

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biologie a patologie buňky (P1516)

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



Peter Gál

Hojící se rána jako model pro studium buněčných interakcí

Healing wound as a model for the study of cell interactions

Typ závěrečné práce

(Disertační)

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana ml., DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 21. 06. 2015

Peter Gál

Identifikační záznam:

Gál, Peter. *Hojící se rána jako model pro studium buněčných interakcí. [Healing wound as a model for the study of cell interactions]*. Praha, 2015. 61s, 6 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav. Vedoucí práce Smetana ml., Karel.

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Karlu Smetanovi ml., DrSc. za neocenitelné připomínky, podnětné návrhy a podporu při řešení úloh disertační práce.

Můj dík patří i mým nejbližším spolupracovníkům z 1. LF UK RNDr. Barboře Dvořánkové, Ph.D. a RNDr. Pavlu Szabovi, Ph.D., z LF UPJŠ MUDr. Tomáši Vasilenkovi, Ph.D., MUDr. Martinu Novotnému, Ph.D., MUDr. Ivanu Kováčovi, RNDr. Lence Varinské, Ph.D. a z ÚMG AVČR Ing. Hynku Strnadovi, Ph.D. a Mgr. Michalu Kolářovi, Ph.D. Velmi děkuji i panu Dr.h.c. prof. Dr.Rer.Nat. Hansi-Joachimovi Gabiusovi z University Ludwiga-Maximiliana za poskytnutí protilátek a značených galektinů.

Rukopis této práce laskavě pročetla a připomínkami opatřila Bc. Radana Kavková a RNDr. Barbora Dvořánková, Ph.D., za což jim patří můj dík.

Za vynikající technickou asistenci při zpracování materiálu děkuji Ivě Burdové a Magdáléně Majnušové.

Finančně byly tyto studie podporovány grantovými agenturami GAČR, IGA, výzkumnými záměry MŠMT, Evropskou komisí Marie Curie Research Training Network Grant, VEGA a APVV.

Abstrakt

Z důvodu stále stoupajícího výskytu metabolických, kardiovaskulárních a onkologických onemocnění vzrůstá pravděpodobnost vzniku špatně se hojících ran. Na druhé straně, hlavní důvod limitované úspěšnosti konzervativní léčby nádorových onemocnění je dán skutečností, že klasická onkologická terapie cytostatiky nebo ionizujícím zářením je zaměřena především na eliminaci rychle se dělících buněk. Touto cestou ale nejsme schopni zásadním způsobem narušit nádorové mikroprostředí. Galektiny patří mezi endogenní lektiny - bílkoviny specificky rozpoznávající cukerné motivy. Galektiny hrají důležitou roli v procesech buněčné proliferace, diferenciaci, migrace a tvorby mezibuněčné hmoty. Jsou navíc schopny přenášet buněčné signály a účastnit se mezibuněčné interakce. Bylo prokázáno, že galektiny hrají významnou roli při tvorbě mikroprostředí nádoru a/nebo hojící se rány. V této práci byla prokázána významná role galektinů, zejména galektinu-1, při hojení ran a interakcích buněčných populací (endotelové buňky, fibroblasty a keratinocyty) tvořící součást granulační tkáně případně nádorového stromatu. Prokázali jsme, že extracelulární matrix bohatá na Galektin-1 vytváří vhodné prostředí pro kultivaci keratinocytů. Galektin-1 rovněž indukuje diferenciaci fibroblastů na myofibroblasty. Poznání daných procesů přispěje k porozumění komplexnímu charakteru biologie nádoru a jeho paralely - hojící se rány.

Klíčová slova: hojení ran, růst nádoru, mikroprostředí rány/nádoru

Abstract

Due to the increasing incidence of metabolic, cardiovascular and oncological diseases increases the probability of the occurrence of poorly healing wounds. On the other hand, the main reason for the limited success of conservative treatment of cancer is due to the fact that traditional anti-tumor therapy is based on administration of cytostatics and/or ionizing radiation, thus is focused on the elimination of quickly dividing cells. By this way we are unable to significantly modulate the tumor microenvironment. Galectins are representatives of endogenous lectins, molecules specifically recognizing distinct sugar motifs. They play an important role in the processes of cell proliferation, differentiation, migration and extracellular matrix formation. Furthermore, galectins are able to transfer cellular signals and to participate in cell interaction. It has been proven that galectins play an important role in the microenvironment formation of a tumor and/or healing wound. This study demonstrated significant role of galectins, in particular Galectin-1, in wound healing and cell interactions (endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes) forming a part of the granulation tissue and tumor stroma. We have demonstrated that the extracellular matrix rich on galectin-1 creates a suitable environment for the cultivation of keratinocytes. Galectin-1 also induces differentiation of fibroblasts into myofibroblasts. The knowledge of above mentioned processes is important to better understand the complexity of cancer biology and its parallel to wound healing.

Key words: wound healing, tumor growth, wound/tumor microenvironment

Seznam skratek

CD – cluster of differentiation (znak diferenciacie)

ECM – extracellular matrix (mezibuněčná hmota)

EGF – epidermal growth factor (epidermální růstový faktor)

ELISA – enzyme-linked immunoabsorbent assay (s enzymem spojené imunoabsorbční stanovení)

FGF – fibroblast growth factor (fibroblastový růstový faktor)

Gal – galektin

IFN – interferone (interferon)

IGF – insuline-like growth factor (inzulínu podobný růstový faktor)

IL – interleukin (interleukin)

KGF – keratinocyte growth factor (keratinocytový růstový faktor)

MIF – macrophage migration inhibitory factor (migraci makrofágů inhibující faktor)

MMP – matrix metalloproteinasis (matrixová metaloproteináza)

PDGF – platelet derived growth factor (od destiček odvozený růstový faktor)

RIA – radioimmunoassay (radioimunostanovení)

RT-PCR – reverse transcription-polymerase chain reaction (reverzní transkripční-polymerázová řetězová reakce)

qRT-PCR – quantitative RT-PCR (kvantitativní RT-PCR)

TIMP – tissue inhibitor of MMP (tkáňový inhibitor MMP)

TGF – transforming growth factor (transformující růstový faktor)

TNF – tumor necrosis factor (tumor nekrotizující faktor)

VEGF – vascular endothelial growth factor (cévní endotelový růstový faktor)

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Přehled dané problematiky.....	12
2.1 Mezibuněčné interakce.....	12
2.1.1 Fyziologické interakce.....	12
2.1.2 Patologické interakce.....	12
2.2 Interakce buňky a extracelulární matrix (ECM).....	13
2.2 Hojení ran.....	14
2.2.1 Regenerace epidermis.....	14
2.2.2 Fibróza.....	16
2.2.2.1 Zánětlivá fáze.....	16
2.2.2.1.1 Koagulační kaskáda a vaskulární reakce.....	16
2.2.2.1.2 Celulární reakce.....	18
2.2.2.2 Proliferační fáze - tvorba granulační tkáně.....	19
2.2.2.2.1 Fibroplazie a produkce extracelulární matrix.....	19
2.2.2.2.2 Angiogenese.....	20
2.2.2.3 Maturační fáze.....	22
2.3 Základní znaky podobnosti rány a nádoru.....	23
2.4 Základní modely hojení ran.....	25
2.4.1 <i>In vitro</i> modely.....	25
2.4.1.1 Migrační test.....	26
2.4.1.2 Proliferační test.....	26
2.4.1.3 Testy syntézy proteinů a exprese genů.....	26
2.4.2 <i>In vivo</i> modely.....	27
2.4.2.1 Modely akutního hojení.....	27
2.4.2.1.1 Incizní model.....	28
2.4.2.1.2 Excizní model a model mrtvého prostoru.....	28
2.4.2.1.3 Popáleninový model.....	29
2.5 Galektiny.....	30
2.5.1 Role galektinů I. skupiny v reparaci tkání a růstu nádorů.....	31
2.5.1.1 Galektin-1.....	31
2.5.1.2 Galektin-2.....	32
2.5.1.3 Galektin-7.....	33
2.5.1.4 Galektiny-5, -10, -11, -13, -14 a -15.....	33
2.5.2 Role galektinů II. skupiny v reparaci tkání a růstu nádorů.....	34
2.5.2.1 Galektin-3.....	34
2.5.3 Role galektinů III. skupiny v reparaci tkání a růstu nádorů.....	35
2.5.3.1 Galektin-4.....	35
2.5.3.2 Galektin-6, -8, -9 a -12.....	35
3. Cíle.....	37
4. Metody a výsledky.....	38
4.1 Gál P et al. Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. <i>Acta Histochem Cytochem.</i> 2011 Oct 26;44(5):191-9.	40
4.2 Grendel et al. Early stages of trachea healing process: (immuno/lectin) histochemical monitoring of selected markers and adhesion/growth-regulatory endogenous lectins. <i>Folia Biol (Praha).</i> 2012;58(4):135-43.	41

4.3 Dvořánková et al. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. <i>Cells Tissues Organs</i> . 2011;194(6):469-80.42	
4.4 Perželová et al. Extracellular matrix of galectin-1-exposed dermal and tumor-associated fibroblasts favors growth of human umbilical vein endothelial cells in vitro: a short report. <i>Anticancer Res</i> . 2014 Aug;34(8):3991-6.....	43
4.5 Valach et al. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. <i>Int J Cancer</i> . 2012 Dec 1;131(11):2499-508.....	44
5. Diskuse.....	45
6. Závěry a zhodnocení cílů	47
7. Literatura	48
8. Příloha	61

1. Úvod

Z důvodu stále stoupajícího výskytu metabolických, kardiovaskulárních a onkologických onemocnění vzrůstá pravděpodobnost výskytu špatně se hojících ran. Už v roce 2003 se pouze ve Spojených státech amerických utratilo přes 9 miliard dolarů na léčbu komplikací spojených se špatným hojením (Ashcroft et al., 2003). Mezi nejzávažnější komplikace hojení ran patří stagnace tvorby granulační tkáně, zpomalená epitelizace, dehiscence a infekce rány, jakož i tvorba hypotrofických, hypertrofických a keloidních jizev. Za tyto problémy je často odpovědná dysfunkce kmenových buněk a tkáňového mikroprostředí. Tyto biologické děje vedou k relativně pomalému průběhu hojení a k ro zsáhlé tvorbě jizev. Stimulace hojení ran je založena buď na protizánětlivém efektu, zvýšení proliferace buněk, stimulaci tvorby extracelulární matrix nebo na indukci kontrakce rány.

Na druhé straně hlavní důvod limitované úspěšnosti konzervativní léčby pokročilých nádorových onemocnění je dán skutečností, že klasická onkologická terapie cytostatiky nebo ionizujícím zářením je zaměřena především na eliminaci rychle se dělících buněk nádorového parenchymu (Korkaya et al., 2011; Scatena et al., 2011). Touto cestou ale nejsme schopni zásadním způsobem narušit nádorové mikroprostředí a funkci nádorové kmenové buňky, která je odpovědná za důležité komplikace protinádorové terapie jako je minimální reziduální nemoc a multi-léková rezistence (Motlik et al., 2007). Určitou možností by byla terapeutická manipulace nádorového mikroprostředí (především stromatu), na němž jsou závislé kmenové buňky. Klíčovou úlohu při vytváření nádorového stromatu a granulační tkáně hrají fibroblasty (Plzak et al., 2010; Strnad et al., 2010). Fibroblasty jsou potentním zdrojem vybraných růstových faktorů (např. IGF-2 (inzulinu podobný růstový faktor-2), BMP-4 (kostní morfogenetický protein-4)), cytokinů (např. IL-6 (interleukin-6)) a chemokinů (např. CXCL-1, IL-8). Podobně nezastupitelný je jejich význam při produkci strukturních makromolekul (kolagen, fibronectin, tenascin), které tvoří extracelulární matrix. Pro kontrakci rány je zásadní jejich schopnost diferenciace na myofibroblasty, ty jsou navíc schopny ovlivnit biologické vlastnosti nádorů (Desmouliere et al., 1993). Mimo zmíněných regulačních molekul existuje i skupina glykoproteinů schopných zásadním způsobem ovlivnit biologické děje zapojené do hojení ran a/nebo tvorby, růstu a metastazování nádorů. Těmito molekulami jsou endogenní lektiny s komplexním účinkem, schopné specificky rozpoznávat a vázat

sacharidové struktury a přenášet různé signály (Gendronneau et al., 2008). Mezi endogenní lektiny patří i galektiny.

Galektiny jsou endogenní lektiny s komplexním účinkem. Jejich počet je odhadován minimálně na 15. Galektin-1 je ve zvýšeném množství přítomen v buňkách a mezibuněčné hmotě stromatu různých lidských nádorů a v hojící se ráně (Klima et al., 2009; Thijssen et al., 2010; Thijssen et al., 2007). Tento galektin hraje důležitou roli v nádorové angiogenezi i v samotném růstu a metastazování nádorů (Saussez et al., 2009; Saussez et al., 2008). Přesná biologická funkce galektinu-1 při tvorbě nádorového mikroprostředí a hojení ran ale zůstává stále předmětem dalšího výzkumu. Dále je známo, že galektin-3 je významným induktorem tkáňové fibrózy (de Boer et al., 2009; Henderson et al., 2008; Henderson et al., 2006). Přes tyto dílčí informace podrobná data o účinku ostatních galektinů při tvorbě nádorového stromatu a granulační tkáň/jizvy nejsou známa. Předložený projekt je zaměřen na studium role vybraných galektinů (zejména galektin-1, a -3) v biologii endotelových buněk, fibroblastů a keratinocytů, při jejich vzájemné interakci a produkci mezibuněčné hmoty.

Již dlouhou dobu se zdá, že existuje určitá paralela mezi hojením rány a růstem nádoru (Dvorak, 1986; Kolar et al., 2012). Terapeutické řešení obou patologických stavů vyvolává potřebu komplexního přístupu, v němž nelze opomenout vazivovou komponentu vytvářející vhodné mikroprostředí.

2. Přehled dané problematiky

2.1 Mezibuněčné interakce

Mezibuněčné interakce umožňují buňkám komunikovat mezi sebou v reakci na změny v jejich mikroprostředí (Islam et al., 2015). Tato schopnost odesílat a přijímat signály je zásadní pro přežití buňky. Interakce mezi buňkami mohou být stabilní (i), které se podílejí na komunikaci a organizaci buněk v určité tkáni. Tyto interakce jsou vytvářeny prostřednictvím buněčných spojení. Jiné (ii) jsou přechodné nebo dočasné, jako jsou interakce mezi buňkami imunitního systému a/nebo interakce vyskytující se při zánětu. Tyto typy mezibuněčných interakcí se odlišují od jiných typů, například od těch, které jsou mezi buňkami a extracelulární matrix (ECM). Dnes je již dobře známo, že přerušení normální komunikace mezi buňkami může vést k nekontrolovatelnému růstu buněk a vzniku rakoviny.

2.1.1 Fyziologické interakce

Normální interakce rozdělujeme podle doby trvání na stabilní a labilní nebo přechodné. Stabilní interakce mezi buňkami jsou nutné pro adhezi, udržení tvaru a funkci (Suzuki, 2013). Tyto stabilní interakce zahrnují buněčné spoje, které jsou tvořeny proteinovými komplexy zajišťujícími kontakt mezi sousedními buňkami. Patří sem: těsná spojení (zonula occludens a zonula adherens), kotevní spojení (desmosom a hemidesmosom), gap junction, nexus a signalizace receptor-ligand (Lullmann-Rauch, 2012).

Do přechodných mezibuněčných interakcí řadíme interakce buněk imunitního systému (Howard and Baudino, 2014) a interakce krevních destiček při srážení krve (Versteeg et al., 2013).

2.1.2 Patologické interakce

Ve zdravých tkáních je růst buněk kontrolován kontaktní inhibicí, kdy kontakt buňky se sousedícími buňkami vede k zástavě proliferace (Abercrombie, 1970). Kontaktní inhibice je zprostředkována cadheriny, proteiny, které hrají významnou roli v buněčné adhezi. Tato inhibice zabraňuje buňkám hromadit se nad sebou a tvořit

tumory. Nicméně, v rakovinných buňkách dochází ke ztrátě exprese E-cadherinu, což vede k nekontrolovanému růstu a vzniku nádorů (Robert et al., 2006).

2.2 Interakce buňky a extracelulární matrix (ECM)

Organizované skupiny buněk, jako je například svalová tkáň, jsou obklopeny ECM z kolagenních vláken, proteoglykanů a multiadhesivních matricových proteinů (Lullmann-Rauch, 2012). Tato ECM slouží k několika cílům. Organizuje buňky do tkání a koordinuje jejich funkce. Kromě toho matrice poskytuje cestu pro buněčnou migraci, a molekuly v ECM mohou aktivovat klasické signální transdukční dráhy, které indukují růst buněk, proliferaci a genové exprese. Hlavní skupinou molekul, které zprostředkují adhezi buňka-matrix jsou integriny, ale patří sem i různé proteoglykany a glykoproteiny včetně galektinů (Zhang et al., 2015).

2.2 Hojení ran

Hojení ran je definováno jako náhrada mrtvé nebo chybějící tkáně živou (Rubin, 1994) s výraznou úlohou adultních kmenových buněk (Herdrich et al., 2008). Prakticky v každé tkáni se nachází lokality s výskytem tzv. kmenových buněk s limitovanou diferenciační schopností, které zabezpečují obnovu buněčné populace schopné v různé míře vyhojit poškozenou tkáň (Barker et al., 2010). Na druhé straně se však ukazuje, že v mnohých případech jsou právě tyto adultní kmenové buňky zodpovědné za nádorová onemocnění (Barker et al., 2010). Všeobecně však lze říci, že hojení ran je velmi komplexní proces regulovaný obrovským množstvím růstových faktorů a ovlivněný spoustou mezibuněčných interakcí.

Samotný proces hojení tkáně může v závislosti na schopnosti obnovy tkáně probíhat dvojím způsobem. V případě, že se tkáň vyhojí do původního stavu, ad integrum, hovoříme o regeneraci. Naopak pokud se tkáň vyhojí jizvou, pak hovoříme o fibróze (Kumar, 2003). Kůže představuje vhodný model pro studium obou základních procesů hojení, protože epidermis je schopná vyhojení ad integrum, naproti tomu dermis se hojí jizvou (Vidinsky et al., 2006). V případě poranění obou složek kůže probíhají oba procesy současně.

2.2.1 Regenerace epidermis

Hlavní funkcí krycího epitelu je vytvořit bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím. Epitel je schopný po poranění úplného vyhojení, tedy se hojí procesem zvaným regenerace (Kumar, 2003). Reepitelizace začíná jeden až dva dny po poranění a probíhá různě dlouhý čas v závislosti na velikosti rány. V kůži jsou zdrojem proliferujících epidermálních buněk, tzv. keratinocytů, dvě základní reepitelizační centra. Jednak jsou to buňky bazální vrstvy epidermis nacházející se na okraji rány a jednak kožní adnexa a to především vlasové folikuly, bez kterých probíhá hojení o poznání pomaleji (Langton et al., 2008). Důležitost těchto kožních adnex potvrzuje fakt, že se tvoří i v novotvořené epidermis. Ukázalo se, že právě buňky, které se nacházejí ve speciálních oblastech vlasových folikulů, mají potenciál adultních kmenových buněk (Taylor et al., 2000).

Po poranění kůže migrují keratinocyty vzniklé z kmenových buněk folikulu do rány a přispívají k novotvorbě epidermis. Keratinocyty v závislosti na stupni

diferenciace exprimují rozličné typy keratinů. Existuje přibližně 19 typů různých keratinů, které patří mezi intermediální filamenta a tvoří součást cytoskeletu buňky. Keratin-10 je ranný znak diferenciace (Carter et al., 2003; Reichelt et al., 2001) a exprimuje se v suprabazální vrstvě epidermis. Naproti tomu keratin-14 je exprimován v bazální vrstvě epidermis a charakterizuje málo diferencované keratinocyty (Peryassu et al., 2005; Reichelt et al., 2001). Epidermové kmenové buňky vlasových folikulů jsou však s porovnáním s bazální vrstvou epidermis ještě méně diferencované a k jejich rozlišení slouží další znaky. V rámci keratinů se považuje za základní protein exprimovaný epidermovými kmenovými buňkami keratin-19 (Dvorankova et al., 2005).

Sítě keratinů fungují jako kostra buňky, která zabezpečuje mechanickou a dynamickou oporu nejen pro samotné buňky, ale také pro kompletní soustavy buněk tvořící například epidermis (van der Velden et al., 1993). Spouštěcí impuls pro počátek proliferace a migrace keratinocytů po poranění kůže je degranulace destiček, ztráta kontaktní inhibice buněk (Coulombe, 2003) a z poškozených cév uvolněný oxid dusnatý (NO) (Witte and Barbul, 2002). Poškozené keratinocyty na okraji rány se napnou, čímž se změní jejich vlastnosti a morfologie. Dochází k výraznému zvětšení jejich velikosti, což vede k "zhrubnutí" epidermis na okraji rány. Za normálních okolností keratinocyty proliferují a migrují nad intaktní bazální membránou. V případě, že je při poranění narušena rovněž bazální membrána, keratinocyty migrují skrz nově vytvořenou ECM tvořenou převážně fibrinem a fibronectinem. Migrace keratinocytů je umožněno pomocí transmembránových integrinových receptorů (Chernyavsky et al., 2005). Hlavní úlohu při iniciaci migrace sehrává laminin-5, který tvoří součást kotvících fibril bazální membrány (Nguyen et al., 2000). Ještě před samotnou migrací musí keratinocyty uvolnit svoje buněčné spoje – desmozomy a hemidesmozomy, což se děje za pomoci intermediálních filament cytoskeletu (Chernyavsky et al., 2005). Keratinocyty na vodícím konci epidermis změní svůj tvar, přičemž se stávají plošší a protáhlé. Pomocí aktinových filament vytváří různá pseudopodia a posouvají se směrem do středu rány. Tento pohyb umožňují i integriny, kterými se přichytávají k ECM (Chernyavsky et al., 2005).

Během migrace si musí keratinocyty vytvářet prostor, proto fagocytují mrtvou tkáň a debris. Z toho důvodu produkují aktivátor plazminogenu aktivující přeměnu plazminogenu na plazmin, který je schopen rozrušovat escharu (Toriseva

and Kahari, 2009). Vzhledem k tomu, že tyto buňky jsou schopny migrace pouze po živé tkáni, musí produkovat i matrixové metaloproteinázy (MMP), jež rozrušují poškozenou ECM (Hattori et al., 2009), aby si vytvořily volnou cestu pro nerušený průběh reepitalizace.

Pro zastavení migrace epitelových buněk je pravděpodobně důležitá kontaktní inhibice, která se uplatní v okamžiku, kdy se epitelové buňky migrující z protilehlých stran střetnou (Curtis and Rooney, 1979). V případě, že došlo při poranění i k porušení bazální membrány, obnovují ji během procesu reepitelizace samotné keratinocyty. Základní stavební složkou membrány je kolagen IV, laminin, a několik proteoglykanů a glykoproteinů (Kumar, 2003). Epitelové buňky se diferencují směrem k povrchu, čímž se organizují do více vrstev. V případě, že v histologickém řezu je přítomna keratinizující vrstva, lze hovořit o kompletní regeneraci epidermis. Migrace, proliferace a diferenciaci keratinocytů se děje pod regulačním vlivem více cytokinů a růstových faktorů (např. EGF, FGF, KGF, TGF- β ...) (Galkowska et al., 2006).

2.2.2 Fibróza

V případě, že dojde k poranění tkáně s omezenou proliferační schopností a tkáň není schopna vyhojení ad integrum dochází ke tvorbě granulační tkáně. Výsledkem takového procesu je vznik fibrózní tkáně – jizvy, která je v konečné fázi acelulární a avaskulární (Kumar, 2003). Takový proces můžeme pozorovat např. v kůži, pokud dojde k porušení dermis. V takovém případě hojení probíhá ve třech nezávislých, ale v sebe se prolínajících fázích: zánětlivé, proliferační a maturační (Barbul, 1993).

2.2.2.1 Zánětlivá fáze

První reakcí organismu na narušení celistvosti, které vede ke vzniku nekrotické tkáně je zánět (Barbul, 1993). Samotná zánětlivá fáze zahrnuje tři etapy/reakce: koagulační kaskádu, vaskulární reakci a celulární reakci.

2.2.2.1.1 Koagulační kaskáda a vaskulární reakce

V případě, že poranění je natolik hluboké, že poškodí cévní řečiště, v kůži dochází ke kontaktu krve s ECM, především kolagenem. Krevní destičky adherují, degranulují a začínají produkovat zánětlivé mediátory. Cestou aktivace destičkového faktoru-III, který ve spojení s faktorem-V a Ca^{2+} aktivuje faktor-X, se spustí vnitřní cesta srážecí kaskády. Na druhé straně kontakt s kolagenem a poranění endotelu cévní stěny podporují uvolňování tromboplastinu a von Willebrandovho faktoru, což iniciuje vnější cestu srážení (Furie and Furie, 2005).

Při poranění endotelu destičky adherují k subendotelové vrstvě cévní stěny a dochází tak k jejich aktivaci, která je provázána uvolněním obsahu granul. Destičky obsahují dva hlavní typy granul:

- α -granula (obsahují: PDAF – angiogenní faktor odvozený od destiček, TGF- β , PDEGF – epidermální růstový faktor odvozený od destiček, PF-4 – destičkový faktor 4).
- denzní tělíčka (obsahují ADP – adenosin-difosfát, adrenalin, Ca^{2+} , histamin a serotonin).

Ukázalo se, že faktory obsažené v granulech jsou nevyhnutelné pro normální průběh hojení (Knighton et al., 1988). Těsně po adherenci a aktivaci destiček dochází díky tromboxanu A₂ k jejich agregaci (Kumar, 2003). Z rozpuštěného plazmatického fibrinogenu vznikají nerozpustná vlákna fibrinu a spolu se shluky krevních destiček a fibronektinem vytvářejí zátku, která zabraňuje dalším ztrátám krve (Barbul, 1993). Tato provizorní matrix sestávající z fibrinu a fibronektinu slouží jako kostra pro migrující buňky, které později vytváří granulační tkáň, v níž se fibronektin začne postupně nahrazovat kolagenem (Midwood et al., 2004).

Okamžitě po porušení celistvosti cévy dochází k vazokonstrikci, která je spuštěna narušením buněčné membrány endotelové buňky, přičemž se uvolní zánětlivé mediátory tromboxany a prostaglandiny. Tímto mechanismem, který trvá přibližně čtvrt hodiny, se zabraňuje ztrátám krve. Následně dochází k histaminem indukované vazodilataci, což umožní infiltrovat ránu zánětlivými buňkami (Stadelmann et al., 1998). Díky histaminu se stávají cévy permeabilní, čímž dochází k úniku proteinů a vody do extravaskulárního prostoru, což vede k rozvoji edému. Zvýšená porozita cévních stěn umožní přestup leukocytů do rány a tím i plynulý přechod do poslední a nejdéle trvající reakce zánětlivé fáze (Barbul, 1993).

2.2.2.1.2 Celulární reakce

Polymorfonukleární leukocyty (PMNL), zejména neutrofilů, se začínají objevovat v ráně jako první buňky bílé krevní složky už v průběhu prvních několika hodin po poranění. Jejich počet plynule stoupá a maxima dosahuje okolo druhého dne po poranění (Vidinsky et al., 2006). Vzhledem k tomu, že cirkulující krev obsahuje vysoké procento neutrofilů, relativně velké množství těchto buněk se dostane do místa poranění už během narušení celistvosti cévní stěny. Po tomto pasivním ději neutrofilů aktivně pod vlivem různých chemokinů, migrují do místa poranění (Gillitzer and Goebeler, 2001). Hlavní funkcí PMNL v hojení ran je zabíjení (uvolňováním volných radikálů) a fagocytóza mikroorganismů, jakožto i formování demarkračního lemu, který oddělí odumřelou tkáň od tkáně vitální. V případě absence infekce pak infiltrace rány PMNL rychle klesá. Po třetím dni začnou podléhat apoptóze a jsou fagocytovány makrofágy (Barbul, 1993).

Dva dny po poranění začínají postupně nahrazovat PMNL tkáňové makrofágy (Kumar, 2003). Tyto buňky jsou chemotakticky přitahovány do rány pomocí cytokinů a chemokinů produkovaných krevními destičkami a ostatními přítomnými buňkami. Na základě těchto signálů přestupují cirkulující monocyty přes cévní stěnu do místa poranění a mění se na tkáňové makrofágy. Makrofágy mají v procesu reparace tkání několik důležitých úloh: prezentaci antigenu, fagocytózu a produkci růstových faktorů. Na druhé straně se předpokládá jejich negativní dopad na výsledný vzhled jizvy (Rodero and Khosrotehrani, 2010). Makrofágy přispívají k degradaci ECM, protože produkují celou řadu proteináz (Riches et al., 1996). Během třetího a čtvrtého dne hojení začíná v ráně převažovat produkce růstových faktorů, mezi něž patří TGF- α , TGF- β , IGF, TNF- α (tumor nekrotizující faktor- α), či IL-1 (interleukin-1), které stimulují postupný přechod do proliferační fáze hojení (Werner and Grose, 2003). TGF- β stimuluje syntézu kolagenu, IL-1 a TNF- α ji inhibují. TNF- α má silný prozánětlivý a makrofágy aktivující efekt. Makrofágy produkovaný TGF- α , TGF- β a IGF (inzulinu podobný růstový faktor) modulují proliferaci a migraci keratinocytů. Makrofágy jsou hlavním zdrojem NO v ráně (Rizk et al., 2004). Na regulaci migrace makrofágů se podílí také cytokin MIF (migraci makrofágů inhibující faktor) (Gilliver et al., 2011).

Dalším typem buněk, které sehraávají úlohu v průběhu zánětlivé fáze hojení rány, jsou T-lymfocyty produkující celou řadu lymfokinů (Schaffer and Barbul,

1998), prostřednictvím nichž jsou schopné modulovat mnohé funkce buněk zapojených do hojení ran.

2.2.2.2 Proliferační fáze - tvorba granulační tkáně

V případě, že hojení probíhá bez infekce, zánětlivá fáze plynule přechází do proliferační fáze hojení, která začíná druhý až třetí den po poranění (Barbul, 1993). Proliferační fáze je charakteristická tvorbou granulační tkáně, která je tvořená fibroblasty, endotelovými buňkami, zánětlivými buňkami a nově vytvořenou ECM (Kumar, 2003). Tuto fázi je možné rozdělit na dva procesy formující novou tkáň.

2.2.2.2.1 Fibroplazie a produkce extracelulární matrix

Fibroblasty se začínají objevovat v ráně od druhého dne po poranění a jejich počet dosahuje maxima po týdnu hojení (Kumar, 2003). Toto relativně rychlé osídlení rány fibroblasty je možné díky kombinaci procesů proliferace a migrace (Ross et al., 1970). Pro novotvorbu tkáně se k těmto procesům musí přidat ještě depozice ECM. Fibroblasty pochází z okolní intaktní tkáně. Účast kmenových buněk kostní dřeně se zdá být omezená na zánětlivou fázi hojení, neboť většina těchto buněk se diferencuje na buňky imunitního systému (Barisic-Dujmovic et al., 2010). Přisun fibroblastů do rány je řízený chemotakticky cytokiny a chemokiny uvolněnými z krevních destiček, makrofágů a lymfocytů. Tyto buňky představují hlavní syntetický aparát v novotvorbě ECM, která sestává z fibronektinu, kolagenu, glykosaminoglykanů, elastinu, glykoproteinů a proteoglykanů (Sorrell and Caplan, 2009). Především hyaluronan a fibronektin vytvářejí vhodné vlhké prostředí pro migraci buněk.

Depozice kolagenu v novotvořené tkáni je klíčová pro zabezpečení mechanické pevnosti budoucí jizvy (Gal et al., 2006). Od třetího dne se v ráně produkuje kolagen typu III spolu s fibronektinem, jejich maximální produkce nastává přibližně dva týdny po poranění (Lawrence, 1998). Kolagen typu III tvoří retikulární vlákna, která jsou v nejranějších fázích maturace rány nahrazen kolagenem typu I za současného poklesu exprese fibronektinu (Kumar, 2003).

Mezi hlavní růstové faktory stimulující chemotaxi fibroblastů a produkci ECM patří TGF- β . Především TGF- β 1 zvyšuje migraci fibroblastů a stimuluje jejich

diferenciaci na myofibroblasty (Brenmoehl et al., 2009), které zabezpečují kontrakci rány. Mimoto je diferenciace fibroblastů indukována i některými izoformami PDGF produkovanými krevními destičkami a makrofágy (Peacock, 1978). Diferencované myofibroblasty migrují po provizorní ECM tvořené fibrinem a fibronectinem až k okrajům rány, kde pomocí integrinů vytváří spojení s ECM a taktéž se pojí i mezi sebou pomocí desmozomů. Takto zasíťované buňky jsou následně schopny kontrahovat ránu za účasti kontraktilní molekuly hladkosvalového aktinu, jež je přes buněčnou membránu v kontaktu s kolagenem a fibronectinem spojen nazývaným fibronexus (Hinz, 2006). Dalším důležitým růstovým faktorem je FGF (fibroblastový růstový faktor), který taktéž stimuluje fibroplazii.

2.2.2.2.2 Angiogenese

Intenzivně probíhající procesy fibroplazie a reepitelizace si vyžadují neustálý přísun kyslíku a živin. Za těchto okolností vzniká v ráně akutní hypoxické prostředí, které vede ke stimulaci angiogeneze. Na druhé straně je dobře známo, že chronická hypoxie zpomaluje všechny procesy reparace tkání (Tandara and Mustoe, 2004). Za normálních okolností začnou do granulační tkáně prorůstat proudy endotelových buněk, které pučí z okolních cév a vytváří kapilární řečiště. Endotelové buňky jsou do novotvořené tkáně přitahovány fibronectinem a angiogenními faktory, které produkují zejména makrofágy a krevní destičky ještě v období akutní hypoxie. Přítomnost laktátu v ráně taktéž stimuluje pučení cév. Hlavní růstový faktor stimulující angiogenezi je VEGF (cévní endotelový růstový faktor). Tento faktor je produkován mnohými mezenchymovými a intersticiálními buňkami, avšak jeho receptory se ve většině případů exprimují pouze na endotelových buňkách (Kumar, 2003).

Na to, aby endotelové buňky mohly migrovat do novovytvořené tkáně, potřebují enzymy, které jim okolní tkáň natráví. Mezi hlavní proteiny zapojené do tohoto procesu patří matrixové metaloproteinázy (MMP) a plazmin. MMP jsou na zinku závislé endopeptidázy schopné natrávit bazální membránu a ECM a tím se podílet na remodelaci tkáně (Goetzl et al., 1996). Rozlišujeme 5 základních skupin MMP (Visse and Nagase, 2003):

- kolagenázy (MMP-1, -8, -13 a -18),
- gelatinázy (MMP-2 a -9),

- stromelyziny (MMP-3, -10 a -11),
- matriliziny (MMP-7 a -26) a
- membránové matrixové metaloproteinázy (MMP-14, 15, 16, 17, 24 a 25).

Mimo tyto existuje ještě sedm dalších neklasifikovaných MMP, které exprimují především makrofágy (Shapiro et al., 1993).

Kolagenáza-I (MMP-1), -II (MMP-8) a -III (MMP-13) štěpí vláknité kolageny třech typů (I, II a III) tvořící fibrily struktury trojitého helixu (Visse and Nagase, 2003). Gelatináza A (MMP-2) a B (MMP-9), degraduje denaturovaný kolagen (želatinu) a MMP-2 je navíc schopna degradovat kolagen I, II a III (Patterson et al., 2001). Stromelyziny-1 (MMP-3) a -2 (MMP-10) jsou schopné štěpit komponenty ECM, ale nejsou schopny natrávit kolagenové fibrily struktury trojitého helixu. Matriliziny-1 (MMP-7) a -2 (MMP-26) jsou schopny natrávení komponent ECM. Matriliziny-1 mimo to ještě zpracovávají některé povrchové molekuly, mezi něž patří např. E-kadherin, Fas-ligand a jiné (Visse and Nagase, 2003). Poslední třídu tvoří s plazmatickou membránou a buněčným povrchem asociované MMP-14, 15, 16, 17, 24, and 25 (MT1- až MT6-MMP), které jsou schopny natrávit mnohé komponenty ECM. MT1-MMP má dokonce kolagenolytickou aktivitu (Ohuchi et al., 1997).

Exprese mnohých MMP je stimulována stejnými růstovými faktory jako migrace endotelových buněk během angiogeneze. Mezi tyto růstové faktory zařazujeme VEGF, TNF- α a FGF (Cornelius et al., 1998). Avšak aktivované MMP jsou rychle inhibované rodinou specifických tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz (TIMP-1, -2, -3 a -4) (Visse and Nagase, 2003). Až na několik málo výjimek jsou TIMP schopny inhibovat všechny typy MMP. Úlohou TIMP je kontrolovat funkci kolagenáz. Metaloproteinázy a jejich tkáňové inhibitory se tak podílejí na regulaci přestavby tkáně a procesu hojení rány. Ke konci proliferační fáze, v důsledku pokročilé angiogeneze, zaniká v ráně hypoxické prostředí. Na základě této změny buňky přestávají produkovat pro-angiogenní faktory. Výsledkem je redukce proliferace a migrace endotelu a zpomalení až zastavení celého procesu angiogeneze.

2.2.2.3 Maturační fáze

Maturační fáze představuje poslední fázi procesu reparace tkání. Charakterizuje ji remodelace ECM (Kumar, 2003). Po akumulaci dostatečného množství komponent ECM v místě poranění rána pokračuje v kontrakci, která začala na vrcholu proliferační fáze. Tento proces je velmi důležitý především pro uzavření ran s velkým tkáňovým defektem a vede též k redukci objemu výsledné jizvy (Barbul, 1993).

Postupně začíná klesat syntéza kolagenu typu III, který je navíc degradován a začíná vzrůstat produkce kolagenu I, který se postupně uspořádává do kolagenových fibril s podstatně vyšší mechanickou pevností (Peacock, 1978). Avšak ještě i po třech týdnech hojení v granulační tkáni převažuje kolagen III nad kolagenem I, což je přesně opačně než v intaktní dermis. Metabolismus kolagenu je regulován cestou aktivit jednotlivých MMP a mírou syntézy samotného kolagenu. V ranných fázích hojení rány jsou kolagení fibrily uspořádané náhodně. Toto jejich uspořádání může zčásti vysvětlovat fakt, že rány v časných stádiích hojení jsou sice bohaté na kolagen, ale jsou také charakteristické relativně nízkou mechanickou pevností (Baum and Arpey, 2005). Později se mezi fibrilami kolagenu začínají vytvářet křížové vazby a dochází tak k remodelaci kolagenu, což vede ke zvýšení pevnosti rány v tahu. Mechanická pevnost však stoupá pomalu, rána dosahuje na začátku maturační fáze hojení pouze 5% pevnosti zdravé kůže a i po ukončení hojení dosáhne pouze přibližně 80% pevnosti intaktní kůže (Burkitt, 1990).

Zatímco rány na vrcholu proliferační fáze hojení obsahují bohatou kapilární síť, počet cév v ranách během maturační fáze se výrazně redukuje (Kumar, 2003). Tak, jako ubývají kapiláry v granulační tkáni, snižuje se i infiltrace rány fibroblasty. Tento děj vede k postupnému poklesu produkce kolagenu. Výsledkem těchto procesů je vznik avaskulární a acelulární jizvy tvořené kolagenem typu I. Procesy, které jsou základem remodelace ECM, probíhají s největší intenzitou prvních 6 měsíců hojení, ovšem v menší míře přetrvávají celý život (Peacock, 1978).

2.3 Základní znaky podobnosti rány a nádoru

Ukázalo se, že biologicky aktivní fibroblasty a epitel-mezenchymová interakce (EMI) hrají v procesech vzniku a růstu nádorů a hojení ran klíčovou roli (Choe et al., 2013; Chong et al., 2009). O těchto podobnostech mezi nádorem a ránou bylo spekulováno již v 80-tých letech minulého století (Dvorak, 1986). V poslední době však došlo k značnému vývoji pohledu na roli nádorového stromatu v procesech růstu a metastazace nádoru. Na rozdíl od předchozích názorů dnes již nádorové stroma není chápáno pouze jako podpůrná část nádoru, ale je považováno za důležitou aktivní složku ovlivňující jeho biologickou aktivitu (Plzak et al., 2010). Předpokládá se, že stroma tvoří vhodné mikroprostředí pro proliferaci a migraci buněk nádorového parenchymu a umožňuje nidaci metastazujících buněk. Používaným názvem pro toto prostředí je "niche". Podobně jako je tomu při zranění granulační tkáně dochází v nádorovém stromatu k permanentní remodelaci (Egeblad et al., 2010; Li et al., 2007). Nádorové stroma má tak obdobnou funkci jako niche, které ke své činnosti vyžadují kmenové buňky (Watt and Fujiwara, 2011).

Je dlouhou dobu známo, že nádorové stroma má morfologickou strukturu podobnou s granulační tkání avšak rozdílnou ve srovnání s mezenchymovou složkou zdravé tkáně. Nádorové stroma/granulační tkáň jsou komplexní útvary složené z fibroblastů, ECM, cév a různých typů leukocytů (Gal et al., 2008; Plzak et al., 2010; Polyak et al., 2009). Nejpočetnější buněčnou složkou stromatu/granulační tkáně jsou fibroblasty. Jejich původ v případě nádorů není zcela jasný. O těchto nádorově asociovaných fibroblastech se předpokládá, že mohou vznikat z lokálního mezenchymu vlivem parakrinní aktivity nádorového parenchymu, epitel-mezenchymovým přechodem, ale i například z cirkulujících mezenchymových kmenových buněk kostní dřeně (Mishra et al., 2009). Na druhé straně jejich vznik z nádorových buněk se po transplantaci nádorových buněk do nu/nu myší nepodařilo prokázat (Dvorankova et al., 2015). Předpokládá se, že nádorově asociované fibroblasty hrají důležitou roli při tvorbě mikroprostředí podobného niche, které je vhodné pro udržování kmenovosti buněk (De Wever and Mareel, 2003; Motlik et al., 2007; Szabo et al., 2011).

V současnosti je na rakovině onemocnění nahlíženo jako na onemocnění kmenových buněk (Smetana et al., 2010). Hypotéza tzv. nádorových kmenových

buněk (cancer stem cells) byla vyslovena na konci osmdesátých let minulého století. Nádorové kmenové buňky pravděpodobně vykazují schopnost asymetrického dělení a mají schopnost rezistence vůči cytostatické léčbě a ionizujícímu záření (Pine and Liu, 2014). Z toho vyplývá, že jsou odpovědny za relaps onemocnění po léčbě (Ailles and Weissman, 2007; Cordon-Cardo, 2010). Je známo, že normální dospělé kmenové buňky, které se účastní regenerace tkání, potřebují specifické mikroprostředí, které sehraává zásadní roli při udržování jejich kmenových vlastností. Z tohoto pohledu se jeví jako nejvíce pravděpodobné, že toto mikroprostředí budou vyžadovat i nádorové kmenové buňky. V nádorech je toto prostředí vytvářeno nádorovým stromatem (Li and Neaves, 2006). Z výše uvedeného vyplývá, že maligní tumory jsou komplexními systémy (Egeblad et al., 2010) s určitou zásobou kmenových nebo progenitorových buněk (Sell, 2010). Poslední studie v oblasti glykobiologie nádorů naznačují, že právě mezibuněčné interakce zprostředkované cukry by mohly tvořit nadějný cíl nové generace protinádorové terapie (Smetana et al., 2013).

2.4 Základní modely hojení ran

Použití jednoduchého a reprodukovatelného modelu představuje základní kámen pro objektivní testování vlivu různých vnějších faktorů na fyziologické a patologické procesy organismů včetně hojení ran (Gal et al., 2008). Otázkou však zůstává, do jaké míry jsou modely schopny odrazit reálnou situaci, kterou nám předkládá život. Ideální animální model by měl z klinického pohledu odrážet etiologii a patogenezi rány. Avšak žádný model nesplňuje toto kritérium (Gottrup et al., 2000).

Při výběru vhodného modelu se nabízí celá škála organismů od jednobuněčných až po šimpanze. Samotné modely lze dělit na *in vitro* a *in vivo*. Výhodou *in vitro* modelů ve výzkumu hojení ran je možnost přímého zkoumání úlohy buněčného a molekulárního mechanismu či vnějšího faktoru na danou buněčnou populaci bez externích vlivů (Gottrup et al., 2000). Na druhé straně z této relativní výhody vyplývá zásadní nevýhoda v extrapolaci výsledků do reálné situace, která se odehrává v hojící se ráně. Hlavní výhodou *in vivo* modelů je to, že rány lze modelovat velmi reálně v porovnání s klinickou situací.

Při výběru vhodného modelu reparace tkání je potřebné přihlížet k více skutečnostem. Model musí mít reprodukovatelné poranění, musí být realizovatelný ve standardních zvěřincích alespoň na dvou animálních druzích, z rány musí být možné odebrat více bioptických vzorků a v neposlední řadě by ideální model měl být časově a manipulačně nenáročný (Leader and Padgett, 1980).

2.4.1 *In vitro* modely

Buněčné a tkáňové kultury představují rychlou a jednoduchou cestu jak se dostat k předbežným výsledkům, případně jak objasnit pozorovaný efekt na buněčné úrovni. Moderní kultivační techniky, jako např. insertové ko-kultury, přinesly nové možnosti v modelování a sledování buněčných interakcí mezi dvěmi až třemi buněčnými liniemi (Strnad et al., 2010). Z pohledu hojení ran jsou nejzajímavější kultury endotelových buněk, fibroblastů a keratinocytů. U těchto buněčných linií je možné sledovat základní procesy hojení, mezi které patří migrace, proliferace a syntéza proteinů (včetně sledování diferenciačních znaků a novotvorby ECM).

Z pohledu objasnění mechanismu účinku na jednotlivou buněčnou populaci představují jednobuněčné (tzv. monokultura) systémy optimální model (Gottrup et al., 2000). Buňky mohou růst na jednoduchých plastových či skleněných povrchích, případně na speciálních substrátech, mezi které patří kolagen, želatina, fibrin, fibronectin, či různé polymery. V případě přímé či nepřímé kokultivace více buněčných linií hovoříme o vícebuněčném (tzv. kokultura) systému, ve kterém lze sledovat mezibuněčné interakce (Kunz-Schughart et al., 1998).

2.4.1.1 Migrační test

Migrace představuje základní proces zapojený do reepitelizace, angiogeneze a fibroplazie. V tomto jednoduchém testu je možné sledovat vliv určité látky či prostředí na rychlost migrace buněk buď v monokultuře (Cheung and Li, 2002), nebo insertové kokultuře (sleduje se vliv např. fibroblastů uložených v insertu na migraci keratinocytů uložených pod insertem na spodině kultivační desky nebo opačně).

2.4.1.2 Proliferační test

Vzhledem k tomu, že samotná migrace nestačí k tomu, aby se do rány dostal dostatečný počet buněk schopných úspěšného vyhojení, je potřeba, aby se počet buněk zvýšil mitotickým dělením (Kumar, 2003). Z toho důvodu je pro hojení zajímavá i buněčná proliferace, která může být studována různými způsoby od jednoduchého počítání buněk až už manuálně nebo pomocí přístroje (Calderon et al., 1996), až po sofistikované značení DNA a využití průtokové cytometrie (Stal et al., 1986).

Na druhé straně lze sledovat proliferaci buněk pomocí speciálních protilátek, které jsou charakteristické pro syntézu DNA, jako jsou např. Ki67 (Scholzen and Gerdes, 2000) a nebo PCNA (proliferační buněčný jaderný antigen).

2.4.1.3 Testy syntézy proteinů a exprese genů

Produkty proteinů média lze hodnotit více způsoby. Například produkce růstových faktorů se dá měřit v supernatantu metabolizovaného kultivačního média pomocí

ELISA (s enzymem spojený imunoabsorbční) testu (Germeyer et al., 2009). Produkce komponentů ECM se dá vizualizovat imunohistochemicky. Důležitou součástí novotvořené ECM je kolagen. Produkci kolagenu je možné měřit jednak pomocí metody RIA (radioimunostanovení) (Rasmussen et al., 1992), nebo po natrávení pepsinem a separaci produktu elektroforeticky na gelu (Miller and Rhodes, 1982).

Dalším významným znakem v případě hojení ran je diferenciace buněk. Tento stav je možné také zobrazovat pomocí různých diferenciačních znaků/proteinů. Pro hojení je zajímavá především normální diferenciace keratinocytů (Wertheimer et al., 2001) a přeměna fibroblastů na myofibroblasty (Hinz et al., 2007). Tyto procesy se dají imunohistochemicky relativně jednoduše detekovat.

V neposlední řadě lze po izolaci RNA z buněk detekovat expresi všech genů pomocí moderních technik micro-array čipů nebo jednotlivě tradiční RT-PCR (reverzní transkriptáza - polymerázová řetězová reakce) nebo modernější kvantitativní qRT-PCR technikou.

2.4.2 *In vivo* modely

Potkani patří mezi nejběžněji používaná zvířata ve výzkumu hojení ran (Dorsett-Martin, 2004). Animální modely hojení ran můžeme rozdělit na akutní, kde je na různých typech ran sledovaný průběh hojení za normálních okolností u jinak zdravých jedinců, dále na modely alterovaného hojení a nakonec na modely s chronickým hojením.

2.4.2.1 Modely akutního hojení

Akutní modely reflektují biologické pochody v ranách, které probíhají po chirurgickém výkonu nebo traumatu za ideálních podmínek (Davidson, 1998). Takové hojení se vyskytuje u zdravých jedinců, u kterých rány nebyly infikovány. Známe tři základní modely hojení:

- incizní,
- excizní,
- popáleninový (Dorsett-Martin, 2004).

2.4.2.1.1 Incizní model

Tento model je optimální pro simulaci operačních ran. Rány je možné vytvořit standartním chirurgickým skalpelem, případně elektrokauterem, či jiným zařízením (např. laserem). V případě, že se rána uzavře suturami, jedná se o primární hojení, *sanatio per primam intentionem*. Nejčastěji se na uzávěr ran používají jednoduchý a intradermální steh. Při práci s laboratorními zvířaty je použití intradermálního stehu vhodnější, neboť zvíře není iritováno z rány vyčnívajícím šicím materiálem a následná manipulace se vzorkem při odběru na histologické vyšetření a měření pevnosti ran je rychlejší a jednodušší (Gal et al., 2009). V případě, že se rána ponechá otevřená, dochází k výrazné tvorbě granulační tkáně a takové hojení nazýváme sekundární, *sanatio per secundam intentionem* (Kumar, 2003). Incizní rána je vhodná na histologické vyšetření a na měření pevnosti v tahu.

2.4.2.1.2 Excizní model a model mrtvého prostoru

V případě, že dojde k úplnému odstranění určitého množství tkáně, hovoříme o excizní ráně. Taková rána se vždy hojí sekundárně (Kumar, 2003). Protože se v tomto typu rány tvoří tkáň v relativně velkém množství (v závislosti na velikosti defektu), je tento model v porovnání s incizním vhodný i na další vyšetření, mezi něž patří izolace proteinů, nukleových kyselin s následným sledováním exprese genů, či měření kontrakce rány. V porovnání s incizní ránou je rána excizní vhodnější na histologické vyšetření, protože tu dochází k podstatně širším histologickým změnám (Gal et al., 2008).

Excizní rány mohou zasahovat do různé hloubky kůže. Jsou známy modely ran, které postihují pouze epidermis, avšak nejčastěji se vytvářejí experimentální rány probíhající celou hloubkou kůže (Davidson, 1998).

Pokud nás zajímá pouze tvorba granulační či spojivé tkáně (jde tedy o sekundární hojení a proto můžeme tento model řadit mezi excizní modely), jsou pro tyto účely nejvhodnější modely tzv. mrtvého prostoru. V tomto případě se nejčastěji používají celulózni a silikonové implantáty či implantáty na bázi syntetických polymerů různých tvarů, které se skrz drobnou incizi zavedou do

podkoží experimentálního zvířete (Davidson, 1998). Ideální jsou nedegradovatelné a inertní implantáty. Jejich hlavní výhodou je, že mají definovaný rozměr a jsou tedy vhodné k přesnému stanovení obsahu různých biochemických produktů.

Modernější způsob je využití matrigelů, do kterých je možné velmi jednoduše přimísit sledovanou látku s očekávaným modulačním účinkem na angiogenezi, případně fibroplazii (Lo et al., 2010).

2.4.2.1.3 Popáleninový model

Popáleninové úrazy jsou relativně běžné, a tak se tento model zařadil mezi tři základní modely akutního hojení ran. Popálenina může být způsobena agresivní chemikálií, chladem, elektrickým proudem, teplem, či zářením (Sevitt, 1979).

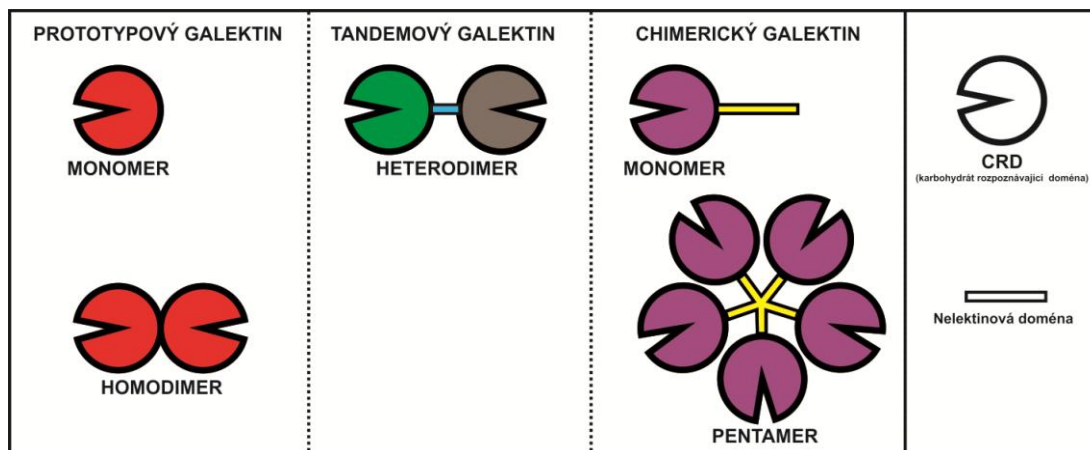
Podle hloubky poškození tkáně dělíme popáleniny na 4 stupně. Popálenina prvního stupně zasahuje pouze epidermis a je charakteristická zčervenáním postiženého místa. Při popálenině druhého stupně dochází k poškození epidermo-dermálního spojení a tvorbě puchýřů. Dermis je v tomto případě poškozená, nikdy však v celém rozsahu. V případě popáleniny třetího stupně dochází k poškození kůže v celé své hloubce. Dojde-li k zuhelnatění kůže, podkoží a struktur nacházejících se pod kůží, jako jsou např. svaly, jedná se o popáleninu čtvrtého stupně (Perry et al., 1996).

2.5 Galektiny

První galektin (Gal) byl objeven v roce 1975 Vivianem Teichbergem z extraktu elektrického úhoře, jako hemaglutinin s nízkou molekulární hmotností (14-16 kDa), vážící beta-galaktosidy (Teichberg et al., 1975). Tento protein byl označen jako elektrolektin – dnes nazývaný Gal-1 (nová systematická nomenklatura označuje galektiny arabskými číslicemi na základě pořadí jejich objevu). Později byly objeveny podobné lektiny v dalších tkáních různých živočišných druhů včetně člověka.

Galektiny mají mnoho znaků cytoplazmatických proteinů, jsou syntetizovány cytosolickými ribosomy, nemají disulfidické můstky, sacharidové řetězce ani žádnou signální sekvenci a ve většině případů je jejich N-konec acetylován (Leffler et al., 2004). Morfologická lokalizace galektinů není omezena pouze na cytoplazmu, ale nacházejí se v závislosti na typu galektinu i v jádře, cytosolu a mezibuněčných prostorech (Gendronneau et al., 2008). Základem jejich struktury je přítomnost tzv. sacharid-rozpoznávající domény CRD (carbohydrate recognition domain) tvořené přibližně 130 aminokyselinami. V závislosti na jejich struktuře a počtu CRD jsou galektiny rozdělené do 3 skupin (Obr. 1) (Hirabayashi and Kasai, 1993). 1) prototypové galektiny, obsahující buď jednu (monomer) nebo dvě identické nekovalentně spojené CRD (homodimer) (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 a -15); 2) chiméra typ galektin, který je reprezentován pouze Gal-3, jež je složen z nelektinové domény napojené na CRD; a 3) tzv. tandemové galektiny, sestávající ze 2 CRD navzájem spojených krátkým polypeptidovým řetězcem (Gal-4, -6, -8, -9, a -12).

Funkční interakce Gal s glykokonjugáty ovlivňují adhezi buněk a buněčnou signalizaci. Interakce Gal s intracelulárními ligandy ovlivňuje množství signálních cest (Cummings and Liu, 2009). Díky těmto funkčním interakcím jsou Gal zapojeny do mnohých biologických dějů zasahujících do funkce buněk, jako například: růst, diferenciaci, proliferaci, migraci (Hsu and Liu, 2004), sestřih mRNA (Liu et al., 2002), adheze (Hughes, 2001), chemotaxe (Sano et al., 2000) a apoptóza (Hsu et al., 2006).



Obr. 1 Základní schema struktury galektinů

2.5.1 Role galektinů I. skupiny v reparaci tkání a růstu nádorů

2.5.1.1 Galektin-1

Gal-1 je přítomen intra i extracelulárně (Camby et al., 2006) a zasahuje do mnohých fyziologických a patologických procesů. Ukázalo se, že Gal-1 je ve zvýšené míře přítomen v buňkách a mezibuněčné hmotě stromatů různých lidských nádorů a v granulační tkáni hojící se rány (Klima et al., 2009; Thijssen et al., 2010; Thijssen et al., 2007). Tento galektin rozpoznává poly-N-acetyllaktosaminové epitopy nacházející se na množství glykoproteinů a některých glykolipidech.

Gal-1 je ve zvýšené míře exprimován v zánětlivé fázi hojení ran u prasat (Klima et al., 2009) a má protizánětlivý účinek, který souvisí se supresí prozánětlivých mediátorů IL-2, TNF- α , IFN- γ (interferon gama) (Rabinovich et al., 1999a), a indukci protizánětlivých mediátorů IL-10, IL-5 a TGF- β (van der Leij et al., 2004). Proto se více studií orientuje tímto směrem a snaží se najít využití Gal-1 v léčbě chronických zánětlivých onemocnění, jako je artritida (van der Leij et al., 2004), kolitida (Rabinovich et al., 1999a) a chronická pankreatitida (Wang et al., 2000).

Na druhé straně se též ukázalo, že Gal-1 v nízkých koncentracích významně podporuje růst buněk (Wang et al., 2000) a zvyšuje adhezi buněk k mezibuněčné hmotě (van den Brule et al., 2004). Gal-1 může interagovat s integrinovými receptory a indukovat anoikis (programovaná buněčná smrt indukovaná ztrátou kontaktu buňky s ECM) (Adams et al., 1996; Andre et al., 2007). Zajímavé bylo zjištění, že Gal-1

existuje i v oxidované formě, která ztratila lektinovou aktivitu. Tato oxidovaná forma však urychluje regeneraci axonů periférních nervů (Miura et al., 2004).

Bylo dokázáno, že tento endogenní lektin hraje významnou úlohu v nádorové angiogenezi a taktéž v samotném růstu a metastázování nádorů (Laderach et al., 2013; Saussez et al., 2008). Přesná biologická funkce Gal-1 při tvorbě nádorového mikroprostředí a hojení ran ale zůstává stále předmětem dalšího výzkumu. Nicméně již dnes jsou známy mnohé samostatné mechanismy, kterými Gal-1 stimuluje angiogenezi. Jedním z nich je interakce s neurolipinem-1 na povrchu endotelových buněk, který se chová jako ko-receptor pro receptor cévního endotelového růstového faktoru (VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor). Neurolipin zvyšuje fosforylaci VEGFR, což následně aktivuje mitogenem-aktivovanou protein kinázu (MAPK) (Saussez et al., 2009). Dalším z mechanismů je stimulace proliferace, adheze a migrace endotelových buněk jako důsledek aktivace Ras-Raf-Erk signální dráhy (Thijssen et al., 2010). Ukázalo se, že exogenní aplikace Gal-1 stimuluje proliferaci a migraci endotelových buněk jakožto i tvorbu cév v *in vitro* (D'Haene et al., 2013; Hsieh et al., 2008; Saussez et al., 2009) a *in vivo* (Thijssen et al., 2010) podmínkách. Zvýšená exprese Gal-1 v nádorových endotelových buňkách byla pozorována ve zvířecích i lidských nádorech (Ito et al., 2011; Thijssen et al., 2008). Navíc, vyřazení genu pro Gal-1 v nádorových buňkách vedlo ke snížení růstu nádoru inhibicí angiogeneze (Clausse et al., 1999).

Špatná prognóza spojená s upregulací Gal-1 je spojená i s únikem nádorových buněk imunitnímu dozoru a apoptózou T-lymfocytů (Rabinovich et al., 1999b). Gal-1 tak může být cílem, který by mohl spojit protinádorovou terapii a léčbu ran.

2.5.1.2 Galektin-2

Gal-2 je dominantně exprimován v gastrointestinálním traktu (Paclik et al., 2008a). Bylo dokázáno, že signifikantně zlepšuje obnovení střevního epitelu nezávisle na TGF- β , což je skutečnost, která může najít uplatnění při léčbě zánětlivých onemocnění střevní stěny (IBD – inflammatory bowel disease) (Paclik et al., 2008b). V epidermis jsou vazebná místa pro Gal-2 přítomna v normálním i transformovaném epitelu. U stresovaných buněk je Gal-2 lokalizovaný v PML (promyelocytický leukemický protein) tělískách buněčných jader (Dvorankova et al., 2008).

2.5.1.3 Galektin-7

Gal-7 se exprimuje ve vícevrstvých epitelech: epidermis, cornea, ústní dutina, oesophageus, anorektální epitel (Magnaldo et al., 1998). Je asociovaný s migrací epitelových buněk, kde sehrává významnou úlohu v procesu reepitelizace kůže a rohovky (Cao et al., 2003). Ukázalo se, že tento galektin je exprimovaný i v průdušnici a hraje úlohu při dozrávání folikulů v ováriu (Sato et al., 2002a; Saussez and Kiss, 2006). Gal-7 rovněž působí jako pro-apoptotický faktor prostřednictvím p53 (Polyak et al., 1997). U nádorů vycházejících z dlaždicového epitelu je exprese Gal-7 významně snižená (Cada et al., 2009).

2.5.1.4 Galektiny-5, -10, -11, -13, -14 a -15

Tyto galektiny nehrají podle doposud známých literárních dat až tak významné úlohy v tkáňové reparaci (Rapoport et al., 2008). Ukázalo se, že Gal-5 je lokalizován v cytosolu a na povrchu retikulocytů a erytrocytů a podílí se na diferenciaci erytroblastů na zralé erytrocyty (Barres et al., 2010). Gal-10 se exprimuje v eozinofilních granulocytech, kde vytváří krystalické formy známé jako Charcot-Leydenovy krystaly. Na rozdíl od ostatních galektinů vykazuje o mnoho vyšší afinitu pro manózu jako i pro beta-galaktosidy (Cummings and Liu, 2009). Gal-11 se exprimuje v gastrointestinálním traktu (Barres et al., 2010). Z onkologického pohledu je zajímavý Gal-13, který je exprimován v makrofázích, NK-buňkách a v mnohých typech nádorů (např.: karcinom prsu, adenokarcinom prostaty, maligní melanom atd.). Zvýšená exprese Gal-13 vede k indukci apoptózy buněk prostřednictvím JNK/sePK (C-junN-terminální kináza / stresem aktivovaná proteinkináza) aktivace (Boronkai et al., 2009). K uvolnění Gal-14 dochází při alergických zánětech respiračního traktu a parazitárních infekcích gastrointestinálního traktu. Během těchto zánětů ovlivňuje adhezi buněk a mění vlastnosti epitelu (Young et al., 2009). Gal-15 byl lokalizován v epitelových buňkách endometria a v zárodečných buňkách trofoektodermu. Extracelulárně reguluje migraci buněk trofoblastu a jejich adhezi k epitelu endometria. Intracelulárně ovlivňuje přežití, růst a diferenciaci buněk trofoblastu. Zároveň může sloužit jako znak funkce endometria a plodnosti (Gray et al., 2004).

2.5.2 Role galektinů II. skupiny v reparaci tkání a růstu nádorů

2.5.2.1 Galektin-3

Gal-3 je exprimován v aktivovaných makrofázích, eozinofilech, mastocytech, fibroblastech, epitelových buňkách gastrointestinálního a respiračního traktu, ledvinách a sensorických neuronech. Tento lektin je schopný zrychlit epitelizaci ran (Cao et al., 2002). Podobně se ukázalo, že Gal-3 stimuluje proliferaci stelárních buněk jater (Maeda et al., 2003) a rovněž je modulátorem interakcí buňka-mezibuněčná hmota (Matarrese et al., 2000). Z tohoto pohledu bylo logické zjištění, že Gal-3 je významným induktorem tkáňové fibrózy v různých tkáních (de Boer et al., 2009; Henderson et al., 2008; Henderson et al., 2006; Wang et al., 2000). Výrazný vzestup koncentrace Gal-3 exprimovaného na povrchu, ale i v cytoplasmě alveolárního epitelu byl pozorován při rozvoji plicní fibrózy (Kasper and Fehrenbach, 2000). Navíc se ukázalo, že Gal-3 aktivuje tvorbu myofibroblastů a fibrózu jater a ledvin (Henderson et al., 2008; Henderson et al., 2006).

Z pohledu hojení a tvorby nádorů je zajímavý i vliv galektinů na zánět. Obecně působí Gal-3 jako prozánětlivý faktor (Cummings and Liu, 2009). Inhibuje uvolňování protizánětlivého IL-5 a to zejména v eozinofilech, ovšem na druhé straně může aktivovat mastocyty, neutrofilů, monocytů a bazofilů (Zuberi et al., 1994). Navíc měli Gal-3 deficitní makrofágy o mnoho nižší schopnost chemotaxe a fagocytózy (Sano et al., 2003). Gal-3 sehrává klíčovou úlohu v ranné fázi zánětu, prostřednictvím jeho vazby na integrinové receptory a patří k důležitým modulátorům funkce neutrofilů. Interaguje s povrchovým receptorem neutrofilů CD66b, který je zodpovědný za aktivaci NADPH (nikotin amid adenin dinukleotid fosfát) oxidázy (Almkvist et al., 2002), čímž indukuje respirační vzplanutí neutrofilů (Hsu and Liu, 2004). Zlepšuje adhezi neutrofilů k lamininu (Kuwabara and Liu, 1996), podporuje jejich extravazaci do zánětlivého ložiska (Sato et al., 2002b). Ukázalo se, že tyto regulace probíhají přes alternativní MAPK cestu (Fernandez et al., 2005).

Gal-3 výrazně ovlivňuje proces apoptózy buněk. Intracelulárně působí jako antiapoptický faktor T lymfocytů a nádorových buněk (Yang et al., 1996), avšak nízké dávky exogenně přidaného Gal-3 indukují proapoptický signál (Fukumori et al., 2003). Zvýšená exprese Gal-3 byla pozorována při mnohých typech karcinomů. Gal-3 zvyšuje invazivitu nádoru a podporuje tvorbu metastáz (Matarrese et al.,

2000). Podobně jako Gal-1 i Gal-3 je zapojen do procesu nádorové angiogeneze. Je schopen stimulovat angiogenesi ovlivněním funkce VEGF a bazálního fibroblastového růstového faktoru (bFGF). K tomuto účinku dochází po navázání Gal-3 na $\alpha_v\beta_3$ integrin na povrchu endotelových buněk. Tato interakce aktivuje FAK (fokálně adhezní kináza), což následně vede k VEGF- a bFGF-zprostředkované tvorbě cév (Markowska et al., 2010). Exogenně přidaný Gal-3 zvyšuje angiogenní odpověď *in vitro* a stimuluje vaskularizaci *in vivo* (Nangia-Makker et al., 2000).

Kromě zapojení Gal-3 do hojení ran a nádorového růstu sehrává tento lektin úlohu i v patogenezi srdečního selhání, kde je považován za nový potenciální prognostický faktor. Ve více klinických studiích bylo totiž prokázáno, že pacienti se zvýšenou hladinou cirkulujícího Gal-3 mají horší prognózu (zvýšené riziko mortality) a riziko hospitalizace v porovnání s pacienty s nízkými či normálními hladinami (Motiwala et al., 2013; van der Velde et al., 2013). Chimerický Gal spouští proliferaci fibroblastů v myokardu při srdečním selhání (Hrynchyshyn et al., 2013; Luecke et al., 2010).

2.5.3 Role galektinů III. skupiny v reparaci tkání a růstu nádorů

2.5.3.1 Galektin-4

Z této skupiny galektinů má z pohledu hojení ran pravděpodobně největší význam Gal-4, který je podobně jako Gal-2 dominantně exprimován v gastrointestinálním traktu (Huflejt and Leffler, 2004). Ukázalo se, že i tento lektin dokáže signifikantně zrychlit střevní reepitelizaci nezávisle na TGF- β (Paclík et al., 2008b).

2.5.3.2 Galektin-6, -8, -9 a -12

Skupina těchto galektinů nemá významný dopad na biologické procesy zapojené do tkáňové reparační. Gal-6 se exprimuje v epitelových buňkách gastrointestinálního traktu (GIT) (Rapoport et al., 2008). Gal-8 je exprimován v plicích, játrech, srdci, mozku a ledvinách. Specificky interaguje s $\alpha_3\beta_1$ a $\alpha_6\beta_1$ integriny na buněčných površích, čímž inhibuje adhezi buněk v procesech, které vyžadují interakci protein-sacharid. Navíc se ukázalo, že Gal-8 indukuje proces apoptózy nezávisle od p53 (Hadari et al., 2000) a podílí se na regulaci funkce neutrofilů při fagocytóze (Nishi et

al., 2003). Na druhé straně Gal-9 působí jako chemotaktický faktor eozinofilů (Matsumoto et al., 2002), což naznačuje jeho potenciální úlohu v modulaci alergických a parazitárních onemocnění (Rabinovich and Gruppi, 2005). Je exprimovaný v thymu, játrech, gastrointestinálním traktu, plicích a indukuje apoptózu aktivovaných T-lymfocytů a rakovinných buněk (Kageshita et al., 2002). Gal-8 a -9 jsou kromě toho exprimovány i endotelovými buňkami. V porovnání s Gal-1 a -3, které jsou intenzivně studovány v souvislosti s nádorovou angiogenesí a jejich zapojením do progresu růstu nádoru, je o Gal-8 a -9 dostupné pouze omezené množství informací. Studie však naznačují proangiogenní charakter především Gal-8 (Delgado et al., 2011). Gal-9 je v normálních dlaždicových epitelích exprimován v bazální vrstvě, která má proliferativní aktivitu. Během aktivace epitelových buněk nebo v nádorech se tento galektin z epitelových buněk ztrácí (Fik et al., 2013). Toto pozorování naznačuje možnou funkci Gal-9 v procesu hojení a kancerogeneze. Exprese Gal-12 je lokalizována v jádře a mitochondriích adipocytů, přičemž indukuje jejich apoptózu (Hotta et al., 2001).

3. Cíle

Ve své práci jsem se zaměřil na oblast glykobiologie hojení ran se zřetelem na možné ovlivnění tohoto procesu galektinem-1 a interakcí normálních a maligních buněk s ECM. Sledovány byly zejména:

1. Exprese a reaktivita vybraných galektinů v hojící se ráně.
2. Vliv vybraných galektinů na produkci extracelulární matrix fibroblasty.
3. Interakce extracelulární matrix s keratinocyty a endotelovými buňkami.
4. Paralela mezi hojením ran a růstem a prognózou nádoru z pohledu glykobiologie.

4. Metody a výsledky

Materiál, metody a výsledky jsou detailně popsány v příložených publikacích:

1. **Gál P.**, Vasilenko T, Kostelníková M, Jakubco J, Kovác I, sebol F, André S, Kaltner H, Gabius H-J, Smetana K Jr. Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. *Acta Histochem Cytochem.* 2011 Oct 26;44(5):191-9. [IF 2010 = 1,000]
2. Grendel T, Sokolský J, Vaščáková A, Hudák V, Chovanec M, sebol F, André S, Kaltner H, Gabius H-J, Frankovičová M, Lenčeš P, Betka J, Smetana K Jr, **Gál P.** Early stages of trachea healing process: (immuno/lectin) histochemical monitoring of selected markers and adhesion/growth-regulatory endogenous lectins. *Folia Biol (Praha).* 2012;58(4):135-43. [IF 2011 = 1,151]
3. Dvořánková B, Szabo P, Lacina L, **Gál P.**, Uhrova J, Zima T, Kaltner H, André S, Gabius H-J, Sykova E, Smetana K Jr. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs.* 2011;194(6):469-80. [IF 2010 = 2,302]
4. Peržel'ová V, Varinská L, Dvořánková B, Szabo P, Spurný P, Valach J, Mojžiš J, André S, Gabius H-J, Smetana K Jr, **Gál P.** Extracellular matrix of galectin-1-exposed dermal and tumor-associated fibroblasts favors growth of human umbilical vein endothelial cells in vitro: a short report. *Anticancer Res.* 2014 Aug;34(8):3991-6. [IF 2013 = 1,872]
5. Valach J, Fík Z, Strnad H, Chovanec M, Plzák J, Cada Z, Szabo P, Sáčhová J, Hroudová M, Urbanová M, Steffl M, Pačes J, Mazánek J, Vlček C, Betka J, Kaltner H, André S, Gabius H-J, Kodet R, Smetana K Jr, **Gál P.**, Kolář M. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma:

increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*. 2012 Dec 1;131(11):2499-508. [IF 2011 = 5,444]

Část výsledků je shrnuta v přehledovém článku:

1. Smetana K Jr, Szabo P, **Gál P**, André S, Gabius H-J, Kodet O, Dvořánková B. Emerging role of tissue lectins as microenvironmental effectors in tumors and wounds. *Histol Histopathol*. 2015 Mar;30(3):293-309. [IF 2013 = 2,236]

4.1 Gál P et al. Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. Acta Histochem Cytochem. 2011 Oct 26;44(5):191-9.

Cílem studie bylo sledovat expresi a reaktivitu vybraných galektinů v průběhu základních fází hojení ran. V této studii byly použity protilátky proti keratinům-10 a -14, širokospektrálnímu cytokeratinu, vimentinu a fibronektinu, galektinům-1, -2, a -3, které byly aplikovány na zmrazené vzorky kožních ran, odebíraných dva (zánětlivá fáze), sedm (proliferační fáze), a jedenadvacet (maturační fáze) dní po poranění. Přítomnost vazebných míst pro Gal-1, -2, -3, -7 byla stanovena za použití značených sond. Naše studie zjistila řadu změn v parametrech galektinů během různých fází hojení ran. Přítomnost Gal-1 je zvýšená v ranné fázi hojení. Naproti tomu Gal-3 byl přítomen až v nově vytvořené granulační tkáni. Mimo to, nukleární reaktivita epidermálních buněk pro Gal-2 byla pozorována sedm dní po traumatu. V této práci jsme ukázali dynamickou regulaci galektinů během re-epitelizace rány. Takové změny mohou poukazovat na potenciální cíle pro vývoj nových léků ke stimulaci hojení rány a následně i léčbě pacientů.

4.2 Grendel et al. Early stages of trachea healing process: (immuno/lectin) histochemical monitoring of selected markers and adhesion/growth-regulatory endogenous lectins. Folia Biol (Praha). 2012;58(4):135-43.

Tracheotomie může být spojena s řadou akutních a chronických komplikací včetně rozsáhlé tvorby granulační tkáně. Při použití protilátek a značených tkáňových lektinů (Gal-1, -2 a -3) jsme sledovali přítomnost a regulaci reaktivity galektinů během hojení ran průdušnice. Navíc jsme použili protilátky proti vysokomolekulárním keratinům, širokospektrálním cytokeratinům, keratinu-10 a -14, α -hladko-svalového aktinu, vimentinu, fibronektinu a Sox-2, s pomocí kterých byly srovnávány zmrazené řezy z poraněných (7, 14, a 28 dní po traumatu) a intaktních průdušnic. Jasný trend jsme pozorovali u Gal-1, přičemž jeho exprese s dobou hojení klesala a reaktivita se zvyšovala. Sox-2-pozitivní buňky byly přítomny po sedmi dnech v lůžku rány. Z tohoto pohledu je zajímavé, že ve srovnání s hojením kůže byla pozorována podobnost zejména při regulaci Gal-1.

4.3 Dvořánková et al. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(6):469-80.

V této části naší práce jsme studovali, zda jsou lidské galektiny schopny stimulovat přeměnu lidských dermálních fibroblastů na myofibroblasty a produkci bioaktivní extracelulární matrix vhodné pro pěstování buněčné kultury. Testovali jsme panel galektinů všech tří podskupin, včetně přírodních a umělých variant (proto-typ galektin-1 a galektin-7, chiméra typ galektin-3 a tandemově opakovací typ galektin-4). Aktivita galektinu-1 si vyžaduje integritu domény rozpoznávající uhlohydráty a byla nezávislá na přítomnosti TGF- β 1, ale vykazovala aditivní účinek. Myofibroblasty jsou relevantní například pro progresi nádoru a jimi generovaná ECM bohatá na fibronectin a Gal-1 podporovala růst kultury keratinocytů bez aplikace podpůrných buněk. Za zmínku stojí informace, že keratinocyty kultivované na tomto podloží měly fenotyp podobný buňkám kmenovým (malé rozměry a exprese keratinu-19). V *in vivo* experimentu jsme ukázali, že stimulace hojení s Gal-1 měla pozitivní vliv na kontrakci ran. V této práci navíc popisujeme diferenciální potenciál vybraných lidských galektinů (1, 3, 4 a 7) k vyvolání konverze dermálních fibroblastů myofibroblasty a jejich schopnost produkovat bioaktivní ECM.

4.4 Peržel'ová et al. Extracellular matrix of galectin-1-exposed dermal and tumor-associated fibroblasts favors growth of human umbilical vein endothelial cells in vitro: a short report. Anticancer Res. 2014 Aug;34(8):3991-6.

Cílem této části naší práce bylo stanovit účinek bioaktivní ECM produkované normálními dermálními nebo nádorovými fibroblasty vystavenými působení Gal-1 na lidské pupečnickové endotelové buňky (human umbilical vein endothelial cells - HUVEC). Fibroblasty byly kultivovány 10 dní s lektinem, následně byla kultura zbavena buněčných složek osmotickým šokem. Čerstvě izolované HUVEC byly nasazeny na takto vytvořenou ECM. Souběžně byly HUVEC naočkovány na čisté a želatinou potažené povrchy. Pozitivní kontrolou růstu buněk bylo použití média doplněného o vaskulární endoteliální růstový faktor. Buňky jsme následně kultivovali po dobu dvou dnů a pak podrobili imunocytochemickému šetření. Endotelové buňky pěstované na ECM generované fibroblasty vykazovaly poměrně vysoký stupeň proliferace. Kromě toho vedl kontakt HUVEC se substrátem produkovaným nádorově-asociovanými fibroblasty ke tvorbě sítě obzvláště bohaté na fibronectin. Naše práce ukazuje, že Gal-1 je schopen vyvolat produkci ECM stimulující růst endotelových buněk. Avšak v budoucnu bude potřeba realizovat další práci na charakterizaci strukturálních rysů ECM a in situ korelaci přítomnosti lektinu v ECM a angiogenezi.

4.5 Valach et al. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. Int J Cancer. 2012 Dec 1;131(11):2499-508.

Adhezi a růst regulující lektin Gal-1 je efektor pro generování myofibroblastů. V naší studii jsme srovnávali přítomnost SMA-pozitivních nádorově asociovaných fibroblastů s endogenním lektinem Gal-1 a jeho *in vivo* konkurentem Gal-3. Ukázalo se, že ve spinocelulárních karcinomech hlavy a krku je up-regulace Gal-1 velmi významně korelována s přítomností SMA-pozitivních nádorových fibroblastů. Pro určení dalších korelací na molekulární úrovni jsme použili microarray analýzu odpovídajících nádorů. V nádorově asociovaných fibroblastech jsme našli významnou korelaci mezi několika transkripty a Gal-1. Tyto aktivované geny (MAP3K2, TRIM23, PTPLAD1, FUSIP1, SLC25A40 a SPIN1) jsou spojeny se známými faktory spojenými se špatnou prognózou u dlaždicových karcinomů, upregulací NF- κ B a downregulací splicingu. Tyto výsledky poskytují nový pohled na význam přítomnosti myofibroblastů v karcinomech dlaždicových epitelů.

5. Diskuse

Ukázali jsme, že exprese jednotlivých galektinů je často odlišná. Přestože galektiny mají zjevnou sekvenční homologii, každý protein následuje svůj charakteristický vzor exprese a biologické úlohy v průběhu hojení. Zdá se, že existuje určitá paralela mezi hojením ran a růstem nádorů (Dvorak, 1986; Kolar et al., 2012). Terapeutické řešení obou patologických stavů vyvolává potřebu komplexního přístupu, z něhož není možné vyjmout vazivovou složku vytvářející vhodné mikroprostředí.

Zdá se, že na modulaci mikroprostředí se výraznou mírou podílí Gal-1, který je up-regulován v ranné fázi hojení (Gal et al., 2011; Klima et al., 2009) jakožto i v karcinomech hlavy a krku s horší prognózou (Valach et al., 2012), kde zásadním způsobem ovlivňuje zánět a diferenciaci buněk. Podobně tomu je i v některých jiných nádorech. Naproti tomu výskyt Gal-3 je stimulován v maturační fázi hojení a pravděpodobně sehrává významnou úlohu v procesu vyžrávání granulační tkáně a následné tvorbě jizvy. Tento lektin je v dnešní době považován za znak fibrózy (Henderson et al., 2006) a srdečního selhání (Luecke et al., 2010). Z publikovaných prací vyplývá, že v hojení ran může mít určitý modulační efekt ještě galektin 2, 4 a 7. Zásadní úloha ostatních galektinů v samotném hojení tkání zůstává zatím nejasná.

Při detailnějším studiu Gal-1 v nádorovém stromatu a granulační tkáni jsme zjistili, že obě tkáně jsou za určitých okolností často bohaté na tento lektin. V obou případech se zdá, že se tento galektin podílí na vzniku myofibroblastů. Zejména se ukázalo, že exprese Gal-1 v nádorovém stromatu v dlaždicových karcinomech hlavy a krku má vztah k přítomnosti myofibroblastů a pozitivně koreluje s expresí genů spojených se špatnou prognózou pacienta (Valach et al., 2012). Gal-1 indukuje diferenciaci fibroblastů na myofibroblasty s aditivním účinkem ke TGF- β 1/3 (Dvorankova et al., 2011). Z uvedených výsledků můžeme předpokládat, že by se Gal-1 mohl uplatnit jako (i) prognostický faktor, (ii) stimulant hojení ran a (iii) v léčbě Gal-1 pozitivních nádorů by jeho blokáce mohla přispět k zefektivnění současné terapie. Z toho pohledu by právě glykobiologické aspekty interakce nádorové buňky se stromatem mohly představovat nadějný cíl nové generace protinádorové terapie (Smetana et al., 2013).

Můžeme usuzovat, že maligní tumory jsou komplexními systémy (Egeblad et al., 2010), které mohou stejně jako normální tkáň obsahovat určitou zásobu kmenových buněk (Sell, 2010). Tento fakt je nezbytné brát na zřetel při vývoji

nových terapeutických přístupů v léčbě zhoubných nádorových onemocnění a terapii hojení ran. Na druhé straně je potřeba uvést, že většina práce byla realizována na buněčných kulturách a hlodavcích. Korelace těchto studií k člověku by byla možná, pokud by neexistovala žádná mezidruhová variabilita anebo pokud by in vitro experimenty odrážely komplexnost organismu. Nicméně díky dostupnosti lidských rekombinantních tkáňových lektinů může být jejich úloha v procesu hojení ran a růstu nádorů i nadále studována v dalších experimentálních i humánních klinických výzkumech.

6. Závěry a zhodnocení cílů

V disertační práci jsme prokázali, že:

1. Exprese a reaktivita vybraných galektinů (-1, -2 a -3) v průběhu hojení kůže (Gal et al., 2011) a trachey (Grendel et al., 2012) je značně podobná. Dokázali jsme, že galektin-1 je stimulován v ranných fázích hojení a galektin-3 spíše později po dobu zrání granulační tkáně a tvorby jizev. Zajímavé bylo pozorování, že v hojící se ráně dochází ke tvorbě vazebných míst pro galektin-2 v jádře keratinocytů během proliferační fáze hojení (Gal et al., 2011).
2. Galektin-1 ve srovnání s ostatními testovanými galektiny (-3, -4 a -7) nejlépe stimuluje produkci extracelulární matrix u fibroblastů. Tato matrix je bohatá na fibronectin a galektin-1 (Dvorankova et al., 2011).
3. Extracelulární matrix bohatá na galektin-1 vytváří vhodné mikroprostředí pro výskyt a přežívání málo diferencovaných keratinocytů (Dvorankova et al., 2011) a podporuje zejména růst endotelových buněk částečně jejich produkci ECM (Perzelova et al., 2014).
4. Existuje určitá paralela mezi hojením ran a růstem a nádoru. Zvýšená exprese galektinu-1 koreluje s výskytem myofibroblastů v karcinomech hlavy a krku a může být považována za znak maligní progresse (Valach et al., 2012). Podobně je exogenně přidaný galektin-1 schopen indukovat diferenciaci fibroblastů na myofibroblasty, což vede k lepší kontrakci rány u potkanů (Dvorankova et al., 2011).

7. Literatura

- ABERCROMBIE, M., Control mechanisms in cancer. *Eur J Cancer*, 1970, 6(1), 7-13.
- ADAMS, L., SCOTT, G.K., WEINBERG, C.S., Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1312(2), 137-144.
- AILLES, L.E., WEISSMAN, I.L., Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(5), 460-466.
- ALMKVIST, J., DAHLGREN, C., LEFFLER, H., KARLSSON, A., Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *J Immunol*, 2002, 168(8), 4034-4041.
- ANDRE, S., SANCHEZ-RUDERISCH, H., NAKAGAWA, H., BUCHHOLZ, M., KOPITZ, J., FORBERICH, P., KEMMNER, W., BOCK, C., DEGUCHI, K., DETJEN, K.M., WIEDENMANN, B., VON KNEBEL DOEBERITZ, M., GRESS, T.M., NISHIMURA, S., ROSEWICZ, S., GABIUS, H.J., Tumor suppressor p16INK4a--modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells. *FEBS J*, 2007, 274(13), 3233-3256.
- ASHCROFT, G.S., MILLS, S.J., LEI, K., GIBBONS, L., JEONG, M.J., TANIGUCHI, M., BUROW, M., HORAN, M.A., WAHL, S.M., NAKAYAMA, T., Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest*, 2003, 111(9), 1309-1318.
- BARBUL, A., REGAN, M.C., 1993. In: J.E. Fischer (Ed.), *Surgical Basic Science*. Mosby Yearbook, St. Louis, pp. 67-89.
- BARISIC-DUJMOVIC, T., BOBAN, I., CLARK, S.H., Fibroblasts/myofibroblasts that participate in cutaneous wound healing are not derived from circulating progenitor cells. *J Cell Physiol*, 2010, 222(3), 703-712.
- BARKER, N., BARTFELD, S., CLEVERS, H., Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6), 656-670.
- BARRES, C., BLANC, L., BETTE-BOBILLO, P., ANDRE, S., MAMOUN, R., GABIUS, H.J., VIDAL, M., Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*, 2010, 115(3), 696-705.
- BAUM, C.L., ARPEY, C.J., Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 2005, 31(6), 674-686; discussion 686.
- BORONKAI, A., BELLYEI, S., SZIGETI, A., POZSGAI, E., BOGNAR, Z., SUMEGI, B., GALLYAS, F., JR., Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by galectin-13 overexpression via activation of Ask-1-p38-MAP kinase and JNK/SAPK pathways and suppression of Akt and ERK1/2 activation in U-937 human macrophage cells. *Eur J Cell Biol*, 2009, 88(12), 753-763.
- BRENMOEHL, J., MILLER, S.N., HOFMANN, C., VOGL, D., FALK, W., SCHOLMERICH, J., ROGLER, G., Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(12), 1431-1442.

- BURKITT, H.G., QUICK, C.R.G., GATT, D., 1990. *Essential Surgery*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- CADA, Z., CHOVANEC, M., SMETANA, K., BETKA, J., LACINA, L., PLZAK, J., KODET, R., STORK, J., LENSCH, M., KALTNER, H., ANDRE, S., GABIUS, H.J., Galectin-7: will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous cell and basal cell carcinomas? *Histol Histopathol*, 2009, 24(1), 41-48.
- CALDERON, M., LAWRENCE, W.T., BANES, A.J., Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. *J Surg Res*, 1996, 61(2), 343-347.
- CAMBY, I., LE MERCIER, M., LEFRANC, F., KISS, R., Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 2006, 16(11), 137R-157R.
- CAO, Z., SAID, N., AMIN, S., WU, H.K., BRUCE, A., GARATE, M., HSU, D.K., KUWABARA, I., LIU, F.T., PANJWANI, N., Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. *J Biol Chem*, 2002, 277(44), 42299-42305.
- CAO, Z., SAID, N., WU, H.K., KUWABARA, I., LIU, F.T., PANJWANI, N., Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol*, 2003, 121(1), 82-86.
- CARTER, C.A., JOLLY, D.G., WORDEN, C.E., SR., HENDREN, D.G., KANE, C.J., Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol*, 2003, 74(3), 244-255.
- CLAUSSE, N., VAN DEN BRULE, F., WALTREGNY, D., GARNIER, F., CASTRONOVO, V., Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis*, 1999, 3(4), 317-325.
- CORDON-CARDO, C., Cancer stem cells. *Ann Oncol*, 2010, 21 Suppl 7, vii93-94.
- CORNELIUS, L.A., NEHRING, L.C., HARDING, E., BOLANOWSKI, M., WELGUS, H.G., KOBAYASHI, D.K., PIERCE, R.A., SHAPIRO, S.D., Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*, 1998, 161(12), 6845-6852.
- COULOMBE, P.A., Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol*, 2003, 121(2), 219-230.
- CUMMINGS, R.D., LIU, F.T., 2009. Galectins. In: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor (NY).
- CURTIS, A.S., ROONEY, P., H-2 restriction of contact inhibition of epithelial cells. *Nature*, 1979, 281(5728), 222-223.
- D'HAENE, N., SAUVAGE, S., MARIS, C., ADANJA, I., LE MERCIER, M., DECAESTECKER, C., BAUM, L., SALMON, I., VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One*, 2013, 8(6), e67029.
- DAVIDSON, J.M., Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res*, 1998, 290 Suppl, S1-11.
- DE BOER, R.A., VOORS, A.A., MUNTENDAM, P., VAN GILST, W.H., VAN VELDHUISEN, D.J., Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail*, 2009, 11(9), 811-817.
- DE WEVER, O., MAREEL, M., Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*, 2003, 200(4), 429-447.
- DELGADO, V.M., NUGNES, L.G., COLOMBO, L.L., TRONCOSO, M.F., FERNANDEZ, M.M., MALCHIODI, E.L., FRAHM, I., CROCI, D.O.,

- COMPAGNO, D., RABINOVICH, G.A., WOLFENSTEIN-TODEL, C., ELOLA, M.T., Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8. *FASEB J*, 2011, 25(1), 242-254.
- DESMOULIERE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F., GABBIANI, G., Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 1993, 122(1), 103-111.
- DORSETT-MARTIN, W.A., Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen*, 2004, 12(6), 591-599.
- DVORAK, H.F., Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 1986, 315(26), 1650-1659.
- DVORANKOVA, B., LACINA, L., SMETANA, K., JR., LENSCH, M., MANNING, J.C., ANDRE, S., GABIUS, H.J., Human galectin-2: nuclear presence in vitro and its modulation by quiescence/stress factors. *Histol Histopathol*, 2008, 23(2), 167-178.
- DVORANKOVA, B., SMETANA, K., JR., CHOVANEC, M., LACINA, L., STORK, J., PLZAKOVA, Z., GALOVICOVA, M., GABIUS, H.J., Transient expression of keratin 19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells. *Int J Mol Med*, 2005, 16(4), 525-531.
- DVORANKOVA, B., SMETANA, K., JR., RIHOVA, B., KUCERA, J., MATEU, R., SZABO, P., Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol*, 2015, 143(5), 463-469.
- DVORANKOVA, B., SZABO, P., LACINA, L., GAL, P., UHROVA, J., ZIMA, T., KALTNER, H., ANDRE, S., GABIUS, H.J., SYKOVA, E., SMETANA, K., JR., Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs*, 2011, 194(6), 469-480.
- EGEBLAD, M., RASCH, M.G., WEAVER, V.M., Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(5), 697-706.
- FERNANDEZ, G.C., ILARREGUI, J.M., RUBEL, C.J., TOSCANO, M.A., GOMEZ, S.A., BEIGIER BOMPADRE, M., ISTURIZ, M.A., RABINOVICH, G.A., PALERMO, M.S., Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology*, 2005, 15(5), 519-527.
- FIK, Z., VALACH, J., CHOVANEC, M., MAZANEK, J., KODET, R., KODET, O., TACHEZY, R., FOLTYNOVA, E., ANDRE, S., KALTNER, H., GABIUS, H.J., SMETANA, K., JR., Loss of adhesion/growth-regulatory galectin-9 from squamous cell epithelium in head and neck carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 2013, 42(2), 166-173.
- FUKUMORI, T., TAKENAKA, Y., YOSHII, T., KIM, H.R., HOGAN, V., INOHARA, H., KAGAWA, S., RAZ, A., CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res*, 2003, 63(23), 8302-8311.
- FURIE, B., FURIE, B.C., Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest*, 2005, 115(12), 3355-3362.

- GAL, P., KILIK, R., MOKRY, M., VIDINSKY, B., VASILENKO, T., MOZES, S., BOBROV, N., TOMORI, Z., BOBER, J., LENHARDT, L., Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Vet Med-Czech*, 2008, 53(12), 652-659.
- GAL, P., TOPORCER, T., VIDINSKY, B., HUDAK, R., ZIVCAK, J., SABO, J., Simple interrupted percutaneous suture versus intradermal running suture for wound tensile strength measurement in rats: a technical note. *Eur Surg Res*, 2009, 43(1), 61-65.
- GAL, P., TOPORCER, T., VIDINSKY, B., MOKRY, M., NOVOTNY, M., KILIK, R., SMETANA, K., JR., GAL, T., SABO, J., Early changes in the tensile strength and morphology of primary sutured skin wounds in rats. *Folia Biol (Praha)*, 2006, 52(4), 109-115.
- GAL, P., VASILENKO, T., KOSTELNIKOVA, M., JAKUBCO, J., KOVAC, I., SABOL, F., ANDRE, S., KALTNER, H., GABIUS, H.J., SMETANA, K., JR., Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. *Acta Histochem Cytochem*, 2011, 44(5), 191-199.
- GALKOWSKA, H., WOJEWODZKA, U., OLSZEWSKI, W.L., Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen*, 2006, 14(5), 558-565.
- GENDRONNEAU, G., SIDHU, S.S., DELACOUR, D., DANG, T., CALONNE, C., HOUZELSTEIN, D., MAGNALDO, T., POIRIER, F., Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(12), 5541-5549.
- GERMEYER, A., SHARKEY, A.M., PRASADAJUDIO, M., SHERWIN, R., MOFFETT, A., BIEBACK, K., CLAUSMEYER, S., MASTERS, L., POPOVICI, R.M., HESS, A.P., STROWITZKI, T., VON WOLFF, M., Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(1), 39-48.
- GILLITZER, R., GOEBELER, M., Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*, 2001, 69(4), 513-521.
- GILLIVER, S.C., EMMERSON, E., BERNHAGEN, J., HARDMAN, M.J., MIF: a key player in cutaneous biology and wound healing. *Exp Dermatol*, 2011, 20(1), 1-6.
- GOETZL, E.J., BANDA, M.J., LEPPERT, D., Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol*, 1996, 156(1), 1-4.
- GOTTRUP, F., AGREN, M.S., KARLSMARK, T., Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen*, 2000, 8(2), 83-96.
- GRAY, C.A., ADELSON, D.L., BAZER, F.W., BURGHARDT, R.C., MEEUSEN, E.N., SPENCER, T.E., Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophectoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(21), 7982-7987.
- GREDEL, T., SOKOLSKY, J., VASCAKOVA, A., HUDAK, V., CHOVANEC, M., SABOL, F., ANDRE, S., KALTNER, H., GABIUS, H.J., FRANKOVICOVA, M., LENCES, P., BETKA, J., SMETANA, K., JR., GAL, P., Early stages of trachea healing process: (immuno/lectin)

- histochemical monitoring of selected markers and adhesion/growth-regulatory endogenous lectins. *Folia Biol (Praha)*, 2012, 58(4), 135-143.
- HADARI, Y.R., ARBEL-GOREN, R., LEVY, Y., AMSTERDAM, A., ALON, R., ZAKUT, R., ZICK, Y., Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci*, 2000, 113 (Pt 13), 2385-2397.
- HATTORI, N., MOCHIZUKI, S., KISHI, K., NAKAJIMA, T., TAKAISHI, H., D'ARMIENTO, J., OKADA, Y., MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *Am J Pathol*, 2009, 175(2), 533-546.
- HENDERSON, N.C., MACKINNON, A.C., FARNWORTH, S.L., KIPARI, T., HASLETT, C., IREDALE, J.P., LIU, F.T., HUGHES, J., SETHI, T., Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol*, 2008, 172(2), 288-298.
- HENDERSON, N.C., MACKINNON, A.C., FARNWORTH, S.L., POIRIER, F., RUSSO, F.P., IREDALE, J.P., HASLETT, C., SIMPSON, K.J., SETHI, T., Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(13), 5060-5065.
- HERDRICH, B.J., LIND, R.C., LIECHTY, K.W., Multipotent adult progenitor cells: their role in wound healing and the treatment of dermal wounds. *Cytotherapy*, 2008, 10(6), 543-550.
- HINZ, B., Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(3-4), 175-181.
- HINZ, B., PHAN, S.H., THANNICKAL, V.J., GALLI, A., BOCHATON-PIALLAT, M.L., GABBIANI, G., The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 2007, 170(6), 1807-1816.
- HIRABAYASHI, J., KASAI, K., The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, 1993, 3(4), 297-304.
- HOTTA, K., FUNAHASHI, T., MATSUKAWA, Y., TAKAHASHI, M., NISHIZAWA, H., KISHIDA, K., MATSUDA, M., KURIYAMA, H., KIHARA, S., NAKAMURA, T., TOCHINO, Y., BODKIN, N.L., HANSEN, B.C., MATSUZAWA, Y., Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. *J Biol Chem*, 2001, 276(36), 34089-34097.
- HOWARD, C.M., BAUDINO, T.A., Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 70, 19-26.
- HRYNCHYSHYN, N., JOURDAIN, P., DESNOS, M., DIEBOLD, B., FUNCK, F., Galectin-3: a new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure. *Arch Cardiovasc Dis*, 2013, 106(10), 541-546.
- HSIEH, S.H., YING, N.W., WU, M.H., CHIANG, W.F., HSU, C.L., WONG, T.Y., JIN, Y.T., HONG, T.M., CHEN, Y.L., Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene*, 2008, 27(26), 3746-3753.
- HSU, D.K., LIU, F.T., Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J*, 2004, 19(7-9), 507-515.
- HSU, D.K., YANG, R.Y., LIU, F.T., Galectins in apoptosis. *Methods Enzymol*, 2006, 417, 256-273.

- HUFLEJT, M.E., LEFFLER, H., Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconj J*, 2004, 20(4), 247-255.
- HUGHES, R.C., Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, 2001, 83(7), 667-676.
- CHERNYAVSKY, A.I., ARREDONDO, J., KARLSSON, E., WESSLER, I., GRANDO, S.A., The Ras/Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway coupled to integrin expression mediates cholinergic regulation of keratinocyte directional migration. *J Biol Chem*, 2005, 280(47), 39220-39228.
- CHEUNG, K.J., JR., LI, G., The tumour suppressor p33ING1 does not regulate migration and angiogenesis in melanoma cells. *Int J Oncol*, 2002, 21(6), 1361-1365.
- CHOE, C., SHIN, Y.S., KIM, S.H., JEON, M.J., CHOI, S.J., LEE, J., KIM, J., Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance motility of non-small cell lung cancer cells through the hedgehog signaling pathway. *Anticancer Res*, 2013, 33(9), 3715-3723.
- CHONG, H.C., TAN, M.J., PHILIPPE, V., TAN, S.H., TAN, C.K., KU, C.W., GOH, Y.Y., WAHLI, W., MICHALIK, L., TAN, N.S., Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *J Cell Biol*, 2009, 184(6), 817-831.
- ISLAM, F., QIAO, B., SMITH, R.A., GOPALAN, V., LAM, A.K., Cancer stem cell: fundamental experimental pathological concepts and updates. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(2), 184-191.
- ITO, K., SCOTT, S.A., CUTLER, S., DONG, L.F., NEUZIL, J., BLANCHARD, H., RALPH, S.J., Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*, 2011, 14(3), 293-307.
- KAGESHITA, T., KASHIO, Y., YAMAUCHI, A., SEKI, M., ABEDIN, M.J., NISHI, N., SHOJI, H., NAKAMURA, T., ONO, T., HIRASHIMA, M., Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer*, 2002, 99(6), 809-816.
- KASPER, M., FEHRENBACH, H., Immunohistochemical evidence for the occurrence of similar epithelial phenotypes during lung development and radiation-induced fibrogenesis. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76(4), 493-501.
- KLIMA, J., LACINA, L., DVORANKOVA, B., HERRMANN, D., CARNWATH, J.W., NIEMANN, H., KALTNER, H., ANDRE, S., MOTLIK, J., GABIUS, H.J., SMETANA, K., JR., Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiol Res*, 2009, 58(6), 873-884.
- KNIGHTON, D.R., DOUCETTE, M., FIEGEL, V.D., CIRESI, K., BUTLER, E., AUSTIN, L., The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. *Prog Clin Biol Res*, 1988, 266, 319-329.
- KOLAR, M., SZABO, P., DVORANKOVA, B., LACINA, L., GABIUS, H.J., STRNAD, H., SACHOVA, J., VLCEK, C., PLZAK, J., CHOVANEC, M., CADA, Z., BETKA, J., FIK, Z., PACES, J., KOVAROVA, H., MOTLIK, J., JARKOVSKA, K., SMETANA, K., JR., Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell*, 2012, 104(12), 738-751.

- KORKAYA, H., LIU, S., WICHA, M.S., Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*, 2011, 121(10), 3804-3809.
- KUMAR, V., COTRAN, R.Z., ROBBINS, S.L., 2003. *Pathologic Basis of Disease*, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.
- KUNZ-SCHUGHART, L.A., KREUTZ, M., KNUECHEL, R., Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol*, 1998, 79(1), 1-23.
- KUWABARA, I., LIU, F.T., Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol*, 1996, 156(10), 3939-3944.
- LADERACH, D.J., GENTILINI, L.D., GIRIBALDI, L., DELGADO, V.C., NUGNES, L., CROCI, D.O., AL NAKOUZI, N., SACCA, P., CASAS, G., MAZZA, O., SHIPP, M.A., VAZQUEZ, E., CHAUCHEREAU, A., KUTOK, J.L., RODIG, S.J., ELOLA, M.T., COMPAGNO, D., RABINOVICH, G.A., A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res*, 2013, 73(1), 86-96.
- LANGTON, A.K., HERRICK, S.E., HEADON, D.J., An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(5), 1311-1318.
- LAWRENCE, W.T., Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*, 1998, 25(3), 321-340.
- LEADER, R.W., PADGETT, G.A., The genesis and validation of animal models. *Am J Pathol*, 1980, 101(3 Suppl), S11-16.
- LEFFLER, H., CARLSSON, S., HEDLUND, M., QIAN, Y., POIRIER, F., Introduction to galectins. *Glycoconj J*, 2004, 19(7-9), 433-440.
- LI, H., FAN, X., HOUGHTON, J., Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*, 2007, 101(4), 805-815.
- LI, L., NEAVES, W.B., Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*, 2006, 66(9), 4553-4557.
- LIU, F.T., PATTERSON, R.J., WANG, J.L., Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1572(2-3), 263-273.
- LO, P.H., LUNG, H.L., CHEUNG, A.K., APTE, S.S., CHAN, K.W., KWONG, F.M., KO, J.M., CHENG, Y., LAW, S., SRIVASTAVA, G., ZABAROVSKY, E.R., TSAO, S.W., TANG, J.C., STANBRIDGE, E.J., LUNG, M.L., Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*, 2010, 70(13), 5567-5576.
- LUECKE, N., TEMPLIN, C., MUETZELBURG, M.V., NEUMANN, D., JUST, I., PICH, A., Secreted proteome of the murine multipotent hematopoietic progenitor cell line DKmix. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(5), 561-570.
- LULLMANN-RAUCH, 2012. *Histologie, Preklad 3. vydani*. Grada, Prague.
- MAEDA, N., KAWADA, N., SEKI, S., ARAKAWA, T., IKEDA, K., IWAO, H., OKUYAMA, H., HIRABAYASHI, J., KASAI, K., YOSHIKATO, K., Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*, 2003, 278(21), 18938-18944.
- MAGNALDO, T., FOWLIS, D., DARMON, M., Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation*, 1998, 63(3), 159-168.

- MARKOWSKA, A.I., LIU, F.T., PANJWANI, N., Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med*, 2010, 207(9), 1981-1993.
- MATARRESE, P., FUSCO, O., TINARI, N., NATOLI, C., LIU, F.T., SEMERARO, M.L., MALORNI, W., IACOBELLI, S., Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer*, 2000, 85(4), 545-554.
- MATSUMOTO, R., HIRASHIMA, M., KITA, H., GLEICH, G.J., Biological activities of ecalectin: a novel eosinophil-activating factor. *J Immunol*, 2002, 168(4), 1961-1967.
- MIDWOOD, K.S., WILLIAMS, L.V., SCHWARZBAUER, J.E., Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(6), 1031-1037.
- MILLER, E.J., RHODES, R.K., Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol*, 1982, 82 Pt A, 33-64.
- MISHRA, P.J., MISHRA, P.J., GLOD, J.W., BANERJEE, D., Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res*, 2009, 69(4), 1255-1258.
- MIURA, T., TAKAHASHI, M., HORIE, H., KURUSHIMA, H., TSUCHIMOTO, D., SAKUMI, K., NAKABEPPU, Y., Galectin-1beta, a natural monomeric form of galectin-1 lacking its six amino-terminal residues promotes axonal regeneration but not cell death. *Cell Death Differ*, 2004, 11(10), 1076-1083.
- MOTIWALA, S.R., SZYMONIFKA, J., BELCHER, A., WEINER, R.B., BAGGISH, A.L., SLUSS, P., GAGGIN, H.K., BHARDWAJ, A., JANUZZI, J.L., Serial measurement of galectin-3 in patients with chronic heart failure: results from the ProBNP Outpatient Tailored Chronic Heart Failure Therapy (PROTECT) study. *Eur J Heart Fail*, 2013, 15(10), 1157-1163.
- MOTLIK, J., KLIMA, J., DVORANKOVA, B., SMETANA, K., JR., Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology*, 2007, 67(1), 105-111.
- NANGIA-MAKKER, P., HONJO, Y., SARVIS, R., AKAHANI, S., HOGAN, V., PIENTA, K.J., RAZ, A., Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*, 2000, 156(3), 899-909.
- NGUYEN, B.P., RYAN, M.C., GIL, S.G., CARTER, W.G., Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(5), 554-562.
- NISHI, N., SHOJI, H., SEKI, M., ITOH, A., MIYANAKA, H., YUUBE, K., HIRASHIMA, M., NAKAMURA, T., Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. *Glycobiology*, 2003, 13(11), 755-763.
- OHUCHI, E., IMAI, K., FUJII, Y., SATO, H., SEIKI, M., OKADA, Y., Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*, 1997, 272(4), 2446-2451.
- PACLIK, D., BERNDT, U., GUZY, C., DANKOF, A., DANESE, S., HOLZLOEHNER, P., ROSEWICZ, S., WIEDENMANN, B., WITTIG, B.M., DIGNASS, A.U., STURM, A., Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice. *J Mol Med (Berl)*, 2008a, 86(12), 1395-1406.
- PACLIK, D., LOHSE, K., WIEDENMANN, B., DIGNASS, A.U., STURM, A., Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound

- healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. *Inflamm Bowel Dis*, 2008b, 14(10), 1366-1372.
- PATTERSON, M.L., ATKINSON, S.J., KNAUPER, V., MURPHY, G., Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett*, 2001, 503(2-3), 158-162.
- PEACOCK, E.E., JR., Wound contraction and scar contracture. *Plast Reconstr Surg*, 1978, 62(4), 600-602.
- PERRY, R.J., MOORE, C.A., MORGAN, B.D., PLUMMER, D.L., Determining the approximate area of a burn: an inconsistency investigated and re-evaluated. *BMJ*, 1996, 312(7042), 1338.
- PERYASSU, M.A., COTTA-PEREIRA, G., RAMOS-E-SILVA, M., FILGUEIRA, A.L., Expression of keratins 14, 10 and 16 in marginal keratoderma of the palms. *Acta Dermatovenerol Croat*, 2005, 13(4), 206-211.
- PERZELOVA, V., VARINSKA, L., DVORANKOVA, B., SZABO, P., SPURNY, P., VALACH, J., MOJZIS, J., ANDRE, S., GABIUS, H.J., SMETANA, K., JR., GAL, P., Extracellular matrix of galectin-1-exposed dermal and tumor-associated fibroblasts favors growth of human umbilical vein endothelial cells in vitro: a short report. *Anticancer Res*, 2014, 34(8), 3991-3996.
- PINE, S.R., LIU, W., Asymmetric cell division and template DNA co-segregation in cancer stem cells. *Front Oncol*, 2014, 4, 226.
- PLZAK, J., LACINA, L., CHOVANEC, M., DVORANKOVA, B., SZABO, P., CADA, Z., SMETANA, K., JR., Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. *Anticancer Res*, 2010, 30(2), 455-462.
- POLYAK, K., HAVIV, I., CAMPBELL, I.G., Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*, 2009, 25(1), 30-38.
- POLYAK, K., XIA, Y., ZWEIER, J.L., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 1997, 389(6648), 300-305.
- RABINOVICH, G.A., ARIEL, A., HERSHKOVIZ, R., HIRABAYASHI, J., KASAI, K.I., LIDER, O., Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*, 1999a, 97(1), 100-106.
- RABINOVICH, G.A., DALY, G., DREJA, H., TAILOR, H., RIERA, C.M., HIRABAYASHI, J., CHERNAJOVSKY, Y., Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*, 1999b, 190(3), 385-398.
- RABINOVICH, G.A., GRUPPI, A., Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol*, 2005, 27(4), 103-114.
- RAPOPORT, E.M., KURMYSHKINA, O.V., BOVIN, N.V., Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions. *Biochemistry (Mosc)*, 2008, 73(4), 393-405.
- RASMUSSEN, L.H., JENSEN, L.T., AVNSTORP, C., KARLSMARK, T., PETERS, K., HORSLEV-PETERSEN, K., Collagen types I and III propeptides as markers of healing in chronic leg ulcers. A noninvasive method for the determination of procollagen propeptides in wound fluid--influence of growth hormone. *Ann Surg*, 1992, 216(6), 684-691.

- REICHEL, J., BUSSOW, H., GRUND, C., MAGIN, T.M., Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(6), 1557-1568.
- RICHES, D.W., CHAN, E.D., WINSTON, B.W., TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology*, 1996, 195(4-5), 477-490.
- RIZK, M., WITTE, M.B., BARBUL, A., Nitric oxide and wound healing. *World J Surg*, 2004, 28(3), 301-306.
- ROBERT, G., GAGGIOLI, C., BAILET, O., CHAVEY, C., ABBE, P., ABERDAM, E., SABATIE, E., CANO, A., GARCIA DE HERREROS, A., BALLOTTI, R., TARTARE-DECKERT, S., SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res*, 2006, 66(15), 7516-7523.
- RODERO, M.P., KHOSROTEHRANI, K., Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 3(7), 643-653.
- ROSS, R., EVERETT, N.B., TYLER, R., Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol*, 1970, 44(3), 645-654.
- RUBIN, E., FARBER, J.L., 1994. *Pathology*. J.B. Lippincott, Philadelphia.
- SANO, H., HSU, D.K., APGAR, J.R., YU, L., SHARMA, B.B., KUWABARA, I., IZUI, S., LIU, F.T., Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest*, 2003, 112(3), 389-397.
- SANO, H., HSU, D.K., YU, L., APGAR, J.R., KUWABARA, I., YAMANAKA, T., HIRASHIMA, M., LIU, F.T., Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol*, 2000, 165(4), 2156-2164.
- SATO, M., NISHI, N., SHOJI, H., KUMAGAI, M., IMAIZUMI, T., HATA, Y., HIRASHIMA, M., SUZUKI, S., NAKAMURA, T., Quantification of galectin-7 and its localization in adult mouse tissues. *J Biochem*, 2002a, 131(2), 255-260.
- SATO, S., OUELLET, N., PELLETIER, I., SIMARD, M., RANCOURT, A., BERGERON, M.G., Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol*, 2002b, 168(4), 1813-1822.
- SAUSSEZ, S., DECAESTECKER, C., CLUDTS, S., ERNOUX, P., CHEVALIER, D., SMETANA, K., JR., ANDRE, S., LEROY, X., GABIUS, H.J., Adhesion/growth-regulatory tissue lectin galectin-1 in relation to angiogenesis/lymphocyte infiltration and prognostic relevance of stromal up-regulation in laryngeal carcinomas. *Anticancer Res*, 2009, 29(1), 59-65.
- SAUSSEZ, S., DECAESTECKER, C., LORFEVRE, F., CHEVALIER, D., MORTUAIRE, G., KALTNER, H., ANDRE, S., TOUBEAU, G., GABIUS, H.J., LEROY, X., Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology*, 2008, 52(4), 483-493.
- SAUSSEZ, S., KISS, R., Galectin-7. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(6), 686-697.
- SCATENA, R., BOTTONI, P., PONTOGLIO, A., GIARDINA, B., Cancer stem cells: the development of new cancer therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, 11(7), 875-892.
- SELL, S., On the stem cell origin of cancer. *Am J Pathol*, 2010, 176(6), 2584-2494.
- SEVITT, S., A review of the complications of burns, their origin and importance for illness and death. *J Trauma*, 1979, 19(5), 358-369.

- SHAPIRO, S.D., KOBAYASHI, D.K., LEY, T.J., Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem*, 1993, 268(32), 23824-23829.
- SCHAFFER, M., BARBUL, A., Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg*, 1998, 85(4), 444-460.
- SCHOLZEN, T., GERDES, J., The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3), 311-322.
- SMETANA, K., DVORANKOVA, B., LACINA, L., KREJCI, E., GRIM, M., [Cancer microenvironment affects biological properties of tumor cells--tumor as an embryologic problem?]. *Cas Lek Cesk*, 2010, 149(12), 572-575.
- SMETANA, K., JR., ANDRE, S., KALTNER, H., KOPITZ, J., GABIUS, H.J., Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(4), 379-392.
- SORRELL, J.M., CAPLAN, A.I., Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009, 276, 161-214.
- STADELMANN, W.K., DIGENIS, A.G., TOBIN, G.R., Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg*, 1998, 176(2A Suppl), 26S-38S.
- STAL, O., KLINTENBERG, C., FRANZEN, G., RISBERG, B., ARVIDSSON, S., BJELKENKRANTZ, K., SKOOG, L., NORDENSKJOLD, B., A comparison of static cytofluorometry and flow cytometry for the estimation of ploidy and DNA replication in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1986, 7(1), 15-22.
- STRNAD, H., LACINA, L., KOLAR, M., CADA, Z., VLCEK, C., DVORANKOVA, B., BETKA, J., PLZAK, J., CHOVANEC, M., SACHOVA, J., VALACH, J., URBANOVA, M., SMETANA, K., JR., Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochem Cell Biol*, 2010, 133(2), 201-211.
- SUZUKI, T., Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(4), 631-659.
- SZABO, P., KOLAR, M., DVORANKOVA, B., LACINA, L., STORK, J., VLCEK, C., STRNAD, H., TVRDEK, M., SMETANA, K., JR., Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells. *Biol Cell*, 2011, 103(5), 233-248.
- TANDARA, A.A., MUSTOE, T.A., Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg*, 2004, 28(3), 294-300.
- TAYLOR, G., LEHRER, M.S., JENSEN, P.J., SUN, T.T., LAVKER, R.M., Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, 2000, 102(4), 451-461.
- TEICHBERG, V.I., SILMAN, I., BEITSCH, D.D., RESHEFF, G., A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, 72(4), 1383-1387.
- THIJSSSEN, V.L., BARKAN, B., SHOJI, H., ARIES, I.M., MATHIEU, V., DELTOUR, L., HACKENG, T.M., KISS, R., KLOOG, Y., POIRIER, F., GRIFFIOEN, A.W., Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res*, 2010, 70(15), 6216-6224.

- THIJSEN, V.L., HULSMANS, S., GRIFFIOEN, A.W., The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol*, 2008, 172(2), 545-553.
- THIJSEN, V.L., POIRIER, F., BAUM, L.G., GRIFFIOEN, A.W., Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood*, 2007, 110(8), 2819-2827.
- TORISEVA, M., KAHARI, V.M., Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(2), 203-224.
- VALACH, J., FIK, Z., STRNAD, H., CHOVANEC, M., PLZAK, J., CADA, Z., SZABO, P., SACHOVA, J., HROUDOVA, M., URBANOVA, M., STEFFL, M., PACES, J., MAZANEK, J., VLCEK, C., BETKA, J., KALTNER, H., ANDRE, S., GABIUS, H.J., KODET, R., SMETANA, K., JR., GAL, P., KOLAR, M., Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*, 2012, 131(11), 2499-2508.
- VAN DEN BRULE, F., CALIFICE, S., CASTRONOVO, V., Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J*, 2004, 19(7-9), 537-542.
- VAN DER LEIJ, J., VAN DEN BERG, A., BLOKZIJL, T., HARMS, G., VAN GOOR, H., ZWIERS, P., VAN WEEGHEL, R., POPPEMA, S., VISSER, L., Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J Pathol*, 2004, 204(5), 511-518.
- VAN DER VELDE, A.R., GULLESTAD, L., UELAND, T., AUKRUST, P., GUO, Y., ADOURIAN, A., MUNTENDAM, P., VAN VELDHUISEN, D.J., DE BOER, R.A., Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure: data from CORONA and COACH. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(2), 219-226.
- VAN DER VELDEN, L.A., SCHAAFSMA, H.E., MANNI, J.J., RAMAEKERS, F.C., KUIJPERS, W., Cytokeratin expression in normal and (pre)malignant head and neck epithelia: an overview. *Head Neck*, 1993, 15(2), 133-146.
- VERSTEEG, H.H., HEEMSKERK, J.W., LEVI, M., REITSMA, P.H., New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*, 2013, 93(1), 327-358.
- VIDINSKY, B., GAL, P., TOPORCER, T., LONGAUER, F., LENHARDT, L., BOBROV, N., SABO, J., Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. *Acta Vet Brno*, 2006, 75(2), 197-+.
- VISSE, R., NAGASE, H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - Structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003, 92(8), 827-839.
- WANG, L., FRIESS, H., ZHU, Z.W., FRIGERI, L., ZIMMERMANN, A., KORC, M., BERBERAT, P.O., BUCHLER, M.W., Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Laboratory Investigation*, 2000, 80(8), 1233-1241.
- WATT, F.M., FUJIWARA, H., Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin. *Csh Perspect Biol*, 2011, 3(4).
- WERNER, S., GROSE, R., Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 2003, 83(3), 835-870.
- WERTHEIMER, E., SPRAVCHIKOV, N., TREBICZ, M., GARTSBEIN, M., ACCILI, D., AVINOA, I., NOFEH-MOSES, S., SIZYAKOV, G., TENNENBAUM, T., The regulation of skin proliferation and differentiation in the IR null mouse: implications for skin complications of diabetes. *Endocrinology*, 2001, 142(3), 1234-1241.

- WITTE, M.B., BARBUL, A., Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg*, 2002, 183(4), 406-412.
- YANG, R.Y., HSU, D.K., LIU, F.T., Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(13), 6737-6742.
- YOUNG, A.R., BARCHAM, G.J., KEMP, J.M., DUNPHY, J.L., NASH, A., MEEUSEN, E.N., Functional characterization of an eosinophil-specific galectin, ovine galectin-14. *Glycoconj J*, 2009, 26(4), 423-432.
- ZHANG, S., MOUSSODIA, R.O., VERTESY, S., ANDRE, S., KLEIN, M.L., GABIUS, H.J., PERCEC, V., Unraveling functional significance of natural variations of a human galectin by glycodendrimersomes with programmable glycan surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(18), 5585-5590.
- ZUBERI, R.I., FRIGERI, L.G., LIU, F.T., Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon BP, an IgE-binding endogenous lectin. *Cell Immunol*, 1994, 156(1), 1-12.

8. Příloha