

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Eva Hrušková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Role metaloproteinázy v procesu nádorové progresse
u pacientů s kolorektálním karcinomem**

Bakalářská práce

Eva Hrušková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením
Mgr. Marty Khoylou, Ph. D. a že jsem zde uvedla všechny zdroje, ze kterých jsem čerpala.

V Olomouci, 24. 4. 2013

.....

Podpis

Souhrn

Každým rokem celosvětově přibývá více než 944 000 pacientů s kolorektálním karcinomem a více než polovina takto postižených zemře. Kolorektální karcinom se vyvíjí sporadicky, na základě dědičných syndromů, nebo z důvodu prvotního zanícení střeva. V posledních letech byla značně rozvinuta myšlenka, že se na tomto procesu podílejí i metaloproteinázy, které mohou hrát až dominantní roli. Konkrétně matrix metaloproteinázy se podílejí na degradaci extracelulární matrix, čímž sice pozitivně ovlivňují proliferaci, diferenciaci, apoptózu a imunitní odpověď buněk, avšak při nadměrné aktivitě se mohou účastnit zánětlivých procesů, progresu primárního nádoru, angiogeneze a rozvoje invazivního fenotypu karcinomu až k metastázám. Konkrétně MMP-19 je konstitutivně sekretována mnoha tkáněmi a typy buněk, a ukázalo se, že je její exprese zvýšena při zánětlivých podmínkách a v průběhu vývoje nádoru. V rámci této bakalářské práce byla s využitím fixačních a parařinizačních technik a pomocí tkáňových microarrayí a imunohistochemického barvení studována role matrix metaloproteinázy MMP-19. Tato metaloproteináza byla detekována v zánětlivých podmínkách ve stromálních buňkách a v primárních fázích kolorektálního karcinomu. Byly zkoumány souvislosti výskytu a intenzity exprese MMP-19 s histologickými parametry jako bezpříznakové období a celkové přežití.

Summary

There are more than 944 000 new patients with colorectal carcinoma worldwide every year and more than half of those affected dies. Colorectal carcinoma develops sporadically, on the basis of hereditary syndromes, or due to primary inflammation of the intestine. In recent years, the idea about the involvement of metalloproteinases, which can play up to a dominant role, in this process was developed extensively. Specifically, matrix metalloproteinases participate in the degradation of extracellular matrix, which positively affect proliferation, differentiation, apoptosis and immune response of the cells, but if they are excessively active, they may participate in the inflammatory process, progression of the primary tumor, angiogenesis and development of the tumor invasive phenotype up to the metastasis. It was found, that MMP-19 is constitutively secreted by many tissues and cell types, and it is upregulated in the inflammatory conditions and during the tumor development. Within this bachelor thesis, the role of matrix metalloproteinase MMP-19 was studied by using fixation and paraffinization techniques, tissue microarrays and immunohistochemical staining. This metalloproteinase was detected in inflammatory conditions in stromal cells and in primary stages of the colorectal carcinoma. The correlations of the presence and intensity of the expression of MMP-19 with histological parameters, as disease-free survival and overall survival were studied.

Poděkování:

Chtěla bych tímto poděkovat Mgr. Martě Khoylou, Ph.D. za vedení a cenné rady při realizaci mé bakalářské práce. Dále děkuji MUDr. et MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D. za odbornou konzultaci výsledků a připomínky k tématu. Děkuji Mgr. Márii Janíkové za pomoc při přípravě vzorků pacientů a rady při hodnocení výsledků. V neposlední řadě děkuji mé rodině, příteli a kamarádům, kteří při mně stáli po celou dobu.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Obsah:

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	Kolorektální karcinom.....	2
2.1.1	Vznik kolorektálního karcinomu.....	4
2.1.2	Molekulární podstata vzniku kolorektálního karcinomu	5
2.1.3	Kolorektální karcinom a střevní záněty	6
2.2	Matrix metaloproteinázy	6
2.2.1	Struktura matrix metaloproteináz.....	7
2.2.2	Regulace matrix metaloproteináz.....	8
2.2.3	Účinky matrix metaloproteináz.....	9
2.2.4	Degradace extracelulární matrix	9
2.2.5	Role matrix metaloproteináz v raných stádiích tumorogeneze	9
2.2.6	Role matrix metaloproteináz v invazním nádoru a metastázích	10
2.2.7	Matrix metaloproteinázy a zánět	12
2.3	Matrix metaloproteináza MMP-19	12
2.3.1	Struktura MMP-19	12
2.3.2	Účinky MMP-19	13
2.3.3	MMP-19 a karcinogeneze	15
2.3.4	MMP-19 a zánět	16
2.4	Tvorba parafinových bloků	16
2.5	Tkáňová microarray	17
2.6	Imunohistochemie	19
2.6.1	Dělení metod podle způsobu značení.....	19
2.6.2	Dělení podle pořadí značené protilátky.....	19
3	CÍLE PRÁCE	23
4	MATERIÁL A METODA	24

4.1	Biologický materiál	24
4.2	Chemikálie.....	24
4.3	Přístrojové vybavení.....	24
4.4	Materiál	24
4.5	Imunohistochemická detekce protilátek: MMP19 - 5	25
4.5.1	Příprava roztoků	25
4.5.2	Příprava vzorků	26
4.5.3	Vlastní postup.....	26
5	VÝSLEDKY	28
6	DISKUZE	35
7	ZÁVĚR.....	37
8	LITERATURA	38
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	47

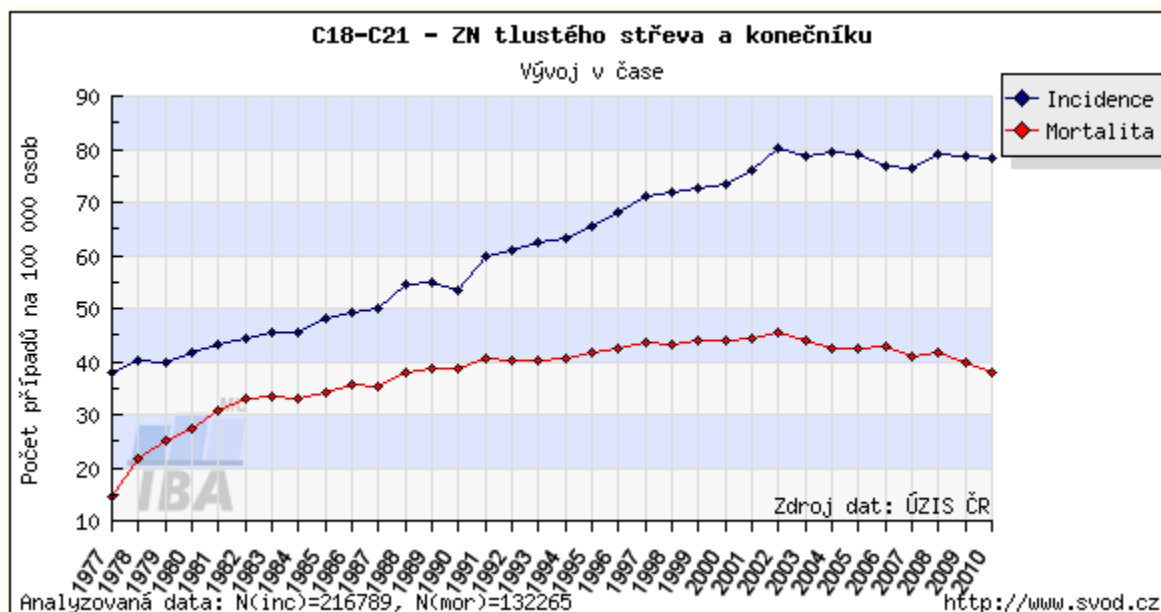
1 ÚVOD

Kolorektální karcinom je velice závažné a časté onemocnění trávicího traktu. Je běžnější v rozvinutých než v rozvojových zemích, kdy v rozvinutých zemích je druhým nejčastějším karcinomem. V rámci České republiky je trend incidence i mortality od roku 2002 v mírném poklesu. U mužů je kolorektální karcinom častější než u žen (58 % ku 42 %). Co se věku týče, tento karcinom se ve výjimečných případech objevuje u pacientů mladších 30 let a s rostoucím věkem se incidence zvyšuje až do 75 let a mortalita do 80 let, poté následuje pokles trendu. Pokud se díváme na incidenci a mortalitu v rámci krajů České republiky, nejhůře na tom je Plzeňský kraj s přibližně 76 případy, z toho 48 úmrtími na 100 000 obyvatel v období 1977-2010. Nejpříznivější výsledky naopak má Zlínský kraj s 56 případy, z toho 32 úmrtími (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2013-03-25]). Obecně se v České republice incidence i mortalita již dlouhou dobu pohybuje u vrcholu celosvětového žebříčku, a to signalizuje neustálou potřebu hledat účinné způsoby léčby. Tento karcinom vzniká jako výsledek patologické transformace normálního epitelu tlustého střeva na adenomatózní polyp a dále se rozvíjí v invazivní nádor. Proces vzniku kolorektálního karcinomu je mnohastupňový, kdy progresse od adenomu k invazivnímu fenotypu a metastázám trvá až desítky let. Tento proces je doprovázen mnohými genetickými změnami, jako například mutace tumor-supresorových genů, protoonkogenů, růstových faktorů, a dalšími molekulárními událostmi (Jablonská, 2000). V mnoha stádiích kolorektálního karcinomu jsou exprimovány matrix metaloproteinázy, což jsou zinek vázající endopeptidázy. Jejich účinek je stále častějším předmětem vědeckých výzkumů, protože se u některých z nich objevují souvislosti s přežitím a prognózou tohoto onemocnění. Matrix metaloproteinázy jsou exprimovány hlavně v invazivním nádoru a metastázách, avšak jejich role ve vznikajících nádorech se také zdá být velice podstatná. Například nadprodukce těchto enzymů ve tkáni a selhání jejich inhibitorů může vést k imunitní odpovědi a vzniku zánětu, což může být předstupeň tvorby karcinomu. Konkrétně role matrix metaloproteinázy MMP-19 v kolorektálním karcinomu ještě není zcela objasněna, proto je předmětem intenzivního výzkumu a je zkoumána v experimentální části této bakalářské práce.

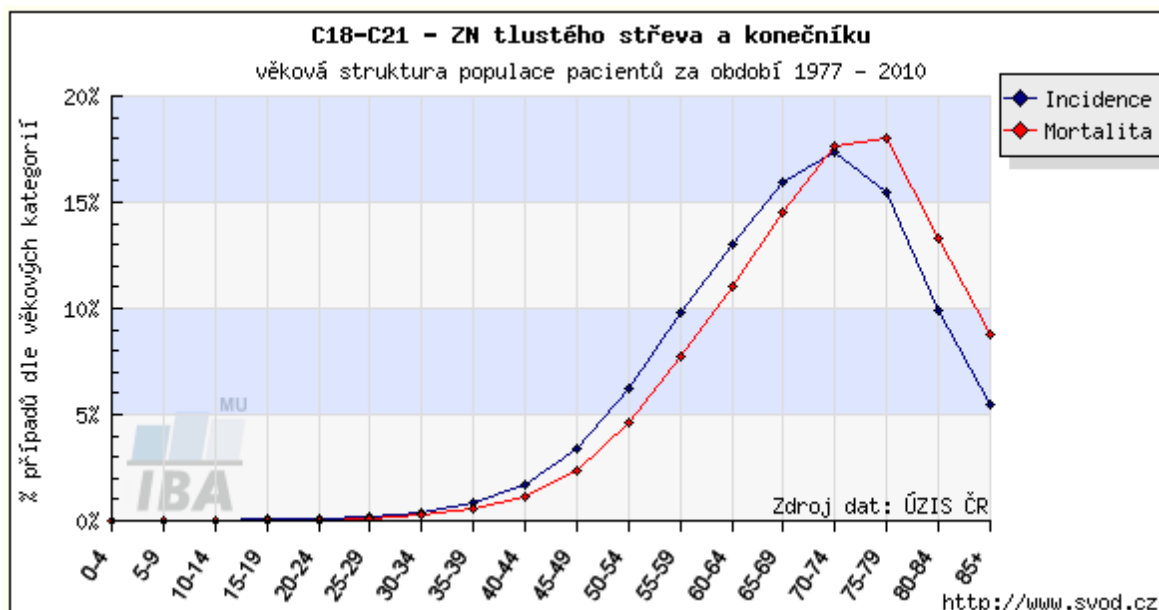
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC - colorectal carcinom) je jedním z nejčastějších lidských zhoubných novotvarů. Podle MKN-10 (Mezinárodní klasifikace nemocí - 10) má tato nemoc více kódů - je spojením C18 (zhoubný novotvar tlustého střeva), C19 (zhoubný novotvar rektosigmoideálního spojení), C20 (zhoubný novotvar konečníku - recta) a C21 (zhoubný novotvar řiti a řitního kanálu) (URL:<<http://www.uzis.cz>> [cit. 2013-03-25]). Například v roce 2000 přibylo více než 944 000 případů a 492 000 úmrtí celosvětově (Parkin a kol., 2000). V České republice přibývá ročně okolo 80 případů kolorektálního karcinomu na 100 000 obyvatel. V přepočtu na 10 500 000 zde žijících je to cca 8 400 obyvatel ročně, čímž se Česká republika stále pohybuje mezi státy s nejvyšší incidencí. Z tohoto čísla je průměrně každý druhý případ smrtelný, takže více než 4 000 obyvatel ČR ročně zemře na kolorektální karcinom. Pokud srovnáváme případy mužů a žen, muži jsou na tom poměrně hůř (58 %) než ženy (42 %). Do roku 2002 incidence i mortalita lineárně narůstala, avšak od tohoto roku nastal mírný pokles trendu (Obr. 1), pravděpodobně s nárůstem informovanosti a možností prevence a léčby. Věková struktura populace pacientů za období 1977 - 2010 je sice tvořena z největší části pacienty ve věku 70 - 80 let, avšak 20 % všech nemocných je tvořeno pacienty mladších 60 let (Obr. 2), čímž se kolorektální karcinom stává nemocí postihující lidi v produktivním věku (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2013-03-25]).



Obr. 1: Časový vývoj hrubé incidence a mortality kolorektálního karcinomu v období 1977 - 2010 (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2013-03-25])



Obr. 2: Věková struktura pacientů kolorektálního karcinomu v období 1977 - 2010
(URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2013-03-25])

Kolorektální karcinom je třetí nejčastěji diagnostikovanou rakovinou u mužů a druhou u žen. Hodnoty CRC incidence rapidně rostou hlavně z důvodu vlivu mnoha rizikových faktorů jako kouření, fyzická neaktivita, nadbytek váhy a obezita, konzumace červeného a druhotně zpracovaného masa a přemíra konzumace alkoholu. CRC je velkým zdravotním problémem. Při hledání nových diagnostických a terapeutických řešení, která by pomohla snížit úmrtnost způsobenou CRC, je důležité nejprve porozumět jeho etiologické a biologické povaze. Pochopení molekulárního původu CRC je základním krokem pro identifikaci nových molekulárních cílů, které mohou pomoci v určování prognózy CRC pacientů a následnému přizpůsobení jejich terapie (Jablonská, 2000).

Za posledních 30 let bylo nashromážděno velké množství experimentálních důkazů, které stále častěji poukazovaly na role proteináz v rozvoji nádorů. Na invazivním procesu nádoru se podílejí cystein, serin, kyselina asparagová a metaloproteinázy, kde poslední zmíněné pravděpodobně hrají dominantní roli (Zucker, 1988). Existuje množství informací o degradaci proteinů pojivové tkáně *in vitro* pomocí proteolytických enzymů izolovaných z nádorových tkání nebo sekretovaných nádorovými buňkami. Avšak existuje velice málo informací o mechanismech, kterými tyto procesy probíhají *in vivo*. Míra, do které musí být extracelulární matrix (ECM) degradována, aby způsobila invazi nádoru, není dosud známa. Některé z enzymů, které degradují matrix, slouží jako aktivátory pro další proteinázy a spouštějí kaskádu vedoucí k účinné degradaci ECM. Jiné však mají opačný efekt, proto tyto enzymy a jejich role v nádorech byly a jsou intenzivně studovány (Jablonská, 2000).

2.1.1 Vznik kolorektálního karcinomu

Nejčastější příčinou vzniku kolorektálního karcinomu je maligní zvrát adenomu, což je nezhoubný nádor žlázového epitelu. Adenom tlustého střeva je proto považován za nejzávažnější prekancerózní lézi. Ve sliznici tlustého střeva byly popsány molekulárně genetické a morfologické změny, které vývoji karcinomu předcházejí (Jablonská, 2000).

Kolorektální karcinom se vyvíjí tak, že se sliznice normálního epitelu tlustého střeva mění proliferací a rozdílnou diferenciací, což se nazývá tzv. „field defect“ (**Tab. I**). Dále vznikají ložiska aberantních krypt, které jsou strukturálně a cytologicky odlišné od slizničních krypt a jejich počet kolísá od 2 do 150. Epitel krypt může být normální, hyperplastický nebo dysplastický. Dále vývoj pokračuje k adenomu s nízkým rizikem maligního zvrátu, poté k adenomu s vysokým rizikem maligního zvrátu a nakonec následuje maligní zvrát adenomu - adenokarcinom v adenomu, adenokarcinom a metastazující adenokarcinom. Zde dochází nejprve k prorůstání karcinomu přes bazální membránu do stromatu, případně do vrstvy hladké svaloviny pod slizničním vazivem (*muscularis propria*). Protože v adenomu a celkově ve sliznici tlustého střeva nejsou obsaženy lymfatické uzliny, nemůže tento adenom, tzv. intramukózní karcinom, metastazovat a stačí jeho chirurgické odstranění. Ovšem pokud karcinom proroste až do stopky adenomu, stane se z něho invazivní karcinom (Cooper a kol., 1998). Tento karcinom lze opět odstranit chirurgicky, ovšem pokud ještě neprorostl až do okraje stopky adenomu. Poté takovýto karcinom dále prorůstá až do lymfatických cév a žil, což je prognosticky závažný stav (Jablonská, 2000).

Tab. I: Modifikovaná Dukesová klasifikace stadia kolorektálního karcinomu (Jablonská, 2000).

Stadium	Hloubka invaze
A	sliznice
B1	invaze do <i>muscularis propria</i> bez penetrace v celé tloušťce uzliny bez nádorové infiltrace
B2	penetrace <i>muscularis propria</i> v celé tloušťce uzliny bez nádorové infiltrace
C1	invaze do <i>muscularis propria</i> bez penetrace v celé tloušťce uzliny s nádorovou infiltrací
C2	penetrace <i>muscularis propria</i> v celé tloušťce uzliny s nádorovou infiltrací
D	vzdálené metastázy

2.1.2 Molekulární podstata vzniku kolorektálního karcinomu

Mnohastupňová progresse k invazivnímu fenotypu nádoru trvá až desítky let, během kterých dochází k mnohým genetickým změnám. První genové mutace se objevují v normální tkáni a vyvolávají proliferaci buněk. Tyto buňky jsou tím pádem citlivější pro další mutace, které dále zvyšují stupeň proliferace. Následuje klonální expanze buněk, další mutace, neoplastický fenotyp, invazivní fenotyp a metastáze (Jablonská, 2000).

Na vzniku CRC se podílí řada tumor-supresorových genů a onkogenů. Rozdíl mezi tumor-supresorovými geny, které ovlivňují maligní transformaci, a onkogeny, které vznikají aktivací protoonkogenů plnicích funkci růstových faktorů, je v tom, že mutace tumor-supresorových genů vznikají v zárodečné i somatické linii. Existuje zde tedy spojitost tumor-supresorových genů s dědičnou povahou některých forem CRC. Oproti tomu mutace protoonkogenů nastávají pouze v somatické linii, takže se neobjevují v dědičných formách CRC (Grodén a kol., 1991).

Klíčovými změnami v CIN karcinomech (karcinomy s chromozómovou nestabilitou) jsou aneuploidie - ztráty částí chromozómů, které souvisí s nestabilitou na molekulární úrovni. Mezi nejranější události na molekulární úrovni v dráze nádorové progresse CRC patří ztráta *APC* genu (adenomatous polyposis coli) na chromozómu 5q (URL:< <http://www.cancer.gov> > [cit. 2013-3-8]). *APC* je tumor-supresorový gen inhibující buněčný růst, takže jeho ztráta je kritická, protože se tkáň odproští od kontrolních mechanismů buněčného růstu. Mutace v zárodečné linii vyvolávají vznik adenomů, mutace v somatické linii hrají roli ve sporadických CRC. Mutace *APC* genu jsou pravděpodobným iniciačním bodem u vzniku mnohých CRC. Další událostí jsou změny v metylaci DNA (hypometylace na úrovni malého adenomu) a účinek onkogenu *K-ras* (na úrovni intermediárního adenomu) na chromozómu 12p. Přechod k velkému adenomu a ke karcinogenezi ovlivňuje mutace supresorového genu *DCC* (deleted in colon cancer) na chromozómu 18q a supresorového genu *Tp53* (kódujícího protein p53) na chromozómu 17p. Tato oblast chromozómu je nejčastěji postiženou oblastí ztrátou alel u CRC. Mutace *Tp53* hraje důležitou roli v maligní transformaci a podporuje vznik metastáz v různých typech lidských tumorů (až 40 % karcinomů). Mezi další genetické změny patří mutace genů *TGF-β* (transformační růstový faktor beta), jehož ztráta podporuje proliferaci buněk a maligní transformační proces (Jablonská, 2000).

2.1.3 Kolorektální karcinom a střevní záněty

Zánět je komplex interakcí rozpustných faktorů a buněk, které mohou vzniknout jako odpověď na traumatické, infekční, post-ischemické, toxické nebo autoimunní poškození jakékoliv tkáně. Díky těmto interakcím nastává hojení a následné uzdravení tkáně. Avšak pokud dojde k blokaci v určitém kroku této odpovědi, může zánět vést k trvalému zasažení tkáně leukocyty, lymfocyty nebo kolagenem. Trvalé zanícení může oxidovat DNA, což podnítlí neoplastickou transformaci (Nathan, 2002).

Vznik kolorektálního karcinomu je často spojen s předchozím zánětlivým onemocněním tlustého střeva, např. ulcerózní kolitidou. U tohoto onemocnění je pro vznik karcinomu důležitý rozsah a délka trvání kolitidy. Pokud je onemocnění zjištěno u mladého pacienta, je riziko vzniku karcinomu výrazně vyšší než u pacienta staršího 40 let. U takto se vyskytujícího karcinomu je vývoj směrem adenom - dysplazie - karcinom, což většinou trvá okolo 10 let a více. Díky takto dlouhé době vývoje a vzhledem k tomu, že adenom i karcinom často krvácejí, lze tento problém detekovat screeningovým vyšetřením krve ve stolici. Dysplazie u ulcerózní kolitidy se však nejčastěji objevuje v ploché sliznici, karcinomové buňky pak invadují do submukózy a svaloviny, což se nijak výrazně neprojeví na povrchu sliznice. Takové stádium se pak neprojevuje ani krvácením, takže je těžké ho rozeznat (Jablonská, 2000).

Výskyt adenomatózních polypů je u pacientů se zánětlivým onemocněním také častý a komplikuje onemocnění. Dále zánětlivé polypy, tzv. pseudopolypy, složené z nahlučených leukocytů ukazují na těžký průběh zánětu. Tyto polypy jsou zdrojem zánětu a mohou způsobit relaps Crohnovy choroby nebo ulcerózní kolitidy. Bylo zjištěno, že po 20letém průběhu Crohnovy choroby je 18násobné riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Riziko se zvyšuje s délkou trvání této nemoci i ulcerózní kolitidy. V místech postižených zánětem se vyskytuje karcinom nejčastěji, tak jako v místech bypassové operace. U těchto nemocí je také zvýšený výskyt dysplazie (Jablonská, 2000).

2.2 Matrix metaloproteinázy

Matrix metaloproteinázy (MMP) jsou rodina více než 24 zinek vázajících endopeptidáz (peptidový řetězec štěpí uvnitř), které jsou klasifikovány podle své struktury a podle *in vitro* specifity k primárnímu substrátu do 6 podskupin. Jsou to kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), želatinázy (MMP-2, MMP-9), stromelysiny a stromelysinové MMP (MMP-3, MMP-10, MMP-11 a MMP-12), matrilysiny (MMP-7, MMP-26), MMP

membránového typu (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) a ostatní (MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-26, MMP-28). Dělení do těchto podskupin se však v různých zdrojích liší. Kolagenázy, želatinázy a stromelysiny jsou všechny sekretovány a jsou rozpustné, zatímco metaloproteinázy membránového typu jsou přichyceny k buněčné povrchové membráně (Curran a Murray, 1999).

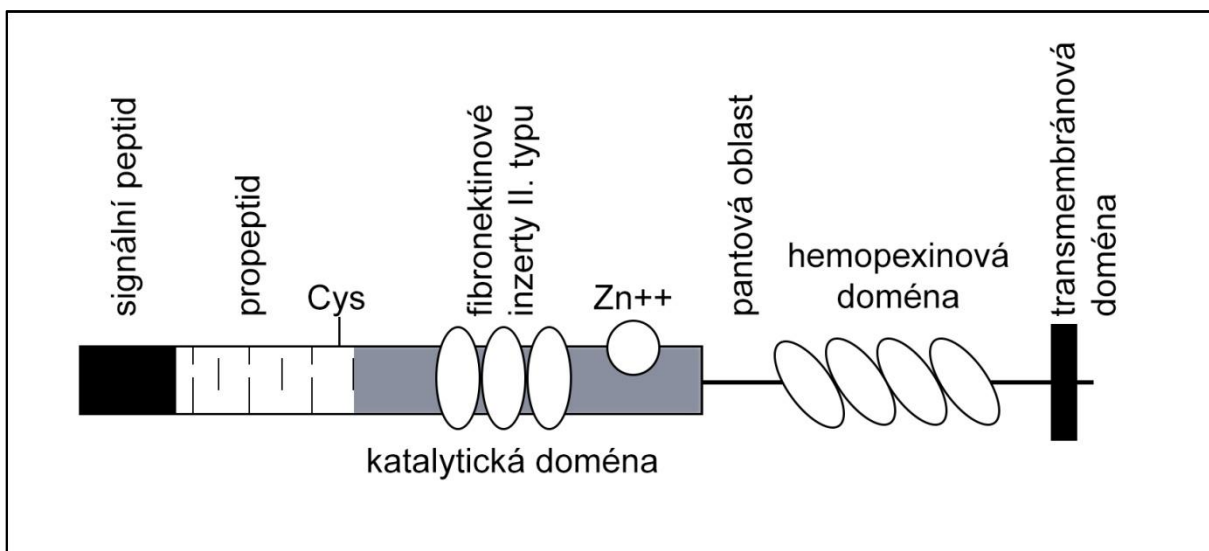
2.2.1 Struktura matrix metaloproteináz

Primární struktura matrix metaloproteináz je tvořena ze specifických prvků, tzv. domén (**Obr. 3**). Propeptidová doména (okolo 80 aminokyselin) má konzervativní jedinečnou sekvenci PRCG(V/N)PD. Cystein v této sekvenci („cystein switch“) podvazuje katalytický zinek, aby udržel latenci pro-MMP. Tato sekvence chybí například u MMP-23 (Gururajan a kol., 1998), u dalších matrix metaloproteináz se může v této oblasti vyskytovat variabilita.

Katalytická doména (okolo 170 aminokyselin) obsahuje zinek vázající motiv a konzervovaný metionin. Tato doména sestává z pětivláknového β -skládaného listu, tří α -helixů a ze smyček (Dhanaraj a kol., 1996). Katalytická doména MMP má navíc strukturní zinečnatý iont a 2 - 3 vápenaté ionty, které jsou zodpovědné za stabilitu a expresi enzymatické aktivity. Například MMP-2 a MMP-9 mají tři opakování fibronektinových inzertů II. typu v katalytické doméně, kde tyto inzerty interagují s kolageny a želatinami (Allan a kol., 1995).

C-terminální hemopexinová doména (okolo 210 aminokyselin) má elipsoidní diskovitý tvar se čtyřmi β -vřetenovitými strukturami (Gomis-Rüth a kol, 1996). Hemopexinová doména je nezbytná pro štěpení kolagenů kolagenázami (Bode, 1995), ačkoliv katalytická doména sama vykazuje proteolytickou aktivitu směrem k ostatním substrátům (Clark a Cawston, 1989). Například MMP-23 má místo hemopexinové domény oblasti bohaté na prolin, cystein a další aminokyseliny (Gururajan a kol., 1998).

Funkce pantové oblasti (hinge region) bohaté na prolin není přesně známá. Transmembránová doména byla objevena u některých matrix metaloproteináz membránového typu, kde plní funkci tzv. kotvy a drží tyto enzymy u povrchu buňky (URL:<<http://www.jbc.org>> [cit. 2013-3-10])



Obr. 3: Schematický diagram matrix metaloproteináz (překresleno dle Westermarck a Kahari, 1999)

2.2.2 Regulace matrix metaloproteináz

Regulace MMP je složitá a je obvykle úzce kontrolována jak časově, tak prostorově. Expresi a aktivitu jednotlivých MMP pozitivně i negativně kontroluje řada transkripčních a posttranskripčních mechanismů. Většina MMP je syntetizována ve velmi nízkých hladinách obvykle jako latentní neaktivní prekurzory (zymogeny, proenzymy - neaktivní prekurzor enzymu). Vylučovány jsou různými typy buněk jako buňkami mezenchymu, T-lymfocyty, monocyty, makrofágy, neutrofilů, keratinocyty a nádorovými buňkami. Přeměna v aktivní enzym obvykle probíhá v pericelulární nebo extracelulární matrix proteolytickým štěpením N-terminálního propeptidu (Edwards a kol., 1996). Matrix metaloproteinázy vzájemně spolupracují a vytvářejí proteolytickou aktivační kaskádu: jakmile je jedna MMP aktivována, může katalyzovat přeměnu dalších MMP zymogenů na jejich aktivní formy. Katalytická kaskáda může způsobit zapnutí mnoha dalších metaloproteináz, které jsou společně schopny degradovat všechny složky ECM - například jsou jedinými enzymy degradujícími fibrilární kolagen (Curran a Murray, 1999), nekolagenní glykoproteiny a proteoglykany (Pender a Macdonald, 2004).

Expresi MMP je v normálních podmínkách ve tkáni velice nízká a je indukována pouze v okamžiku, kdy je potřeba remodelace a degradace ECM. Metaloproteinázy jsou regulovány čtyřmi cestami: primárně na úrovni transkripce, v bodě aktivace prekurzorových zymogenů, interakcí se speciálními složkami ECM a TIMP inhibitory (Gomez a kol., 1997; Brew a kol., 2000). Existuje však také důkaz o modulaci stability mRNA v odpovědi na růstové faktory a cytokiny (Westermarck a Kahari, 1999).

2.2.3 Účinky matrix metaloproteináz

MMP regulují účinky buněčného růstového faktoru a zánětlivé reakce štěpením a uvolňováním růstových faktorů, cytokinů, chemokinů a jejich receptorů (Schonbeck a kol., 1998; Haro a kol., 2000). MMP jsou zapojeny do patobiologie revmatoidní artritidy a osteoartritidy (Bresnihan, 1999; Ishiguro a kol., 1999), růstu nádoru a metastáz (Westermarck a Kähäri, 1999), arterosklerózy (Schonbeck a kol., 1997) a chronických kožních vředů (Saarialho-Kere, 1998). Navíc exprese různých MMP jako stromelysin-1, stromelysin-2 a metaloelastáza působí jako jeden z hlavních faktorů přispívajících ke vzniku slizničních vředů v idiopatických střevních zánětech (IBD - Inflammatory Bowel Disease), mezi které patří například Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (Vaalamo a kol., 1998; Salmela a kol., 2002). Přesné expresní vzorce a funkce některých MMP jako MMP-19, MMP-26 a MMP-28 však v současné době nejsou ještě dostatečně známy.

2.2.4 Degradace extracelulární matrix

Degradace ECM je normální fyziologický proces probíhající v embryonálním vývoji, orgánové morfogenezi, implantaci blastocytů, ovulaci, růstu vlasových folikulů, přestavbě kostí a hojení ran (Shapiro, 1998). Matrix metaloproteinázy jsou schopné degradovat všechny druhy proteinů extracelulární matrix, ale jsou schopny zpracovat i mnoho jiných bioaktivních molekul. Je známo, že se podílí na štěpení receptorů lokalizovaných na buněčném povrchu, uvolnění apoptotických ligandů a aktivaci nebo deaktivaci chemokinů nebo cytosinu. Degradace ECM je během vývoje, růstu a opravy tkání nezbytná, takže MMP pravděpodobně také hrají klíčovou roli v buněčných procesech jako proliferace, migrace (adheze, disperze), diferenciace, apoptóza a hostitelská obrana (Sena a kol., 2011).

Na druhou stranu je nadměrná proteolýza častým rysem mnoha patologických jevů (Shapiro, 1998). Nádorová invaze, metastáze a angiogeneze vyžadují kontrolovanou degradaci ECM a jak již bylo řečeno, MMP hrají v těchto procesech významnou roli.

2.2.5 Role matrix metaloproteináz v raných stádiích tumorogeneze

Nejprve byla objevena role MMP v metastázích, proto se dlouho zkoumaly role právě v pokročilých stádiích nádorů. Avšak později bylo zjištěno, že klíčové onkogeny a tumor-supresorové geny účastníci se kolorektální tumorogeneze exprimují různé MMP už i v raných stádiích tumorogeneze, proto jsou jejich další role neustále studovány.

Například přítomnost MMP-1 v kolorektálním karcinomu je spojena se špatnou prognózou v přímé závislosti na Dukesových stádiích (Shiozava a kol., 2000), hodnoty MMP-2 byly výrazně zvýšeny v nádorové tkáni kolorekta ve srovnání se zdravou tkání (Parsons a kol., 1998; Waas a kol., 2002) a vysoká exprese MMP-2 v maligním epitelu byla spojena se sníženým přežitím pacientů s CRC (Hilska a kol., 2007). Exprese MMP-3 je zvýšena v CRC, čímž aktivuje pro-MMP-9 (Inuzuka a kol., 2000), což vede k progresi CRC. Při studiu raných stádií CRC byla také identifikována MMP-7, matrilysin (Oshima a kol., 2008), o které je dosud shromážděno nejvíce důkazů. Matrilysinová aktivita byla pozorována v kolorektálních adenomech (Yamamoto a kol., 1994) a imunoreaktivní MMP-7 byla lokalizována v cytoplazmě buněk kolorektálního adenomu (Fingleton a kol., 1999). Na základě těchto pozdějších objevů byly určeny intracelulární funkce. Mechanismus, jakým MMP-7 ovlivňuje raná stádia kolorektální tumorogeneze, je stále oblastí zájmu.

V maligní tkáni CRC byla dále zjištěna zvýšená exprese MMP-9 (Zeng a kol., 2002). Její vysoká hladina byla spojena s kratším bezpříznakovým obdobím po vyléčení (DFS - disease-free survival) a celkovým přežitím (OS - overall survival). Dále byly zjištěny korelace mezi zvýšenými hladinami MMP-9 v plazmě a kratším přežitím ve srovnání s normálními hladinami MMP-9 (Zucker a kol., 1995). Naopak zvýšená exprese MMP-12 výrazně korelovala s delším přežitím a sníženou angiogenezí (Yang a kol., 2001). Výrazně vyšší hladiny aktivní MMP-13 byly detekovány v maligních tkáních ve srovnání s nemaligními tkáněmi (Leeman a kol., 2002).

2.2.6 Role matrix metaloproteináz v invazním nádoru a metastázích

Mnoho pacientů, kteří umírají na kolorektální karcinom, podlehne častěji účinkům vzdálených metastáz než primárnímu nádoru. Nádorová invaze a tvorba metastáz jsou považovány za komplexní mnohastupňový proces, kde je za kritický krok považována degradace extracelulární matrix a bazální membrány, což uvolní nádorové buňky z místa jejich původu a usnadňuje jejich migraci do lumen cév (Liotta a kol., 1991; Stetler-Stevenson a kol., 1993).

MMP proteolyticky degradují mnoho složek extracelulární matrix (Zucker a Vacirca, 2004). Existuje několik linií důkazů jak z *in vitro*, tak z *in vivo* modelů, které ukazují, že MMP hrají hlavní role v degradaci mezibuněčného prostoru v čele nádorové invaze (Liotta a kol., 1991; Stetler-Stevenson a Yu, 2001). Existují souvislosti mezi schopností nádorových buněk napadat okolní tkáň a zvýšenou expresí MMP. Navíc *in vitro* studie rekonstituované bazální

membrány ukázaly, že zvýšené hladiny exprese MMP souvisely se zvýšenou schopností procházet bazální membránou. Schopnost nádorových buněk metastazovat do vzdálených míst je také spojena s MMP. Degradace ECM pomocí MMP umožňuje nádorovým buňkám volně se pohybovat přes stroma. Ze stroma mohou nádorové buňky pronikat do cév, putovat přes krevní řečiště a poté extravazovat, čímž vytvoří vzdálené metastázy. Angiogeneze, což je tvorba nového krevního řečiště, je nezbytná pro nádorový růst i pro úspěšnou nádorovou invazi a metastáze. Je to komplexní a dynamický proces, který vyžaduje proliferaci endotelových buněk z existujících krevních cév, narušení ECM a migraci endotelových buněk. Proto růst a tvorba krevních cév v nádoru vyžadují stejné podmínky, které jsou stěžejní i pro invazi nádorových buněk. MMP hrají důležitou roli ve všech těchto procesech. V angiogenezi mají jednotlivé MMP různé, často i protichůdné role. Proteolýza ECM je při angiogenezi důležitým krokem a aktivované MMP jsou přítomny v endotelových buňkách krevních cév na místech angiogeneze. Nicméně některé MMP (MMP-2, MMP-3, MMP-7, a MMP-9) jsou schopny proteolytického štěpení plasminogenu, čímž vzniká angiostatin (endogenní angiogenní inhibitor), který specificky inhibuje proliferaci endotelových buněk. Nicméně role MMP v angiogenezi je velice rozsáhlé téma.

Důkaz účasti MMP v nádorové invazi vychází z řady experimentálních kroků, kdy byly jednotlivé MMP izolovány z nádorových buněk a následně byla jejich zvýšená aktivita nalezena v mnoha typech nádorů. Naopak byla také provedena transfekce nádorových buněk specifickými MMP, která ve výsledku ústila ve zvýšenou buněčnou invazivnost (Brinckerhoff a kol., 2000; Chambers a Matrisian, 1997). Tak MMP přispívají k invazi a vzdáleným metastázám v karcinomu střev.

Na druhé straně existují tkáňové inhibitory TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase), které jsou endogenními inhibitory MMP. TIMP se dělí na čtyři podtypy: TIMP -1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4 (Lambert a kol., 2004). K nim byl později přidán regulátor známý jako RECK (reversion-included cysteine-rich protein with Kazal motifs). Vzhledem k tomu, že TIMP a RECK inhibují MMP, které podporují rozvoj nemoci, dala by se zvýšená exprese těchto inhibitorů využít pro lepší prognózu pacientů s CRC (Takahashi a kol., 1998). V této souvislosti byla provedena řada studií pro objasnění role a funkce MMP, TIMP a RECK. Většinou byly potvrzeny očekávané účinky, avšak nedávné studie postupně objevily paradoxní situaci, kdy některé MMP hrály roli v inhibici nádorové progresi (Yang a kol., 2001), zatímco některé TIMP byly spojeny s aktivací MMP (Kinoshita a kol., 1998).

2.2.7 Matrix metaloproteinázy a zánět

Jak již bylo řečeno, hlavním úkolem matrix metaloproteináz je degradace extracelulární matrix. V nedávných letech se však zjistilo, že tyto proteinázy mohou také modifikovat mnoho jiných substrátů, mezi které patří např. cytokiny a chemokiny. Tyto substráty se účastní zánětlivých procesů, z čehož vyplývá, že MMP hrají důležitou roli také v zánětech. Zánětlivý proces vzniká na základě různých podnětů, např. poškození tkáně, přítomnost mikroorganismů, akumulace a účinky buněk eliminujících mikroorganismy a infikované hostitelské buňky a oprava tkání primárně poškozených traumatem nebo odpovědí hostitele. Zánětlivé procesy jsou klasifikovány podle jejich pravděpodobného původu a konkrétní role, které se účastní (Nathan, 2002). V jednotlivých kategoriích jsou nemoci, ve kterých je zvýšena exprese určitých MMP. V každé nemoci charakterizované zánětem nebo s ním spojené je pozorována zvýšená hladina nebo špatná regulace hladin některých MMP. Proteolýza matrix je tedy známkou zánětlivých procesů a role MMP jako matrix degradujících proteináz je součástí odpovědi hostitele na traumatické, infekční, toxické nebo autoimunitní poškození. MMP inhibitory jsou užívány jako protizánětlivé léky např. na paradontózu (Lee a kol., 2004) a jsou předpokládány za součást budoucí léčby destrukce tkáně v zánětlivých podmínkách jako artritida (Whelan, 2004) a vaskulární onemocnění (Sierevogel a kol., 2003). Pravá role mnoha MMP v zánětu však nebyla dosud objasněna, dokonce nebylo ani zjištěno, zda zánět zhoršují nebo zlepšují. Dlouhou dobu bylo předpokládáno, že MMP, např. MMP-2 a MMP-3, přispívají k destrukci kloubu, avšak některé MMP mohou vlastně poskytovat kloubní ochranu (Itoh a kol., 2002).

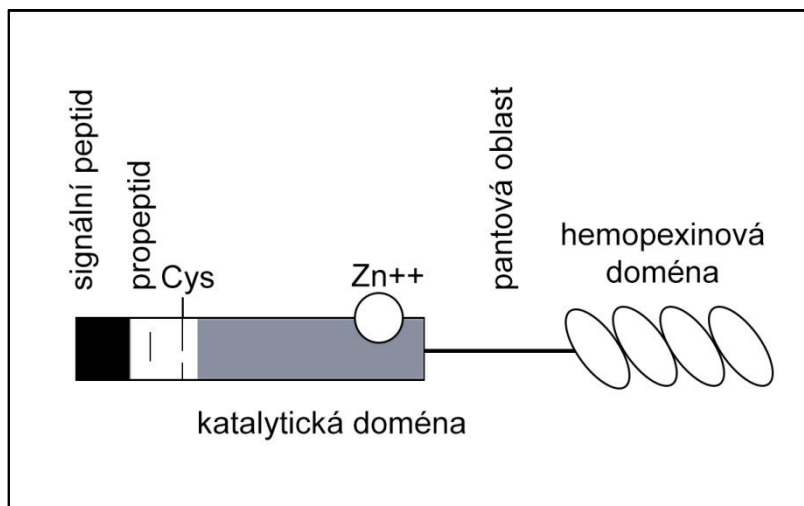
2.3 Matrix metaloproteináza MMP-19

Stejně jako ostatní členové MMP rodiny je MMP-19 syntetizována jako zymogen se signálním peptidem, který navede protein do sekreční dráhy. Jakmile se latentní forma nachází v ECM, pro-MMP-19 vyžaduje proces koenzymové aktivace, ačkoliv má i tendenci k samoaktivaci.

2.3.1 Struktura MMP-19

Lidská MMP-19 má základní strukturální rysy všech rozpustných MMP a skládá se z typických proteinových domén: N-terminální signální sekvence, pro-peptidové domény s cysteinovým zbytkem nezbytným pro zachování latence enzymu, aktivační sekvence obsahující zinek-vázající místo a C-terminální hemopexinové domény (Pendas a kol., 1997).

Nicméně nemá žádné specifické strukturální rysy popsaných MMP tříd - například nemá k dispozici C-terminální trans-membránovou doménu charakteristickou pro MMP membránového typu (**Obr. 4**).



Obr. 4: Schéma MMP-19 (překresleno dle Westermarck a Kahari, 1999)

MMP-19 byla považována za prvního člena nové skupiny MMP a nedávno klonovaná lidská MMP-28 byla do této skupiny záhy přidělena také, protože měla podobné strukturální rysy (Marchenko a Strongin, 2001). MMP-19 se liší od ostatních MMP v několika vlastnostech. První odlišnost je ve velice konzervativní autoinhibiční sekvenci PRCGVDP, která leží v pro-peptidové doméně a zajišťuje latenci pro-MMP. V MMP-19 je valin zaměněn leucinem a prolin glutamovou kyselinou, takže je tato konzervativní sekvence nahrazena sekvencí PRCGLED. Druhou odlišností je, že karboxy-terminální oblast obsahuje sekvenci 37 aminokyselin bohatou na treonin. Tato sekvence obsahuje unikátní úsek 27 aminokyselin TTPSGGNTTPSGTGITLDTTLSATETT, který nevykazuje žádnou podobnost s jinými proteiny. A třetí odlišností je, že MMP-19 obsahuje v pantové oblasti na prolin bohaté sekvence, kterým předchází úsek oligoglutamové kyseliny EEEEETELPTVPPVPTEPSPM (Sedláček a kol., 1997).

2.3.2 Účinky MMP-19

MMP-19 byla původně izolována z mléčné žlázy (Cossins a kol., 1996) a nazvána MMP-18. Následně Pendas a kol. (1997) izolovali stejnou metaloproteinázu z jater, ale pojmenovali ji MMP-19. Zjistilo se, že jsou tyto MMP shodné a název byl sjednocen na MMP-19. Tato metaloproteináza byla také izolována ze zánětlivé synoviální tkáně jako autoantigen RASI-1

(Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed-1) u pacientů s revmatoidní artritidou (Sedláček a kol., 1997). V revmatoidní artritidě vede proliferace synoviálních buněk, infiltrace lymfocytů a chronický zánět k destrukci kloubní tkáně, na čemž se MMP-19 také podílí. MMP-19 mRNA byla detekována v mnoha tkáních jako v placentě, plicích, slinivce břišní, vaječnících, slezině a střevě (Pendas a kol., 1997), a také v akutním zánětu synoviální tkáně, především v kapilárních endoteliálních buňkách, což značí, že může hrát roli v neovaskularizaci a angiogenezi (Kolb a kol., 1999).

Exprimovaná lidská MMP-19 vykazuje *in vitro* silnou aktivitu degradace bazální membrány a je také schopná degradovat dvě složky chrupavky, přesněji chrupavkový oligomerní matrix protein a aggrecan (Stracke a kol., 2000a; 2000b), ale její substrátová specifita *in vivo* nebyla identifikována. Cévní buňky hladkého svalstva, myoepiteliální buňky a bazální keratinocyty exprimují MMP-19 konstitutivně, zatímco endoteliální buňky, epiteliální buňky mléčné žlázy i monocyty a makrofágy vykazují různou expresi tohoto enzymu (Kolb a kol., 1997, 1999; Mauch a kol., 2002; Djonov a kol., 2001; Sadowski a kol., 2003a, 2003b). Přítomnost byla objevena i ve fibroblastech (vazivové buňky tvořící ECM) a myoepiteliálních buňkách a buňkách hladké svaloviny ve spojitosti s buněčným povrchem myeloidních buněk (granulocyty, monocyty, žírné buňky, dendritické buňky, megakaryocyty, erytroblasty) (Kolb a kol., 1999; Djonov a kol., 2001; Mauch a kol., 2002). MMP-19 je schopná degradovat *in vitro*, např. kolagen typu IV, laminin-1, laminin-5, nidogen-1, tenascin-C, fibronectin a želatinu typu I, ale není schopna aktivace žádné pro-MMP (Stracke a kol., 2000a; Stracke a kol., 2000b).

Oproti klasickým MMP je MMP-19 přítomna v klidné mléčné žláze a v jejích benigních lézích. Vývoj k invazivnímu fenotypu a neoplastické dediferenciaci však vede k vymizení MMP-19 z nádorových buněk a krevních cév, což znamená, že se může jednat o určitý druh markeru (Djonov a kol., 2001).

MMP-19 je konstitutivně sekretována mnoha tkáněmi a typy buněk a její exprese je zvýšena v kůži při zánětlivých podmínkách a v průběhu vývoje nádoru. MMP-19 také kontroluje zpožděný typ hypersenzitivity v kůži. V závislosti na buněčném a tkáňovém typu, MMP-19 může hrát supresorovou roli, nebo může zhoršit výsledek nemoci. Například zhoršení kolitidy u myši s deficiencí MMP-19 společně se zvýšenými koncentracemi pro-zánětlivých cytokinů odvozených ze střevní tkáně předpokládá, že MMP-19 hraje zásadní roli v udržování střevní homeostaze. To může mít zásadní vliv na dvě hlavní zánětlivá onemocnění střeva u lidí, Crohnovy choroby a ulcerativní kolitidy (Brauer a kol., 2011b).

MMP-19 charakteristicky štěpí lidský plasminogen, čímž generuje tři angiostatinové fragmenty. Plasminogen, jednořetězcový 92 kDa glykoprotein složený z N-terminálního peptidu, pěti 'kringle' domén a domény serinové proteinázy (Forsgren a kol., 1987), hraje klíčovou roli v nádorových metastázích a angiogenezi, kde je vyžadována proteolýza. Tyto vzniklé fragmenty uvolněné pomocí MMP-19 výrazně inhibují proliferaci HMEC (Human Mammary Epithelial Cells) a redukuje tvorbu kapilárních struktur v angiogenezi (Brauer a kol., 2011a).

Gen *MMP-19* leží na chromozómu 12q14 a obsahuje 9 různě dlouhých exonů na délce 7,6 kb. Všechny z nich jsou vysoce konzervovány u savčích druhů. Nicméně v ptačím genomu nebyly nalezeny žádné homology k lidské *MMP-19*. Přítomnost tohoto genu u některých bezobratlých však předpokládá, že specificky vymizel v ptačí linii.

(URL:<<http://books.google.cz>> [cit. 2012-12-4]).

2.3.3 MMP-19 a karcinogeneze

MMP hrají složitou roli v rozvoji nádoru díky jejich schopnosti účastnit se proteolytických procesů širokého množství substrátů. MMP jsou hlavně považovány za pro-onkogenní faktory, protože umí degradovat molekuly ECM a tím usnadní migraci a invazi nádorových buněk. Nicméně tato pro-onkogenní role MMP byla popírána rozvíjejícími se protinádorovými vlastnostmi nalezenými u některých MMP (Rodgers a Clark, 2010). V souladu s těmito složitými funkcemi MMP v rakovině hraje MMP-19 dvojí roli v nádorové progresi. Expze MMP-19 je zvýšena během pozdních fází progresu melanomu, kdy usnadňuje vertikální migraci nádorových buněk (Rodgers a kol., 2009). Nicméně expze MMP-19 je také zvýšena v bazálních a dlaždicových buňkách během neoplastické dediferenciace stejně jako ve střevě a nosohltanových karcinomech (Swingler a kol., 2010). S ohledem na to se přišlo s návrhem mechanismu umlčení genu *MMP-19* během nádorové progresu, a to delecí alely a hypermetylací promoteru. Navíc má MMP-19 antiangiogenní vlastnosti, které mohou být zodpovědné za její aktivitu v nádorové supresi (Bernal a kol., 2005). *In vivo* studie mutantních myší s deficitem *MMP-19* potvrdily dvě role této metaloproteinázy v rakovině (Bister a kol., 2004). Ačkoliv se teda předpokládá, že MMP-19 negativně reguluje raná stádia invaze nádorových buněk, rakovinné buňky se mohou stát méně citlivé na účinek MMP-19 po rozvinutí nádoru. Tyto zdánlivě paradoxní výsledky mohou znamenat rozdílné role MMP-19 v evoluci různých typů rakoviny stejně jako různých kroků nádorové progresu.

2.3.4 MMP-19 a zánět

Několik prací poukazuje na roli MMP-19 v řízení zánětlivých procesů. Tento enzym byl původně identifikován jako autoantigen u pacientů s revmatoidní artritidou (Sedláček a kol., 1997). Mnohem později bylo ukázáno, že MMP-19 působí jako molekulární mediátor zánětu dýchacích cest tak, že brání ukládání tenascin-C (glykoprotein, který podporuje adhezi a akumulaci zánětlivých buněk přes jejich kapacitu interagovat s integriny (Li a kol., 2003)) v dýchacích dutinách. Navíc nedostatek MMP-19 zvyšuje hladiny interleukinu-13 (IL-13). V tomto ohledu bylo zjištěno, že MMP-19 je také významným faktorem v kožních imunitních odpovědích a ovlivňuje vývoj T-lymfocytů (Beck a kol., 2008). Nicméně v kontextu s kůží nedostatek MMP-19 redukuje uvolnění zánětlivých buněk, snižuje proliferaci keratinocytů a eliminuje aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů, které jsou zodpovědné za tento typ reakce. Dále bylo zjištěno, že MMP-19 je exprimována v myeloidních buňkách (Mauch a kol., 2002) a její exprese je zvýšena v zánětlivých podmínkách jako artritida a roztroušená skleróza, kde exprese proteinázy mikroglie může vést k formaci nových lézí zvyšujících leukocytovou migraci, poškození axonu a k přestavbě ECM (Behera a kol., 2005)

2.4 Tvorba parafinových bloků

Pro opakované vyšetření jednoho vzorku tkáně je potřeba vytvořit parafinové bloky. Zpracování tkáně od fixace po parafinizaci je jedna z nejpoužívanějších technik v histologii. Začíná se odběrem tkáně (vzorku), což je jeden z nejdůležitějších procesů, od kterého se odvíjí celý následující postup - poškození tkáně při odběru může mít fatální důsledky. Odběr se provádí u pacienta zaživa (bioptické vyšetření), během operace (pooperační biopsie) nebo po pacientově smrti (nekroptické vyšetření). Odebraný vzorek je nutno co nejrychleji vložit do fixační tekutiny, protože krátce po zastavení krevního oběhu ve tkáni nastává rozklad tkáně hydrolytickými enzymy (autolýza). Aby fixační tekutina do tkáně lehce pronikala, je nutno tkáň předem nařezat na menší vzorky (bločky). Fixací je rychle a násilně usmrcena živá hmota denurací nativních bílkovin, avšak bez velkých zásahů do uspořádání této hmoty. Pro tyto účely se používají fixační tekutiny připravené z organických i anorganických látek, např. formol (4% roztok formaldehydu). Po cca 24hodinové fixaci následuje vyprání fixační tekutiny (voda, alkohol) a poté odvodnění. Odvodnění se provádí stoupající koncentrací alkoholu, kdy se tkáň vkládá postupně do 70%, 80% a 100% etanolu. Následuje aceton, poté směs aceton/xylen a nakonec xylen, čímž se tkáň tzv. projasní. Poté se provádí prosycení tkáně parafinem a vlastní zalévání do parafinu. Tímto postupem vzniknou tzv. parafinové

bloky, které se následně dají uchovávat po dlouhou dobu a nebo dále zpracovávat krájením a barvením (Lichnovský a Malinský, 2007-2009).

Krájení tkání zalitých v parafinu se provádí pomocí mikrotomu. Mikrotom je zařízení používané pro krájení extrémně tenkých řezů tkání pro následné využití v mikroskopii, pro imunohistochemické reakce a další. Mikrotomy využívají ocelové, skleněné nebo diamantové nože v závislosti na požadované tloušťce řezu. Ocelové nože jsou užívány pro přípravu preparátů zvířecích nebo rostlinných pro světelnou a fluorescenční mikroskopii. Skleněné nože jsou užívány pro krájení řezů pro světelnou a elektronovou mikroskopii. Diamantové nože jsou využívány pro krájení tvrdých materiálů jako kosti, zuby a pro rostlinné preparáty pro světelnou i elektronovou mikroskopii (Lang, 2006).

Mikrotomy existují sáňové, rotační, zmrazovací, ultramikrotomy, vibratomy, pilové a laserové.

2.5 Tkáňová microarray

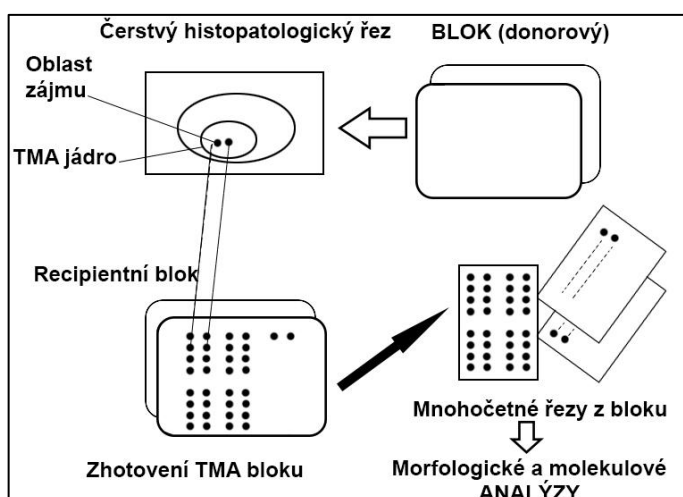
Technika tkáňová microarray (TMA - tissue microarray) je procedura, která umožňuje nakombinovat desítky až stovky vzorků tkáně zalité v parafinovém bloku do jednoho parafinového bloku (**Obr. 5**). Válcová jádra tkáně (většinou 0,6 - 2,0 mm v průměru) jsou vyříznuta z jedné nebo více reprezentativních oblastí tkáně zalité v parafinu (donorový blok) a poté přesně uspořádány do nového parafinového bloku (recipientní blok) užitím tkáňového 'microarrayeru'. TMA jádra mohou být odebrána z různých míst téhož nádoru, ze vzorků v různých obdobích choroby, nebo z nádorů od mnoha dalších pacientů. Z každého TMA bloku může být následně nařezáno až 200 příčných řezů 4 - 5 mm tloušťky, namontováno na mikroskopické sklíčko a zpracováno jako běžné úseky tkáně širokou řadou technik (histochemické barvení, imunohistochemické a imunofluorescenční barvení, FISH).

Hlavní výhoda TMA sestává v montáži několika stovek vzorků do jednoho parafinového bloku, který může být poté analyzován najednou, takže umožňuje výkonný screening exprese, zajišťuje uniformní reakční podmínky a vyhýbá se potřebě barvení a čtení mnoha jednotlivých preparátů. Z těchto důvodů je analýza TMA nákladově nenáročná, užívá se pouze minimum reagensů a protilátek. Protože jsou používána jádra malá, umožňuje tato technika úsporu vzácných biologických vzorků; po vyříznutí jader obsahují donorové bloky stále dostatečnou zbytkovou tkáň pro adekvátní patologickou interpretaci.

Přístroj Galileo TMA CK 3500 od firmy Integrated System Engineering (**Obr. 6**), používaný při realizaci této práce, obsahuje digitální kameru o vysokém rozlišení, která usnadňuje

identifikaci cílové oblasti donorového bloku. Digitální kamera také umožňuje ukládání obrazů snímků a parafinových bloků do počítače pro pozdější užití. Přístroj umožňuje automatické polohování jehel, což umožňuje proces tvorby 'microarrays'. Nastavitelná je hloubka jehel, což brání nepravidelnému rozmístění jednotlivých vzorků v recipientním bloku a tím i absenci některých vzorků v jednotlivých řezech. Proces tvoření výřezů je manuální, což brání destrukci bloku při selhání nástroje během konstrukce. Součástí příslušenství je také automatický podnos řízený počítačem, který zajišťuje přesné polohování parafinového bloku. Na tento podnos může být umístěno až 6 donorových bloků. Dále je přítomna nastavitelná LED černosvětelná iluminace, která zvyšuje kvalitu obrazu.

Pro práci s Galileo TMA CK 3500 je potřeba IseTMA software, který slouží jako propojení přístroje a počítače a asistuje uživateli ve všech fázích realizace TMA (URL:<<http://www.isenet.it>> [cit. 2012-11-4])



Obr. 5: Schematické znázornění zhotovení TMA bloku (překresleno dle URL:<<http://www.roche-diagnostics.cz>> [cit. 2012-12-4])



Obr. 6: Galileo TMA CK 3500 (URL:<<http://www.isenet.it>> [cit. 2012-11-4])

2.6 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je metoda vzniklá z histochemie objevením a zavedením imunologické reakce v praxi. Základem IHC je průkaz antigenů (antigenních determinant) v tkáni pomocí značených specifických protilátek (monoklonálních i polyklonálních), kdy zde probíhá tzv. vazba zámku a klíče. Díky rozvoji dalších věd jako molekulární biologie, genového inženýrství a jiných, byla metoda postupně vylepšována až do současného stavu. Dnes můžeme rozlišovat několik IHC metod. (Beranová a Tonar, 2002).

2.6.1 Dělení metod podle způsobu značení

Samotná vazba protilátky na antigen není doprovázena žádnou barevnou změnou. Abychom mohli detekovat přítomnost a distribuci určitého antigenu ve tkáni, musí po navázání proběhnout barevná reakce, která je následně detekovatelná. Proto jsou protilátky značeny. Podle způsobu značení jsou IHC metody děleny na enzymatické, fluorescenční a značené kovem.

Enzymatické značení je založeno na tom, že určitý enzym (alkalická fosfatáza, křemová peroxidáza) navázaný na protilátku změni barvu chromogenního substrátu, který je přidán k reakci.

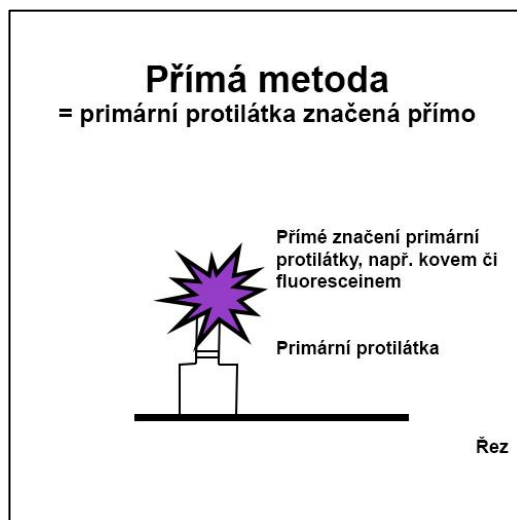
Značení fluoresceinem - imunofluorescenční značení - využívá vlastností molekul absorbovat světlo o určité vlnové délce (výbojka, laser) a následně emitovat světlo větší vlnové délky. Tyto fluoresceiny (např. FITC, TRITC) jsou následně detekovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Značení kovem (např. zlatem, železem) se používá většinou pro metody elektronové mikroskopie (Beranová a Tonar, 2002) a značení pomocí elektronodenzní substance je metoda využívající koloidní zlato nebo ferritin. Tato metoda se užívá v elektronové mikroskopii (Lichnovský a Malinský, 2007-2009).

2.6.2 Dělení podle pořadí značené protilátky

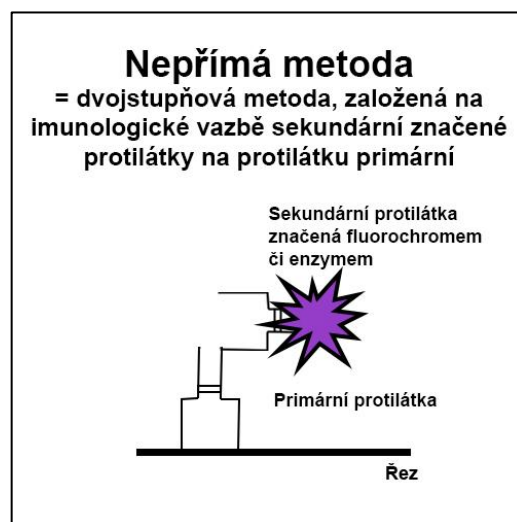
Značení protilátky je základem detekce specifické imunologické reakce mezi antigenem a protilátkou. Zde záleží na tom, jestli značíme protilátku primární (přímá metoda), sekundární (nepřímá dvojestupňová metoda) a nebo se na sekundární neznačenou protilátku váže značený komplex (nepřímá trojestupňová metoda).

Přímá metoda využívá značené protilátky, které se naváží přímo na antigen v tkáni - tzv. primární protilátky (Obr. 7). Tato metoda je nejjednodušší a levná, avšak z důvodu omezené citlivosti jí lze využít pouze pokud je antigen přítomen ve vysoké koncentraci, například v nativních řezech. Pro parafínové řezy není tato metoda dostatečně citlivá (Gomolčák, 1997).



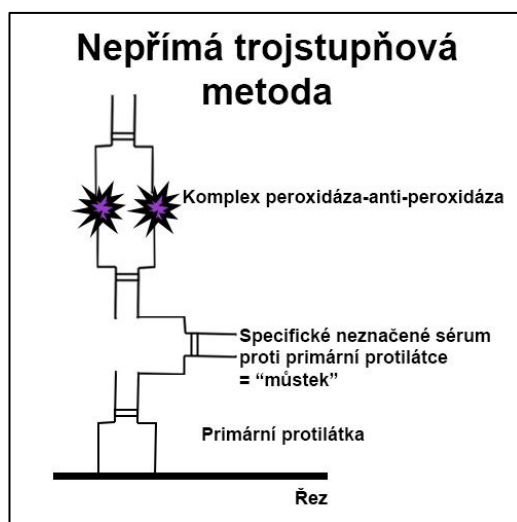
Obr. 7: Schematické znázornění vazby značené primární protilátky na antigen ve tkáni - přímá metoda (překresleno dle Beranová a Tonar, 2002)

Nepřímá dvojestupňová metoda využívá značené protilátky, tzv. sekundární, které se váží až na navázané neznačené primární protilátky (Obr. 8). Tato metoda je mnohem citlivější, takže se více hodí pro použití na parafínových řezech. Širší uplatnění má tato metoda při imunoserologickém vyšetření při podezření na autoimunitní onemocnění (Gomolčák, 1997).

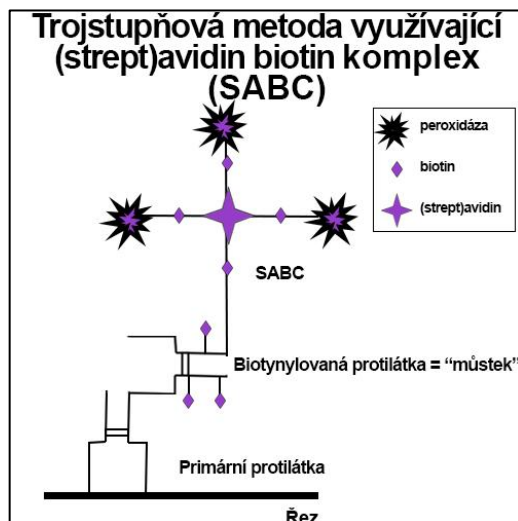


Obr. 8: Schematické znázornění vazby značené sekundární protilátky na primární protilátku navázanou na antigen ve tkáni - nepřímá dvojestupňová metoda (překresleno dle Beranová a Tonar, 2002)

Nepřímá trojstupňová metoda, tzv. sendvičová, je metoda sloužící pro amplifikaci signálu. Na antigen ve tkáni je navázána protilátka, na kterou se specificky váže sekundární protilátka. Této sekundární protilátce se také říká „můstek“ (**Obr. 9**) a je nutné, aby byla aplikována v nadbytku. Pokud by totiž došlo k vazebnému vysycení obou Fab-fragmentů (Fragment Antigen-Binding) protilátky, při následné aplikaci značeného komplexu by došlo k falešně negativním výsledkům. Na sekundární protilátku se následně váže komplex peroxidáza-anti-peroxidáza - PAP, alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza - APAAP, nebo (strept)avidin-biotin-komplex - (S)ABC (**Obr. 10**). Tyto komplexy amplifikují výsledný barevný signál, protože jeden antigen je označen větším množstvím značek. (Beranová a Tonar, 2002).



Obr. 9: Schematické znázornění vazby značeného komplexu na sekundární protilátku, která je navázána na protilátku primární vážící se na antigen ve tkáni - nepřímá trojstupňová metoda (překresleno dle Beranová a Tonar, 2002)



Obr. 10: Schematické znázornění vazby značeného komplexu (S)ABC na sekundární protilátku, která je navázána na protilátku primární vážící se na antigen ve tkáni - nepřímá trojstupňová metoda (překresleno dle Beranová a Tonar, 2002)

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je hledání souvislostí výskytu a distribuce metaloproteinázy MMP-19 u primárních fází kolorektálního karcinomu v rámci zánětlivého procesu. Je zde zkoumán vztah mezi expresí této metaloproteinázy a histologickými parametry jako bezpříznakové období - DFS (disease-free survival) a celkové přežití - OS (overall survival). Při zpracování biologického materiálu byly použity parafinizační a fixační techniky a následně byla provedena nepřímá dvojestupňová metoda imunohistochemie pro detekci proteinu MMP-19 v tkáních kolorektálního karcinomu zpracovaných běžným způsobem pro histologická vyšetření.

4 MATERIÁL A METODA

4.1 Biologický materiál

Donorové bloky vzorků pacientů byly poskytnuty archivem Ústavu klinické a molekulární patologie z Fakultní nemocnice Olomouc.

4.2 Chemikálie

neionizovaná voda, aceton (LachNer), xylén (LachNer); etanol (70 %, 80 %, 100%), NaCl, KCl, Na₂HPO₄·2H₂O, KH₂PO₄, Tween 20 (Sigma, kat. č. 37470), citrát sodný dihydrát (Aldrich, kat. č. BA-9200), HCl, 30% H₂O₂, Tween 20 (Sigma, kat. č. 37470), sušené odtučněné mléko (Laktino), bovinní albumin frakce V (Sigma, kat. č. 85040C-1K), 10 % NaN₃ (Sigma, kat. č. 26628-22-8), fetální sérum, primární protilátka MMP19 - 5, Dako EnVisionTM + Dual Link System-HRP, Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, kat. č. K3466), pertex (Histolab AB, Bamed), hematoxylin (Sigma, HI-00801), KAl(SO₄)₂·12H₂O (Sigma, kat. č. A-6435), hematoxylin (Sigma, kat. č. H 3136)

4.3 Přístrojové vybavení

digestoř (Merci), vodní lázeň TW8 (Maneko), lednice (Liebherr), mikroskop (Olympus), mikrotom RM2135 (Leica), mikroarrayer Galileo TMA CK 3500 (Integrated System Engineering), termostat IP100-U (LTE), pH metr, digitální timer, vortex V-1 plus (Biosan), minicentrifuga

4.4 Materiál

automatické pipety (100 - 1000 µl) + špičky; 1,5ml mikrozskumavky, barvicí nádoby, odměrné válce, odpadní láhev, buničina, pinzeta, kladně nabitá podložní skla (Thermo scientific), krycí skla 24 x 40 mm (Bamed), vlhká komůrka, parafinový fix Liquid blocker, centrofix, skalpel, gumové rukavice

4.5 Imunohistochemická detekce protilátek: MMP19 - 5

4.5.1 Příprava roztoků

Zásobní 10 x koncentrovaný PBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g Na₂HPO₄ · 2H₂O, 2 g KH₂PO₄ - rozpustit v 900 ml deionizované vody, upravit pH na 7,4 a doplnit do 1 litru deionizovanou vodou) - skladovat při laboratorní teplotě (18 - 27 °C)

1 x PBS s Tweenem (100 ml 10 x PBS, 900 ml deionizované vody, 1 ml Tween 20) - před každým použitím připravit čerstvý roztok

10mM citrátový pufr pH 6.0 (2,9 g citrát sodný dihydrát - rozpustit v 900 ml deionizované vody, upravit pH na 6,0 pomocí HCl) - skladovat v ledničce (1 až 10 °C)

Roztok blokace endogenní peroxidázy - 3% H₂O₂ (10 ml 30% H₂O₂, 90 ml 1x PBS, 100 µl Tween 20 (Sigma, 37470) - před každým použitím připravit čerstvý roztok

Blokační mléko (3 g sušené odtučněné mléko, 2 g bovinní albumin frakce V, 1 ml 10% NaN₃ - rozpustit ve 100 ml 1x PBS) - před každým použitím připravit čerstvý roztok

Ředící roztok pro primární protilátku (900 µl 1x PBS, 100 µl Fetálního séra, 10 µl 10% NaN₃) - před každým použitím připravit čerstvý roztok

Primární protilátka MMP19 - 5 (ředěno 1:600 - 1,66 µl do 1000 ml ředícího roztoku)

Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen Systém, DakoCytomation, kat. č. K3466 (smíchání 1 ml DAB + substrate buffer s 1 kapkou DAB + chromogen)

Kamencový hematoxylin (50 ml 5% kamence hlinitodraselného, 1 ml 10% hematoxylinu v 96% etanolu, 1 ml 2% kyseliny jodisté, 10 kapek 3% koncentrované HCl (35 %)) - skladovat při laboratorní teplotě (18° C - 27° C)

- **5% zásobní roztok kamence hlinitodraselného** - KAl(SO₄)₂·12H₂O (5 g KAl(SO₄)₂·12H₂O - rozpustit ve 100 ml destilované vody)
- **10% zásobní roztok hematoxylinu v 96% etanolu** (1 g hematoxylinu - rozpustit v 10 ml 96% etanolu)
- **2% zásobní roztok kyseliny jodisté** (0,5 g H₅IO₆ - rozpustit ve 25 ml destilované vody)
- **3% zásobní roztok koncentrované HCl** (8,6 ml koncentrované HCl (35 %) - přidat po kapkách do 91,4 ml destilované vody)

4.5.2 Příprava vzorků

Tvorba TMA bloků: Z patientských donorových bloků byly pomocí tkáňového microarrayeru (Galileo TMA CK 3500) vytvořeny TMA bloky obsahující vzorky reprezentující vždy jak zdravou, tak nádorovou tkáň pacienta.

Krájení TMA bloků: TMA bloky byly následně nakrájeny pomocí rotačního mikrotomu RM2135 na 4 µm tenké řezy, které byly poté uchyceny na „plusová“ (pozitivně nabitá) podložní sklíčka. Sklíčka s řezy byla v termostatu inkubována přes noc při 56 °C.

4.5.3 Vlastní postup

Deparafinizace: Po inkubaci byla provedena deparafinizace tak, že byla sklíčka s řezy vložena do barvicí nádoby s xylenem. Po 5 minutách byla sklíčka přenesena do další barvicí nádoby s xylenem a po dalších 5 minutách byl proces ještě jednou zopakován. Následovalo vložení sklíček do nádoby se 100% etanolem, poté 80% a nakonec 70% etanolem - vždy na 5 minut. Následovalo 2 x promytí destilovanou vodou.

Odmaskování antigenů: Barvicí nádobka s 10mM roztokem citrátového pufru (pH 6,0) byla umístěna do vodní lázně předehřáté na 95 - 99 °C. Po vyhřátí pufru na teplotu 95 - 99 °C do něho byla vložena sklíčka s preparáty a inkubována. Po uplynutí 40 minut byla sklíčka 20 minut ponechána při pokojové teplotě, aby vychladla. Tyto preparáty byly následně opláchnuty destilovanou vodou a poté ponořeny do kyvety s 1x koncentrovaným PBS pufrem.

Blokace endogenní peroxidázy: Preparáty byly umístěny do roztoku pro blokaci endogenních peroxidáz na dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly 2x opláchnuty v roztoku 1x PBS s Tweenem. Dále byly preparáty vloženy do kyvety s 1x PBS s Tweenem a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Tohle bylo zopakováno ještě 2x.

Blokace pozadí: Opláchnuté preparáty byly inkubovány v roztoku blokačního mléka po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.

Oplach preparátu v 1x PBS s Tweenem: Po vyjmutí z blokačního mléka byly preparáty 2x rychle opláchnuty v 1x PBS s Tweenem a poté 3x po 5 minutách inkubovány v novém 1x PBS s Tweenem při laboratorní teplotě.

Aplikace primární protilátky: Protilátka MMP19-5 ředěná 1:600 byla po osušení sklíčka nanesena ve 200 µl na oblast sklíčka ohraničenou pomocí parafinového fixu. Sklíčka byla umístěna do vlhké komůrky a inkubována přes noc v lednici.

Oplach preparátu v 1x PBS s Tweenem: Preparáty byly vloženy do kyvety s 1x PBS s Tweenem a 2x rychle opláchnuty. Poté byly inkubovány 3x 5 minut v tomto pufru.

Aplikace sekundární protilátky: Protilátka (Labelled Polymer - HRP, EnVision™ + Dual Link System) byla po osušení sklíčka nanесena ve 200 µl na oblast sklíčka ohraničenou pomocí parafinového fixu. Sklíčka byla umístěna do vlhké komůrky a inkubována po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.

Oplach preparátu v 1x PBS s Tweenem: Po vyjmutí z vlhké komůrky byly preparáty 2x rychle opláchnuty v 1x PBS s Tweenem a poté 3x po 5 minutách inkubovány v novém 1x PBS s Tweenem při laboratorní teplotě.

Vizualizace: Protože byl detekční komplex značený pomocí Labelled Polymer - HRP (Horse Radish Peroxidase), jako chromogen byl použit DAB, 3,3-diaminobenzidin (EnVision™ + Dual Link System-HRP*). Oxidací DAB vznikl hnědý produkt. Byl použit kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, kat. č. K3466). Na osušená sklíčka bylo nanесeno 100 µl Liquid DAB + Substrate Chromogen a preparáty byly inkubovány 5 - 10 minut při laboratorní teplotě.

Oplach preparátu v 1x PBS s Tweenem: Po inkubaci byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou, poté 2x rychle opláchnuty v 1x PBS s Tweenem a 3x po 5 minutách inkubovány v novém 1x PBS s Tweenem při laboratorní teplotě.

Podbarvení hematoxylinem: Následovalo vložení sklíček do kyvety s roztokem hematoxylinu a inkubace 30 sekund při laboratorní teplotě, dále vložení do kyvety s destilovanou vodou a poté 3 minuty promývání pod tekoucí vodou (navázání vápenatých iontů z pitné vody) s následným oplachem v destilované vodě.

Odvodnění a montování: Preparáty byly poté oplachovány 30 sekund v acetonu, 30 sekund ve směsi aceton/xylen a 3 minuty v xylenu, čímž proběhlo odvodnění preparátů. Po vyjmutí z xyleny byly preparáty zamontovány do Pertexu - montovací médium.

5 VÝSLEDKY

Detekce matrix metaloproteinázy MMP-19 byla prováděna na 30 patientských vzorcích. 2 vzorky byly ve výsledku nehodnotitelné, proto do statistiky nebyly zahrnuty. 4 pacienti (4.,8.,27. a 28.) neměli kolorektální karcinom, ale karcinoid. Karcinoid je tzv. semimaligní nádor neuroendokrinního původu, který může a nemusí být zhoubný. V těchto případech zhoubný byl, proto byl do statistických výsledků zahrnut. Intenzita exprese MMP-19 byla sledována v cytoplazmě nádorových buněk, v cytoplazmě bazálních buněk bez nádoru a ve stromálních buňkách (fibroblastech) (**Tab. II**).

Tab. II: Závislost exprese MMP-19 v různých typech buněk na DFS a OS

Vzorek	Nádorové buňky	Bazálních nenádorové buňky	Stromální buňky	DFS*	OS*
1.	100 %	100 %	100 %	9+	9+
2.	100 %	100 %	100 %	9+	9+
3.	100 %	100 %	100 %	2	2
4.	100 %	0 %	100 %	9+	9+
5.	100 %	100 %	100 %	2	10+
6.	65 %	100 %	100 %	2	10+
7.	100 %	100 %	100 %	1	10+
8.	100 %	100 %	100 %	9+	9+
9.	100 %	100 %	100 %	9+	9+
10.	50 %	0	0	1	9+
11.	100 %	100 %	100 %	9+	9+
12.	10 %	0	50 %	9+	9+
13.	0	0	0	7	8
14.	100 %	100 %	100 %	2	9+
15.	100 %	100 %	100 %	8	8
16.	20%	0	40 %	6	9+
17.	50 %	100 %	100 %	9+	9+
18.	100 %	100 %	100 %	6	9+
19.	100 %	100 %	100 %	1	2
20.	0	0	0	2	9+
21.	100 %	100 %	100 %	3	4
22.	60 %	100 %	100 %	1	1
23.	100 %	100 %	100 %	1	1
24.	100 %	100 %	0	9+	9+
25.	100 %	60 %	60 %	1	9+
26.	100 %	0	0	9+	9+
27.	50 %	0	100 %	1	9+
28.	100 %	0	100 %	5	9+

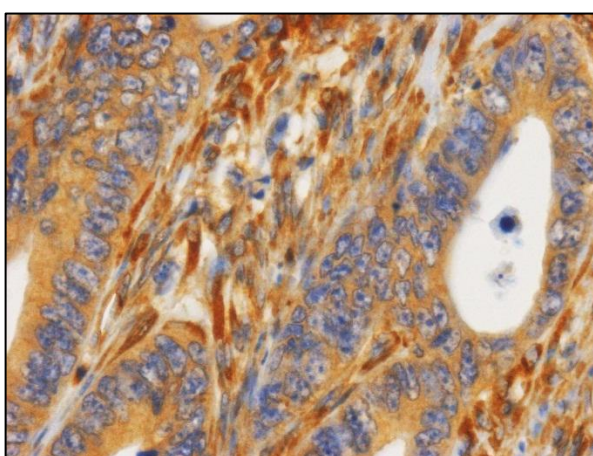
*...hodnoty uvedeny v počtu let

+...pacient žije dodnes

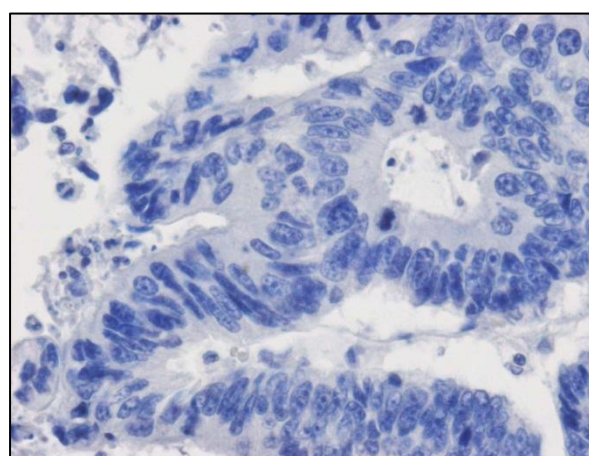
Expresi MMP-19 byla hodnocena podle intenzity zbarvení do hněda u pozitivních tkání (**Obr. 11**), pokud byla tkáň zbarvena pouze modře (**Obr. 12**), byla negativní. Expresi v cytoplasmě nádorových buněk vykazovalo 26 vzorků z 28 (92,86 %): 20 (71,43 %) bylo vysoce pozitivních, 4 (14,29 %) byly středně pozitivní a 2 (7,14 %) nízko pozitivní. Zbylé 2 vzorky z 28 byly negativní (7,14 %). Vysoce pozitivní expresi v cytoplasmě bazálních buněk bez nádoru vykazovalo 19 vzorků z celkového počtu (67,86 %), zbylých 9 bylo negativních (32,14 %). Expresi v cytoplasmě stromálních fibroblastů vykazovalo celkově 23 vzorků (82,14 %): 21 (75 %) bylo vysoce pozitivních a 2 (7,14 %) středně pozitivní. Zbylých 5 vzorků (17,86 %) bylo negativních (**Tab. III**).

Tab. III: Intenzita exprese MMP-19 v různých typech buněk

Intenzita	Nádorové buňky	Bazální nenádorové buňky	Stromální buňky (fibroblasty)
negativita (0 - 9 %)	2 / 28 (7,14 %)	9 / 28 (32,14 %)	5 / 28 (17,86 %)
nízká pozitivita (10 - 29 %)	2 / 28 (7,14 %)	0	0
střední pozitivita (30 - 60 %)	4 z 28 (14,29 %)	0	2 / 28 (7,14 %)
vysoká pozitivita (61 - 100 %)	20 / 28 (71,43 %)	19 / 28 (67,86 %)	21 / 28 (75 %)



Obr. 11: Imunohistochemická detekce MMP-19 - pozitivní tkáň



Obr. 12: Imunohistochemická detekce MMP-19 - negativní tkáň

K vizualizaci vzájemného vztahu exprese jednotlivých typů buněk byly využity kontingenční tabulky a χ^2 test nezávislosti. Za pozitivní byly považovány všechny buňky s intenzitou exprese vyšší nebo rovnou 10 %. Bylo zjištěno, že pozitivita a negativita exprese MMP-19

nádorových buněk nesouvisí s pozitivitou a negativitou bazálních nenádorových buněk ($p < 0,178$) (**Tab. IV**). Byly však nalezeny souvislosti jak mezi pozitivitou a negativitou nádorových buněk a pozitivitou a negativitou stromálních buněk ($p < 0,028$) (**Tab. V**), tak mezi pozitivitou a negativitou bazálních nenádorových buněk a pozitivitou a negativitou stromálních buněk ($p < 0,045$) (**Tab. VI**).

Tab. IV: Vliv positivity a negativity nádorových buněk na pozitivitu a negativitu bazálních nenádorových buněk

Bazální nenádorové buňky		
	Negativní (0 - 9 %)	Pozitivní (10 - 100 %)
Nádorové buňky	Negativní (0 - 9 %)	2
	Pozitivní (10 - 100 %)	7
		0
		19

Tab. V: Vliv positivity a negativity nádorových buněk na pozitivitu a negativitu stromálních buněk

Stromální buňky		
	Negativní (0 - 9 %)	Pozitivní (10 - 100 %)
Nádorové buňky	Negativní (0 - 9 %)	2
	Pozitivní (10 - 100 %)	7
		0
		23

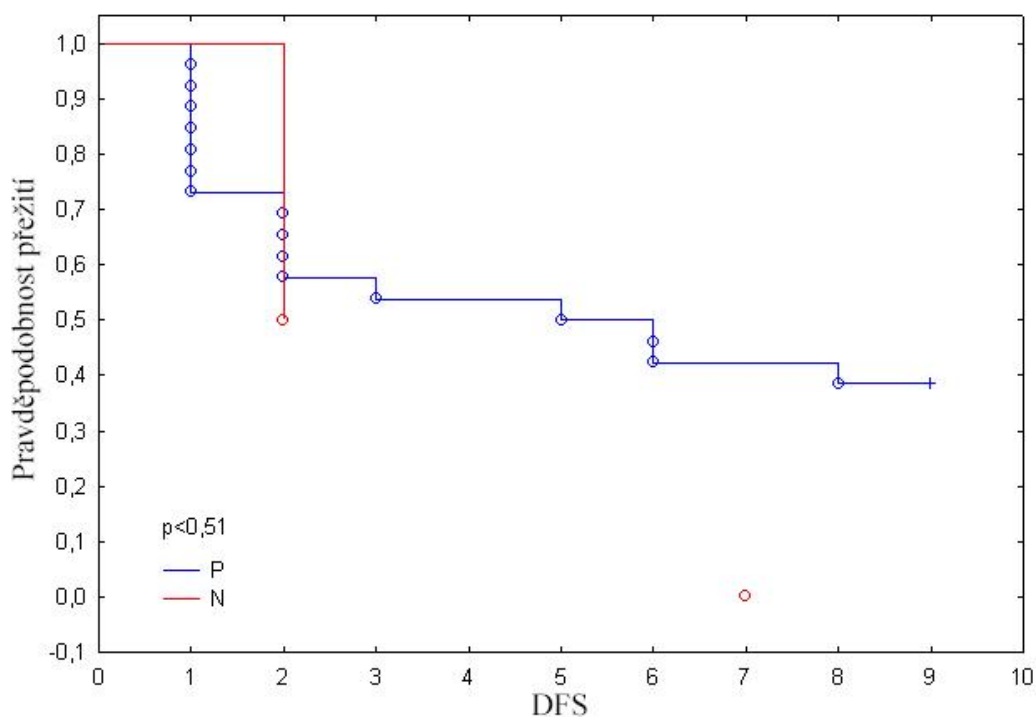
Tab. VI: Vliv positivity a negativity bazálních nenádorových buněk na pozitivitu a negativitu stromálních buněk

Stromální buňky		
	Negativní (0 - 9 %)	Pozitivní (10 - 100 %)
Bazální nenádorové buňky	Negativní (0 - 9 %)	2
	Pozitivní (10 - 100 %)	7
		0
		9

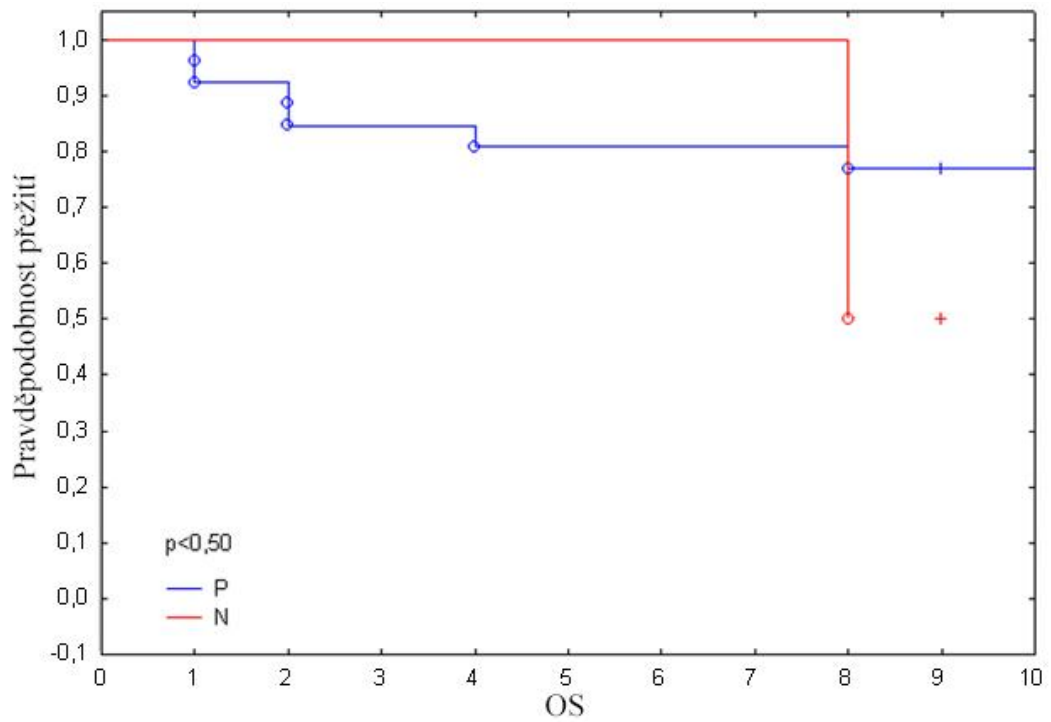
Dále bylo analyzováno, zda studovaný marker MMP-19 ovlivňuje přežití pacientů naší testované skupiny. U těchto pacientů byly dohledány hodnoty DFS a OS. Pokud má pacient obě hodnoty 9+, znamená to, že pacient žije a dodnes se mu nemoc nevrátila. Tento stav je nejideálnější a nastal u 10 sledovaných pacientů. Ostatní se setkali s recidivou v různých dlouhých intervalech. Pokud je hodnota DFS rovna OS, většinou to znamená, že pacient zemřel z důvodu návratu nemoci.

Dále byla provedena Kaplan-Meierova analýza přežití (Log-rank test). P-hodnoty statistické významnosti byly založeny na χ^2 testu a pouze p-hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní. V parametrech přežití jsme za porovnávatelné považovali pouze vzorky s intenzitou exprese $\geq 10\%$. Mezi pacienty s pozitivními a negativními nádorovými buňkami nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v DFS (**Graf 1**) ani v OS (**Graf 2**). Statisticky významný rozdíl v hodnotách DFS (**Graf 3**) a OS (**Graf 4**) nebyl nalezen ani u pacientů s pozitivními a negativními bazálními nenádorovými buňkami. U pacientů s pozitivními a negativními stromálními buňkami taktéž nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v DFS (**Graf 5**) ani v OS (**Graf 6**). Z toho vyplývá, že neexistují žádné korelace mezi expresí MMP-19 a diagnostickými parametry (DFS, OS) - bezpříznakové období ani celkové přežití nijak nezávisí na intenzitě exprese MMP-19.

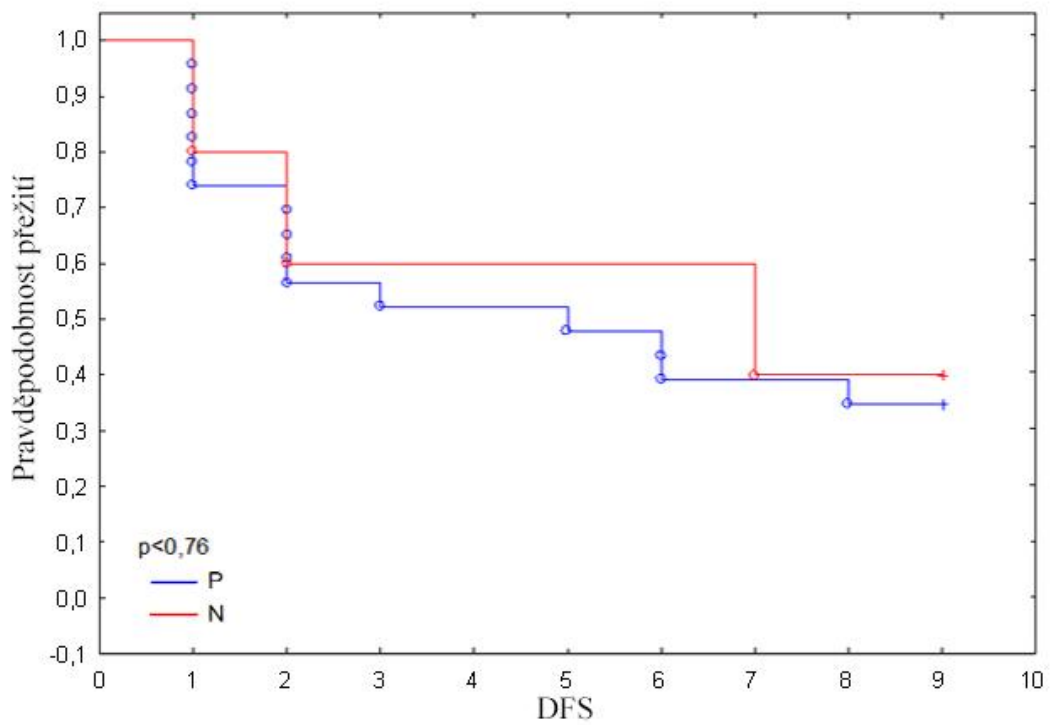
Graf 1: Pravděpodobnost DFS pacientů s pozitivními (P) a negativními (N) nádorovými buňkami



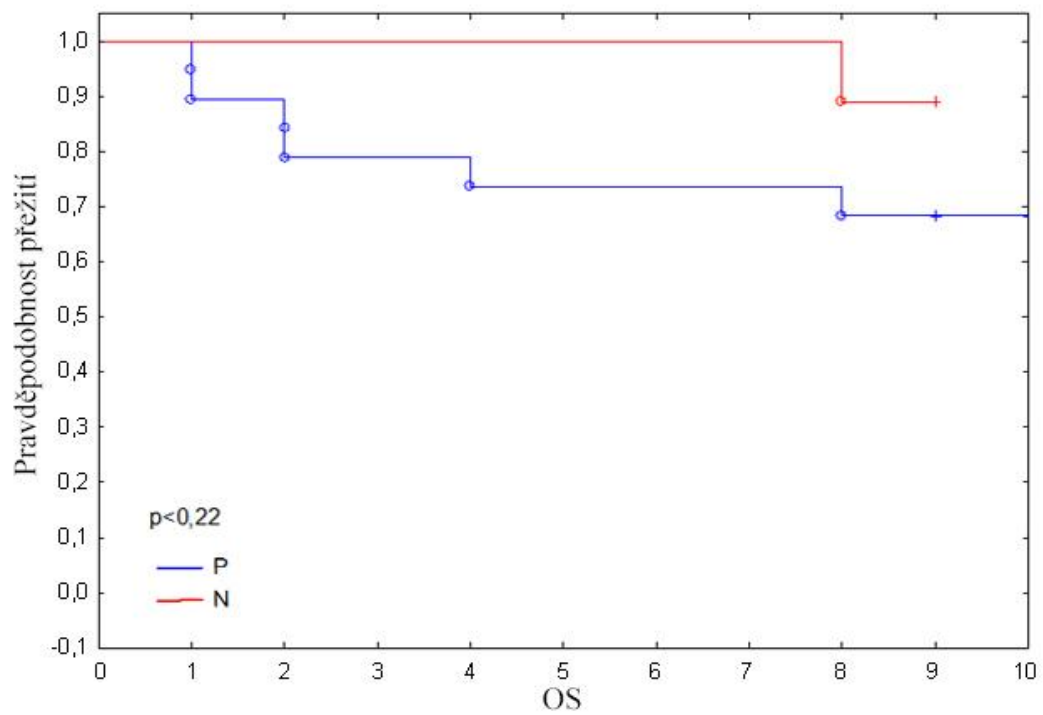
Graf 2: Pravděpodobnost OS pacientů s pozitivními (P) a negativními (N) nádorovými buňkami



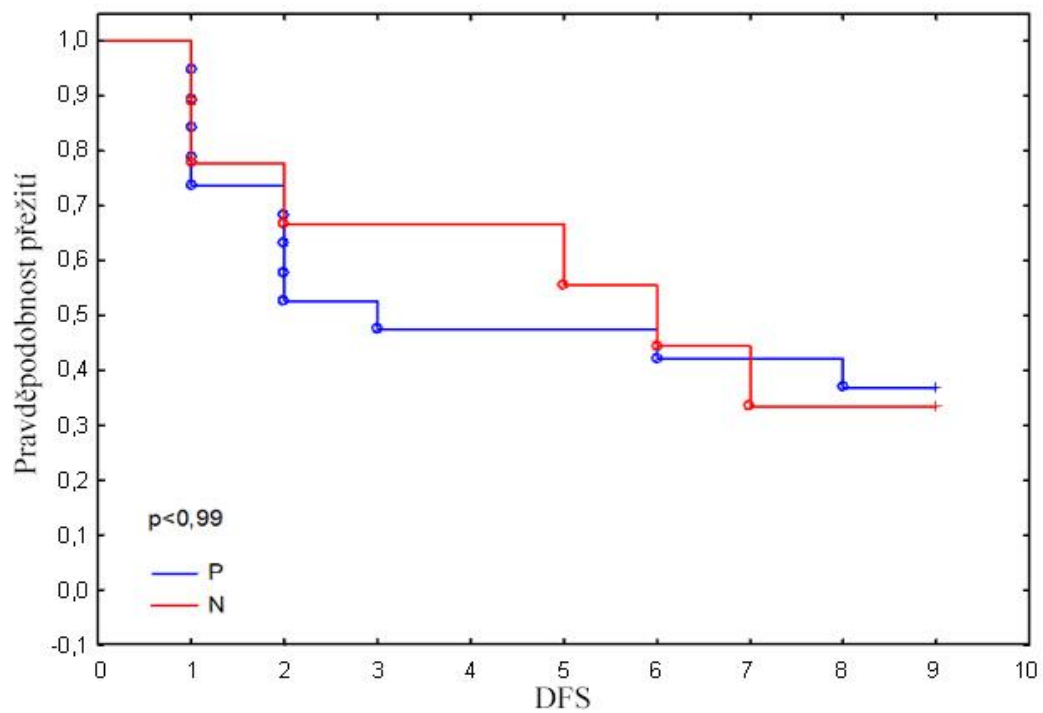
Graf 3: Pravděpodobnost DFS pacientů s pozitivními (P) a negativními (N) bazálními nenádorovými buňkami



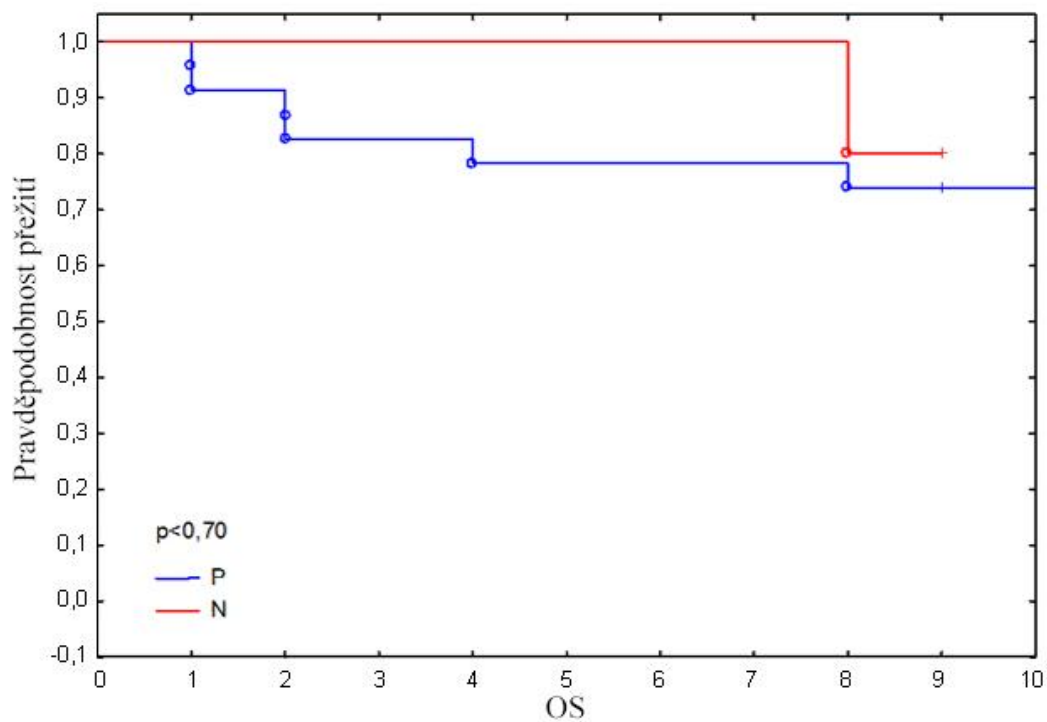
Graf 4: Pravděpodobnost OS pacientů s pozitivními (P) a negativními (N) bazálními nenádorovými buňkami



Graf 5: Pravděpodobnost DFS pacientů s pozitivními (P) a negativními (N) stromálními buňkami



Graf 6: Pravděpodobnost OS pacientů s pozitivními (P) a negativními (N) stromálními buňkami



6 DISKUZE

Cílem experimentální části této práce bylo detekovat matrix metaloproteinázu MMP-19 ve tkáni kolorektálního karcinomu a sledovat její potenciální roli v raných fázích karcinomu v rámci zánětlivého procesu. MMP-19 zde byla exprimována v cytoplazmě nenádorových buněk kolorektální tkáně. Tyto výsledky jsou v souladu se studií Bistera a kol. (2004), kteří zjistili, že oproti mnoha klasickým MMP, jejichž produkce a aktivita je zvýšena v odpovědi na poškození tkáně, zánět a v průběhu karcinogeneze, je MMP-19, i s MMP-26 a MMP-28, exprimována v normálním střevním epitelu. Sena a kol. (2012) sledovali MMP-19 v průběhu stěžejních kroků transformace normální nenádorové tkáně ke kolorektálnímu karcinomu. Dle jejich výsledků byla MMP-19 exprimována v normální tkáni pouze v nízké hladině a během neoplastické progresse byla exprese postupně zvyšována. Tyto poznatky naznačují, že MMP-19 pravděpodobně hraje roli během maligní transformace.

Zde je však nutno poukázat na protichůdná tvrzení. Djonov a kol. (2001) zaznamenali progresivní ztrátu exprese MMP-19 ve směru progresse od primárního nádoru k invazivnímu fenotypu, což je opačný trend než v předchozí studii. Zdá se tedy, že zde MMP-19 plní funkci ochranného faktoru. Tato ztráta MMP-19 může být markerem invazivního fenotypu, takže by v tomhle ohledu byla zajímavá studie, která by se snažila obnovou exprese MMP-19 redukovat její invazivní potenciál. Studie Djonova a kol. (2001) však byla zaměřena na karcinom prsu a není potvrzeno, zda se matrix metaloproteinázy chovají v nádorech různých tkání stejně.

Součástí této práce byla detekce MMP-19 i ve stromálních buňkách. Matrix metaloproteinázy, jak již bylo řečeno, degradují složky extracelulární matrix, což pravděpodobně souvisí se zánětem. Mauch a kol. (2002) sledovali MMP-19 ve střevních zánětech a zjistili, že její exprese byla zánětem zvýšena a poté mohla být detekována ve fibroblastech. Zánět může být prvním krokem k transformaci normální tkáně na tkáň nádorovou, a proto může exprese MMP-19 v těchto buňkách souviset s tímto procesem. V této práci vykazovalo expresi v cytoplazmě stromálních fibroblastů celkově 23 vzorků z 28 (82,14 %), u kterých iniciátorem nádoru mohl být zánět střeva.

Mueller a kol. (2000) ukázali, že i přes několik rozdílů ve struktuře, je ortologní myši *MMP-19* gen věrohodným nástrojem pro vytvoření myšího systému pro charakterizaci potenciálních fyziologických a patologických funkcí proteinu MMP-19 *in vivo*. Brauer a kol. (2011b) sledovali vliv deficiencie MMP-19 u myši na chemicky indukovaný zánět. Tyto

mutagenní myši sice vykazovaly redukovanou infiltraci neutrofilů do střevní tkáně, ale ve výsledku se dostavilo celkové zhoršení kolitidy. Myši měly dále zvýšené hladiny pro-zánětlivých cytokinů v krevní plazmě a střevní tkáni ve všech fázích kolitidy. MMP-19 tedy pravděpodobně hraje zásadní roli v udržování střevní homeostázy, takže deficit tohoto proteinu zhoršuje zánětlivé procesy ve střevech.

Asano a kol. (2008) pracovali se 160 vzorky a zjistili, že DFS pacientů s vysokou intenzitou exprese MMP-19 bylo významně kratší, než s intenzitou exprese nízkou. Z toho vyplývá, že vyšší exprese MMP-19 může souviset s recidivou. Výsledky této předložené práce však toto tvrzení potvrdit nemohou, protože některé vzorky vykazovaly i opačný trend. To však může souviset s malým počtem vzorků, ze kterého se nedá vytvořit věrohodná statistika. Výrazné rozdíly v hladinách exprese MMP-19 byly také pozorovány v analýze celkového přežití (OS).

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na sledování role matrix metaloproteinázy MMP-19 v kolorektálním karcinomu. První část teoretického souhrnu byla věnována tématu kolorektálního karcinomu - jeho etiologii, molekulární podstatě, souvislosti se zánětem. Největší podíl teoretické části se zabýval matrix metaloproteinázami s podrobnějším zaměřením na jednu z těchto metaloproteináz - MMP-19. V poslední fázi teoretické části jsou teoreticky popsány metody imunohistochemie a tkáňových mikroarrayí, které byly následně využity v experimentální části této práce.

V experimentální části byla s předchozím využitím parafinizační a fixační techniky, tkáňové microarraye a imunohistochemických metod provedena detekce matrix metaloproteinázy MMP-19 ve tkáni kolorektálního karcinomu. Pozornost zde byla věnována hlavně primárnímu nádoru a zánětu. Exprese byla zkoumána v cytoplazmě nádorových buněk, v bazálních buňkách bez nádoru a také ve stromálních buňkách. Byly zde zjištěny souvislosti mezi pozitivitou a negativitou exprese MMP-19 nádorových buněk a pozitivitou a negativitou stromálních buněk s p-hodnotou statistické významnosti menší než 0,028. Byly také zpozorovány souvislosti mezi pozitivitou a negativitou bazálních nenádorových buněk a pozitivitou a negativitou stromálních buněk s p-hodnotou menší než 0,045.

Dále zde byl zkoumán vztah mezi expresí MMP-19 a histologickými parametry jako bezpříznakové období - DFS a celkové přežití - OS. V závislosti na expresi této metaloproteinázy nebyly zpozorovány žádné korelace s délkou DFS ani OS, což mohlo pravděpodobně souviset s malým počtem vzorků.

8 LITERATURA

- ALLAN, J. A., DOCHERTY, A. J., BARKER P. J., HUSKISSON, N. S., REYNOLDS, J. J., MURPHY, G.: Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*, 1995, roč. 309, č. 1, s. 299-306.
- ASANO, T., TADA, M., CHENG, S., TAKEMOTO, N., KURAMAE, T., ABE, M., TAKAHASHI, O., MIYAMOTO, M., HAMADA, J., MORIUCHI, T., KONDO, S.: Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. *J Surg Res*, 2008, roč. 146, č. 1, s. 32-42.
- BECK, I. M., RUCKERT, R., BRANDT, K., MUELLER, M. S., SADOWSKI, T., BRAUER, R., SCHIRMACHER, P., MENTLEIN, R., SEDLACEK, R.: MMP19 is essential for T cell development and T cell-mediated cutaneous immune responses. *PLoS One*, 2008, roč. 3, č. 6, e2343.
- BEHERA, A. K., HILDEBRAND, E., SCAGLIOTTI, J., STEERE, A. C., HU, L. T.: Induction of host matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* differs in human and murine lyme arthritis. *Infect Immun*, 2005, roč. 73, č. 1, s. 126-134.
- BERNAL, F., HARTUNG, H. P., KIESEIER, B. C.: Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix metalloproteinases. *Biol Res*, roč. 38, č. 2-3, s. 267-271.
- BISTER, V.-O., SALMELA, M. T., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.-L., URJA, J., LOHI J., PUOLAKKAINEN, P., LOPEZ-OTIN, C., SAARIALHO-KERE, U.: Differential Expression of Three Matrix Metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in Normal and Inflamed Intestine and Colon Cancer. *Digest Dis Sci*, 2004, roč. 49, č. 4, s. 653-661.
- BODE, W.: A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure*, 1995, roč. 3, č. 6, s. 527-530.
- BRAUER, R., BECK, I. M., RODERFELD, M., ROEB, E., SEDLACEK, R.: Matrix metalloproteinase-19 inhibits growth of endothelial cells by generating angiostatin-like fragments from plasminogen. *BMC Biochem*, 2011, roč. 12, č. 38.
- BRAUER, R., DZIECHCIARKOVÁ, M., SKARDA, J., HAJDUCH, M., SEDLACEK, R.: Increased susceptibility of MMP19 deficient mice to DSS-induced colitis provides novel insights into pathogenesis of intestinal inflammation. In: Programme and abstract book: The 7th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The

- 96th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology. The 3rd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, 29. - 30. dubna 2011. Olomouc: Ústav patologie LF UP, 2011, 25. ISBN: 978-80-87327-59-3
- BRESNIHAN, B: Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1999, roč. 26, č. 3, s. 717-719.
- BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000, roč. 1477, č. 1-2, s. 267-283.
- BRINCKERHOFF, C. E., RUTTER, J. L., BENBOW, U.: Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 2000, roč. 6, č. 12, s. 4823-4830.
- CLARK, I. M., CAWSTON, T. E: Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J*, 1989, roč. 263, č. 1, s. 201-206.
- COOPER, H. S., DEPPISCH, L. M., KAHN, E. I., LEV, R., MANLEY, P. N., PASCAL, R. R., QIZILBASH, A. H., RICKERT, R. R., SILVERMAN, J. F., WIRMAN, J. A.: Pathology of the malignant colorectal polyp. *Hum Pathol*, 1998, roč. 29, č. 1, s. 15-26.
- COSSINS, J., DUDGEON, T. J., CATLIN, G., GEARING, J. A., CLEMENTS, J. M.: Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, roč. 228, č. 2, s. 494-498.
- CURRAN, S., MURRAY, G. I.: Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, 1999, roč. 189, č. 3, s. 300-308.
- DHANARAJ, V., YE, Q. Z., JOHNSON, L. L., HUPE, D. J., ORTWINE, D. F., DUNBAR, J. B., RUBIN, J. R., PAVLOVSKY, A., HUMBLET, C., BLUNDELL, T. L.: X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure*, 1996, roč. 4, č. 4, s. 375-386.
- DJONOV, V., HOGGER, K., SEDLACEK, R., LAISSUE, J., DRAEGER, A.: MMP-19: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours. *J Pathol*, 2001, roč. 195, č. 2, s. 147-155.
- EDWARDS, D. R., BEAUDRY, P. P., LAING, T. D., KOWAL, V., LECO, K. J., LECO, P. A., LIM, M. S.: The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996, roč. 3, doplněk s. 9-15.

- FINGLETON, B. M., HEPNER GOSS, K. J., CRAWFORD, H. C., MATRISIAN, L. M.:
Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS*, 1999, roč. 107, č. 1, s.
102-110.
- FORSGREN, M., RADEN, B., ISRAELSSON, M., LARSSON, K., HEDEN, L. O.:
Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human
plasminogen. *FEBS Lett*, 1987, roč. 213, č. 2, s. 254-260.
- GOMEZ, D. E., ALONSO, D. F., YOSHIJI, H., THORGEIRSSON, U. P.: Tissue inhibitors
of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*,
1997, roč. 74, č. 2, s. 111-122.
- GOMIS-RUTH, F. X., GOHLKE, U., BETZ, M., KNAUPER, V., MURPHY, G., LÓPEZ-
OTÍN, C., BODE, W.: The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 A crystal
structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *J Mol Biol*, 1996, roč. 264, č. 3, s.
556-566.
- 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.: Identification and characterization of the familial
adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991, roč. 66, č. 3, s. 589-600.
- GURURAJAN, R., GRENET, J., LAHTI, J. M., KIDD, V. J.: Isolation and characterization
of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome
1p36.3. *Genomics*, 1998, roč. 52, č. 1, s. 101-106.
- HARO, H., CRAWFORD H. C., FINGLETON, B., SHINOMIYA, K., SPENGLER, D. M.,
MATRISIAN, L. M.: Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis
factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest*, 2000, roč. 105, č. 2, s.
143-150.
- HILSKA, M., ROBERTS, P. J., COLLAN, Y. U., LAINE, V. J., KOSSI, J., HIRSIMAKI, P.,
RAHKONEN, O., LAATO, M.: Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -
2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal
cancer. *Int J Cancer*, 2007, roč. 121, č. 4, s. 714-723.
- CHAMBERS, A. F., MATRISIAN, L. M.: Changing views of the role of matrix
metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 1997, roč. 89, č. 17, s. 1260-1270.

- INUZUKA, K., OGATA, Y., NAGASE, H., SHIROUZU, K.: Significance of coexpression of urokinase-type plasminogen activator, and matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and 9 (gelatinase B) in colorectal carcinoma. *J Surg Res*, 2000, roč. 93, č. 2, s. 211-218.
- ISHIGURO, N., ITO, T., ITO, H., IWATA, H., JUGESSUR, H., IONESCU, M., POOLE, A. R.: Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arth Rheum*, 1999, roč 42, č. 1, s. 129-136.
- ITOH, T., MATSUDA, H., TANIOKA, M., KUWABARA, K., ITOHARA, S., SUZUKI, R.: The role of matrix metalloproteinase-2 a matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol*, 2002, roč. 169, č. 5, s. 2643-2647.
- KINOSHITA, T., SATO, H., OKADA, A., OHUCHI, E., IMAI, K., OKADA, Y., SEIKI, M.: TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem*, 1998, roč. 273, č. 26, s. 16098-16103.
- KOLB, C., MAUCH, S., KRAWINKEL, U., SEDLACEK, R.: Matrix metalloproteinase-19 in capillary endothelial cells: expression in acutely, but not in chronically, inflamed synovium. *Exp Cell Res*, 1999, roč. 250, č. 1, s. 122-130.
- KOLB, C., MAUCH, S., PETER, H. H., KRAWINKEL, U., SEDLACEK, R.: The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunol Lett*, 1997, roč. 57, č. 1-3, s. 83-88.
- LAMBERT, E., DASSE, E., HAYE, B., PETITFRERE, E.: TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, roč. 49, č. 3, s. 187-198.
- LEE, H. M., CIANCIO, S. G., TUTER, G., RYAN, M. E., KOMAROFF, E., GOLUB, L. M.: Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J Periodontol*, 2004, roč. 75, č. 3, s. 453-463.
- LEEMAN, M. F., MCKAY, J. A., MURRAY, G. I.: Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol*, 2002, roč. 55, č. 10, s. 758-762.
- LI, Q. L., ILLMAN, S. A., WANG, H. M., LIU, D. L., LOHI, J., ZHU, C.: Matrix metalloproteinase-28 transcript and protein are expressed in rhesus monkey placenta during early pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 2003, roč. 9, č. 4, s. 205-211.

- LIOTTA, L. A., STEEG, P. S., STETLER-STEVENSON, W. G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 1991, roč. 64, č. 2, s. 327-336.
- MARCHENKO, G. N., STRONGIN, A. Y.: MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence, is widely expressed in tumors. *Gene*, 2001, roč. 265, č. 1-2, s. 87-93.
- MAUCH, S., KOLB, C., KOLB, B., SADOWSKI, T., SEDLACEK, R.: Matrix metalloproteinase-19 is expressed in myeloid cells in an adhesion dependent manner and associates with the cell surface. *J Immunol*, 2002, roč. 168, č. 3, s. 1244-1251.
- MUELLER, M.S., MAUCH, S., SEDLACEK, R.: Structure of the human MMP-19 gene. *Gene*, 2000, roč. 252, č. 1-2, s. 27-37.
- NATHAN, C.: Points of control in inflammation. *Nature*, 2002, roč. 420, č. 6917, s. 846-852.
- OSHIMA, T., AKAIKE, M., YOSHIHARA, K., SHIOZAWA, M., YAMAMOTO, N., SATO, T., YAMADA, R., FUJII, S., RINO, Y., KUNISAKI, C., TANAKA, K., MASUDA, M., IMADA, T.: Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinase-7, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor-2 and insulin-like growth factor-1 receptor in patients with colorectal cancer: Insulin-like growth factor-1 receptor gene expression is a useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2008, roč. 20, č. 2, s. 359-364.
- PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J., PISANI, P.: Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 2001, roč. 94, č. 2, s. 153-156.
- PARSONS, S. L., WATSON, S. A., COLLINS, H. M., GRIFFIN, N. R., CLARKEM P. A., STEELE, R. J.: Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer*, 1998, roč. 78, č. 11, s. 1495-1502.
- PENDAS, A. M., KNAUPER, V., PUENTE, X. S., LLANO, E., MATTEI, M. G., APTE, S., MURPHY, G., LOPEZ-OTIN, C.: Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem*, 1997, roč. 272, č. 7, s. 4281-4286.
- PENDER, S. L. F., MACDONALD, T. T.: Matrix metalloproteinases and the gut - new roles for old enzymes. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, roč. 4, č. 6, s. 546-550.
- RODGERS, U. R., CLARK, I. M.: Expression of recombinant MMP-28 in mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 2010, roč. 622, s. 55-65.

- RODGERS, U. R., KEVORKIAN, L., SURRIDGE, A. K., WATERS, J. G., SWINGLER, T. E., CULLEY, K., ILLMAN, S., LOHI, J., PARKER, A. E., CLARK, I. M.: Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28. *Matrix Biol*, 2009, roč. 28, č. 5, s. 263-272.
- SAARIALHO-KERE, U. K.: Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res*, 1998, roč. 290, s. 47-54.
- SADOWSKI, T., DIETRICH, S., KOSCHINSKY, F., SEDLACEK, R.: Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol Biol Cell*, 2003, roč. 14, č. 11, s. 4569-4580.
- SADOWSKI, T., DIETRICH, S., MULLER, M., HAVLICKOVA, B., SCHUNCK, M., PROKSCH, E., MULLER, M. S., SEDLACEK, R.: Matrix metalloproteinase-19 expression in normal and diseased skin: dysregulation by epidermal proliferation. *J Invest Dermatol*, 2003, roč. 121, č. 5, s. 989-996.
- SALMELA, M. T., MACDONALD, T. T., BLACK, D., IRVINE, B., ZHUMA, T., SAARIALHO-KERE, U., PENDER, S. L.: Upregulation of matrix metalloproteinases during T-cell mediated injury in the gut-Analysis by gene array and in situ hybridization. *Gut*, 2002, roč. 51, č. 4, s. 540-547.
- SEDLACEK, R., MAUCH, S., KOLB, B., SCHATZLEIN, CH., EIBEL, H., PETER, H.-H., SCHMITT, J., KRAWINKEL, U.: 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*, 1997/1998, roč. 198, č. 4, s. 408-423.
- SENA, P., MARIANI, F., MARZONA, L., BENINCASA, M., PONZ DE LEON, M., PALUMBO, C., RONCUCCI, L.: Matrix metalloproteinases 15 and 19 are stromal regulators of colorectal cancer development from the early stages. *Int J Oncol*, 2012, roč. 41, č. 1, s. 260-266.
- SENA, P., MARIANI, F., MARZONA, L., RONCUCCI, L., PALUMBO, C.: Quantification and localization of matrix metalloproteinases (MMP15 and MMP19) in human colorectal carcinogenesis. *Ital J Anat Embryol*, 2011, roč. 116, č. 1, Suppl.
- SHAPIRO, S. D.: Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, roč. 10, č. 5, s. 602-608.

- SHIOZAWA, J., ITO, M., NAKAYAMA, T., NAKASHIMA, M., KOHNO, S., SEKINE, I.: Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol*, 2000, roč. 13, č. 9, s. 925-933.
- SCHONBECK, U., MACH, F., LIBBY, P. J.: Generation of biologically active IL-1beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*, 1998, roč. 161, č. 7, s. 3340-3346.
- SCHONBECK, U., MACH, F., SUKHOVA, G. K., MURPHY, C., BONNEFOY, J. Y., FABUNMI, R. P., LIBBY, P.: Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*, 1997 roč. 81, č. 3, s. 448-454.
- SIEREVOGEL, M. J., PASTERKAMP, G., DE KLEIJN, D. P., STRAUSS, B. H.: Matrix metalloproteinases: a therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*, 2003, roč. 9, č. 13, s. 1033-1040.
- STETLER-STEVENSON, W. G., LIOTTA, L. A., KLEINER, D. E.: Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J*, 1993, roč. 7, č. 15, s. 1434-1441.
- STETLER-STEVENSON, W. G., YU, A. E.: Proteases in invasion: Matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*, 2001, roč. 11, č. 2, s. 143-152.
- STRACKE, J. O., HUTTON, M., STEWART, M., PENDAS, A.M., SMITH, B., LOPEZ-OTIN, C., MURPHY, G., KNAUPER, V.: Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem*, 2000, roč. 275, č. 20, s. 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., KNAUPER, V.: Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Lett*, 2000, roč. 478, č. 1-2, s. 52-56.
- SWINGLER, T. E., KEVORKIAN, L., CULLEY, K. L., ILLMAN, S. A., YOUNG, D. A., PARKER, A. E., LOHI, J., CLARK, I. M.: MMP28 gene expression is regulated by Sp1 transcription factor acetylation. *Biochem J*, 2010, roč. 427, č. 3, s. 391-400.
- TAKAHASHI, C., SHENG, Z., HORAN, T. P., KITAYAMA, H., MAKI, M., HITOMI, K., KITAURA, Y., TAKAI, S., SASAHARA, R. M., HORIMOTO, A., IKAWA, Y., RATZKIN, B. J., ARAKAWA, T., NODA, M.: Regulation of matrix metalloproteinase-9

- and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, roč. 95, č. 22, s. 13221-13226.
- VAALAMO, M., KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L., PUOLAKKAINEN, P., KERE, J., SAARIALHO-KERE, U.: Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am J Pathol*, 1998, roč. 152, č. 4, s. 1005-1014.
- WAAS, E. T., LOMME, R. M., DEGROOT, J., WOBES, T., HENDRIKS, T.: Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2002, roč. 86, č. 12, s. 1876-1883.
- WESTERMARCK, J., KAHARI, V. M.: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, 1999, roč. 13, č. 8, s. 781-792.
- WHELAN, C. J.: Metalloproteinase inhibitors as anti-inflammatory agents: an envolving target? *Curr Opin Investig Drugs*, 2004, roč. 5, č. 5, s. 511-516.
- YAMAMOTO, H., ITOH, F., HINODA, Y., SENOTA, A., YOSHIMOTO, M., NAKAMURA, H., IMAI, K., YACHI, A.: Expression of matrilysin mRNA in colorectal adenomas and its induction by truncated fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, roč. 201, č. 2, s. 657-664.
- YANG, W., ARII, S., GORRIN-RIVAS, M. J., MORI, A., ONODERA, H., IMAMURA, M.: Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer*, 2001, roč. 91, č. 7, s. 1277-1283.
- YANG, W., ARII, S., GORRIN-RIVAS, M. J., MORI, A., ONODERA, H., IMAMURA, M.: Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer*, 2001, roč. 91, č. 7, s. 1277-1283.
- ZENG, Z. S., SHU, W. P., COHEN, A. M., GUILLEM, J. G.: Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: Evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res*, 2002, roč. 8, č. 1, s. 144-148.
- ZUCKER, S., LYSIK, R. M., DIMASSIMO, B. I., ZARRABI, H. M., MOLL, U. M., GRIMSON, R., TICKLE, S. P., DOCHERTY, A. J.: Plasma assay of gelatinase B: Tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. *Cancer*, 1995, roč. 76, č. 4, s. 700-708.

ZUCKER, S., VACIRCA, J.: Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, roč. 23, č. 1-2, s. 101-117.

ZUCKER, S.: A critical appraisal of the role of proteolytic enzymes in cancer invasion: emphasis on tumour surface proteinases. *Cancer Invest*, 1988, roč. 6, č. 2, s. 219-231.

KNIHY:

BERANOVÁ, M., TONAR, Z.: *Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty*. Ústav histologie a embryologie LF UK. Plzeň, 2002, s. 3-7.

GOMOLČÁK, P.: *Základy imunohistochemie v patologii*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1997, 91 s. ISBN 80-701-3239-6.

JABLONSKA, M.: *Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 455 s. ISBN 80-716-9777-X.

LICHNOVSKÝ, V., MALINSKÝ, J.: *Přehled histologie člověka v obrazech*. 2. nezm. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007-2009, 2 sv. (153, 189 s.). ISBN 978-80-244-2277-02.

LANG, G.: *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik ; [für MTA und biomedizinische Analytikerinnen]*. 1. Aufl. Wien: Springer, 2006. ISBN 32-113-3141-7.

WEB:

<http://www.svod.cz>

http://www.isenet.it/upload/product/CK3500_brochure.pdf

http://books.google.cz/books?id=XBuHJLFRjRkC&pg=PA833&lpg=PA833&dq=mmp19+inflammation+cancer+colon&source=bl&ots=Bc6Jz2UP-N&sig=71__F42kSyFI1A8CRk-1bTjoDy&hl=cs&sa=X&ei=Wt6zUNb7MifE4gSZ-YCADA&ved=0CDsQ6AEwAjk#v=onepage&q=mmp19%20inflammation%20cancer%20colon&f=false

http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/colorectal/HealthProfessional/page1/AllPages#Section_6

<http://www.jbc.org/content/274/31/21491.long>

<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0404/markery.pdf>

<http://www.uzis.cz>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(S)ABC	Komplex (strept)avidin-biotin
APAAP	Komplex alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza
APC	„Adenomatous Polyposis Coli“
CD	Diferenční skupina povrchových antigenů - „Cluster of Differentiation“
CIN	Chromozomální nestabilita - „Chromosomal Instability“
CRC	Kolorektální karcinom - „Colorectal Carcinom“
ČR	Česká republika
DAB	3,3-diaminobenzidin
DCC	Tumor-supresorový gen - „deleted in colon cancer“
DFS	Bezpříznakové období - „Disease-Free Survival“
DNA	Deoxyribonukleová kyselina - „deoxyribonucleic acid“
ECM	Extracelulární matrix - „Extracellular Matrix“
Fab	Fragment vázající antigen - „Fragment Antigen-Binding“
FISH	Fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace - „Fluorescent <i>In-Situ</i> Hybridisation“
FITC	Fluorescein isothiokyanát
TRITC	Tetrametylodamin isothiokyanát
HMEC	Epiteliální buňky lidské prsní žlázy - „Human Mammary Epithelial Cells“
HRP	Křenová peroxidáza - „horseradish peroxidase“
IBD	Nespecifické střevní záněty - „Inflammatory Bowel Disease“
IHC	Imunohistochemie - „Immunohistochemistry“
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton
K-ras	Onkogen - „kirsten ras oncogen“
MMP	Matrix metaloproteináza - „Matrix Metalloproteinases“
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina - „Messenger Ribonucleic Acid“
MT-MMP	Matrix metaloproteináza membránového typu - „Membrane-type Matrix Metalloproteinase“

N	Negativní pacient
OS	Celkové přežití - „Overall Survival“
P	Pozitivní pacienti
p	Krátké raménko chromozómu
PAP	Komplex peroxidáza-anti-peroxidáza
PBS	Fosfátový pufr - „phosphate buffered saline“
pro-MMP	Neaktivní matrix metaloproteináza
q	Dlouhé raménko chromozómu
RASI-1	„Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed - 1“
RECK	„Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs“
TGF	Transformující růstový faktor - „Transforming Growth Factor“
TIMP	Tkáňový inhibitor metaloproteinázy - „Tissue Inhibitor of Metalloproteinase“
TMA	Tkáňová mikroarray - „Tissue Microarray“
TNF	Tumor nekrotizující faktor - „Tumor Necrosis Factor“
Tp53	Tumor-supresorový gen p53 - „Tumor-suppressor Gene p 53“