

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Barbora Jenčíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Prognostický a prediktivní význam matrix
metaloproteináz u pacientů s kolorektálním
karcinomem**

Bakalářská práce

Barbora Jenčíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

Konzultant: MUDr. et MVDr. Jozef Škarda, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením
Mgr. Marty Khoylou, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Martě Khoylou, Ph.D. za odborné vedení v laboratoři a cenné rady při realizaci této práce. Dále bych velmi poděkovala MUDr. *et* MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D., Ph.D. za trpělivost, vstřícnost a ochotu mi pomoci při zpracování celé bakalářské práce, především pak za odborné připomínky při hodnocení výsledků. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat celé mojí rodině za morální podporu během studia.

Souhrn

Kolorektální karcinom je jedním z nejčastěji diagnostikovaných zhoubných nádorů ve vyspělých zemích. Kolorektální karcinom může vzniknout sporadicky nebo na základě dědičné predispozice. V procesu vzniku kolorektálního karcinomu se uplatňují matrix metaloproteinázy a PTEN. V poslední době se v rámci individuálního přístupu uplatňuje cílená léčba, kterou je možné nasadit na základě detekce určitých molekulárních biomarkerů, zejména v mutacích v genech RAS a expresi proteinu EGFR. Přesto však zůstává význam nových potencionálních prognostických a prediktivních faktorů v léčbě kolorektálního karcinomu.

Z uvedeného důvodu jsme sledovali v této bakalářské práci prognostický a prediktivní význam exprese proteinů MMP-19 a PTEN pomocí nepřímé imunohistochemické metody ve vzorcích pacientů s kolorektálním karcinomem. Oba tyto proteiny se podílejí, jak v raných, tak pozdních fázích vývoje kolorektálního karcinomu. Analýza námi získaných dat byla zpracována pomocí softwaru R a graficky modelována prostřednictvím Kaplan-Meierovy metody. Expresí těchto proteinů byly korelovány s histologickým typem adenokarcinomu, gradingem, stagingem, celkovým přežitím a délkou bezpříznakového období. Bylo zpozorováno lepší celkové přežití i délka bezpříznakového období u pacientů s vyšší expresí PTEN, než u pacientů se sníženou nebo dokonce negativní expresí PTEN. Expresí MMP-19 v cytoplazmě nádorových buněk by mohla být pozitivním faktorem přežívání.

Summary

Colorectal carcinoma represents one of the most frequent malignancies world wide. It could be of either nonhereditary or hereditary origin. Matrix metalloproteinases and PTEN represent important molecules involved in the process of colorectal cancer development and progression. Individualized targeted therapy seems to be of an increasing importance. For these reason molecular biomarkers such as RAS mutation status and EGFR expression are used. However, implementation of novel prognostic markers into clinical practice is increasingly important.

Therefore the aim of my bachelor work was to study the prognostic and predictive value of MMP-19 and PTEN in CRC patients using indirect immunohistochemical method. These proteins participate in both early and late phase of development of colorectal carcinoma. Data analysis has been processed by software R. Charts have been modelled using Kaplan-Meier method. Overall survival and disease free survival have been correlated with histological type of adenocarcinoma, grading and stage of disease. Associations between the expression of MMP-19, PTEN, overall survival and disease free survival has been pursued. Increased expression of PTEN was associated with better overall survival and disease free survival, in comparison with patients with decreased expression. Cytoplasmic expression of MMP-19 could be a positive prognostic factor in CRC patients.

Obsah

1	ÚVOD	9
2	KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM.....	10
2.1	Epidemiologie a léčba kolorektální karcinomu	10
2.2	Vznik kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni.....	12
3	SOUČASNÉ POZNATKY O PTEN A MMP	13
3.1	PTEN	13
3.1.1	Struktura a funkce PTEN.....	14
3.1.2	PTEN jako součást signální dráhy PI3K/Akt/mTOR.....	14
3.1.3	Exprese a prognostický význam PTEN u kolorektálního karcinomu.....	16
3.1.4	Prediktivní význam exprese PTEN u pacientů s CRC s ohledem na biologickou léčbu	16
3.2	Matrix metaloproteinázy	18
3.2.1	Struktura matrix metaloproteináz	18
3.2.2	Klasifikace matrix metaloproteináz.....	19
3.2.3	Funkce matrix metaloproteináz	20
3.2.4	Prognostický význam exprese MMP u pacientů s CRC.....	20
3.2.5	Prediktivní význam exprese MMP u pacientů s CRC	21
3.3	MMP-19.....	22
3.3.1	Struktura MMP-19.....	22
3.3.2	Exprese MMP-19 a její význam v zánětlivých procesech a v solidních nádorech.	23
4	CÍLE PRÁCE.....	24
5	MATERIÁL A METODIKA.....	25
5.1	Tvorba parafinových bloků.....	25
5.2	Tvorba tkáňové microarray	26
5.3	Imunohistochemie	27
5.4	Biologický materiál.....	29
5.5	Chemikálie a roztoky	29
5.6	Přístrojové vybavení laboratoře	30
5.7	Materiál	30

5.8	Vlastní postup - imunohistochemie	31
6	VÝSLEDKY	33
7	DISKUZE	44
8	ZÁVĚR	46
9	POUŽITÁ LITERATURA	47
9.1	Knihy	56
9.2	Použité internetové zdroje.....	56
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	57

1 ÚVOD

Kolorektální karcinom (CRC - colorectal carcinoma) je společné označení pro nádory tlustého střeva a konečníku, které se řadí mezi onemocnění trávicího systému. Podstatnou část karcinomů tlustého střeva představují adenokarcinomy vznikající ze žlázových buněk a střevní sliznice (URL:<<http://www.linkos.cz>> [cit. 2014-10-15]).

Adenokarcinomy a karcinomy konečníku jsou jedním z nejčastějších nádorů vůbec. V České republice se ročně vyskytuje přes 8 000 nových případů, přičemž každý druhý pacient s tímto onemocněním zemře. Maximum výskytu daného nádorového onemocnění je mezi 60 - 70 roky života (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2014-10-15]).

K šíření nádorů tlustého střeva dochází, jak lokálně, tak pomocí metastáz, které vznikají lymfatickou nebo hematogenní cestou. Za regionální lymfatické uzliny jsou považovány perikolické, presakrální a anorektální uzliny. Vzdálenější lymfatické uzliny jsou uzliny při radixu mesenteria, paraaortální, ilické a inguinální. K metastázování krevní cestou dochází převážně do jater.

Karcinomy tlustého střeva jsou zejména sporadické, které představují 75 % veškerých karcinomů tlustého střeva. Další skupinu tvoří hereditární karcinomy.

Léčba kolorektálního karcinomu je především chirurgická v kombinaci s chemoterapií, radioterapií a klinickou terapií.

Mezi ukazatele prognózy u pacientů s karcinomem tlustého střeva a kolorekta patří velikost tumoru, počet lymfatických uzlin postižených nádorem, věk pacienta (pacienti mladší 35 let mají horší prognózu) a hladina tzv. CEA – karcinoembryonálního antigenu v séru (Fu *et al.*, 2014).

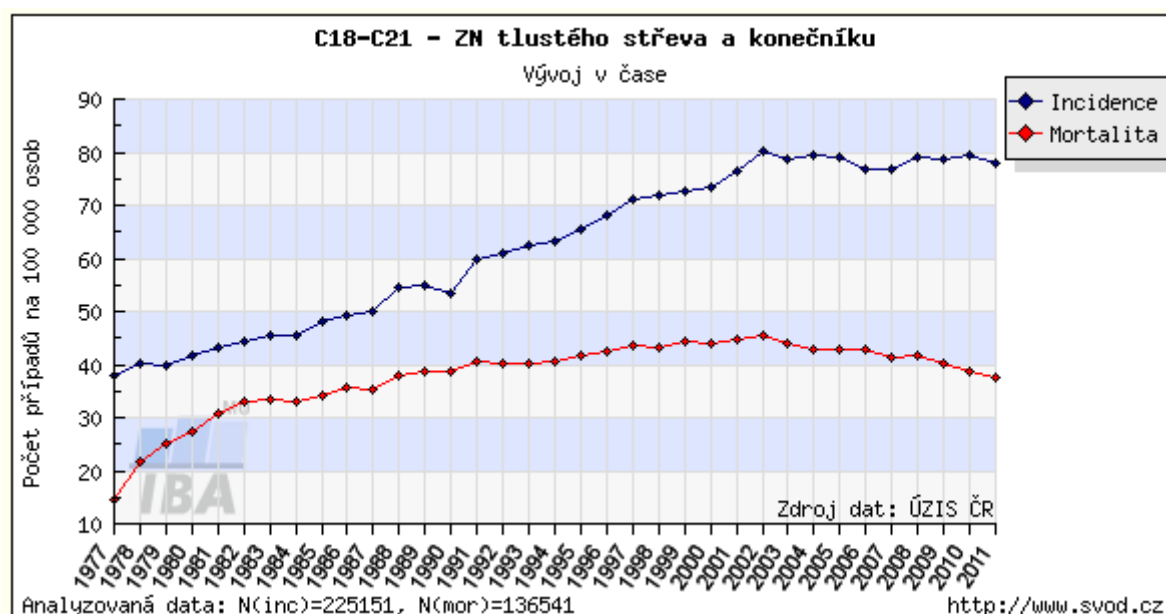
Maligní transformace je biologicky složitý proces, který zahrnuje aktivaci onkogenů a inaktivaci tumor supresorových genů (TSG). TSG na podporu rozvoje nádoru zbavují buňky rovnováhy mezi proliferací a apoptózou (Zheng *et al.*, 2007). PTEN hraje zásadní roli při vzniku nádorů a progresi malignit jako TSG a je jedním z nejčastěji mutovaných supresorů u lidských malignit (Keniry *et Parsons*, 2008). Taktéž matrix metaloproteinázy (MMP) jsou předmětem mnoha experimentálních studií, jelikož byly pozorovány v rozvoji i metastázách kolorektálního karcinomu a mohly by souviset s prognózou a s přežitím pacientů s tímto onemocněním.

Prognostický a prediktivní význam MMP-19 ještě nebyl v souvislosti s kolorektálním karcinomem podrobně prostudován, proto je zkoumán v této bakalářské práci současně s expresí PTEN.

2 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

2.1 Epidemiologie a léčba kolorektální karcinomu

Kolorektální karcinom je označení pro velmi časté zhoubné onemocnění trávicího systému, který zahrnuje nádory tlustého střeva (colon cancer) a nádory konečníku (rectal cancer). Z dosavadních dat vyplývá, že vyšší výskyt tohoto onemocnění je ve vyspělých státech světa. Česká republika je v jeho incidenci na předních místech již mnoho let. V roce 2012 byla Česká republika na 6. místě v hodnocení počtu nových případů na 100 000 obyvatel (URL:<<http://www.wcrf.org>> [cit. 2015-3-18]). V České republice byl od roku 2003 zaznamenán mírný pokles incidence i mortality (**Obr. 1**). Tento pokles je možným důsledkem vyšší informovanosti o možné prevenci a léčbě pacientů s tímto onemocněním. Menší procento nádorů se vyskytuje u osob pod 50 let věku. Vyšší počet případů je pak zaznamenán ve věku nad 70 let. Při srovnání pohlaví jsou kolorektálním karcinomem mnohem více postiženi muži než ženy (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2015-3-18]). Muži v celkovém žebříčku incidence obsadili 4. místo hned za Slovenskou republikou, Maďarskem a Korejskou republikou, kdežto ženy se v počtu nových případů na 100 000 obyvatel umístily na 16. místě (URL:<<http://www.wcrf.org>> [cit. 2015-3-18]).



Obr. 1: Vývoj incidence a mortality CRC v letech 1977 – 2011 v České republice (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2015-3-18])

U mužů je nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním rakovina prostaty a hned poté kolorektální karcinom v rámci České republiky. Ženám je nejčastěji diagnostikovaná rakovina prsu a poté taktéž kolorektální karcinom (URL:<<http://www.globocan.iarc.fr>> [cit. 2015-3-18]).

Příčina vzniku kolorektálního karcinomu není přesně známá, ale jsou definovány rizikové faktory, které zvyšují riziko vzniku tohoto onemocnění. Mezi tyto faktory patří složení potravy, především nadměrný příjem živočišných tuků, červeného masa a uzenin, ale také alkoholu. Další faktor spojený s potravou je naopak nízký příjem vlákniny a luštěnin. Dalšími faktory jsou věk, dědičné predispozice, vznik polypů ve střevích a chronická zánětlivá onemocnění střev (URL:<<http://www.kolorektum.cz>> [cit. 2015-3-18]).

Pro zvolení vhodné léčby je nutné komplexně vyšetřit nemocné pomocí zobrazovacích metod a určit rozsah onemocnění a klinické stádium (**Tab. 1**). Mezinárodně uznávanou klasifikací je klasifikace TNM, která je založená na třech informacích – T, N a M. T značí rozsah primárního nádoru; N popisuje postižení regionálních lymfatických uzlin, což jsou malé sbírky buněk imunitního systému nutné v boji proti infekcím a M popisuje přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz. TNM klasifikace zahrnuje klinické stádium 0-IV (URL:<<http://www.cancer.org>> [cit. 2015-3-18]). Méně používanou, avšak uznávanou klasifikací, je Dukesova klasifikace, která rozděluje onemocnění kolorektálního karcinomu do stádií A – D (Zavoral *et al.*, 2013). Stádia Dukesovy klasifikace odpovídají stádiím TNM klasifikace (URL:<<http://www.cancer.gov>> [cit. 2015-3-18]).

V kombinaci s chirurgickou léčbou může být použita adjuvantní chemoterapie i neoadjuvantní chemoterapie. Adjuvantní terapie bývá nasazena zpravidla po chirurgickém odstranění nádoru, aby došlo ke zničení zbytků choroby. Neoadjuvantní léčba bývá nasazena před zahájením léčebného procesu, aby se docílilo zmenšení nádoru a usnadnění operace (URL:<<http://www.kolorektum.cz>> [cit. 2015-3-18]).

V onkologii se stále častěji využívají tzv. molekulární markery, což jsou látky vylučované nádorovými buňkami. Jejich hladina v krvi může být obrazem odpovědi nádoru na léčbu nebo naopak časným příznakem zhoršení onemocnění (URL:<<http://www.kolorektum.cz>> [cit. 2015-3-18]). Bylo zjištěno, že takovou roli mohou hrát i matrix metaloproteinázy ve vývoji CRC.

Tab. 1: Modifikovaná klasifikace stádií CRC podle Dukese a TNM ve vztahu k léčbě
(URL:<<http://www.cancer.gov>> [cit. 2015-3-18])

Stádium TNM	Stádium Dukes	Hloubka invaze	Léčba
0	-	Tumor intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae	chirurgická
I	A	Tumor ohraničen střevní stěnou	chirurgická
II	B	Tumor zasahuje nebo proniká všemi vrstvami střevní sliznice	chirurgická + může být použita adjuvantní chemoterapie
III	C	Tumor poizitivní + pozitivní lymfatické uzliny	chirurgická + adjuvantní chemoterapie
IV	D	Vzdálené metastázy	chirurgická + adjuvantní/neoadjuvantní chemoterapie

2.2 Vznik kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni

Kolorektální karcinogeneze probíhá ve většině případů prostřednictvím vícestupňového procesu od sekvence adenomu po sekvenci karcinomu (Fearon *et Vogelstein*, 1990, Miyaki *et al.*, 1990). Za vznik CRC jsou zodpovědné mutace v tumor-supresorových genech (TSG) a onkogenech. Pro všechny buněčné linie kolorektálního karcinomu je typická genetická nestabilita – mikrosatelitní nestabilita (MSI - microsatellite instability) nebo chromozómová nestabilita (CIN - chromosomal instability). Přeměna buněčných genů do onkologických variantních alel v případě MSI vyplývá z bodových mutací, které mění strukturu genů a jejich funkce. V případě CIN dochází k této přeměně prostřednictvím chromozómových přestaveb nebo amplifikací, které narušují regulovanou genovou expresi (Michor *et al.*, 2005, Fearon, 2011).

Onkogeny urychlují dělení buněk nebo jim napomáhají k delšímu přežití, kdežto TSG zpomalují buněčné dělení nebo regulují odumírání buněk (URL:<<http://www.cancer.org>> [cit. 2015-2-16]). Mutace v těchto genech společně s DNA-metylací a změnami ve struktuře chromatinu dysregulují konzervované signální sítě, které mají účinek závislý na kritických buněčných fenotypech, včetně regulace buněčného metabolismu, proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Mutace v onkogenech byly detekovány pouze v somatických tkáních CRC (Fearon, 2011). Na rozdíl od onkogenů mutace v TSG se mohou vyskytovat i v zárodečných liniích, což může úzce souviset s dědičnou formou CRC, avšak ke většině změn dochází v somatických liniích (Grodén *et al.*, 1991).

Za iniciální genetické změny podporující progresi kolorektálního karcinomu je považováno genetické narušení tumor-supresorového genu APC (adenomatous polyposis coli), který se nachází na chromozómu 5q21 (Kinzler *et al.*, 1991a). Somatické mutace způsobující inaktivaci APC jsou typické pro sporadické formy kolorektálních karcinomů (Grodén *et al.*, 1991, Nishisho *et al.*, 1991). Mutace APC v zárodečné linii způsobuje vznik FAP (familial adenomatous polyposis), obecně adenomů (Grodén *et al.*, 1991, Kinzler *et al.*, 1991b). Následně může dojít k mutaci v onkogenu K-ras na chromozómu 12, což vede k přechodu z malého adenomu k velkému adenomu (Michor *et al.*, 2005, Fearon, 2011). Alelová ztráta na chromozómu 17p v oblasti obsahující tumor-supresorový gen Tp53 je další událostí pozorovanou ve vývoji kolorektálního karcinomu a ve spojení s mutací druhé alely vede k bi-alelické inaktivaci. Tato funkční ztráta Tp53 zahrnuje pozdní fázi v rozvoji kolorektálního karcinomu, konkrétně přechod od adenomu ke karcinomu (Baker *et al.*, 2003, Michor *et al.*, 2005).

3 SOUČASNÉ POZNATKY O PTEN A MMP

3.1 PTEN

PTEN – homolog fosfatázy a tensinu, lokalizovaný na chromozomu 10q23 je tumor-supresorový gen zapojený v širokém spektru nádorů u lidí. Jedná se o fosfatázu, která může působit na substrátech polypeptidových i fosfoinositidových *in vitro*. PTEN kóduje 403 aminokyselin polypeptidu s fosfátovou aktivitou. (Yang *et al.*, 2010).

3.1.1 Struktura a funkce PTEN

Protein PTEN se strukturně skládá ze tří částí: NH₂-terminální fosfatázová katalytická doména (přibližně 185 AMK s vysokou sekvenční homologií k cytoskeletálním proteinům – kuřecí tenzin a hovězí auxilin), COOH-terminální C2 doména a COOH-terminální doména (asi 50 AMK), (Li *et al.*, 2009). COOH-terminální C2 doména je složená do β -sendviče, který se sestává ze dvou antiparalelních β -listů se dvěma krátkými α -šroubovicemi zasahující mezi vlákna proteinu (Song *et al.*, 2012). Karboxy-terminální doména obsahuje tři fosforylační místa (Ser380, Thr382 a Thr383), která regulují stabilitu PTEN a mohou hrát důležitou roli při kontrole jeho biologické aktivity (Vazquez *et al.*, 2000).

Hlavní katalytickou funkcí PTEN je defosforylace fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu (PIP3), který je vytvářen aktivací fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K). Zvýšená hladina PIP3, jako důsledek ztráty funkce PTEN, způsobuje silnou derepresi PI3K/Akt/mTOR dráhy, která stimuluje buněčný růst a proliferaci (**Obr. 2**) (Stambolic *et al.*, 1998).

3.1.2 PTEN jako součást signální dráhy PI3K/Akt/mTOR

PTEN je hlavní negativní regulátor PI3K/Akt/mTOR signální dráhy. Na povrchu plazmatické membrány dochází k aktivaci fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), přičemž musí dojít k navázání růstových faktorů na receptor dané tyrosinkinázy (RTK), (Dahl *et al.*, 2007). Aktivovaná PI3K fosforyluje membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2). Tento proces vede k vytvoření dostatečného množství fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu (PIP3). Aktivita PI3K, která má za následek produkci PIP3 je přísně kontrolována a negativně regulována několika fosfatázami. PTEN - lipidová fosfatáza defosforyluje PIP3 ve 3' poloze, čímž je značně omezena produkce PIP3. PIP3 rekrutuje fosfatidylinositol-dependentní kinázu 1 (PDK1) a protein kinázu B (PKB, také známá jako Akt) do plazmatické membrány, kde PDK1 fosforyluje Akt (Park *et al.*, 2010).

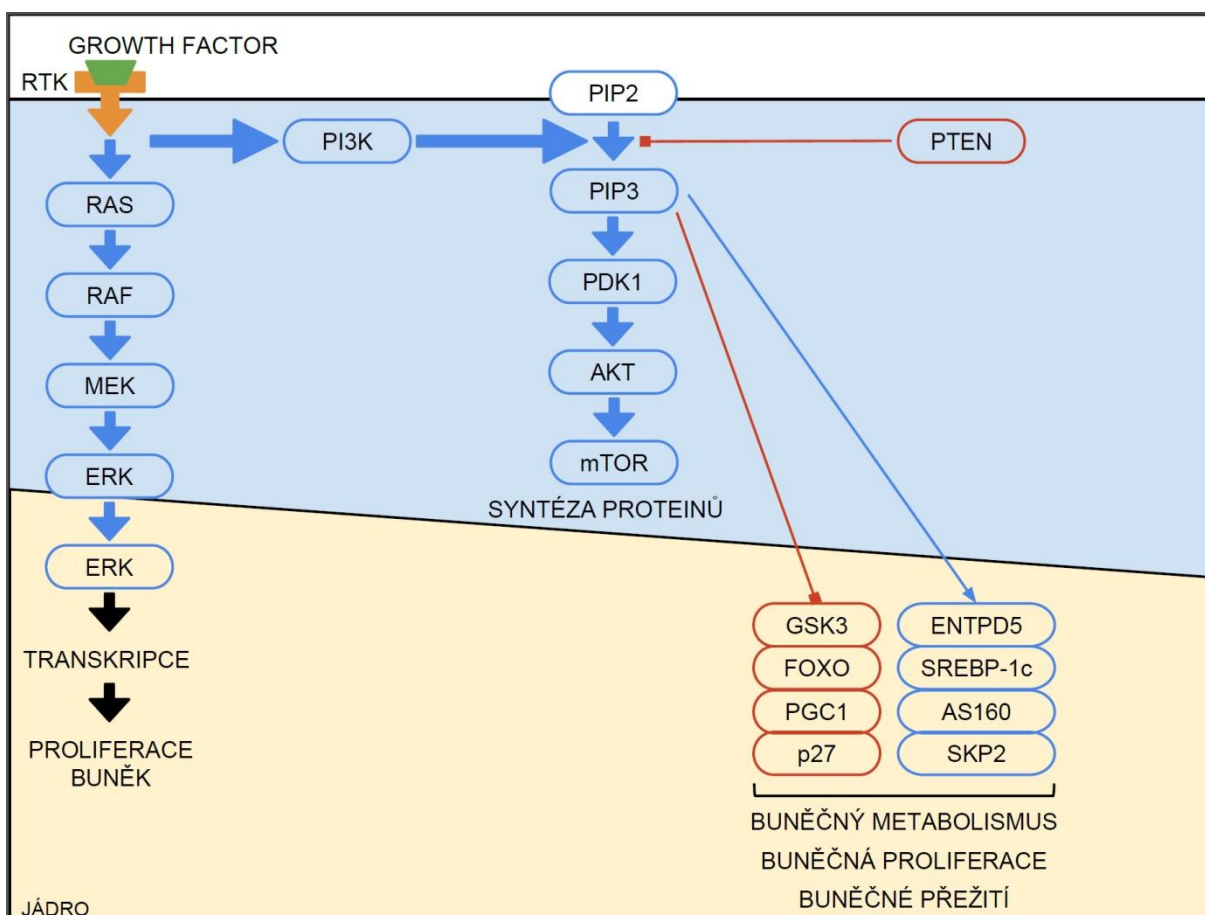
Aktivovaná kináza Akt reguluje přežití buněk, proliferaci buněk a buněčný metabolismus prostřednictvím inhibiční fosforylace (**Obr. 2**) ve směru proudu proteinů zahrnující GSK3, FOX proteiny O (FOXO), PGC1 a protein p27. Tyto procesy mohou být také řízeny opačným mechanismem, prostřednictvím aktivační fosforylace (**Obr. 2**) zahrnující ENTPD5, SREBP1C, AS160 a SKP2 (Song *et al.*, 2012). Mnoho substrátů, které jsou nezbytné pro rozvoj nádorového onemocnění, je aktivováno právě Akt účastníci se této signální dráhy.

Kaskáda pokračuje fosforylací proteinové kinázy mTOR (Park *et al.*, 2010). Mimo jiné funkce, mTOR také fosforyluje protein Mdm2, přičemž se jeho množství v buňce zvyšuje a dochází tak k ubikvitinaci a degradaci proteinu p53. Nízká hladina proteinu p53 zapříčiňuje negativní pochody v buňce, jejichž výsledkem může být nekontrolované množení buněk a vznik nádorového onemocnění (Moumen *et al.*, 2007).

Dalšími členy signální dráhy PI3K/Akt/mTOR jsou TSC1/TSC2, RHEB, mTOR, 4EBP, p70S6K a PP2A (Cully *et al.*, 2006).

Členové signální dráhy RAS-RTK jsou RAS, RAF, MEK a ERK - aktivace této dráhy vede k proliferaci buněk (**Obr. 2**) (Cully *et al.*, 2006).

Genetická inaktivace PTEN vede ke konstitutivní aktivaci signální dráhy PI3K/Akt/mTOR u celé řady nádorů, např. u karcinomu prostaty, močového měchýře, mozku, melanomu a kolorektálního karcinomu (Park *et al.*, 2010).



Obr. 2: Schéma signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v buňce (RTK – receptor tyrosin kinázy pro vazbu růstových faktorů v cytoplazmatické membráně buňky, modrá barva znázorňuje fosforylací jednotlivých substrátů, naopak červená barva vystihuje defosforylací (inhibici) substrátů). Překresleno podle Song *et al.* (2012).

3.1.3 Exprese a prognostický význam PTEN u kolorektálního karcinomu

Vícero studií se zaměřilo na sledování prognostického významu exprese PTEN u kolorektálního karcinomu. Exprese proteinu byla sledována, jak u adenokarcinomů *in situ* (preinvazivních lézí), tak i u metastatických karcinomů, kde v některých případech byla pozorována snížená exprese. V jiných studiích byla pozorována normální exprese a v jiných snížená exprese tohoto proteinu v cytoplazmě a jádrech buněk střevní sliznice.

Ztráta exprese PTEN může hrát důležitou roli, jak v časných, tak pozdních stádiích kolorektální karcinogeneze. V případě adenomatózních polypů to může být známkou prekancerózního stavu – transformace nádoru. Během pozdní karcinogeneze je PTEN korelován s pokročilým stádiem onemocnění a může být prediktorem špatné prognózy (Waniczek *et al.*, 2013).

Waniczek *et al.* (2013) uvádí, že exprese proteinu PTEN byla přítomna hlavně v cytoplazmě buněk, ale také v jádře buněk normální střevní sliznice. Li *et al.* (2009) pozorovali nižší expresi PTEN v kolorektálním karcinomu, než ve zdravé tkáni. Vyšší exprese PTEN byla pozorována u pacientů mužského pohlaví, než u ženského pohlaví.

Snížená exprese PTEN u kolorektálního karcinomu úzce souvisí s vyšším stádiem Dukesovy klasifikace kolorektálního karcinomu, ale ne s věkem pacienta, diferenciací a žilní invazí. Mimo to, na základě jednorozměrné analýzy bylo prokázáno, že pacienti bez exprese PTEN vykazují horší prognózu (kratší přežití), než pacienti s expresí PTEN (Li *et al.*, 2009).

Expresí PTEN pravděpodobně přispívá k růstu, invazi a metastázám kolorektálního karcinomu, a tedy by mohl být považován jako vhodný marker pro indikaci agresivního chování a špatné prognózy u kolorektálního karcinomu (Li *et al.*, 2009).

3.1.4 Prediktivní význam exprese PTEN u pacientů s CRC s ohledem na biologickou léčbu

Důvod, proč se v onkologii hledají prediktivní markery, je hlavně volba nejvhodnější metody léčby u daného pacienta. Aby mohl být určitý marker používán v praxi, musí splňovat určité podmínky, jako jsou dostatečná senzitivita, specifita, technická pravidelnost a také cena. Problém při používání markerů je ve složitosti vztahů mezi signálními dráhami, které se vzájemně ovlivňují, proto je možné použít více markerů současně (URL:<<http://www.remedia.cz>> [cit. 2015-3-11]).

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je nadměrně exprimován v buňkách karcinomu tlustého střeva a hraje důležitou roli v jeho rozvoji. Protilátky proti EGFR, kam se také řadí cetuximab a panitumumab, jsou v současné době používány pro léčbu metastatického kolorektálního karcinomu (mCRC) v první, druhé nebo třetí linii chemoterapie.

Mezi ligandy EGFR patří epidermální růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor alfa (TGF- α), amfiredulin, epiregulin nebo EGF podobný růstový faktor vázající heparin. Vazba ligandu na EGFR způsobí dimerizaci receptoru, což vede k autofosforylaci zbytků tyrosinu v intracelulární doméně a následné signální transdukcí RAS/RAF/MEK (MAP kinázy) dráhy a PI3K/Akt/mTOR signální dráhy ve směru proudu proteinů (Spano *et al.*, 2005). Aktivace signální transdukcí EGFR podporuje růst nádoru, metastáze a angiogenezi nádorové tkáně (Liu *et al.*, 2001).

Mechanismus protinádorového účinku léků obsahující protilátky proti EGFR (cetuximab a panitumumab) spočívá v kompetitivní vazbě na extracelulární doménu EGFR, což vede k inhibici aktivace EGFR a následně signálních drah RAS/RAF/MEK (MAP kinázy) a PI3K/Akt/mTOR. Léky obsahující protilátky proti EGFR inhibují růst, invazi, angiogenezi a způsobují apoptózu buněk kolorektálního karcinomu (Liu *et al.*, 2001). Avšak panitumumab a cetuximab nemají stejný mechanismus účinku, ačkoli se tyto EGFR-I vážou na stejnou oblast EGFR. Cetuximab je IgG1 protilátka, má tedy schopnost působit také na indukci buněčné cytotoxicity, na rozdíl od panitumumabu, který se řadí mezi protilátky IgG2. (Kim, 2009, Freeman *et al.*, 2008)

PTEN blokuje signalizační dráhu receptorů pro růstový faktor a účinkem je tedy narušení signálu z PI3K. Přestože metoda stanovení PTEN nebyla dosud dobře prokázána, lze u 20 % až 40 % karcinomů tračníku bez exprese PTEN v důsledku methylace promotoru očekávat, že nebudou vykazovat odpověď na inhibici EGFR (URL:<<http://www.linkos.cz>> [cit. 2015-2-28]).

Několik studií se zabývalo vztahem mezi expresí PTEN/AKT a účinností léčby protilátek proti EGFR. Některé studie prokázaly, že ztráta PTEN je spojena s rezistencí na cetuximab u pacientů s metastatickým CRC, nicméně tyto studie nebyly uniformní při hodnocení exprese PTEN (Frattini *et al.*, 2007; Jhaver *et al.*, 2008).

Naopak, studie Laurent-Puig *et al.* (2009) uvádí, že ztráta exprese proteinu PTEN, která byla detekována asi u 20 % (ve 22 ze 111 vzorků) z K-ras divokého typu, nebyla spojena s odpovědí nádoru nebo s přežitím bez progresu (PFS), ale byla spojována s mírně horším celkovým přežitím (OS).

3.2 Matrix metaloproteinázy

Matrix metaloproteinázy (MMP) jsou skupina na vápníku závislých a zinek obsahujících endopeptidáz, které jsou zodpovědné za remodelaci tkání a degradaci extracelulární matrix (ECM). Exprese MMP je za fyziologických podmínek minimální, čímž se udržuje homeostáza. Regulace MMP je zajišťována pomocí hormonů, růstových faktorů a cytokininů. Funkce těchto enzymů je striktně kontrolována endogenními inhibitory matrix metaloproteináz (MMPI) a tkáňovými inhibitory matrix metaloproteináz (TIMP) (Rajeschwar *et Corwin*, 2007).

3.2.1 Struktura matrix metaloproteináz

Matrix metaloproteinázy mají společnou strukturu složenou z tzv. domén, přičemž nemusí být všechny zastoupeny u jednotlivých skupin MMP. Základní struktura matrix metaloproteináz obsahuje propeptid, katalytickou doménu a C terminální hemopexinovou doménu (Szabo *et al.*, 2004).

Před propeptidovou doménou se nachází signální peptid, který vede k sekreci matrix metaloproteináz z buňky (Vincenti *et Brinckerhoff*, 2007). Mimo to, mohou být tyto enzymy ukotveny k cytoplazmatické membráně, a tím omezovat jejich katalytickou aktivitu v extracelulárním prostoru nebo na povrchu buňky (Fanjul-Fernandéz *et al.*, 2010). Všechny MMP jsou syntetizovány v latentní formě (Van Wart *et Birkedal-Hansen*, 1990).

Propeptidová doména obsahuje okolo 80 aminokyselin, které vytvářejí tři α řetězce a spojovací smyčku. Tato doména se vyznačuje přítomností SH skupiny cysteinu, která reaguje s katalytickým iontem zinku v aktivním místě. Cystein je zde v sekvenčním motivu PRCGXPD („cystein switch“) k udržení enzymu v neaktivní formě (Murphy *et Nagase*, 2008).

Furinem aktivovatelné MMP jsou skupinou matrix metaloproteináz, které obsahují furin rozpoznávací motiv RXKR, vložený mezi propeptid a katalytickou doménu. Tuto sekvenci rozpoznává a následně štěpí proteáza (konvertáza), což slouží jako základ pro furin-dependentní aktivaci latentních enzymů před jejich sekrecí. Jedná se o úsek zhruba 25 aminokyselin, charakteristický především pro matrix metaloproteinázy membránového typu (Fanjul-Fernandéz *et al.*, 2010, Massova *et al.*, 1998).

Katalytická doména je tvořena přibližně 170 aminokyselinami a je podobná tvaru koule (Fanjul-Fernandéz *et al.*, 2009, Tallant *et al.*, 2010). Katalytická doména obsahuje dva zinečnaté ionty a alespoň jeden iont vápenatý, tudíž má zinek vázající motif HEXXHXXGXXH, ve kterém tři histidinové zbytky vážou jeden ze dvou zinečnatých iontů

nacházející se v aktivním místě této domény. Tento iont je zapojen do katalytických procesů matrix metaloproteináz a je tedy nezbytný pro jejich proteolytickou aktivitu. Druhý zinečnatý iont (strukturální zinek) a vápenaté ionty jsou přítomny v katalytické doméně dále od místa, kde se váže katalytický zinek. (Lee *et al.*, 2004, Massova *et al.*, 1998).

Pantová oblast („hinge region“), má variabilní délku (2-72 aminokyselin), spojuje katalytickou doménu s doménou hemopexinovou (Sela-Passwell *et al.*, 2010). Důležitý význam má pro stabilitu enzymů a pro degradaci komplexních substrátů (Maskas, 2004).

C terminální hemopexinovou doménu tvoří okolo 200 aminokyselinových zbytků, které ji udávají strukturu čtyř-lopátkové β vrtule („4-bladed β -propeller fold“) s jednou stabilizační disulfidovou vazbou (Visse *et Nagase*, 2003, Bode *et al.*, 1995). Bylo prokázáno, že tato doména hraje roli v substrátové specifitě proteinů a v interakci s tkáňovými inhibitory matrix metaloproteináz (TIMP) (Borden *et al.*, 1997, Gomis-Rüth *et al.*, 1997). U kolagenáz má hemopexinová doména zásadní význam, protože je schopna zpracovávat helikální strukturu trojvláknového kolagenu, kterou katalytická doména sama nezpracovává (Murphy *et al.*, 1992).

U matrix metaloproteináz membránového typu se také nacházejí transmembránové domény, které slouží k ukotvení těchto enzymů k povrchu buňky (Nagase *et Woessner*, 1999). Za touto doménou u některých matrix metaloproteináz následuje cytoplazmatický ligand („cytoplasmic tail“), který má např. u MMP-14 význam pro intracelulární signalizaci a možnou regulaci tohoto enzymu (Spinale *et al.*, 2013)

3.2.2 Klasifikace matrix metaloproteináz

Na základě klasifikace jsou MMP rozděleny do šesti skupin podle jejich substrátové specifity a umístění domén. Jedná se o kolagenázy, želatinázy, stromelysiny, matrilysiny, MMP membránového typu a ostatní.

Kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13 a MMP-18) štěpí intersticiální kolageny I, II a III na charakteristické $\frac{3}{4}$ a $\frac{1}{4}$ fragmenty, ale mohou štěpit i další molekuly ECM a rozpustné proteiny.

Do skupiny **želatináz** patří želatináza A (MMP-2) a želatináza B (MMP-9). Tyto enzymy mají tři repetice typu II fibronektinové domény, která se váže k želatině/kolagenu.

Ke **stromelysinům** se řadí stromelysin 1 (MMP-3), stromelysin 2 (MMP-10) a stromelysin 3 (MMP-11). Všechny tři typy MMP mají uspořádání jednotlivých domén

podobné ke kolagenázovým doménám. MMP-3 a MMP-10 nesou podobnou strukturu a substrátovou specifitu, na rozdíl od MMP-11, která je k nim vzdáleně příbuzná.

Matrilysiny je skupina obsahující pouze dvě matrix metaloproteinázy (MMP-7 a MMP-26), kterým chybí hemopexinová doména.

MMP membránového typu zahrnují čtyři transmembránové proteiny (MMP-14, MMP-15, MMP-16 a MMP-24) a dva proteiny připevněné k membráně glykosylfosfatidylinositolovou kotvou (MMP-17 a MMP-25).

Dalších sedm matrix metaloproteináz (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 a MMP-28) není zařazeno do výše zmíněných kategorií, ačkoli MMP-12, MMP-20 a MMP-27 vlastní podobnou strukturu a umístění na chromozomu jako stromelysiny (Nagase *et al.*, 2006).

3.2.3 Funkce matrix metaloproteináz

Ve většině orgánů jsou základními složkami extracelulárního matrix (ECM) kolageny a mnoho dalších proteinů (lamin, entaktin a proteoglykany), které tvoří bazální membránu buněk. Nádorové buňky nadměrně exprimují MMP nebo indukují jejich expresi ve stromatu sousedních buněk, aby mohlo dojít k degradaci bazální membrány a napadení okolní tkáně. Proteolytická aktivita MMP je důležitá pro invazi nádorových buněk do nedalekých cév (intravazace) a následně pro invazi do vzdálených míst (extravazace), kde dochází k tvorbě metastáz (Roy *et al.*, 2009). Degradované složky ECM jsou potřebné pro nádorovou angiogenezi, což je novotvorba krevních kapilár důležitá pro invazi nádoru a metastázy (Ogata *et al.*, 2006).

3.2.4 Prognostický význam exprese MMP u pacientů s CRC

Matrix metaloproteinázy (MMP) hrají u kolorektálního karcinomu klíčovou roli v procesu nádorové invaze a metastázování. Jejich význam spočívá v degradaci a remodelaci ECM v nádorovém stromatu (Liabakk *et al.*, 1996). Mnohé studie exprese jednotlivých matrix metaloproteináz prokázaných u kolorektálního karcinomu ukázaly, že může jít buď o zvýšenou expresi MMP nebo zvýšenou aktivitu MMP u tohoto typu nádoru (Leeman *et al.*, 2003).

Expresí matrix metaloproteinázy 1 (MMP-1) byla pozorována v cytoplazmě nádorových buněk, některých stromálních buněk a v několika normálních epitelových buňkách sliznice tlustého střeva. Expresí MMP-1 u kolorektálního karcinomu je spojena se špatnou prognózou a významně koreluje s hematogenními metastázemi kolorektálního

karcinomu. Další studie neprokázala korelaci mezi expresí MMP-1 a jinými klinicko-patologickými znaky (hloubka invaze nádoru, lymfatická invaze, žilní invaze, metastáze lymfatických uzlin a Dukesova klasifikace) nebyla nalezena (Hinoda *et al.*, 2002, Sunami *et al.*, 2000).

Levy *et al.* (1991) prokázali zvýšenou expresi matrix metaloproteinázy 2 (MMP-2) v nádorovém stromatu u kolorektálního karcinomu s použitím nepřímé dvoustupňové imunohistochemické metody. Zucker *et al.* (1993) také prokázali zvýšenou hladinu aktivní matrix metaloproteinázy 9 (MMP-9) v cytoplazmě buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem. Ačkoli obě studie prokazují přítomnost MMP-2 a MMP-9 u kolorektálního karcinomu, bylo vždy popsáno malé množství vzorků nebo nebyly kvantitativní (Liabakk *et al.*, 1996). Ogata *et al.* (2006) poukázali na fakt, že zvýšená exprese MMP-9 v cytoplazmě nádorových buněk významně souvisí s invazí nádoru do lymfatických uzlin a angioinvazí.

Matrix metaloproteináza 7 (MMP-7) je nejmenším členem matrix degradujících metaloproteináz, která je specificky exprimována v epiteliálních nádorových buňkách (namísto intersticiálních buněk) a je spojena s nádorovou progresí, apoptózou a angiogenezí. Některé studie uvádí, že korelace mezi expresí MMP-7 a přežitím nebo prognózou u kolorektálního karcinomu je stále neprůkazná (Yang *et al.*, 2012). Avšak Adachi *et al.* (1999) uvádí, že u pacientů s kolorektálním karcinomem byla zjištěna významná korelace exprese MMP-7 s přítomností lymfatických uzlin a vzdálených metastáz.

Přítomnost matrix metaloproteinázy 13 (MMP-13) byla prokázána v lidském karcinomu prsu, u osteoartrózy chrupavky a také byla detekována v několika typech malignity. Podle Yamada *et al.* (2010) vysoká exprese MMP-13 u pacientů s kolorektálním karcinomem významně souvisí s jaterními metastázemi, ale nesouvisí s věkem, pohlavím, velikostí nádoru, histologickým typem, hloubkou invaze, lokalizací nádoru, lymfatickou invazí, lymfatickými uzlinami, ani žilní invazí.

3.2.5 Prediktivní význam exprese MMP u pacientů s CRC

V rámci prediktivního významu matrix metaloproteináz byly u kolorektálního karcinomu studovány pouze následovné MMP. MMP-9, která dle práce Bendardaf *et al.* (2010) byla prokázána jako nezávislý prediktivní faktor pro interval bezpříznakového období (DFS). Stejně tak i MMP-7, survivin a TACSTD2 byly nezávislými prediktory horšího přežití (Fang *et al.*, 2009). Nízká exprese MMP-7 byla považována za nezávislý prediktor relapsu (návratu nemoci) u pacientů s kolorektálním karcinomem (Martínez-Fernández *et al.*, 2009).

Zvýšená exprese MMP-9 RNA je považována za nezávislý prediktor rekurence u pacientů s kolorektálním karcinomem (Zeng *et al.*, 1996).

3.3 MMP-19

MMP-19 je vylučována ve formě zymogenu, stejně jako ostatní členové matrix metaloproteináz. Pendás *et al.* (1997) izolovali MMP-19 z jater a placenty a označili ji jako MMP-19. Nicméně tato matrix metaloproteináza byla také izolovaná u pacientů s revmatoidní artritidou ze zánětlivé synoviální tkáně jako auto-antigen RASI-1 (Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed - 1), proto je někdy také označována v literatuře „RASI“ (Sedláček *et al.*, 1997).

MMP-19 může být syntetizována v placentě, plicích, slinivce břišní, vaječnicích a ve střevech a může tedy v těchto tkáních hrát specializovanou roli (Pendás *et al.*, 1997).

3.3.1 Struktura MMP-19

MMP-19 vykazuje stejnou strukturu domén charakteristickou i pro ostatní členy MMP: signální peptid; propeptidovou doménu se zbytkem cysteinu, který je nutný k zachování latence enzymu; katalytickou doménu obsahující aktivační sekvenci s vazebným místem pro zinek a C-terminální doménu. MMP-19 kóduje 508 aminokyselin a nachází se v chromozómové oblasti 12q14, což je jedinečná poloha vzhledem k lokalizaci jiných MMP. MMP-19 obsahuje 2 glykosylační místa. Na rozdíl od většiny MMP, které mají 10 exonů, má MMP-19 pouze 9 exonů. MMP-19 postrádá charakteristické vlastnosti pro zařazení do některé z popsaných šesti skupin MMP (Pendás *et al.*, 1997, Mueller *et al.*, 2000). MMP-19 je tedy řazena do nové skupiny, kam byla také přiřazena MMP-28, jelikož vykazuje podobnou strukturu jako MMP-19 (Marchenko *et Strongin*, 2001).

MMP-19 se liší od ostatních MMP v autoinhibiční sekvenci vyskytující se v propeptidové doméně. Předpokládá se, že sekvence PRCGLED umožní autokatalytickou aktivaci MMP-19. Tato sekvence vzniká záměnou valinu vyskytujícího se v běžné sekvenci ostatních MMP za leucin a prolinu za kyselinu glutamovou. Dalším rysem MMP-19 je unikátní úsek 27 aminokyselin TTPSGGNTTPSGTGITLDTTLSATETT, který je součástí sekvence bohaté na treonin v C-terminální doméně a není homologní s žádnými jinými proteiny. Sekvence bohaté na prolin v pantové oblasti, jímž předchází úsek oligoglutamové kyseliny EEEETELPTVPPVPTEPSM je další charakteristikou MMP-19 (Sedláček *et al.*, 1997).

3.3.2 Exprese MMP-19 a její význam v zánětlivých procesech a v solidních nádorech

Matrix metaloproteinázy nejsou exprimovány ve zdravých tkáních nebo jen v malé míře, ale jejich produkce a aktivita je zvýšená během zranění, zánětu nebo v průběhu vzniku nádoru (Nagase *et Woessner*, 1999). Bister *et al.* (2004) ve své studii prokázali, že na rozdíl od většiny matrix metaloproteináz, je MMP-19 přítomna i v normální střevní sliznici. MMP-19, ale také MMP-28 vykazují sníženou expresi v průběhu maligní transformace tlustého střeva a mohou hrát důležitou roli při homeostáze.

V rámci *in vitro* experimentů byla prokázána schopnost MMP-19 degradovat kolagen typu IV, laminin-1, nido-gen, fibronectin a želatinu typu I. Je zajímavé, že schopnost aktivovat pro-MMP nebyla u MMP19 *in vitro* prokázána (Stracke *et al.*, 2000a, Stracke *et al.*, 2000b). Další zajímavostí je, že se MMP-19 nachází v benigních lézích prsní žlázy, ale také v samotné normální tkáni prsní žlázy, avšak progresse směřující k invazivnímu fenotypu a nádorové dediferenciaci vede k vymizení MMP-19 z nádorových buněk a krevních cév, což naznačuje, že by MMP-19 mohla sloužit jako ochranný marker (Djonov *et al.*, 2001).

V zánětlivých onemocněních střev byla zvýšená exprese MMP-19 v neemigrujících enterocytech a ubývajícím epitelu střev. Exprese MMP-19 není spojena s migrací v normální střevní sliznici (Bister *et al.*, 2004). Ve studii Bister *et al.* (2004) nezpozorovali přítomnost MMP-19 na počátku invaze karcinomu tlustého střeva, ale byla jasně snížená exprese v epitelu nádorových buněčných ostrůvků, tzn. v pozdním karcinomu tlustého střeva.

Poprvé byla exprese MMP-19 v lymfatických cévách, neuronech a v hladké svalovině pozorována ve studii Červinková *et al.* (2014). Ačkoliv funkce MMP-19 v lymfatických cévách není známá, mohla by mít podobnou funkci, jak bylo navrženo pro MMP-19 v krevních cévách, tj. tato proteináza je schopna štěpit komponenty bazální membrány (Stracke *et al.*, 2000a, Titz *et al.*, 2004, Sadowski *et al.*, 2005), které jsou zapojeny do růstu cév (Červinková *et al.*, 2014). Popsané mechanismy se uplatňují v procesech zánětu a hojení.

Vysoká exprese MMP-19 propagující invazi nádorových buněk byla pozorována v proliferujících buňkách astrocytomu (nejčastějšího gliomu mozku) a v kožním melanomu (Lettau *et al.*, 2010, Muller *et al.*, 2010).

Exprese a regulace MMP-19 může být různá v závislosti na typu buněk, jakož i na typu onemocnění, např. zánět nebo nádor. Ačkoli role MMP-19 a všechny její substráty ve střevě ještě nebyly objasněny v souvislosti se střevní homeostázou a v rozvoji střevních onemocnění, je pravděpodobné, že MMP-19 se podílí na progresi těchto onemocnění (Červinková *et al.*, 2014).

4 CÍLE PRÁCE

1. Imunohistochemická detekce PTEN a MMP-19 ve formalínu fixovaných a do parafínu zalitých vzorcích u pacientů s kolorektálním karcinomem.
2. Korelace délky přežití a délky bezpříznakového období s typem adenokarcinomu, gradingem, stádiem onemocnění a expresí výše uvedených proteinů.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Tvorba parafinových bloků

Aby mohl být tentýž vzorek tkáně od jednoho pacienta použit k opakovanému vyšetření, je nutné vytvořit parafinové bloky. Tato metoda zahrnující fixaci tkáně, zalití tkáně, krájení tkáně, barvení a následné montování se v histologii používá nejčastěji.

Prvním krokem je odběr tkáně. S odebraným materiálem je nutné pracovat šetrně a rychle ho vložit do fixační tekutiny, jelikož tkáně bez přístupu kyslíku podléhají rozkladu hydrolytickými enzymy (autolýza). Na správném provedení fixace záleží výsledek dalšího zpracování tkáně. Jestliže se odebere vzorek většího objemu, musí být nakrájen na menší objekty, aby mohla fixační tekutina dostatečně rychle proniknout i do středu bloku (Malínský, 1988). Důvodem fixace je rychlé usmrcení buněk, čímž se zabrání denaturaci bílkovin, které mohou být důležité pro další práci s tkání. Fixační tekutinou mohou být látky organického nebo anorganického původu, z nichž nejčastěji používanou je formol (4 – 10% roztok formaldehydu). Jeho výhodou je dobré srážení bílkovin, nerozpouští tuky a tkáň je možné v něm uchovávat po delší dobu (URL:<<http://www.biologie.pedf.cuni.cz>> [cit. 2015-3-23]). Po zhruba 24hodinové fixaci musí být provedeno vyprání fixační tekutiny a odvodnění alkoholy o postupně se zvyšující koncentraci, protože parafin je médium nemísitelné s vodou. Vzorek je tedy odvodňován v 70%, 80% a 100% etanolu. Po odstranění vody z tkáňových bločků je třeba objekty prosytit látkou mísící se současně se zalévacím médiem (parafinem) i alkoholem. K projasnění se vzorek vkládá do acetonu, poté do směsi aceton/xylen a nakonec do xylenu. Po projasnění musí být tkáň prosycena parafinem, aby došlo k odstranění xylenu z tkáně. Poté následuje vlastní zalití tkáně do parafinu, přičemž dojde ke vzniku parafinových bloků připravených ke krájení (Malínský, 1988).

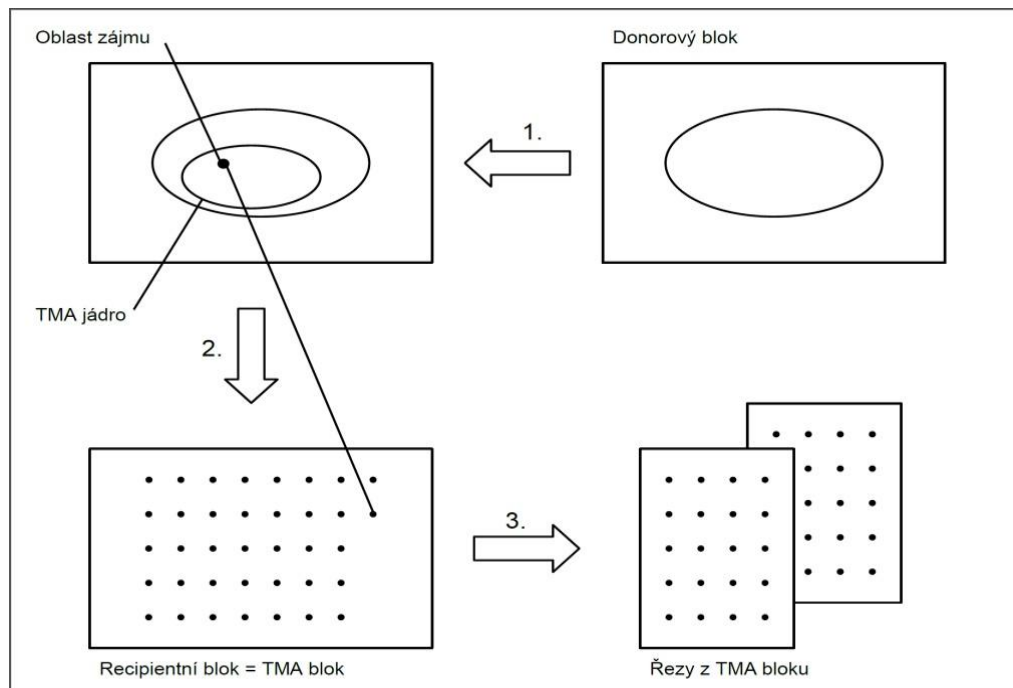
Jakmile je tkáň zalitá v parafinu je možné vzorek krájet pomocí tzv. mikrotomu na požadovanou tloušťku řezu (v řádech mikrometrů – μm). Z bločku se pomocí speciálních broušených nožů, které jsou součástí mikrotomu, odkrajují řezy o tloušťce cca 4 μm . Následně jsou tyto řezy pomocí vodní lázně napnuty a přeneseny na podložní sklíčko. Takto připravené skla mohou být využity k imunohistochemické detekci.

5.2 Tvorba tkáňové microarray

Shromáždit několik vzorků tkání zalitých v parafinových blocích do jednoho parafinového bloku (**Obr. 3**) je možné prostřednictvím metody tkáňové microarray (TMA – tissue microarray). Předem označená místa na tkáni (donorový blok) jsou pomocí jehly, která je součástí přístroje, vyřezána ve tvaru válečků a vložena do nového (recipientního) parafinového bloku. Umístění válečků do recipientního bloku má přesnou orientaci, která je vytvářena v softwaru propojeným s „microarrayerem“. Pro bezchybnou orientaci následných řezů se do recipientního bloku vkládají i válečky tkání z jiných orgánů sloužící jako kontrola, kterou patolog dokáže rozpoznat. Válečky mohou být odebrány z mnoha míst stejného nádoru, z nádoru v odlišném čase jeho vývoje nebo z nádorů od několika pacientů. Z TMA bloku nesoucího velké množství vzorků se krájí tenké řezy, které jsou poté napnuty na podložní sklo a připraveny pro další zpracování jako např. imunohistochemie, imunofluorescence nebo FISH.

TMA přináší celou řadu výhod, z nichž nejcennější je seskupení většího počtu vzorků do jednoho bloku. S touto výhodou souvisí experimentální jednotnost, snížení množství protilátek a dalších činidel, zachování části původního vzorku pro další diagnózu patologem, dostatečné množství materiálu TMA, nutné v případě potřeby dalších řezů a opakování experimentu a nakonec také menší časová náročnost.

Při zpracování vzorků pro tuto práci byl použit od firmy Integrated System Engineering přístroj Galileo TMA CK 3500, který spolupracuje se softwarem IseTMA v počítači a je nutný pro realizaci recipientního bloku z několika donorových bloků (URL:<<http://www.isenet.it>> [cit. 2015-3-24]).



Obr. 3: Schéma zhotovení TMA bloku. Překresleno podle Jawhar (2009).

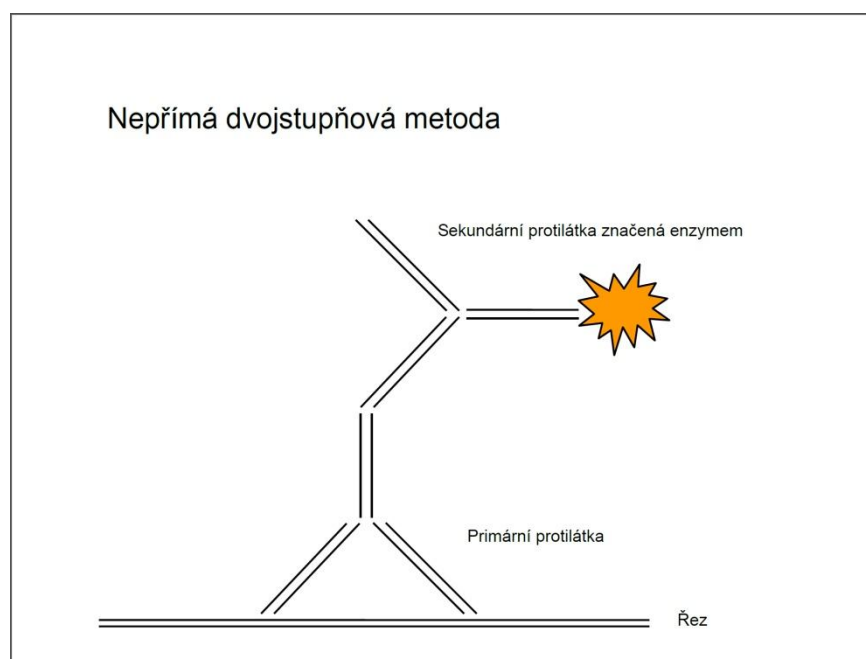
5.3 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je jednoduchá metoda, jež vznikla propojením tří vědních disciplín: imunologie, histologie a chemie. IHC umožňuje detekovat distribuci a lokalizaci specifických buněčných složek (antigenů a jejich determinant) v tkáňových řezech pomocí specificky značených protilátek. Jakmile dojde k vazbě protilátky s antigenem, nastává barevná histochemická reakce, kterou lze pozorovat světelným mikroskopem v případě značení protilátky enzymem nebo fluorescenčním mikroskopem v případě značení protilátky fluorochromem. Značení protilátek enzymem nebo fluorochromem je nutné k barevné vizualizaci, protože samotná vazba protilátky s antigenem nezpůsobí žádnou barevnou reakci. (Ramos-Vara, 2005). V obecné rovině je tato vazba chápána jako vazba zámku (antigen) a klíče (protilátka), které do sebe specificky zapadnou (Beranová *et* Tonar, 2002). IHC je v současnosti využívána v diagnostice a výzkumu infekčních i nádorových onemocnění (Ramos-Vara, 2005).

Na základě pořadí značené protilátky lze imunohistochemické metody rozdělit na přímé a nepřímé. Při užití přímé metody se tzv. primární protilátka značená enzymem či fluorochromem váže rovnou k antigenu. Nepřímé metody jsou komplikovanější, ale za to jsou mnohem citlivější ve srovnání s přímými metodami. Mezi nepřímé metody patří nepřímá dvojstupňová metoda, která byla použita v této práci, proto bude popsána podrobněji a dále nepřímá trojstupňová metoda, kam se také řadí metoda avidin-biotin komplexu (ABC).

Nepřímá trojstupňová metoda umožňuje zesílení signálu, jestliže je nedostatečné množství antigenu ve tkáni. V případě trojstupňové metody se primární protilátka váže k antigenu a na tuto primární protilátku se specificky váže sekundární protilátka, která musí být aplikována v nadbytku. Dalším krokem je navázání značeného komplexu na sekundární protilátku, čímž dojde k barevné reakci. Tímto komplexem může být peroxidáza-anti-peroxidáza – PAP, alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza – APAAP nebo (strept)avidin-biotin-komplex – (S)ABC (Beranová *et* Tonar, 2002).

Při použití dvojstupňové nepřímé metody (**Obr. 4**) se v první vrstvě nanáší na tkáňové řezy neoznačená primární protilátka nebo sérum, které jsou specifické proti prokazovanému antigenu. Ve druhé vrstvě se aplikuje sekundární protilátka proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, které bylo dárce primární protilátky. Sekundární protilátka značená enzymem nebo fluorochromem se imunologickou vazbou váže na primární protilátku (Beranová *et* Tonar, 2002).



Obr. 4: Schéma nepřímé dvojstupňové metody – znázornění vazby sekundární protilátky značenou enzymem na primární protilátku, která váže antigen ve tkáni.

Překresleno podle Beranová *et* Tonar (2002)

5.4 Biologický materiál

Z Ústavu klinické a molekulární patologie z Fakultní nemocnice Olomouc nám byly poskytnuty donorové bloky pacientů se vzorky kolorektálního karcinomu.

5.5 Chemikálie a roztoky

Anti-MMP19 antibody (Abcam, kat. č. ab53146), PTEN (138G6) Rabbit mAb (Cell Signaling, kat. č. 9559), Dako EnVisionTM + Dual Link Systém – HRP (DakoCytomation, kat. č. K4061), Liquid DAB + Substrate Chromogen Systém (DakoCytomation, kat. č. 3468), pertex (Bamed), citrát sodný dihydrát (Aldrich, kat. č. 85,578-2), deionizovaná voda, Tween 20 (Sigma, kat. č. 37470), NaCl (Lachner, kat. č. 30093-APO), KCl (Lachner, kat. č. 30076-APO), Na₂HPO₄·2H₂O (Lachner, kat. č. 30388-APO), KH₂PO₄, 30% H₂O₂ (Lachner), aceton (Lachner), xylén (Lachner), etanol (Lachner), sušené odtučněné mléko, bovinní albumin frakce V (Sigma, kat. č. A7906), 10% NaN₃ (Sigma, kat. č. 26628-22-8), fetální sérum

Příprava roztoků

Zásobní 10x koncentrovaný roztok PBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄·2H₂O, 2,4 g KH₂PO₄) – navážky rozpustit v 0,5 l destilované vody a po dokonalém rozpuštění upravit pH na 6,8 a doplnit vodou na objem 1 l. Skladovat při laboratorní teplotě

Zředěný 1x PBS s Tweenem (100 ml 10x PBS, 900 ml destilované vody a 1 ml Tween 20) – vše smíchat. Je nutné před každým použitím připravit nový.

10 mM citrátový pufr pH 6,0 (2,9 g citrát sodný dihydrát) – rozpustit v menším objemu destilované vody, upravit pH na 6,0 pomocí HCl a po dokonalém rozpuštění doplnit do 1 l. Skladovat v lednici.

Roztok blokující endogenní peroxidázy (3% H₂O₂), (10 ml 30% H₂O₂, 90 ml 1x PBS s Tweenem) – vše smíchat. Před každým použitím je nutné připravit nový roztok.

Blokační mléko (3 g sušené odtučněné mléko, 2 g bovinní albumin frakce V a 1 ml 10% NaN₃) – navážky rozpustit v 50 ml 1x PBS s Tweenem a poté přidat 1 ml 10% NaN₃. Po dokonalém rozpuštění doplnit do 100 ml. Před každým použitím připravit čerstvý roztok.

Roztok pro ředění primární protilátky (900 µl 1x PBS s Tweenem, 100 µl fetálního séra, 10 µl 10% NaN₃) – vše smíchat. Před každým použitím připravit čerstvý roztok.

PTEN naředit 1:100 (10 µl do 1000 µl ředícího roztoku)

MMP19 naředit 1:600 (1,66 µl do 1000 µl ředícího roztoku)

Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen Systém (1 ml DAB + substrate buffer s 1 kapkou DAB + chromogen) – vše smíchat.

Kamencový Hematoxylin (50 ml 5% $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 ml 10% hematoxylinu v 96% etanolu, 1 ml 2% H_5IO_6 , 10 kapek 3% koncentrované HCl (35%)) – vše smíchat.

- **5% zásobní roztok $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – kamence hlinitodraselného**
Odvážených 5 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpustit ve 100 ml destilované H_2O
- **10% zásobní roztok hematoxylinu v 96% etanolu**
Odvážený 1 g hematoxylinu rozpustit v 10 ml 96% etanolu
- **2% zásobní roztok H_5IO_6 – kyseliny jodisté**
Odváženého 0,5 g rozpustit ve 25 ml destilované H_2O
- **3% zásobní roztok koncentrované HCl (35%) – kyseliny chlorovodíkové**
Odměřených 8,6 ml konc. HCl (35%) smíchat se 100 ml destilované H_2O

5.6 Přístrojové vybavení laboratoře

přístroj pro tvorbu TMA bloků – Galileo TMA CK 3500 (Integrated System Engineering), mikrotom RM 2135 (Reica), termostat IP100 U (LTE), lednice C 4023 (Liebherr), vodní lázeň TW8 (Julabo), magnetická míchačka Heidolph Hei-Standard (Heidolph Instruments GmbH), vortex V-1 plus (Biosan), minicentrifuga (Fisher Scientific), váhy, pH metr, digitální timer, laboratorní digestoř (Merci), mikroskop (Olympus)

5.7 Materiál

barvicí vany dle Coplina s víkem, odměrné válce, pozitivně nabitá podložní skla (Thermo scientific), krycí skla, automatické pipety (2 – 1000 μl) a špičky, 1,5ml mikrozkuhavky, odpadní láhev, vlhká komůrka, skalpel, pinzeta, buničina, ochranné rukavice, parafínový fix Liquid blocker, centrofix

5.8 Vlastní postup - imunohistochemie

Z jednotlivých patientských vzorků byly vytvořeny TMA bloky. TMA bloky byly krájeny na 4µm řezy, které byly napnuty na podložní sklo a inkubovány při 56 °C v termostatu do dalšího dne.

Po inkubaci následovala deparafinizace řezů. Sklíčka s řezy byla 3x vložena do nádoby s xylenem, vždy po dobu 5 minut. Aby došlo k hydrataci tkáně, byla sklíčka přemístěna do sestupné etanolové řady (100% etanol, 80% etanol a nakonec 70% etanol), přičemž byla v každé koncentraci ponechána 5 minut. Poté byla sklíčka opláchnuta 2x destilovanou vodou.

Ke zkvalitnění detekce antigenů byla sklíčka vložena do nádoby s citrátovým pufrům (pH 6,0), kde probíhala inkubace 40 minut. Předtím byla nádoba umístěna do vodní lázně předehřáté na 95 – 99 °C, kde také zůstala po celou dobu inkubace. Po inkubaci se sklíčka nechala chladnout 20 minut při laboratorní teplotě a následoval oplach destilovanou vodou. Tyto vzorky byly ponořeny do kyvety s 1x koncentrovaným PBS pufrům

Po deparafinizaci a odmaskování antigenů byly preparáty vloženy na 10 minut do roztoku 3% peroxidu vodíku, čímž došlo k blokaci endogenních peroxidáz. Dále byly preparáty 2x opláchnuty v roztoku s 1x PBS s Tweenem a poté ponořeny na 5 minut do kyvety s 1x PBS s Tweenem. Inkubace v kyvetě po dobu 5 minut byla provedena ještě 2x.

Aby došlo k zablokování pozadí, byly vzorky přemístěny na dobu 1 hodiny do blokačního mléka, kde se inkubovaly při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly vzorky 2x rychle opláchnuty v roztoku s 1x PBS s Tweenem a poté opět ponořeny na 3x 5 minut do kyvety s 1x PBS s Tweenem.

Následně na osušená sklíčka bylo napipetováno 200 µl zředěné primární protilátky. Použité primární protilátky jsou zaznamenány v **Tab. 2**. Sklíčka s primární protilátkou byla uzavřena do vlhké komůrky, která se nechala inkubovat přes noc v lednici. Další den byla sklíčka 2x rychle opláchnuta v roztoku s 1x PBS s Tweenem a v tomto pufru inkubována 3x 5 minut.

Po osušení sklíček bylo aplikováno 200 µl sekundární protilátky (EnVision™ + Dual Link Systém, Labelled Polymer – HRP) a sklíčka byla ponechána ve vlhké komůrce k inkubaci po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.

Po opláchnutí sklíček destilovanou vodou a 2x rychle v roztoku s 1x PBS s Tweenem a následné inkubaci 3x 5 minut v tentýž pufru bylo aplikováno 100 µl chromogenu DAB,

který se nechal inkubovat 5 – 10 minut. Byl použit kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, kat. č. K3468).

Po opětovném promytí destilovanou vodou a 2x rychle v roztoku s 1x PBS s Tweenem a následné inkubaci 3x 5 minut v tentýž pufru byly preparáty vloženy na 30 sekund do kyvety s barvicím roztokem hematoxylinu a poté do kyvety s destilovanou vodou. Následně byly preparáty oplachovány 3 minuty pod tekoucí vodou.

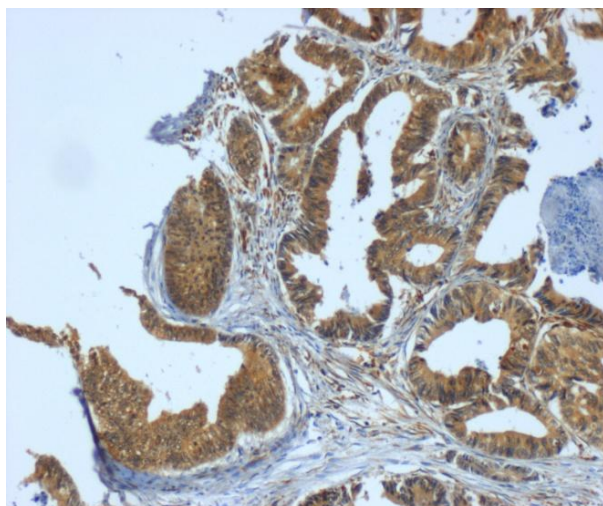
Odvodnění preparátů bylo provedeno oplachem v acetonu – 1 minutu, ve směsi aceton/xylen – 1 minutu a nakonec v xylenu – 3 minuty. Posledním krokem bylo zamontování preparátů do montovacího média – Pertexu.

Tab. 2: Přehled použitých primárních protilátek

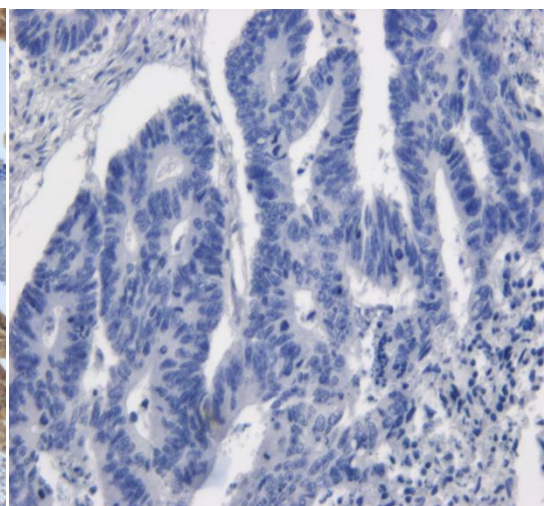
Detekovaný protein	Protilátka	Ředění
MMP-19	monoklonální	1:600
PTEN	monoklonální	1:100

6 VÝSLEDKY

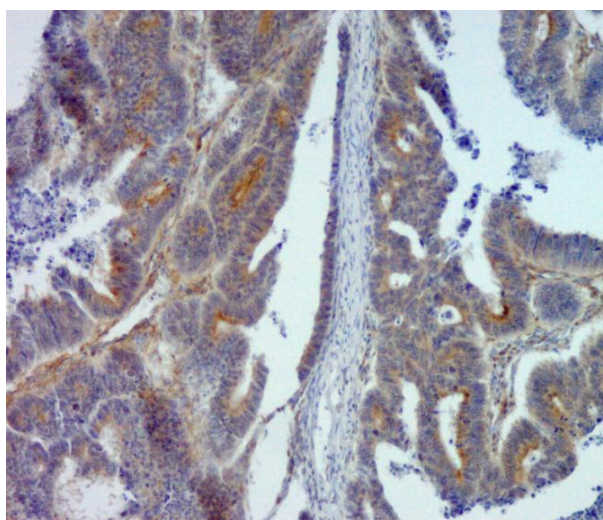
Pomocí nepřímé dvojstupňové metody byla provedena detekce proteinů MMP-19 a PTEN za použití komerčně dostupných protilátek na souboru 53 patientských vzorků, kterým byl diagnostikovaný kolorektální karcinom. Expres těchto proteinů byla hodnocena pomocí H – indexu (pozitivita slabá – 1+, střední – 2+ a silná – 3+ násobená % pozitivních buněk). Podle intenzity zbarvení pozitivní tkáně do hněda byl stanoven stupeň positivity (**Obr. 5 a Obr. 7**), přičemž slabá pozitivita odpovídá intenzitě zbarvení 10 – 29 %, střední pozitivita odpovídá intenzitě zbarvení 30 – 60 % a vysoká pozitivita odpovídá intenzitě zbarvení 61 – 100 %. Negativní tkáň byla zbarvena pouze do modra (**Obr. 6 a Obr. 8**), čemuž odpovídá intenzita zbarvení 0 – 9 %.



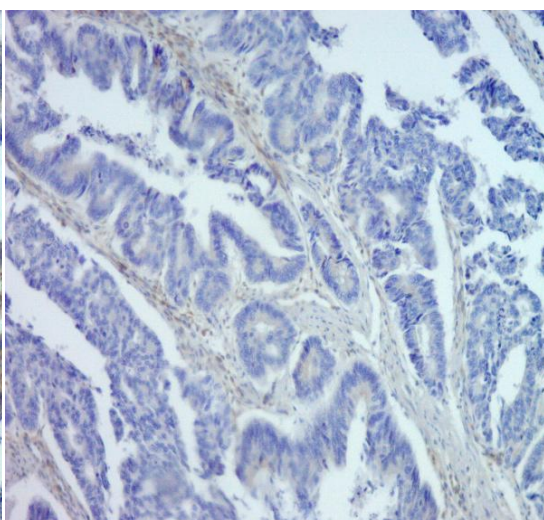
Obr. 5: Vizualizace imunohistochemické detekce MMP-19 v pozitivní tkáni



Obr. 6: Vizualizace imunohistochemické detekce MMP-19 v negativní tkáni



Obr. 7: Vizualizace imunohistochemické detekce PTEN v pozitivní tkáni



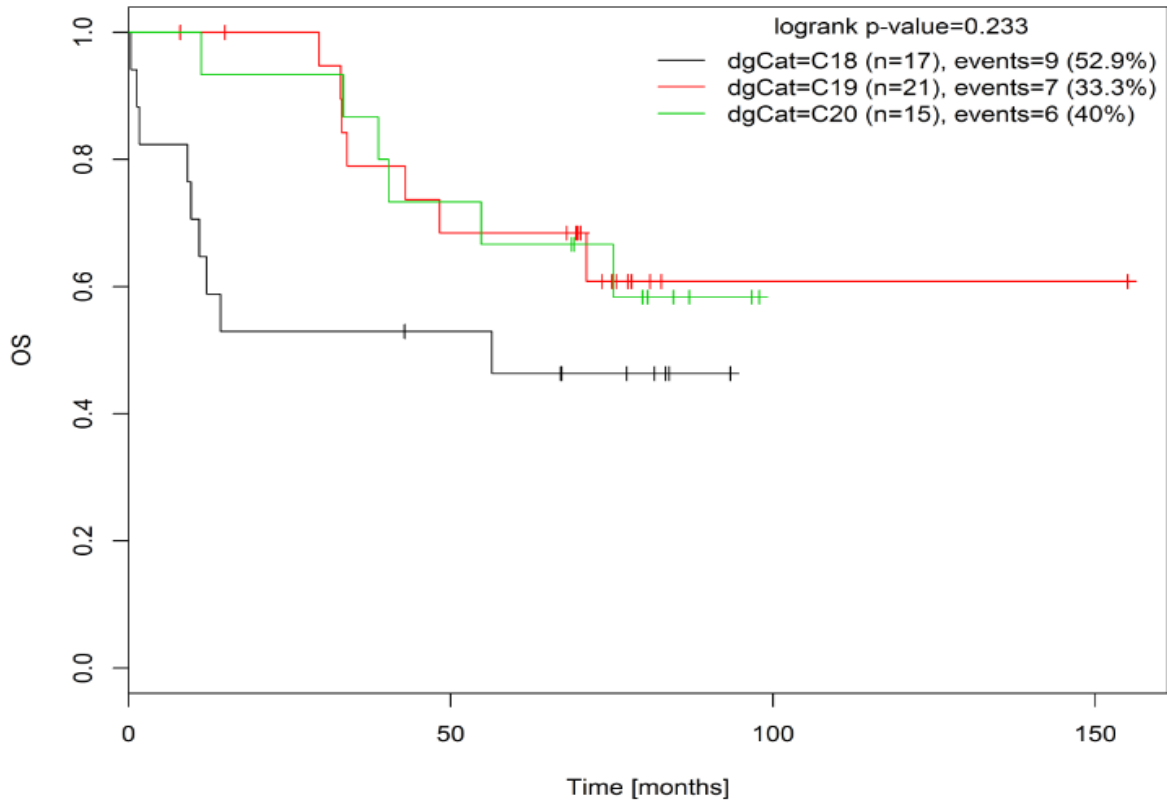
Obr. 8: Vizualizace imunohistochemické detekce PTEN v negativní tkáni

Data byla zpracována v počítačovém statistickém softwaru R. Byla provedena analýza vlivu jednotlivých faktorů (gradingu, stagingu a histologického typu kolorektálního karcinomu) na celkové přežití (OS – overall survival) a délku bezpříznakového období (DFS – disease free survival) prostřednictvím log-rank testu a jednotlivá přežívání (DFS, OS) byla následně modelována prostřednictvím Coxova regresního modelu. Pro každou podskupinu pacientů vytvořenou dle daného faktoru byly odhadnuty křivky přežívání metodou Kaplan-Meiera. V grafech pro příslušný faktor je kromě samotných křivek přežívání vyznačen výsledek log-rank testu a absolutní a relativní (v procentech) počet událostí pro každou podskupinu. Hladina signifikance byla u všech analýz stanovena 5 %.

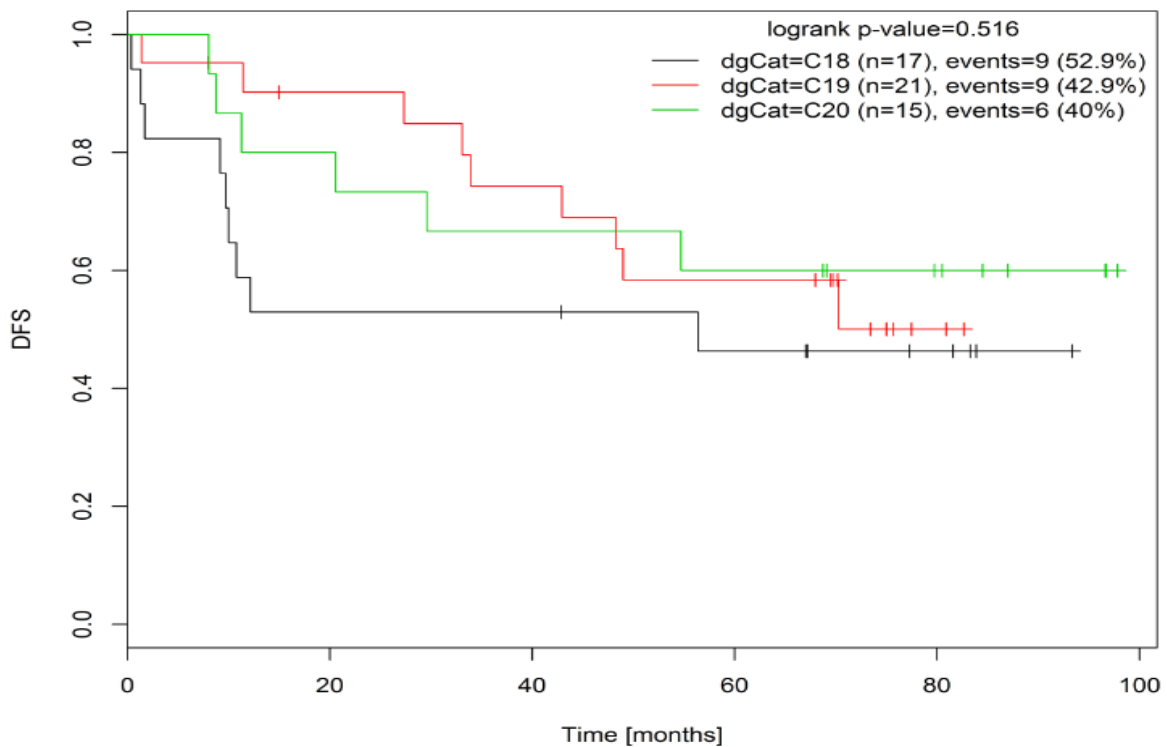
Kolorektální karcinom je dělen do histologických subtypů C18 (zhoubný novotvar tlustého střeva), C19 (zhoubný novotvar rektosigmoideálního spojení), C 20 (zhoubný novotvar konečníku). Ze získaných dat je zřejmé, že OS i DFS je u novotvarů C19 a C20 lepší, než u C18 (**Graf 1 a 2**).

Podle očekávání, z Coxovy regresní analýzy i z log-rank testu, je patrné, že grading je významným faktorem přežívání. OS i DFS jsou horší u pacientů s vyšším gradingem, než u pacientů s nižším gradingem. Hodnota HR = 7,5, 95%CI = (0.92-62.01), pro grading 3 v případě OS vykazuje riziko události (úmrť) 7,5x vyšší vůči gradingu 1, byť je významnost dosažena až na hladině 10 % (**Tab. 3 a Graf 3**). Hodnota HR pro grading 3 a DFS vůči gradingu 1 není významná ani na hladině 10 %, HR = 2,8, 95%CI = (0.57-13.42) (**Tab. 4 a Graf 4**), avšak dá se usuzovat, že při větším počtu vzorků by mohla být prokázána hypotéza o souvislosti vyššího gradingu s horším DFS přežíváním. Výsledky log-rank testu pro grading a oba typy přežívání jsou statisticky významné (OS p-value = 0,011, DFS p-value = 0,043). Taktéž i stádium je významným faktorem OS a DFS (log-rank test, OS p-value = 0,004, DFS p-value < 0,001). Pro stádium 4 a OS je HR = 13.9, 95%CI = (1.77-108.78), což znamená, že riziko události je 13,9x vyšší, než pro stádium 1 (**Tab. 5 a Graf 5**). U DFS je ve stejném případě dokonce HR = 27.4, 95%CI = (3.51-214.57) (**Tab. 6 a Graf 6**).

Graf 1: Křivky celkového přežívání (Kaplan-Meierův odhad) pacientů ve vztahu k histologickému typu adenokarcinomu



Graf 2: Křivky DFS (Kaplan-Meierův odhad) pacientů ve vztahu k histologickému typu adenokarcinomu



Tab. 3: Vliv gradingu na celkové přežívání testovaný prostřednictvím log-rank testu (p-value) a HR spolu s 95% konfidenčním intervalem z odpovídajícího Coxova regresního modelu pro jednotlivé kategorie (vztaženo k základní kategorii grading 1).

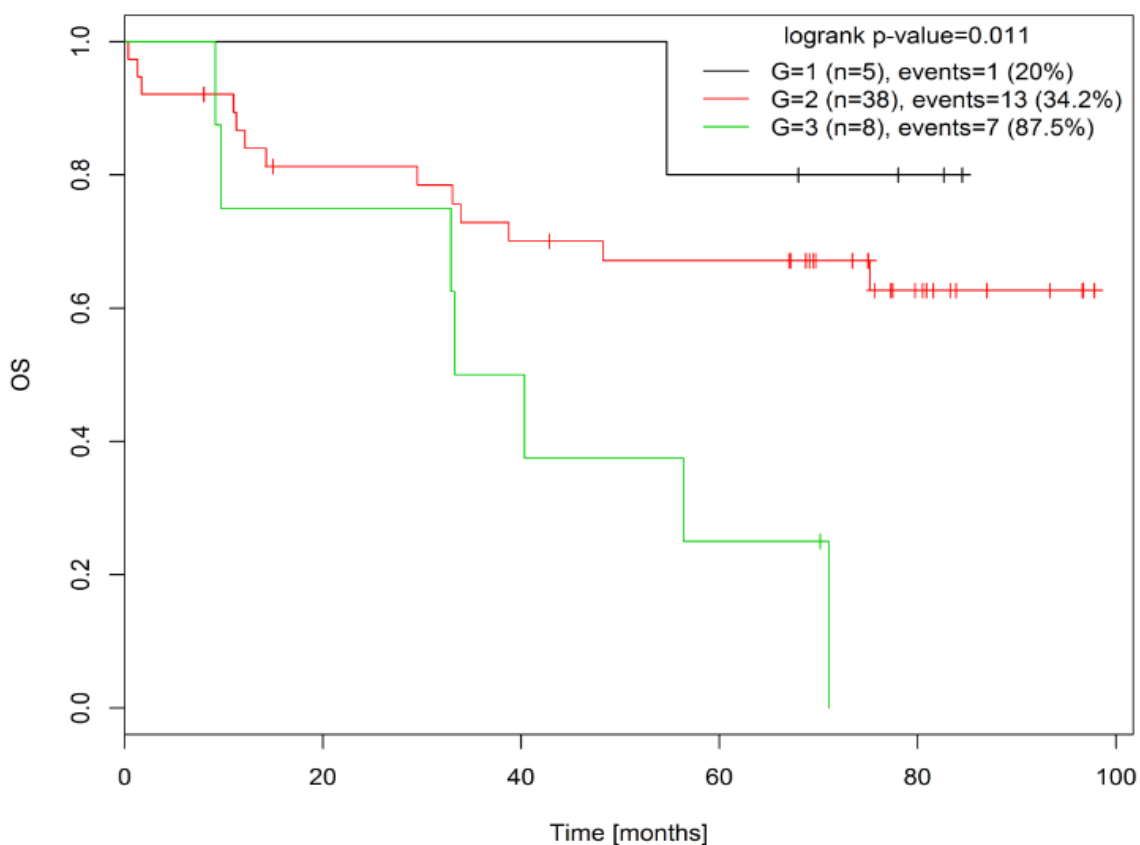
Grading	N	Events	HR (95% CI)
1	5	1 (20 %)	
2	38	13 (34.2 %)	2.2 (0.29-17.15)
3	8	7 (87.5 %)	7.5 (0.92-62.01) *
		p-value=0.011	

* test významnosti regresního parametru, p-value < 0,1

N...celkový počet pozorování v dané kategorii

Events...počet událostí (úmrť) i s procentuálním vyjádřením

Graf 3: Křivky celkového přežívání (Kaplan-Meierův odhad) pacientů ve vztahu ke gradingu



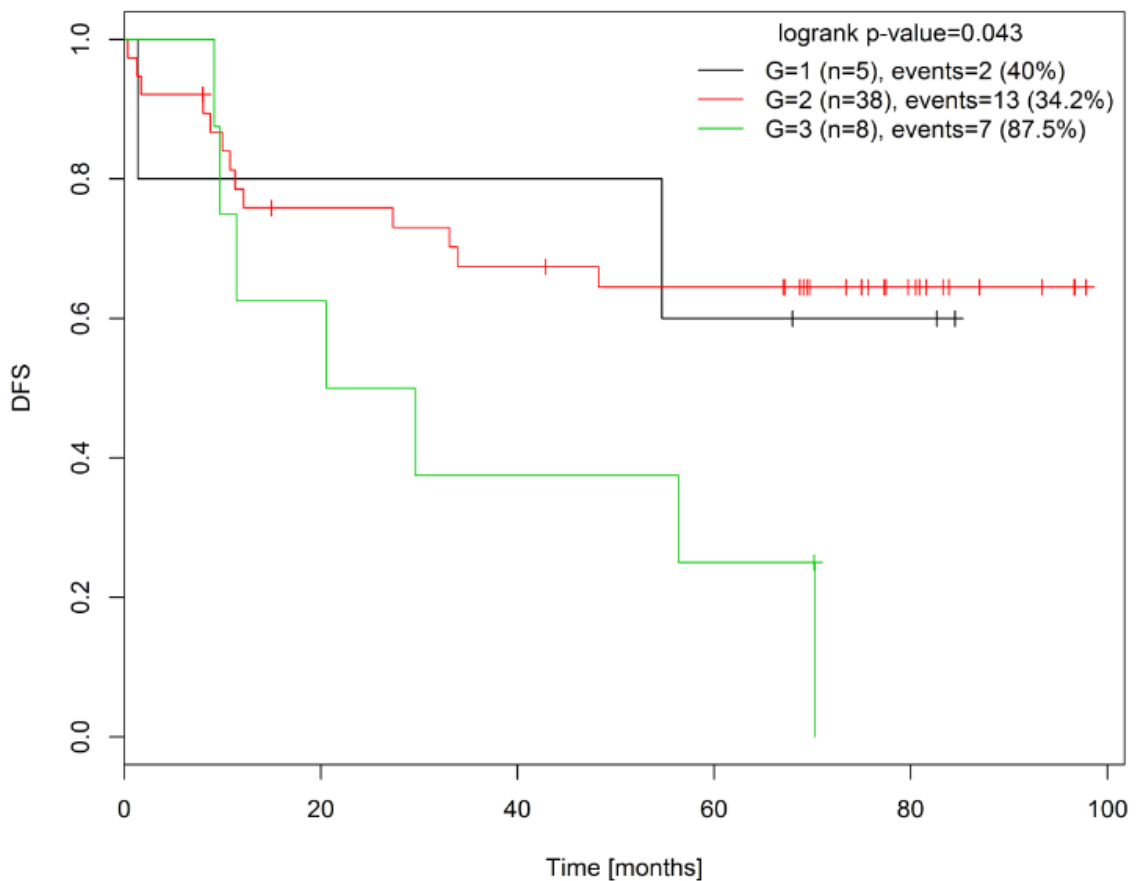
Tab. 4: Vliv gradingu na DFS testovaný prostřednictvím log-rank testu (p-value) a HR spolu s 95% konfidenčním intervalem z odpovídajícího Coxova regresního modelu pro jednotlivé kategorie (vztaženo k základní kategorii grading 1)

Grading	N	Events	HR (95% CI)
1	5	2 (40 %)	
2	38	13 (34.2 %)	0.9 (0.2-4.01)
3	8	7 (87.5 %)	2.8 (0.57-13.42)
		p-value=0.043	

N...celkový počet pozorování v dané kategorii

Events...počet událostí (úmrťí) i s procentuálním vyjádřením

Graf 4: Křivky DFS (Kaplan-Meierův odhad) pacientů ve vztahu ke gradingu



Tab. 5: Vliv stagingu na OS testovaný prostřednictvím log-rank testu (p-value) a HR spolu s 95% konfidenčním intervalem z odpovídajícího Coxova regresního modelu pro jednotlivé kategorie (vztaženo k základní kategorii staging 1)

Staging	N	Events	HR (95% CI)
1	11	1 (9.1 %)	
2	18	6 (33.3 %)	3.9 (0.47-32.24)
3	10	5 (50 %)	6.8 (0.8-58.52) *
4	14	10 (71.4 %)	13.9 (1.77-108.78) **
		p-value=0,004	

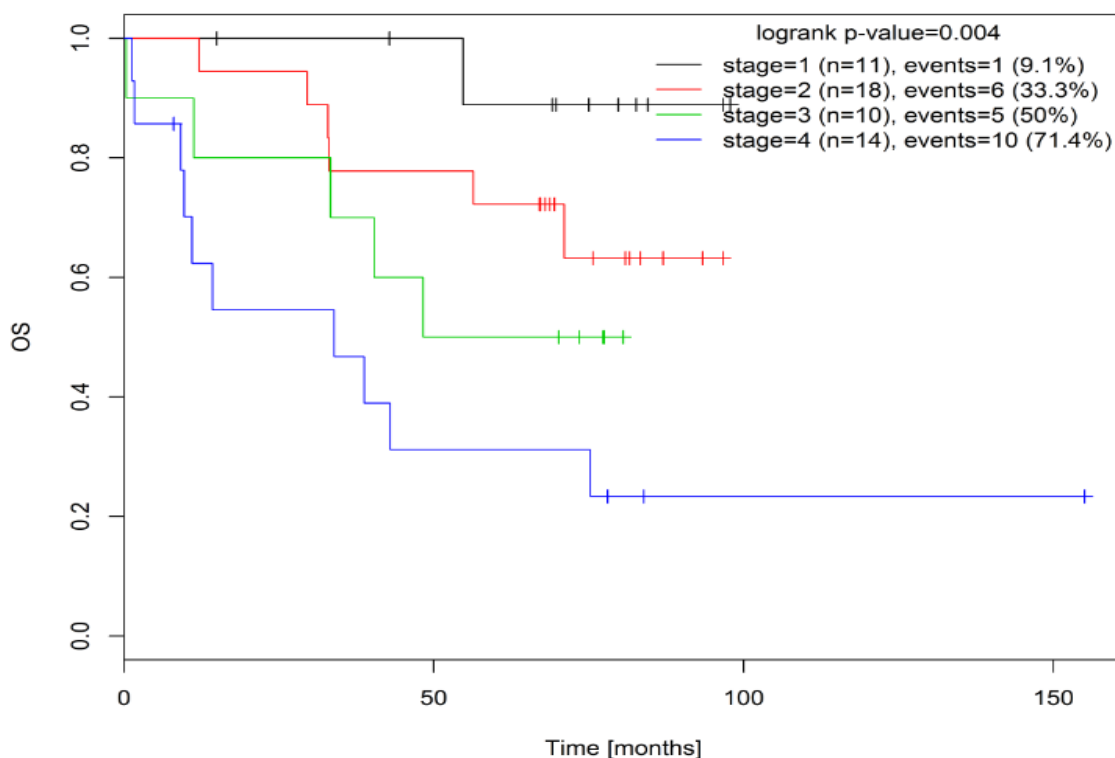
* test významnosti regresního parametru, p-value < 0,1

** test významnosti regresního parametru, p-value < 0,05

N...celkový počet pozorování v dané kategorii

Events...počet událostí (úmrtí) i s procentuálním vyjádřením

Graf 5: Křivky celkového přežívání (Kaplan-Meierův odhad) pacientů ve vztahu ke stádiu onemocnění



Tab. 6: Vliv stagingu na DFS testovaný prostřednictvím log-rank testu (p-value) a HR spolu s 95% konfidenčním intervalem z odpovídajícího Coxova regresního modelu pro jednotlivé kategorie (vztaženo k základní kategorii staging 1)

Staging	N	Events	HR (95% CI)
1	11	1 (9.1 %)	
2	18	6 (33.3 %)	3.8 (0.46-31.66)
3	10	5 (50 %)	7.1 (0.82-60.49) *
4	14	12 (85.7 %)	27.4 (3.51-214.57) ***
		p-value<0,001	

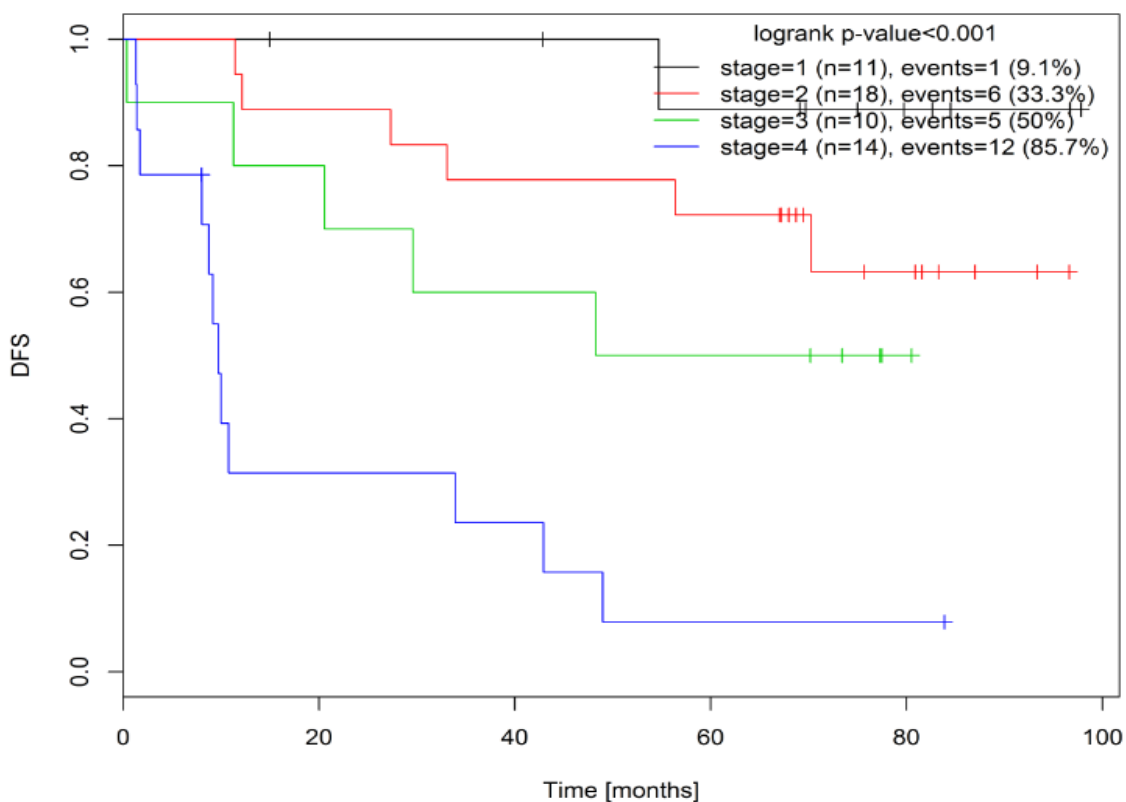
* test významnosti regresního parametru, p-value < 0,1

*** test významnosti regresního parametru, p-value < 0,01

N...celkový počet pozorování v dané kategorii

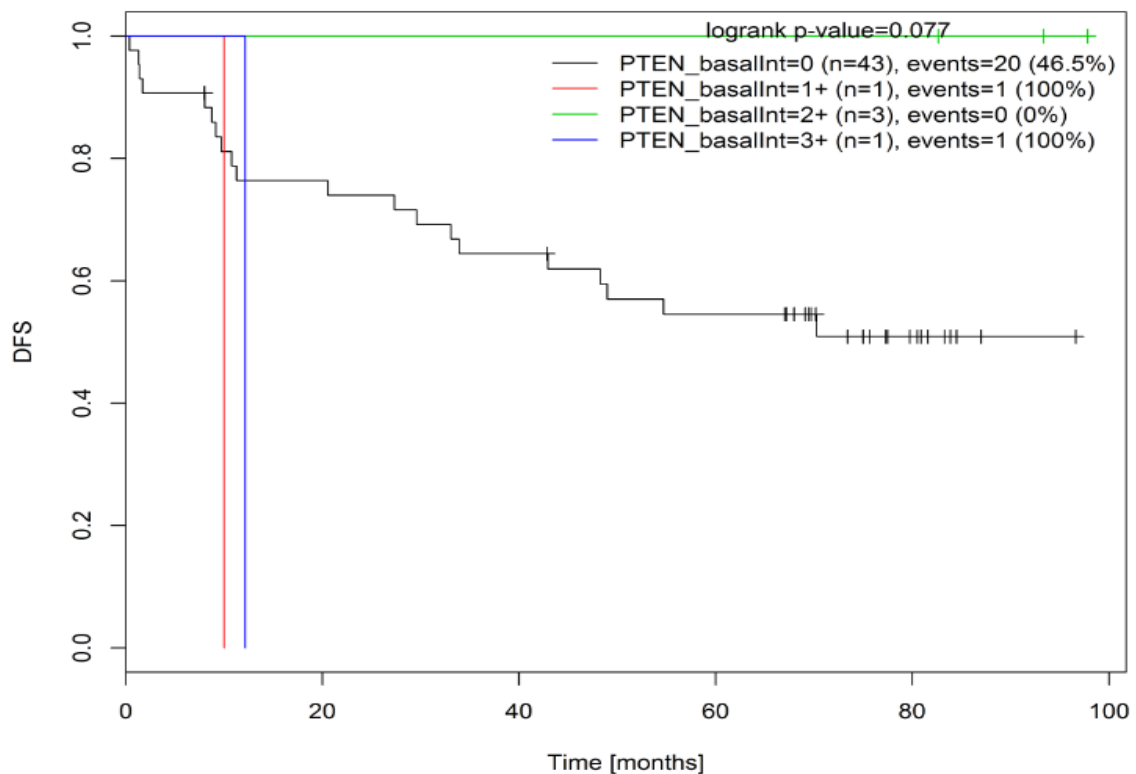
Events...počet událostí (úmrtí) i s procentuálním vyjádřením

Graf 6: Křivky DFS (Kaplan-Meierův odhad) pacientů ve vztahu ke stádiu onemocnění



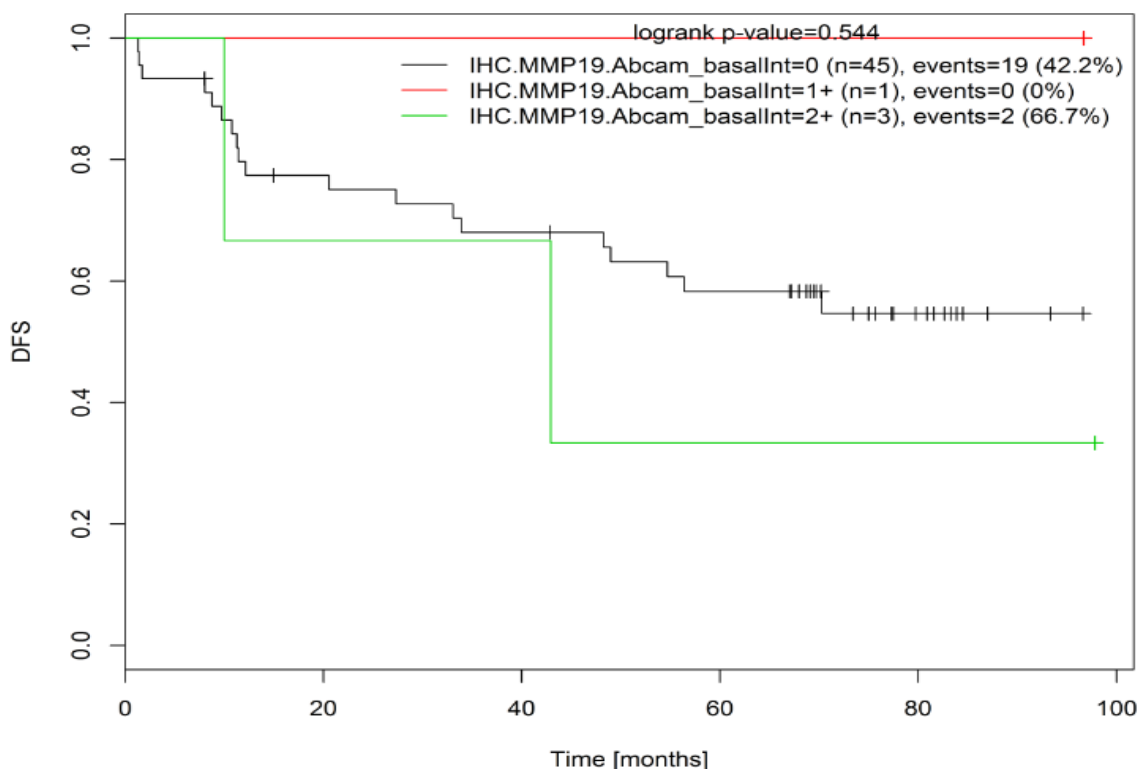
Intenzita exprese proteinů MMP-19 a PTEN byla hodnocena v jádrech nádorových buněk, v cytoplazmě nádorových buněk, v bazálních buňkách bez tumoru a ve stromálních buňkách. Z grafu odhadnutých křivek přežívání (Kaplan-Meier odhad) je vidět, že pacienti s expresí PTEN v bazálních buňkách bez tumoru se střední pozitivitou (2+) přežívají daleko lépe, než ti pacienti s negativními bazálními buňkami (**Graf 7**). Z toho vyplývá, že mutace PTEN (tedy snížená exprese) by mohla znamenat horší prognózu u pacientů s CRC. Pro zajištění statistické významnosti by bylo zapotřebí získat rozsáhlejší soubor pacientů s větším zastoupením ve skupinách s vyšší pozitivitou. Po rozšíření souboru pacientů budeme tento jev dále sledovat. Asociace mezi expresí PTEN v cytoplazmě nádorových buněk s OS i DFS přežíváním nebyla v našem souboru pacientů průkazná, zřejmě také díky malému zastoupení vzorků v kategoriích s pozitivitou 1+ až 3+.

Graf 7: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) DFS pacientů dle stupně positivity exprese PTEN v bazálních nenádorových buňkách

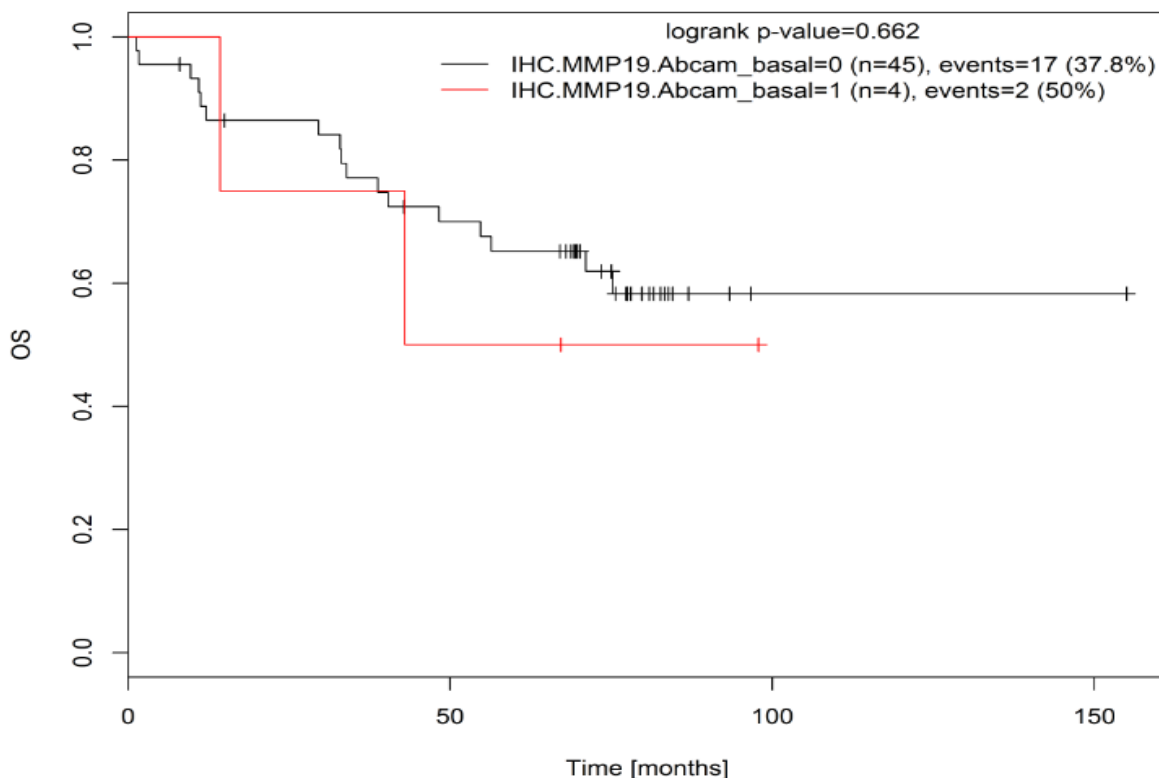


Nebyl zjištěn statisticky významný prognostický vliv imunohistochemické exprese MMP-19 na OS ani DFS v bazálních buňkách bez tumoru v našem souboru pacientů. Nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v DFS přežívání pro jednotlivé kategorie exprese MMP-19 v bazálních nenádorových buňkách (log-rank test, p-value = 0,544), viz **Graf 8**. Také exprese MMP-19 v nenádorových bazálních buňkách nebyla asociována s celkovým přežitím ($p = 0,662$), viz **Graf 9**. Rovněž nebyl zjištěn vliv exprese MMP-19 v nádorových buňkách na interval bezpříznakového období. Coxův regresní model, ve kterém adjustujeme vzhledem ke gradingu a stagingu, vypovídá, že exprese MMP-19 v cytoplazmě buněk by mohla být pozitivním faktorem přežívání (**Tab. 7**). Výsledek log-rank testu je ovšem statisticky nevýznamný (p-value = 0,544), nicméně pozorujeme výrazně lepší trend přežívání u pacientů se zvýšenou expresí MMP-19 v cytoplazmě nádorových buněk ve srovnání s negativní expresí (**Graf 10**).

Graf 8: Křivky DFS přežívání (Kaplan-Meierův odhad) pacientů s různým stupněm positivity exprese MMP-19 v bazálních nenádorových buňkách



Graf 9: Křivky celkového přežívání (Kaplan-Meierův odhad) pacientů s různým stupněm pozitivitu exprese MMP-19 v bazálních nenádorových buňkách



Tab. 7: Adjustovaný (vzhledem ke gradingu a stagingu) Coxův regresní model celkového přežívání pro pozitivitu exprese MMP-19 v cytoplazmě nádorových buněk (HR spolu s 95% konfidenčním intervalem pro jednotlivé kategorie vztažené k základní kategorii 0, HR pro grading a staging vztaženo k jednotkové změně těchto parametrů)

Staging	N	Events	HR (95% CI)
0	4	3 (75%)	
1+	2	1 (50%)	0.3 (0.03-3.92)
2+	6	2 (33.3%)	0.1 (0.02-0.87)**
3+	38	14 (36.8%)	0.3 (0.07-1.07)*
grading			3.4 (1.2-9.87)**
staging			2.8 (1.57-4.91)***

* test významnosti regresního parametru, p-value < 0,1

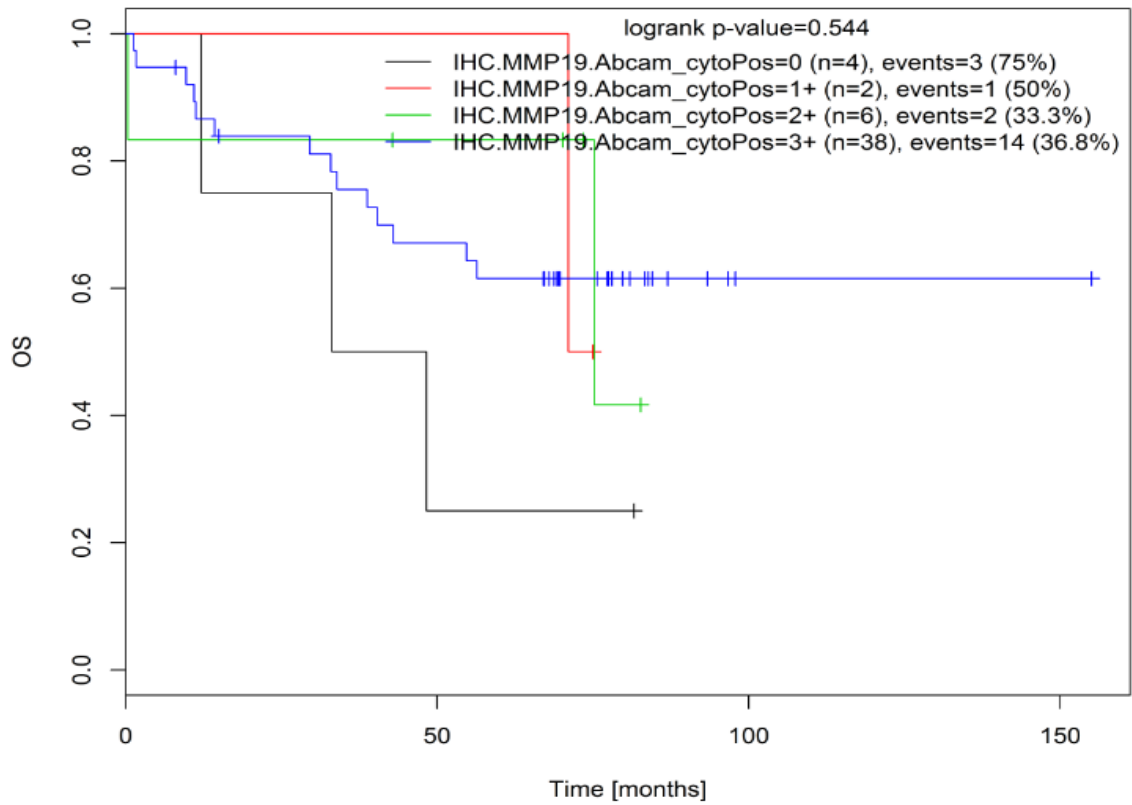
** test významnosti regresního parametru, p-value < 0,05

*** test významnosti regresního parametru, p-value < 0,01

N...celkový počet pozorování v dané kategorii

Events...počet událostí (úmrtí) i s procentuálním vyjádřením

Graf 10: Křivky celkového přežívání (Kaplan-Meierův odhad) pacientů s různým stupněm pozitivity exprese MMP-19 v cytoplazmě nádorových buněk



7 DISKUZE

Cílem experimentální části předkládané bakalářské práce bylo detekovat imunohistochemickou expresi proteinů MMP-19 a PTEN ve tkáni kolorektálního karcinomu. Následně zjistit korelaci celkového přežití a délku bezpříznakového období s typem adenokarcinomu, gradingem, stádiem onemocnění a nakonec se získanými výsledky expresí těchto proteinů.

Z našich výsledků vyplývá, že OS a DFS u karcinomu tlustého střeva (C18) je horší, než u karcinomu konečnicku (C19-C20). Je však nutné poukázat na tvrzení Jayne *et al.* (2010) z jeho studie, kde uvádí, že nebyl nalezen rozdíl v DFS ani OS mezi karcinomem tlustého střeva a karcinomem konečnicku. Uvedené rozdíly jsou dány různou strukturou souboru pacientů.

V našem souboru pacientů bylo sledováno horší OS i DFS v souvislosti s vyšším gradingem. Vliv gradingu u kolorektálního karcinomu na OS a DFS není v literatuře prozatím jednoznačně doložený. Ve studii Kim *et al.* (2015) uvádí, že grading je nezávislým prognostickým faktorem DFS.

Stádium kolorektálního karcinomu úzce souvisí s celkovým přežitím i délkou bezpříznakového období. OS i DFS je horší u pacientů s vyšším stádiem tohoto onemocnění. Tyto výsledky jsou v souladu se studií Musila (2003), ve které uvádí, že pacienti se stádiem I mají 94% pravděpodobnost pětiletého přežití, oproti pacientům se stádiem IV, kteří mají pravděpodobnost na pětileté přežití pouze 2,4 %. Dané výsledky podporují výsledky i mnoha dalších autorů.

Z našich výsledků se dá pouze předpokládat, že pacienti s expresí PTEN vykazují lepší OS oproti pacientům bez exprese PTEN. S naším předpokladem se shoduje výsledek práce týmu Atreya *et al.* (2013), který uvádí medián OS 9 měsíců u pacientů s negativní expresí PTEN. Medián OS u pacientů s expresí PTEN pak uvádí 49 měsíců. Li *et al.* (2009) studovali expresi PTEN metodou PCR, po které následovalo přímé sekvenování. Nicméně došli taktéž k závěru, že pacienti bez exprese PTEN měli kratší dobu přežití, než pacienti s expresí tohoto proteinu. Mimo to, zjistili, že nízká exprese PTEN je v pozitivní korelaci s velikostí nádoru, hloubkou invaze, lymfatickou invazí a s vyšším stádiem nádoru dle Dukesovi klasifikace.

MMP-19 byla exprimována i v nenádorových buňkách kolorektální tkáně, avšak nebyla zaznamenána její korelace s OS nebo DFS v souvislosti s tímto typem buněk. Dle výsledků Sena *et al.* (2012), byla nízká exprese MMP-19 sledována ve zdravé tkáni střevní sliznice, kdežto v nádorových buňkách pak pozorovali zvýšenou hladinu exprese

MMP-19. Na základě poznatků ze studie Sena *et al.* (2012), lze předpokládat, že MMP-19 hraje roli v průběhu maligní transformace.

Asano *et al.* (2008), studovali expresi několika matrix metaloproteináz, včetně MMP-19 na souboru 112 vzorků s kolorektálním karcinomem. Zjistili, že DFS je u pacientů s vyšší intenzitou exprese MMP-19 výrazně kratší, než u pacientů se sníženou intenzitou exprese tohoto proteinu. Z těchto poznatků vyplývá, že zvýšená exprese MMP-19 může souviset s recidivou. Naše výsledky poukazují však na opačný trend i v souvislosti s OS. To může být důsledkem hodnocení malého počtu vzorků v dané kategorii, které nejsou dostačující pro věrohodnou statistiku.

8 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zabývala detekcí exprese proteinů MMP-19 a PTEN u kolorektálního karcinomu. Byla sledována korelace mezi celkovým přežitím (OS) a délkou bezpříznakového období (DFS) s histopatologickými znaky, kterými jsou typ adenokarcinomu, grading a stádium onemocnění a nakonec také s expresí detekovaných proteinů. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zaměřená na problematiku kolorektálního karcinomu, prognostický a prediktivní význam proteinů MMP-19 a PTEN u kolorektálního karcinomu.

V experimentální části je popsána tvorba microarejí a princip imunohistochemické metody, které byly využity při zpracování vzorků. Z výsledků statické analýzy bylo zjištěno, že OS i DFS je horší u pacientů s karcinomem tlustého střeva, než u pacientů s karcinomem konečníku. OS i DFS bylo rovněž horší u pacientů s vyšším stádiem onemocnění i s vyšším gradigem. Bylo zpozorováno lepší OS i DFS u pacientů s vyšší expresí PTEN, než u pacientů se sníženou nebo dokonce negativní expresí PTEN. Exprese MMP-19 v cytoplazmě nádorových buněk by mohla být pozitivním faktorem přežívání. Výsledky poukazují na určitý trend, avšak pro pochopení souvislosti MMP-19 v kolorektálním karcinomu je nutné zpracovat větší počet vzorků, aby mohl být tento trend potvrzen.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- ADACHI, Y., YAMAMOTO, H., ITOH, F., HINODA, Y., OKADA, Y., IMAI, K. (1999): Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* (45): 252 – 258
- ASANO, T., TADA, M., CHENG, S., TAKEMOTO, N., KURAMAE, T., ABE, M., TAKAHASHI, O., MIYAMOTO, M., HAMADA, J., MORIUCHI, T., KONDO, S. (2008): Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. *Journal of Surgical Research* (146): 32 – 42
- ATREYA, C. E., SANGALE, Z., XU, N., MATLI, M. R., TIKISHVILI, E., WELBOURN, W., STONE, S., SHOKAT, K. M., WARREN, R. S. (2013): PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival. *Cancer Medicine* (2): 496 – 506
- BAKER, S. J., FEARON, E. R., NIGRO, J. M., HAMILTON, S. R., PREISINGER, A. C., JESSUP, J. M., VANTUINEN, P., LEDBETTER, D. H., BARKER, D. F., NAKAMURA, Y., WHITE, R., VOGELSTEIN, B. (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* (244): 217 – 221
- BENDARDAF, F., BUHMEIDA, A., HILSKA, M., LAATO, M., SYRJÄNEN, S., SYRJÄNEN, K., COLLAN, Y., PYRHÖNEN, S. (2010): MMP-9 (gelatinase B) expression is associated with disease-free survival and disease-specific survival in colorectal cancer patients. *Cancer Investigation* (28): 38 – 43
- BISTER, V. O., SALMELA, M. T., KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L., URJA, J., LOHI, J., PUOLAKKAINEN, P., LOPEZ-OTIN, C., SAARIALHO-KERE, U. (2004): Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer. *Digestive Diseases and Sciences* (49): 653 – 661
- BODE, W., FERNANDEZ-CATALAN, C., TSCHESCHE, H., GRAMS, F., NAGASE, H., MASKOS K. (1999): Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* (55): 639 – 652
- BORDEN, P., HELLER, R. A. (1997): Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* (7): 159 – 178

- CERVINKOVA, M., HORAK, P., KANCHEV, I., MATEJ, R., FANTA, J., SEQUENS, R., KASPAREK, P., SARNOVA, L., TURECKOVA, J., SEDLACEK, R. (2014): Differential expression and processing of matrix metalloproteinase 19 marks progression of gastrointestinal diseases. *Folia Biologica* (60): 113 – 122
- CULLY, M., YOU, H., LEVINE, A. J., MAK, T. W. (2006): Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* (6): 184 – 192
- DAHL, C., GULDBERG, P. (2007): The genome and epigenome of malignant melanoma. *Apmis* (115): 1161 – 1176
- DJONOV, V. HÖGGER, K., SEDLACEK, R., LAISSUE, J., DRAEGER, A. (2001): MMP-19: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours. *The Journal of Pathology* (195): 147 – 155
- FANG, Y. J., LU, Z. H., WANG, G. Q., PAN, Z. Z., ZHOU, Z. W., YUN, J. P., ZHANG, M. F., WAN, D. S. (2009): Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease* (24): 875 – 884
- FANJUL-FERNÁNDEZ, M., FOLGUERAS, A. R., CABRERA S., LÓPEZ-OTÍN, C. (2010): Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (1803): 3 – 19
- FEARON, E. R., VOGELSTEIN, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (61): 759 – 767
- FEARON, E. R. (2011): Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Pathology: Mechanisms of Disease* (6): 479 – 507
- FRATTINI, M., SALETTI, P., ROMAGNANI, E., MARTIN, V., MOLINARI, F., GHISLETTA, M., CAMPONOV, A., ETIENNE, L. L., CAVALLI, F., MAZZUCHELLI, L. (2007): PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer* (97): 1139 – 1145
- FREEMAN, D., SUN, J., BASS, R., JUNG, K., OGBAGABRIEL, S., ELLIOTT, G., RADINSKY, R. (2008): Panitumumab and cetuximab epitope mapping and in vitro activity. *Journal of Clinical Oncology* (26): 14536

- FU, J., YANG, J., TAN, Y., JIANG, M., WEN, F., HUANG, Y., CHEN, H., YI, C., ZHENG, S., YUAN, Y. (2014): Young patients (≤ 35 years old) with colorectal cancer have worse outcomes due to more advanced disease: a 30-year retrospective review. *Medicine* (93): 135
- GOMIS-RÜTH, F. X., MASKOS, K., BETZ, M., BERGNER, A., HUBER, R., SUZUKI, K., YOSHIDA, N., NAGASE, H., BREW, K., BOURENKOV, G. P., BARTUNIK, H., BODE, W. (1997): Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* (389): 77 – 81
- GRODEN, J., THLIVERIS, A., SAMOWITZ, W., CARLON, M., GELBERT, L., ALBERTSEN, H., STEVENS, J., SPIRIO, L., ROBERTSON, M., SERGEANT, L., KRAPCHO, K., WOLFF, E., BURT, R., HUGHES, J. P., WARRINGTON, J., MCPHERSON, J., WASMUTH, J., LE PASTIER, D., ABDERRAHIM, H., COHEN, D., LEPPERT, M., WHITE, R. (1991): Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* (66): 589 – 600
- HINODA, Y., OKAYAMA, N., TAKANO, N., FUJIMURA, K., SUEHIRO, Y., HAMANAKA, Y., HAZAMA, S., KITAMURA, Y., KAMATANI, N., OKA, M. (2002): Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer. *International Journal of Cancer* (102): 526 – 529
- JAWHAR, N. M. T. (2009): Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi Medicine* (29): 123 – 127
- JAYNE, D. G., THORPE, H. C., COPELAND, J., QUIRKE, P., BROWN, J. M., GUILLOU, P. J. (2010): Five-year follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of laparoscopically assisted versus open surgery for colorectal cancer. *British Journal of Surgery* (97): 1638 – 1645
- JHAWER, M., GOEL, S., WILSON, A. J., MONTAGNA, C., LING, Y. H., BYUN, D. S., NASSER, S., ARANGO, D., SHIN, J., KLAMPFER, L., AUGENLICHT, L. H., PEREZ-SOLER, R., MARIADASON, J. M. (2008): PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Research* (68): 1953 – 1961
- KENIRY, M., PARSONS, R. (2008): The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* (27): 5477 – 5485
- KIM, R. (2009): Cetuximab and panitumumab: are they interchangeable? *The Lancet Oncology* (10): 1140 – 1141

- KIM, J. W., SHIN, M. K., KIM, B. C. (2015): Clinicopathologic impacts of poorly differentiated cluster-based grading system in colorectal carcinoma. *Journal of Korean Medical Science* (30): 16 – 23
- KINZLER, K. W., NILBERT, M. C., VOGELSTEIN, B., BRYAN, T. M., LEVY, D. B., SMITH, K. J., PREISINGER, A. C., HAMILTON, S. R., HEDGE, P., MARKHAM, A., CARLSON, M., JOSLYN, G., GRODEN, J., WHIRE, R., MIKI, Y., MIYOSHI, Y., NISHISHO, I., NAKAMURA., Y. (1991): Identification of a Gene Located at Chromosome 5q21 That is Mutated in Colorectal Cancers. *Science* (251): 1366 – 1370a
- KINZLER, K. W., NILBERT, M. C., SU, L. K., VOGELSTEIN, B., BRYAN, T. M., LEVY, D. B., SMITH, K. J., PREISINGER, A. C., HAMILTON, S. R., HEDGE, P., McKECHNIE, D., FINNIEAR, R., MARKHAM, A., GROFFEN, J., BOGUSKI, M. S., ALTSCHUL, S. F., HORII, A., ANDO, H., MIYOSHI, Y., MIKI, Y., NISHISHO, I., NAKAMURA., Y. (1991): Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* (253): 661 – 665b
- LAURENT-PUIG, P., CAYRE, A., MANCEAU, G., BUC, E., BACHET, J. B., LECOMTE, T., ROUGIER, P., LIEVRE, A., LANDI, B., BOIGE, V., DUCREUX, M., YCHOU, M., BIBEAU, F., BOUCHÉ, O., REID, J., STONE, S., PENNAULT-LLORCA, F. (2009): Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology* (27): 5924 – 5930
- LEE, M. H., MURPHY, G (2004): Matrix metalloproteinases at a glance. *Journal of Cell Science* (117): 4015 – 4016
- LEEMAN, M. F., CURRAN, S., MURRAY, G. I. (2003): New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *The Journal of pathology* (201): 528 – 534
- LETTAU, L., HATTERMANN, K., HELD-FEINDT, J., BRAUER, R., SEDLACEK, R. MENTLEIN, R. (2010): Matrix metalloproteinase-19 is highly expressed in astroglial tumors and promotes invasion of glioma cells. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* (69): 215 – 223
- LEVY, A. T., CIOCE, V., SOBEL, M. E., GARBOSA, S., GRIGIONI, W. F., LIOTTA, L. A., STETLER-STEVENSON, W. (1991): Increased Expression of the M_r 72,000 Type IV Collagenase in Human Colonic Adenocarcinoma. *Cancer Research* (51): 439 – 444

- LI, X. H., ZHENG, H. C., TAKAHASHI H., MASUDA, S., YANG, X. H., TAKANO, Y. (2009): PTEN expression and mutation in colorectal carcinomas. *Oncology Reports* (22): 757 – 764
- LIABAKK, N. B., TALBOT, I., SMITH, R. A., WILKINSON, K., BALKWILL, F. (1996): Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Research* (56): 190 – 196
- LIU, B., FANG, M., LU, Y., MENDELSON, J., FAN, Z. (2001): Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* (20): 1913 – 1922
- MARCHENKO, G. N., STRONGIN, A. Y. (2001): MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* (265): 87 – 93
- MASKOS, K. (2004): Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* (87): 249 – 263
- MASSOVA, I., KOTRA, L. P., FRIDMAN, R., MOBASHERY, S. (1998): Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *The FASEB Journal* (12): 1075 – 1095
- MARTINEZ-FERNANDEZ, A., GARCIA-ALBENIZ, X., PINEDA, E., VISA, L., GALLEGO, R., CODONY-SERVAT, J., AUGE, J. M., LONGARON, R., GASCON, P., LACY, A., CASTELLS, A., MAUREL, J. (2009): Serum matrilysin levels predict outcome in curatively resected colorectal cancer patients. *Annals of Surgical Oncology* (16): 1412 – 1420
- MICHOR, F., IWASA, Y., LENGAUER, C., NOWAK, M. A. (2005): Dynamics of colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology* (15): 484 – 493
- MIYAKI, M., SEKI, M., OKAMOTO, M., YAMANAKA, Y., MAEDA, Y., TANAKA, K., KIKUCHI, Y., IWAMA, T., IKEUCHI, T., TONOMURA, A., NAKAMURA, Y., WHITE, R., MIKI, Y., UTSUNOMIYA, J., KOIKE, M. (1990): Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Research* (50): 7166 – 7173
- MOUMEN, A., PATANÉ, S., PORRAS, A., DONO, R., MAINA, F. (2007) Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development. *Development* (134): 1443 – 1451

- MUELLER, M. S., MAUCH, S., SEDLACEK, R (2000): Structure of the human MMP-19 gene. *Gene* (252): 27 – 37
- MÜLLER, M., BECK, I. M., GADESMANN, J., KARSCHUK, N., PASCHEN, A., PROKSCH, E., DJONOV, V., REISS, K., SEDLACEK, R (2010): MMP19 is upregulated during melanoma progression and increases invasion of melanoma cells. *Modern Pathology* (23): 511 – 521
- MURPHY, G., NAGASE, H. (2008): Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine* (29): 290 – 308
- MURPHY, G., ALLAN, J. A., WILLENBROCK, F., COCKETT, M. I., O'CONNELL, J. P., DOCHERTY, A. J. (1992): The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *The Journal of Biological Chemistry* (267): 9612 – 9618
- MUSIL, D. (2003): Populační skrining kolorektálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi* (3): 126 – 130
- NAGASE, H., WOESSNER Jr., J. F. (1999): Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* (274): 21491 – 21494
- NISHISHO, I., NAKAMURA, Y., MIYOSHI, Y., MIKI, Y., ANDO, H., HORII, A., KOYAMA, K., UTSUNOMIYA, J., BABA, S., HEDGE, P. (1991): Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* (253): 665 – 669
- OGATA, Y., MATONO, K., SASATOMI, T., ISHIBASHI, N., OHKITA, A., MIZOBE, T., OGO, S., IKEDA, S., OZASA, H., SHIROUZU, K. (2006): The MMP-9 expression determined the efficacy of postoperative adjuvant chemotherapy using oral fluoropyrimidines in stage II or III colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (57): 577 – 583
- PARK, S., CHAPUIS, N., TAMBURINI, J., BARDET, V., CORNILLET-LEFEBVRE, P., WILLEMS, L., GREEN, A., MAYEUX, P., LACOMBE, C., BOUSCARY, D. (2010): Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica* (95): 819 – 828
- PENDAS, A. M., KNÄUPER, V., PUENTE, X. S., LLANO, E., MATTEI, M. G., APTE, S., MURPHY, G., LÓPEZ-OTÍN, C (1997): Identification and Characterization of a Novel Human Matrix Metalloproteinase with Unique Structural Characteristics, Chromosomal Location, and Tissue Distribution. *The Journal of Biological Chemistry* (272): 4281 – 4286

- RAMOS-VARA, J. A. (2005): Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* (42): 405 – 426
- ROY, R., YANG, J., MOSES, M. A. (2009): Matrix Metalloproteinase As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* (27): 5287 – 5297
- SADOWSKI, T. DIETRICH, S., KOSCHINSKY, F., LUDWIG, A., PROKSCH, E., TITZ, B., SEDLACEK, R. (2005): Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 γ 2 chain and induces epithelial cell migration. *Cellular and Molecular Life Sciences* (62): 870 – 880
- SEDLACEK, R, MAUCH, S., KOLB, B., SCHATZLEIN, CH., EIBEL, H., PETER, H. H., SCHMITT, J., KRAWINKEL, U. (1997/1998): Matrix Metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is Expressed on the Surface of Activated Peripheral Blood Mononuclear Cells and is Detected as an Autoantigen in Rheumatoid Arthritis. *Immunobiology* (198): 408 – 423
- SELA-PASSWELL, N., ROSENBLUM, G., SHOHAM, T., SAGI, I. (2010): Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (1803): 29 – 38
- SENA, P., MARIANI, F., MARZONA, L., BENINCASA, M., PONZ DE LEON, M., PALUMBO, C., RONCUCCI, L. (2012): Matrix metalloproteinases 15 and 19 are stromal regulators of colorectal cancer development from the early stages. *International Journal of Oncology* (41): 260 – 266
- SONG, M. S., SALMENA, L., PANDOLFI, P. P. (2012): The function and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (13): 283 – 296
- SPANO, J. P., LAGORCE, C., ATLAN, D., MILANO, G., DOMONT, J., BENAMOUZIG, R., ATTAR, A., BENICHO, J., MARTIN, A., MORERE, J. F., RAPHAEL, M., PENAULT-LLORCA, F., BREAU, J. L., FAGARD, R., KHAYAT, D., WIND, P. (2005): Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Annals of Oncology* (16): 102 – 108
- SPINALE, F. G., JANICKI, J. S., ZILE, M. R. (2013): Membrane-associated matrix proteolysis and heart failure. *Circulation Research* (112): 195 – 208

- STAMBOLIC, V., SUZUKI, A., de la POMPA, J. L., BROTHERS, G. M., CHRISTINE, M., SASAKI, T., RULAND, J., PENNINGER, J. M., SIDEROVSKI, D. P., MAK, T. W. (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* (95): 29 – 39
- STRACKE, J. O., HUTTON, M., STEWART, M., PENDAS, A. M., SMITH, B., LOPEZ-OTIN, C., MURPHY, G., KNÄUPER, V. (2000a): Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* (275): 14809 – 14816
- STRACKE, J. O., FOSANG, A. J., LAST, K., MERCURI, F. A., PENDAS, A. M., LLANO, E., PERRIS, R., DI CESARE, P. E., MURPHY, G., KNÄUPER, V. (2000b): Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Letters* (478): 52 – 56
- SUNAMI, E., TSUNO, N., OSADA, T., KITAYAMA, J., TOMOZAWA, S., TSURUO, T., SHIBATA, Y., MUTO, T., NAGAWA, H. (2000): MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *The Oncologist* (5): 108 – 114
- SZABO, K. A., ABLIN, R. J., SINGH, G. (2004): Matrix metalloproteinases and the immune response. *Clinical and Applied Immunology Reviews* (4): 295 – 319
- TAKAHASHI, C., SHENG, Z., PORAN, T. P., KITAYAMA, H., MAKI, M., HITOMI, K., KITAURA, Y., TAKAI, S., SASAHARA, R. M., HORIMOTO, A., IKAWA, Y., RATZKIN, B., ARAKAWA, T., NODA, M. (1998): Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* (95): 13221 – 13226
- TALLANT, C., MARRERO, A., GOMIS-RÜTH, F. X. (2010): Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (1803): 20–28
- TITZ, B., DIETRICH, S., SADOWSKI, T., BECK, C., PETERSEN, A., SEDLACEK, R. (2004): Activity of MMP-19 inhibits capillarylike formation due to processing of nidogen-1. *Cellular and Molecular Life Sciences* (61): 1826 – 1833
- VAN WART, H. E., BIRKEDAL-HANSEN, H. (1990): The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Biochemistry* (87): 5578 – 5592

- VAZQUEZ, F., RAMASWAMY, S., NAKAMURA, N., SELLERS, W. R. (2000): Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Molecular and Cellular Biology* (20): 5010 - 5018
- VERMA, R. P., HANSCH, C. (2007): Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (15): 2223 – 2268
- VINCENTI, M. P., BRINCKERHOFF, C. E. (2007): Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *Journal of Cellular Physiology* (213): 355 – 364
- VISSE, R., NAGASE, H. (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* (92): 827 – 839
- WANICZEK, D., ŚNIETURA, M., MŁYNARCZYK-LISZKA, J., PIGŁOWSKI, W., LANGE, D., RUDZKI, M., ARENDT, J. (2013): PTEN expression profiles in colorectal adenocarcinoma and its precancerous lesions. *Polish Journal of Pathology* (1): 15 – 20
- YAMADA, T., OSHIMA, T., YOSHIHARA, K., TAMURA, S., KANAZAWA, A., INAGAKI, D., YAMAMOTO, N., SATO, T., FUJII, S., NUMATA, K., KUNISAKI, C., SHIOZAWA, M., MORINAGA, S., AKAIKE, M., RINO, Y., TANAKA, K., MASUDA, M., IMADA, T. (2010): Overexpression of *MMP-13* Gene in Colorectal Cancer with Liver Metastasis. *Anticancer Research* (30): 2693 – 2699
- YANG, Y., SHAO, N., LUO, G., LU, L., ZHENG, L., NILSSON-EHLE, P., XU, N. (2010): Mutations of PTEN gene in gliomas correlate to tumor differentiation and short-term survival rate. *Anticancer research* (30): 981 – 986
- YANG, B., SU, K., GAO, J., RAO, Z. (2012): Expression and prognostic value of matrix metalloproteinase-7 in colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (13): 1049 – 1052
- ZAVORAL, M., VOJTECHOVA, G., SUCHANEK, S. (2013): Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie* (4): 172 – 175
- ZENG, Z. S., HUANG, Y., COHEN, A. M., GUILLEM, J. G. (1996): Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *Journal of Clinical Oncology* (14): 3133 – 3140

- ZHENG, H., TAKAHASHI, H., MURAI, Y., CUI, Z., NOMOTO, K., TSUNEYAMA, K., TAKANO, Y. (2007): Low expression of FHIT and PTEN correlates with malignancy of gastric carcinomas: tissue-array findings. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* (15): 432 – 440
- ZUCKER, S., LYSIK, R. M., ZARRABI, M. H., MOLL, U. (1993): M_r 92,000 Type IV Collagenase Is Increased in Plasma of Patients with Colon Cancer and Breast Cancer. *Cancer research* (53): 140 – 146

9.1 Knihy

- MALINSKY, J. (1988): Přehled histologické techniky. 2. vydání Olomouc: rektorát Univerzity Palackého v Olomouci, 1 - 46
- BERANOVA, M., TONAR, Z. (2002): Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty. Ústav histologie a embryologie LF UK. Plzeň. 1 - 31

9.2 Použité internetové zdroje

<http://www.linkos.cz>

<http://www.svod.cz>

<http://www.cancer.org>

<http://www.cancer.gov>

<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics>

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

<http://www.kolorektum.cz>

<http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Vyznam-signalni-cesty-EGFR-a-prediktivni-markery-cilene-lecby-u-karcinomu-hlavy-a-krku/6-F-yt.magarticle.aspx>

<http://biologie.pedf.cuni.cz/maratova/barveni--ez--1.html>

<http://www.isenet.it/index.php/eu/products/galileo-ck-3500>

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4E-BP	Eukaryotní translační iniciační faktor
Akt	Protein kináza B – také PKB
APAAP	Alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza komplex
APC	Adenomatous polyposis coli
AS160	TBC1 domain family member 4
CEA	Karcinoembryonální antigen
CIN	Chromozomální nestabilita
CRC	Kolorektální karcinom
DAB	3,3-diaminobenzidin
DFS	Délka bezpříznakového období
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
ENTPD5	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
FISH	Fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace
FOXO	Forkhead box O
GSK3	Glykogen syntáza kináza 3
HR	Hazard ratio
IHC	Imunohistochemie
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog
mAb	Monoklonální protilátka
mCRC	Metastazující kolorektální karcinom
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MMP	Matrix metaloproteináza
MMPI	Inhibitor matrix metaloproteinázy
MSI	Mikrosatelitní nestabilita
mTOR	Mammalian target of rapamycin
OS	Celkové přežití
p70S6K	70 kDa ribosomal protein S6 kinase

PAP	Peroxidáza-anti-peroxidáza komplex
PDK1	Fosfatidylinositol-fosfát dependentní kináza-1
PFS	doba přežití bez progrese
PGC1	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PIP2	Fosfatidylinositol-4,5-bifosfát
PIP3	Fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PP2A	Protein fosfatáza 2A
PTEN	Fosfatázový a tensinový homolog
RAF	Raf kinases
RASI-1	Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed – 1
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RNA	Ribonukleová kyselina
RTK	Receptor tyrosin kinázy
(S)ABC	(Strept)avidin-biotin komplex
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c
TGF- α	Transformující růstový faktor alfa
TIMP	Tkáňový inhibitor metaloproteinázy
TMA	Tkáňová mikroarray
Tp53	Tumor-supresorový gen p53
TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
TSC1/TSC2	Komplex tuberózní sklerózy 1/2
TSG	Tumor-supresorový gen