P, Abrahámová J, Fait V, Mališ J, Matějovský Z, Petruželka L, Žaloudík J. (2002)c *Klinická onkologie*. Nakladatelství Galén. 23.

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

Knowles MR, Boucher RC. (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of Clinical Investigation*. 109(5): 571-577

Kondo S, Asano M, Suyuki H. (1993) Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 16, 194(3): 1234-1241

Laible NJ, Germaine GR. (1985) Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun*. 48: 720-728

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

Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, Baba H, Kohnoe S, Sugimachi K. (1999) Role of transforming growth factor – β 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Onkol.* 17: 607-614

Martin E, Ganz T, Lehrer RI. (1995) Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol.* 58(2): 128-136

Matsuzaki K. (1999) Why and how are peptide-lipide interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochem Biophys Acta.* 1462(1-2): 1-10

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

Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW. (1993) Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol.* 155(2): 408-413

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

Nagaoka I, Niyonsaba F, Tsutsumi-Ishii Y, Tamura H, Hirata M. (2008) Evaluation of the effect of human β -defensins on neutrophil apoptosis. *International Immunology.* 20(4): 543-553

Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, Kim YM, Chung HT, Lee H, Han JA, Ha KS, Kwon YG. (2005) Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med.* 37: 588-600

Nečas E, et al. (2007)a *Obecná patologická fyziologie.* Nakladatelství Karolinum. 113-116

Nečas E, et al. (2007)b *Obecná patologická fyziologie.* Nakladatelství Karolinum. 129-147

Nečas E, et al. (2007)c *Obecná patologická fyziologie.* Nakladatelství Karolinum. 137, 174, 359

Nečas E, et al. (2007)d *Obecná patologická fyziologie.* Nakladatelství Karolinum. 150-172

Nečas E, et al, (2007)e *Obecná patologická fyziologie.* Nakladatelství Karolinum. 165, 210

Nečas E, et al, (2007)f *Obecná patologická fyziologie.* Nakladatelství Karolinum. 220-221

Norgaard P, Hougaard S, Poulsen HS, Spang-Thomsen M. (1995) Transforming growth factor β and cancer. *Cancer Treat Rev.* 21: 367-403

Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. (2001) Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J.* 15: 879-892

Park PW, Pier GB, Preston MJ, Goldberger O, Fitzgerald ML, and Bernfield M. (2000) Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol. Chem.* 275: 3057-3064

Peschel A, Jack RW, Otto M, Andreas, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, Kalbacher H, Nieuwenhuizen WF, Jung G, Tarkowski A, van Kessel KPM and van Strijp JAG. (2001) Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med.* 193: 1067-1076

Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman A. (1998) A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor β 1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7: 497-504

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

Quinn GA, Cole AM. (2007) Suppression of innate immunity by nasal carriage strain of Staphylococcus aureus increases its colonization on nasal epithelium. *Imunology.* 122: 80-89

Raviz MJ, Wenner CE. (1997) Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF- β . *Adv Cancer Res.* 71: 165-207

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

Rogan MP, Geraghy P, Green CM, O'Neill SJ, taggart CC, McElvaney NG. (2006) Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respiratory Research.* 7(29)

Sandreson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. (1995) Hepatic expression of mature transforming growth factor β 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 2572-2576

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

Schibli DJ, Hunter HN, Aeyev V, Starner TD, Wieneck JM, Mccray PB, Tack BF, Vogel HJ. (2002) The solution structures of human β -defensin 3 lead to better understanding of the potent bactericidal activity of HBD-3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 277: 8279-8289

Schmidtchen A, Frick IM, Bjorck L. (2001) Dermatan sulphate is released by proteinase of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alfa-defensin. *Mol Microbiol.* 39: 708-713

Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H and Björck L. (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antimicrobial peptide LL-37. *Mol Microbiol.* 46: 157-168

Scholzen T, Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology.* 182: 311-322

Shafer WM, Qu X, Waring AL, Lehrer RI. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antimicrobial peptides due to a member of the resistance/modulation/ division efflux pump family. *Proc Natl Acad USA.* 95: 1829-1833

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor β 1 gene results in multifactorial inflammatory disease. *Nature.* 359: 693-699

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359: 843-845

Simon HU. (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev.* 193: 101

Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway B-AD, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T. (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl. Acad. USA.* 95: 14961-14966

Smith JA. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 56: 672-686

Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C. (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci.* 106: 143-153

Taylor K, Barran PE, Dorin JR. (2007). Structure –Activity Relationships in β -defensin peptides. *Peptide Science.* 90(1)

Theilgaard-Monch K, Knudsen S, Follin P, Borregaard N. (2004) The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol.* 172: 7684-7693

Travis SM, Conway BAD, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, Greenberg EP, Welsh MJ. (1999) Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 20: 872-879

Ugras S and Kutluhan A. (2008) Chronic tonsillitis can be diagnosed with histopathologic findings. *Eur J Gen Med.* 5(2): 95-103

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

Vacek Z. (1972) *Histologie a histologická technika*, III. vydání. Nakladatelství Avicenum. 224-227, 254, 258

Van Wetering S, Van Wetering S, Manesse-Lazeroms SP, Van Sterkenburg MA, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS. (1997) Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Physiol.* 272: 1888-1896

Wang C, Dong Z, Yang Z. (2004) Expression of human beta-defensin in palatine tonsil. *Lin. Chuang. Er. Bi. Yan. Hou. Ke. Za. Zhi.* 18(3): 129-131

Wang L, Shi GG, Yao JC, Gong W, Wei D, Wu TT, Ajani JA, Huang S, Xie K. (2005) Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer.* 8: 18-28

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

Whyte M, Renshaw S, Lawson R, Bingle C. (1999) Apoptosis and the regulation of neutrophil lifespan. *Biochem Soc Trans.* 27: 802-807

Wimley WC, Selsted ME, White SH. (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: Evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* 3: 1362-1373

Wittekindt C, Hess A, Bloch W, Sultanie S, Michel O. (2002) Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF-receptors in nasal polyps as compared to normal turbinate mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 259(2): 294-298

Woodruff C. (1980) Non-neoplastic and inflammatory disorders of Waldeyer's ring. *Ear Nose Throat J.* 59: 457-62

Xie W, Bharathy S, Kim D, Haffty BG, Rimm DL, Reiss M. (2003) Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 14(2): 61-73

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ. (1999) β -Defensins: Linking Innate and Adaptive Immunity Through Dendritic and T Cell CCR6. *Science* Oct. 15: 525-528

Ying L, Hofseth LJ. (2007) An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res*. 67(4): 1407-1410

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

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415(24): 389-395

Zhao CQ, Wang I, Lehrer RI (1996) Widespread expression of beta-defensin HBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*. 396: 319-322

7. PŘÍLOHY

Seznam publikací

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:

a) s IF

1. **Pácová 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, **Pácová 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. **Pácová 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, **Pácová 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, **Pácová H**, Šterzl I, Betka J. (2006) Sérové hladiny IL-2, IL-4, IL-10 a TGFβ1 a jejich srovnání s markery angiogeneze apoptózy u karcinomů a chronického zánětu patrové mandle. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 55(2): 88-91
4. **Pácová H**, Kuchynková Z. (2006) Funkční aspekty morfologie nosní sliznice. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 55(3): 174–177
5. Kuchynková Z, Nyč O, **Pácová H**, Jandová Z. (2007) Chronická rinosinusitida s nosními polypy a *Staphylococcus aureus*. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 56(4): 220-226
6. Kuchynková Z, **Pácová H**. (2008) Defensiny - důležitá složka přirozené imunity v obraně proti infekci. *Otorinolaryng a Foniatic*. /Prague/, 57(1): 36-39
7. Kuchynková Z, **Pácová H**, Balatková Z. (2008) Beta defensiny 2 a 3 ve sliznici nosních polypů u nemocných s chronickou rinosinusitidou s nosními polypy a s kulturačním 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, **Pácová 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