

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Role metaloproteinázy v procesu metastazování
u pacientů s kolorektálním karcinomem**

Autor: Kateřina Trněná

Studijní program: Organická chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie

Typ studia: Prezenční

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

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

Termín odevzdání práce: 7. 5. 2013

Já, Kateřina Trněná, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Mgr. Marta Khoylou, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci dne2013

.....

Ráda bych poděkovala Mgr. Martě Khoylou, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, ochotu a trpělivost během vedení této práce. Rovněž bych chtěla poděkovat MUDr. et MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D. za jeho odborné rady, vstřícnost a pomoc při získání informací a podkladů. Děkuji také Mgr. Márii Janíkové za pomoc s přípravami patientských vzorků a rady při hodnocení. Velké poděkování náleží nejen celé mé rodině a příteli za podporu, trpělivost a povzbuzování, ale i kamarádům za morální oporu během mého studia.

Bakalářská práce byla vytvořena ve spolupráci s Ústavem molekulární a translační medicíny, která byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030) a Ústavem klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Kateřina Trněná

Název práce: Role metaloproteinázy v procesu metastazování u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc

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

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Rakovina tlustého střeva patří mezi jednu z nejčastějších onkologických diagnóz v České Republice i ve všech vyspělých zemích. Vznik karcinomu je dlouhodobý a vícestupňový proces, který závisí na řadě interakcí mezi nádorovými buňkami, extracelulární matrix a cílovou tkání. Významnou roli v této nádorové invazi a metastazování hrají matrix metaloproteinázy (MMP). MMP jsou dobře známy díky své schopnosti rozkládat proteiny extracelulární matrix a podílet se na řadě fyziologických funkcí jako je angiogeneze, tvorba zánětů, apoptóza a nádorové procesy. V této práci byla zaměřena pozornost na MMP-19, méně známého člena rodiny MMP. MMP-19 hraje klíčovou roli v procesu metastazování kolorektálního karcinomu, a to jak v primární nádorové progresi, tak v procesu metastazování, jak je popisováno v *in vitro* studiích. Imunohistochemií, jako námi vybranou metodou pro detekci MMP-19 v nádorových tkáních, jsme se pokusili objasnit, jakou roli hraje MMP-19 v procesu metastazování. Expresí proteinu MMP-19 byla hodnocena jak v nádorové tkáni, tak v bazální nenádorové tkáni, tak i v buňkách stromatu. Posuzovali jsme vztah mezi pozitivitou/negativitou nádorových buněk a pozitivitou/negativitou stromálních buněk vzhledem k výskytu vzdálených metastáz a jejich množství, k tvorbě metastáz v uzlinách, vzhledem k diferenciaci nádoru a pT nádoru. Veškeré tyto výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí softwaru Statistica 8. Při testování byl použit χ^2 test nezávislosti v kontingenčních tabulkách. Bylo zjištěno, že nádorové buňky ovlivňují expresi proteinu MMP-19 jak u bazálních nenádorových buněk, tak u stromálních buněk. Bazální nenádorové buňky ovlivňují expresi proteinu MMP-19 i u stromálních buněk.

Exprese proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk a stromálních buněk má vliv na tvorbu vzdálených metastáz. U stromálních buněk byl prokázán vliv exprimovaného proteinu MMP-19 na tvorbu uzlinových metastáz, ale ne na jejich počet. Korelace byla nalezena mezi bazálními nenádorovými buňkami a adenokarcinomem a nízce diferenciováním neuroendokrinním tumorem. Uvedené výsledky jsou pouze předběžné, protože byly vypracovány pro malou skupinu pacientů, nicméně naznačují určitý trend, který bude ověřený na větším souboru pacientů v rámci magisterské práce.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, matrix metaloproteinázy (MMP), MMP-19, metastazování, imunohistochemie, TMA blok

Počet stran: 74

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Kateřina Trněná

Title: Role of metalloproteinases in the process of metastasis in patients with colorectal cancer.

Type of thesis: Bachelor

Department: Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc

Supervisor: Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract:

Large intestinal cancer is one of the most often oncological diagnose in the Czech Republic and in all developed countries. Forming of the carcinoma is a long-time and gradual process which is dependent on a series of interactions among tumorous cells, extracellular matrix and target tissue. A very important role in this tumorous invasion and metastasis growth is played by matrix metalloproteinases (MMP). MMP are able to degrade proteins of extracellular matrix and are involved in a lot of physiological functions such as angiogenesis, inflammation, apoptosis and tumorous processes. This work is aimed at MMP-19, less known member of MMP family. MMP-19 plays a key role in the process of metastasizing of colorectal carcinoma in the primary tumour progression and also in metastasizing as it is described in *in vitro* studies. Using immunohistochemistry, which we decided to choose as a method of detection MMP-19 in tumorous tissue, we tried to specify the role of MMP-19 in the process of forming metastases. The expression of protein MMP-19 was assessed not only in the tumorous tissue, but also in the basal non-tumorous tissue and in the cells of stroma. We assessed the relationship between positivity/negativity of tumorous cells and positivity/negativity of stromal cells with regard to distant metastases and their quantity, to metastasizing in nodes, to differentiation of the tumour and pT tumour. All the results were statistically evaluated with the help of Statistica 8 software. For testing χ^2 test of independency was used in contingency tables. It was found out that tumorous cells influence the expression of protein MMP-19 not only in basal non-tumorous cells, but also in stromal cells. The expression of protein MMP-19 in basal non-tumorous cells and stromal cells

influences forming distant metastases. In stromal cells, the influence of expressed protein MMP-19 on forming nodal metastases was proved but was not proved in the number of nodal metastases. In our sample, statistical significance of expression of protein MMP-19 was not proved in intergrowth of tumorous cells or the level of tumour differentiation. Correlation was found, though, between basal non-tumorous cells and adenocarcinoma and lowly differentiated neuroendocrine tumour. Our results are preliminary because they were developed for a small group of patients; however, suggest a trend that will be verified in a larger group of patients in the Master's thesis.

Keywords: colorectal cancer, matrix metalloproteinases (MMP), MMP-19, metastasis, immunohistochemistry, TMA block

Number of pages: 74

Language: Czech

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM (CRC).....	2
2.2. MATRIX METALOPROTEINÁZY (MMP).....	6
2.2.1. Struktura MMP.....	7
2.2.2. Dělení MMP.....	10
2.2.3. MMP-19.....	11
2.3. METASTAZOVÁNÍ.....	12
2.3.1. MMP a metastazování.....	14
2.3.2. MMP-19 a metastazování.....	16
2.3.3. Metody detekce MMP.....	18
2.4. IMUNOHISTOCHEMIE.....	19
2.4.1. Typy imunohistochemických metod.....	20
2.4.2. Tvorba parafinových bloků.....	22
2.4.3. Tkáňové mikroarray.....	23
3. PRAKTICKÁ ČÁST	25
4. MATERIÁL A METODA	26
4.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	26
4.2. CHEMIKÁLIE.....	26
4.3. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	26
4.4. MATERIÁL.....	26
4.5. IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE PROTI LÁTEK: MMP19 - 5.....	27
4.5.1. Příprava vzorků.....	27
4.5.2. Příprava roztoků.....	27
4.6. SAMOTNÁ IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE.....	29
4.6.1. Deparafinizace řezů:.....	29
4.6.2. Postup imunohistochemické detekce.....	29
5. VÝSLEDKY	32
6. DISKUZE	52
7. ZÁVĚR	54
8. LITERATURA	57

1. Cíle práce

Bakalářská práce se skládá z teoretické a experimentální části. V teoretické části jsou popsány obecné informace o kolorektálním karcinomu a matrix metaloproteinázách. Literární rešerše byla dále zaměřena na shrnutí vlastností a funkcí matrix metaloproteináz se specializací na MMP-19, která hraje významnou roli v nádorové progresi a procesu metastazování.

Experimentální část je zaměřena na imunohistochemickou detekci MMP-19. Detekce proteinu MMP-19 byla provedena na 30 patientských vzorcích, u nichž byl diagnostikován karcinom kolorekta. Použitím parafinizačních a fixačních technik s následnou imunohistochemickou detekcí se testovala exprese MMP-19 v nádorové tkáni, bazální nenádorové tkáni a v buňkách stromatu. Získané výsledky byly statisticky zhodnoceny a získaná data byla porovnána již s publikovanými výsledky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

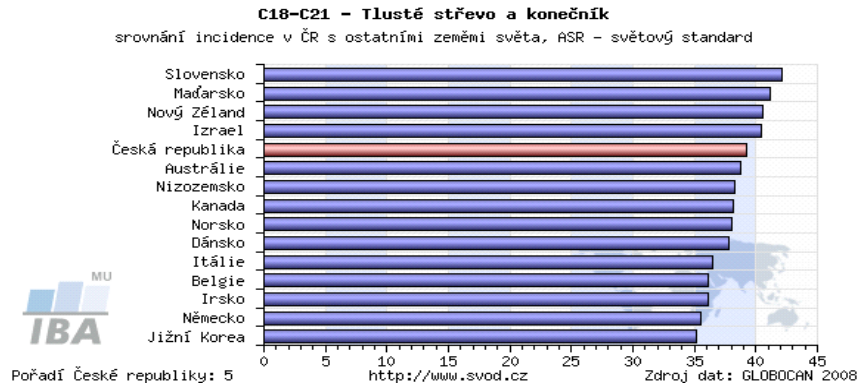
2.1. Kolorektální karcinom (CRC)

Naprostou většinu nádorů tlustého střeva tvoří adenokarcinomy. Jsou to nádory vznikající ze žláznatých buněk střevní sliznice. Rakovina tlustého střeva a konečníku má mnoho společného, to vystihuje i společný název kolorektální karcinom [1]. Obvykle nevzniká náhle. Na sliznici tlustého střeva nejprve vzniká benigní polyp, ve kterém dochází k dalším změnám buněk, které nakonec vyústí v karcinom [2].

Karcinom kolorekta je jednou z nejčastějších onkologických diagnóz a ve všech vyspělých státech jeho incidence narůstá (obr.1). Nejčastěji se vyskytuje u lidí nad 50 let. Typický věk českého pacienta s CRC sice leží v intervalu 61–77 let, ale 21 % všech nemocných je mladších než 60 let (obr.2). Způsobuje smrt zhruba 655 000 lidí ročně. Přesto lze v posledních letech pozorovat náznaky zlepšení, především stabilizaci mortality, která začíná mírně klesat (obr.3). Při stále rostoucí incidenci ovšem situace vede k zvyšování prevalence, tedy počtu žijících osob, u kterých byl v minulosti diagnostikován a léčen CRC. Prevalence dosáhla v roce 2009 hodnoty 47 371 osob a ve srovnání s rokem 1999 tak vzrostla o 63 % [3].

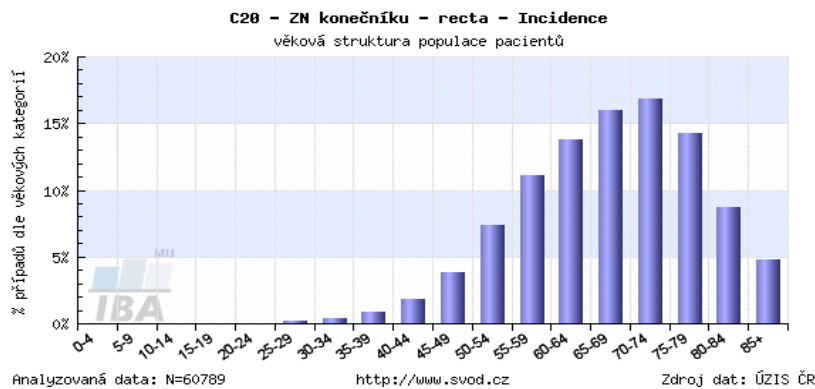
Obecně lze říci, že incidence CRC přirozeně narůstá s věkem, stejně jako je tomu u většiny ostatních nádorů. Je to důsledek vzniku různých genových abnormalit, většinou zřejmě spojených s delecí supresorových genů. Stále platí, že CRC je častější v ekonomicky vyspělejších zemích, což může být spojeno s vyšším příjmem živočišných tuků, červeného masa, stejně jako s nedostatkem vlákniny v potravě a nedostatkem fyzické aktivity, spojeným s obezitou [4].

Jedním z nejpostiženějších států na světě je Česko (společně se Slovenskem a Maďarskem) [2]. V naší zemi v pořadí výskytu maligních onemocnění je kolorektální karcinom u žen na druhém místě (po nádorech prsu), u mužů představuje třetí nejčastější onemocnění (po nádorech plic a prostaty). V celosvětových statistikách v incidenci (roční počet nových onemocnění na 100 000 obyvatel) se Česká republika udržuje na předních místech. Onemocní každý 20. obyvatel. U nádorů konečníku zaujímáme dokonce prvenství [5].



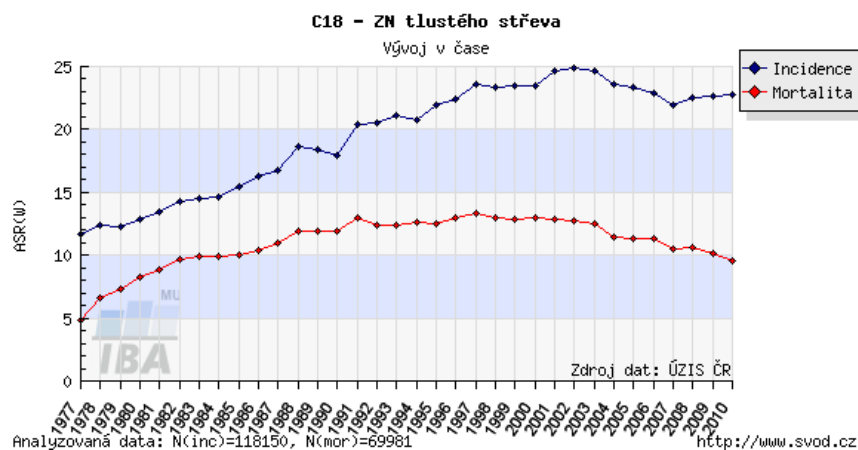
Obrázek 1: Incidence kolorektálního karcinomu ve světě ve srovnání s ČR [6].

Česká republika, ve srovnání s ostatními státy, se řadí v incidenci kolorektálního karcinomu na přední příčky.



Obrázek 2: Incidence věkového zastoupení pacientů s kolorektálním karcinomem [7].

Nejčastější výskyt CRC se objevuje u pacientů kolem 61-77 roku, avšak 21% všech nemocných je mladších 60 let.



Obrázek 3: Incidence a mortalita [8].

Incidence CRC se za poslední roky zvětšuje, avšak můžeme pozorovat náznaky zlepšení a to především stabilizací až snižováním se mortality vůbec.

Ve světě obecně platí, že u žen je pravděpodobnost výskytu CRC větší, než u mužů. V České Republice však častěji onemocní muži. Je to způsobeno především častější nadměrnou konzumací piva, která riziko výskytu rakoviny výrazně zvyšuje. Mezi zevní rizikové faktory patří strava s vysokým obsahem živočišných tuků a červeného masa, nízký obsah vlákniny ve stravě, nadváha, kouření, konzumace alkoholu nebo nedostatečný příjem ochranných látek, např. vitamínu C či kyseliny listové [9].

Nebezpečí CRC spočívá v tom, že může probíhat poměrně dlouho, skrytě a manifestovat se až v pokročilejším, a tedy obtížněji řešitelném, stádiu. Většinou se manifestuje krví ve stolici, méně často se projeví bolestí břicha, střídáním zácpy a průjmu, hlenem ve stolici, hubnutím nebo změnami chutě [2]. Všechny karcinomy tlustého střeva postupně prorůstají střevní stěnou do okolních struktur a infiltrují lymfatické a krevní cévy [10].

Při histologicky potvrzeném CRC je nutno provést předepsaná vyšetření, jejichž výsledek zásadním způsobem ovlivňuje léčebnou strategii. Je nezbytné stanovit lokální rozsah nádoru, postižení lymfatických uzlin a vyloučit vzdálené metastázy. Lokální rozsah nádoru a postižení lymfatických uzlin nejlépe diagnostikuje patolog z primárního nádoru střeva, který je odstraněn chirurgicky. Na základě vyšetření může onkolog stanovit stádium kolorektálního karcinomu (obr. 4), který je rozhodující pro prognózu a léčbu nádorového onemocnění [11]. Stádium vyjadřuje stupeň pokročilosti choroby a jeho určení má zásadní význam pro volbu vhodného terapeutického postupu. Jednotlivá stadia jsou definována výčtem možných typů postižení:

- Stádium 0

Tzv. nádor *in situ*, tj. zatím neinvazivní střevní nebo rektální nádor, který se nachází maximálně ve svalové vrstvě sliznice.

- Stádium I

Střevní nádor prostoupil svalovou vrstvou stěny do hlubších vrstev. Rektální nádor se rozšířil mimo svalovou vrstvu sliznice rekta do druhé a třetí vrstvy a postihl i vnitřní stranu sliznice rekta, ale nedostal se mimo rektum nebo vně.

- Stádium II

Střevní nádor se rozšířil i mimo střední vrstvy střevní stěny, popřípadě i do okolních tkání a okolo střeva (stadium IIA). Střevní nádor se rozšířil mimo střevní stěnu do sousedních orgánů, popř. i do serózní blány (stadium IIB). Rektální nádor se rozšířil mimo rektum do okolních tkání, ale není přítomný v lymfatických uzlinách.

- Stádium III

Střevní nádor se rozšířil ze svrchní vrstvy střevní stěny do středních vrstev. Střevní nádor se rozšířil do tří blízkých lymfatických uzlin (stadium IIIA) a zároveň také mimo střední vrstvy střevní stěny nebo do sousedních tkání v okolí střeva či rekta nebo mimo střevní stěnu do okolních orgánů, popř. i za serózní blánu (stadium IIIB). Střevní nádor se rozšířil do čtyř nebo více sousedních lymfatických uzlin a zároveň také do střední vrstvy střevní stěny či mimo ni nebo do okolních tkání v okolí střeva či rekta nebo do okolních orgánů, popř. mimo serózní blánu (stadium IIIC). Rektální nádor se rozšířil do okolních lymfatických uzlin, ale nikoli do ostatních částí těla.

- Stádium IV

Střevní nebo rektální nádor se rozšířil do ostatních částí těla, jako například do jater, plic, pobřišnice (peritoneum) nebo do vaječníků [12].



Obrázek 4: Grafické znázornění stádií nádoru kolorekta [12].

Znázornění invaze rakovinových buněk od tvorby zhoubného nádoru, až po prorůstání tumoru lymfatickými uzlinami.

Určení stádia nádorového onemocnění je důležité i pro prognózu. U kolorektálního karcinomu se hodnotí prognóza jako podíl pacientů, kteří přežívají pět let po stanovení diagnózy. Hodnoty pětiletého přežití podle stádia nemoci: stádium 0, I: 80 – 90 % nemocných; stádium II: 60 – 80 % nemocných; stádium III: 50 – 60 % nemocných; stádium IV: do 5 % nemocných. Pokud nelze metastázy chirurgicky odstranit, jedná se o nevléčitelnou chorobu [11]. Hlavním léčebným cílem u pacientů s metastatickým onemocněním je prodloužení přežití a zlepšení kvality života [5].

2.2. Matrix metaloproteinázy (MMP)

Matrix metaloproteinázy, nebo i jinak nazývané matrixiny, tvoří rodinu na zinku závislých endopeptidáz, které hrají hlavní roli při remodelaci a opravě struktury pojivové tkáně. Obecně jsou zapojeny do různých fyziologických procesů, jako je například hojení ran a embryogeneze, ale také v patologických procesech [13]. MMP se podílejí na degradaci extracelulární matrix (ECM)[14]. Všechny MMP jsou syntetizovány jako preproenzym a většina z nich jsou vylučovány z buněk jako proenzym. To znamená, že aktivace těchto proenzymů je jedním z kritických kroků, které vedou k degradaci ECM [15]. Makromolekuly ECM, jsou důležité pro tvorbu buněčného prostředí, potřebných při vývoji a morfogenezi [16, 17]. Za normálních fyziologických podmínek, je aktivita MMP přesně regulována na úrovni transkripce, aktivace prekurzorů zymogenů a interakce s konkrétními ECM. Ztráta kontroly činnosti může vést k onemocnění, jako je artritida, rakovina, ateroskleróza, vředy a fibrózy [18]. Tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP) jsou specifické inhibitory matrixin, které se účastní řízení místní aktivity MMP v tkáni [14].

Podstatou MMP je schopnost vázat ve svém aktivním váží části Zn, který je nezbytný pro funkci a aktivitu enzymu. Mohou ale vázat i jiné ionty, např. Ca, který je důležitý pro optimální konformaci molekuly [19]. Zinkové proteiny jsou nejpočetnější skupinou metaloproteinů lidského genomu. Jejich struktura je tak rozličná, jak pestré jsou funkce, které v organismu plní – od biokatalyzátorů, přes transportéry, detoxikanty, až po transkripční faktory. Proteiny spojené se zinkem je možno formálně rozdělit na zinkové enzymy a zinkové neenzymové proteiny. Mezi nejpočetnější skupinu zinkových enzymů patří zinek dependentní metaloproteinázy [20].

První člen enzymatické rodiny metaloproteináz byl popsán v roce 1962 vědci Jerome Gross a Charles M. Lapiere - v tu dobu byl označen jako kolagenáza. Zajímavé je, že byl objeven ve tkáni ocásku žabího pulce, což vedlo k napsání článku s názvem „Jak se z žabího pulce stal princ“ [21]. Později v roce 1968 byl izolován z lidské kůže a bylo zjištěno,

že je syntetizován jako zymogen, tedy inaktivní forma. V roce 1990 byl popsán princip udržení inaktivní formy – latence metaloproteináz mechanismem tzv. cysteinového spínače (cysteine switch) [22]. Cystein switch je mechanismus, při kterém propeptid cysteinu účinkuje jako čtvrtý ligand katalytického zinku, čímž zabraňuje tvorbě vazby na molekulu vody, která hraje roli při hydrolýze peptidového substrátu.

V současné době je charakterizováno více než 20 MMP. Názvosloví je komplikováno užíváním mnoha synonym, které vznikaly v průběhu intenzivního biomedicínského výzkumu. Jednotná klasifikace užívá zkratky MMP a pořadového čísla [23].

2.2.1. Struktura MMP

V MMP jsou vysoce konzervované zinek dependentní endopeptidázy, které jsou společně schopny degradace většiny, ne-li všech, komponent bazální membrány a extracelulární matrix. Je zajímavé poznamenat, že několik MMP bylo lokalizováno na stejném chromozomální místě, které ukazuje zesílení v několika solidních tumorech. Nomenklatura z MMP je komplexní a je shrnuta v tabulce, kde jsou MMP přidělena čísla, která mají své triviální názvy (tab.1).

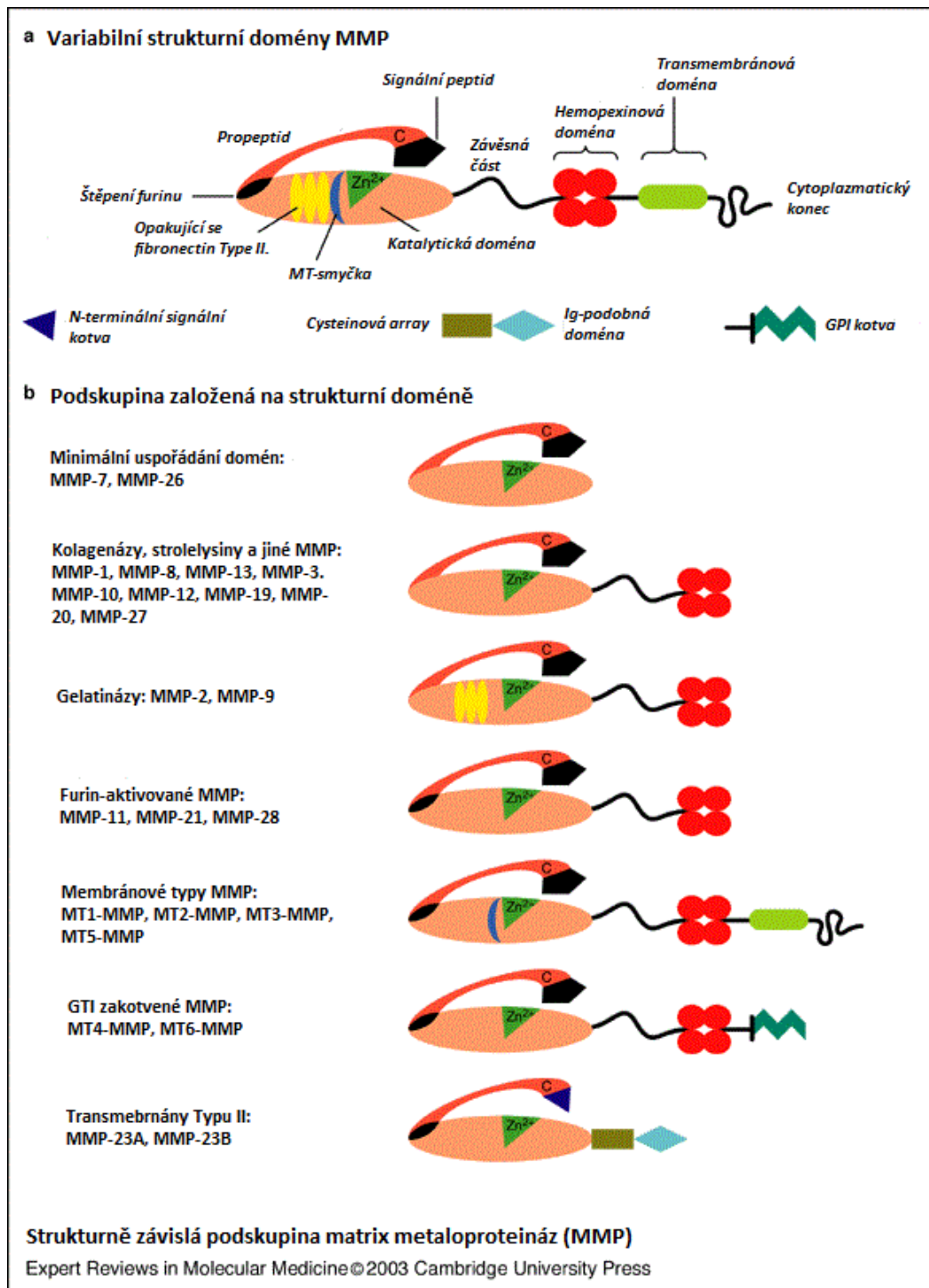
Většina matrix metaloproteináz obsahuje propeptid, katalytickou doménu a C terminální doménu [24]. Propeptid je tvořen asi 80 aminokyselinami a má jedinečnou konzervativní PRCG sekvenci. Cystein v tomto pořadí ("cystein switch") plní zásadní funkci a to, že zachovává katalytickou latenci ligandu zinku pro-MMP [25, 26]. Pomocí této propeptidové domény jsou transmembránové metaloproteinázy zakotveny v cytoplazmatické membráně. Před propeptidem (na N-terminálním konci enzymu) se nachází signální propeptid, řídící sekreci matrix metaloproteináz z buňky. Skupina matrix metaloproteináz, které jsou aktivovány intracelulárně, obsahuje navíc mezi propeptidem a katalytickou doménou sekvenci 10 aminokyselin, jejichž štěpením dochází k odštěpení propeptidu a k aktivaci enzymu [24]. Katalytická doména je tvořena asi 170 aminokyselinami, obsahuje zinek závazný vzor HE XX HXX G XX H [27]. Cystein "switch" v propeptidu je běžným konstrukčním vzorem, kde se tři histidiny v souřadnici s vázaným zinkem a cysteinem v propeptidu zkoordinují s katalytickým iontem zinku. Tato Cys-Zn²⁺ koordinace udržuje proMMP neaktivní a zabraňuje navázání molekule vody, která hraje roli při katalýze vazby k atomu zinku. Katalytické domény matrixinů mají další strukturální ionty zinku a 2-3 vápenaté ionty, které jsou nezbytné pro stabilitu a výraz enzymové aktivity. MMP-2 a MMP-9 se třikrát opakují v doméně fibronektinu typu II., vložené v katalytické doméně [28, 29].

Peptidový linker s proměnnou délkou (označováno jako závěsný region) je tvořen hemopexinovými (HPX) doménami o asi 200 aminokyselinách. HPX doména je nezbytným předpokladem pro přilnutí kolagenáz na trojšroubovicový intersticiální kolagen [30], i když si katalytické domény samy udržují proteolytickou aktivitu ve vztahu k jiným materiálům [127]. HPX doména MMP-2 je také potřebná pro aktivaci na buněčném povrchu pro-MMP-2 i MT1-MMP [31, 32]. Funkce prolinu, jako spojovacího peptidu, který se spojuje na katalytické doméně hemopexinu není známá, i když jeho interakce s trojitou šroubovicí kolagenu se předpokládá na základě molekulárního modelování [33]. Transmembránové domény se nachází v MT-MMP, které tyto enzymy zakotví k povrchu buňky.

MMP-4, MMP-5, MMP-6 a MMP-22 v seznamu chybí, protože bylo prokázáno, že jsou totožné s ostatními členy. Na základě organizace domén jsou MMP seskupeny do kolagenáz, gelatináz, stromelysin, matrilysin, MMP membránového typu a ostatní MMP [34]. Rozdíly ve strukturách MMP jsou shrnuty (obr. 7) [35]. Díky metodám rentgenové krystalografie a NMR je dnes známá struktura mnoha MMP [36].

Tabulka 1. Přehled matrix metaloproteináz

Enzym	Název	Synonyma
MMP-1	Kolagenáza	Intersticiální kolagenáza, fibroblast kolagenóza
MMP-2	Gelatináza A	Type IV kolagenáza, 72kDa gelatináza
MMP-3	Stromelyzin 1	Transin, proteoglykanáza, kolagenáza aktivující protein
MMP-7	Matrilysin	Pump-1
MMP-8	Kolagenáza 2	Neutrofil kolagenóza
MMP-9	Gelatináza B	Type IV/V kolagenáza, 92kDa gelatináza
MMP-10	Stromelyzin 2	Transin 2
MMP-11	Stromelyzin 3	
MMP-12	Makrofágová elastáza	Metaloelastáza
MMP-13	Kolagenáza 3	Rat intersticiální kolagenóza
MMP-14	Membránový typ MMP 1	MT1-MMP
MMP-15	Membránový typ MMP 2	MT2-MMP
MMP-16	Membránový typ MMP 3	MT3-MMP
MMP-17	Membránový typ MMP 4	MT4-MMP
MMP-18	Kolagenáza 4	
MMP-19	RASI-1, RASI-6	
MMP-20	Enamelyzin	
MMP-21	XMMP	
MMP-22	CMMP	
MMP-23	CA-MMP	Femalyzin
MMP-25	MT-6 MMP	Leukolyzin
MMP-26	Matrilysin 2	Endometáza
MMP-28	Epilyzin	



Obrázek 7: Struktura matrix metaloproteinázy. [37]

Všechny MMP obsahují Zn^{2+} ionty, které podporují enzymatickou aktivitu. Většina MMP obsahuje signální peptid (nutný pro sekreci), propeptid (katalytickou doménu, která váže zinek Zn^{2+}), závěsnou část (HG) a karboxy hemopexin - (C)-terminální doménu. Matrilýziny postrádají hemopexinovou doménu a C-terminální doménu. Gelatinázy obsahují fibronectin typu II moduly, které zlepšují účinnost kolagenu a degradace želatiny.

2.2.2. Dělení MMP

MMP se dělí do několika skupin podle jejich substrátové specifity a primární struktury [38]:

1. Kolagenázy (MMP-1, 8, 13, 18)

- štěpí intersticiální kolagen, substrát rozpoznávají přes haemopexinovou doménu. Nedávné studie ukázaly, že MMP-1 aktivuje proteázou aktivovaný receptor (PAR) štěpením vazba Arg-Ser, který podporuje růst a invazi buněk karcinomu prsu.

2. Gelatinázy (MMP- 2, 9)

- jsou schopny enzymaticky zpracovat různé substráty ECM, jakým je například kolagen I a IV. Kromě hemopexinové domény je pro gelatinázy charakteristická přítomnost domény vázající kolagen (CBD), která se vyskytuje na jejich katalytické doméně. CBD je složena ze tří fibronektinů II a přítomné domény preferující vazbu fibrilárního kolagenu typu I.

3. Stromelyziny (MMP- 3, 10, 11)

- jsou schopny hydrolyzovat kolagen typu IV, ale nejsou schopny štěpit fibrilární kolagen typu I.

4. Matriliziny (MMP- 7, 26)

- nemají haemopexinovou doménu, jsou schopny zpracovat kolagen typu IV, ale kolagen typu I naopak nejsou schopny zpracovat.

5. MMP membránového typu (MMP - 14, 15, 16, 17, 24, 25)

- obsahují navíc C-koncovou doménu přítomnou v intermembránové oblasti, která je doplněna o cytoplasmatickou část. Pouze MMP-14 a MMP-16 byly schopny štěpit fibrilární kolagen typu I.

6. Další MMP (MMP- 12, 19, 20, 21, 23, 27, 28)

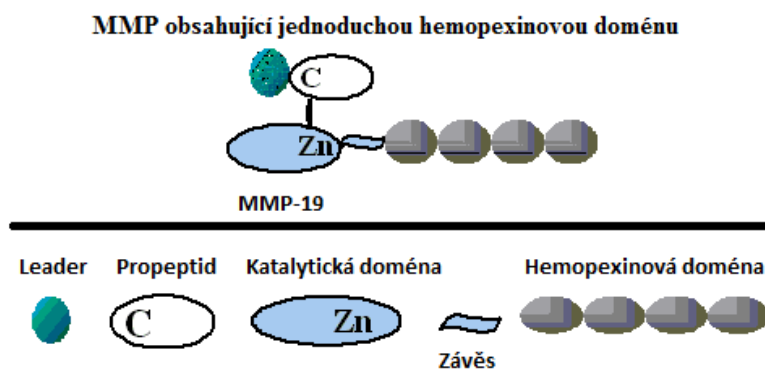
- některé MMP, konkrétně (MMP-12), RASI-1 (MMP-19), MMP-21 a MMP-28 nemohou být zahrnuty do žádné z výše uvedených tříd. MMP-19 nazývaný též RASI (revmatoidní artritida synoviálního zánětu) lze nalézt v aktivovaných lymfocytech a plazmě u pacientů s revmatoidní artritidou [37].

2.2.3. MMP-19

MMP-19 patří do podčeledi matrix metaloproteináz (velké skupiny zinkových endopeptidáz), také známých jako matrixiny, které jsou hromadně schopny degradovat všechny složky extracelulární matrix. Gen MMP-19 se nachází na chromozomu 12q14 na němž je podélně devět exonů [39]. Všechny z nich jsou vysoce konzervované mezi savčími druhy. Přítomnost tohoto genu je dokázána u bezobratlých, v ptačí linii se však tento gen ztratil [40]. Typickou doménu MMP včetně prodomény tvoří základem cysteinový zbytek na zachování enzymů latenci, katalytickou doménu a asi 160 zbytků s konzervativní vazbou na zinek. Linkerovou oblast tvoří COOH-terminální fragmet z 200 aminokyselin se sekvenční podobností hemopexinu. MMP-19 však nevykazuje strukturální rysy charakteristické hlavních MMP podčeledi, jako jsou například gelatinázy. Naproti tomu MMP-19 představují unikátní strukturální změny v rámci rodiny MMP. Tato peptidáza vykazuje archetypální strukturální doménu, která není charakteristická ostatním členům rodiny MMP. Podčeleď vykazuje nízkou sekvenční podobnost s jinými známými MMP a nemůže být tudíž zařazena do předem definované podskupiny [39]. Navíc se MMP-19 liší od ostatních známých MMP v tom, že má vložené kyselé aminokyseliny v závěsné oblasti, a dvě potenciální místa glykosylace v hemopexinové oblasti [41, 40]. MMP-19 je schopna se prostřednictvím své hemopexinové domény připojit k povrchu buňky [42, 43]. Je exprimována v celé řadě normálních lidských tkání včetně mléčných žláz, placenty, plic, slinivky břišní, vaječníků, tenkého střeva, tlustého střeva a srdce apod. Transkripce není detekována v mozku, ledvinách, játrech nebo v periferní krvi leukocytů [41, 40]. Exprese MMP-19 se upravuje během maligní transformace tlustého střeva a může hrát významnou roli v homeostáze tkání [44, 45]. MMP-19 je schopna *in vitro* degradovat např. kolagen typu IV, laminin-1, fibronectin a želatina typu I [46].

Činnost MMP je zapojena do řady biologických funkcí, jako je buněčná proliferace, migrace, adheze a stejně tak i při regulaci mnoha základních fyziologických událostí včetně angiogeneze, zánětu a apoptózy [47-49, 50]. MMP-19, klonovaná z lidské mléčné žlázy, byla nejprve označena jako MMP-18 [41], avšak ta představuje 18. MMP, kolagenázu - IV. Navíc bylo zjištěno, že MMP izolovaná z jater cDNA knihovny [40], je totožná s MMP z mléčné žlázy, a tak byla označena jako 19. MMP, tedy MMP-19. MMP-19 může hrát také roli při zánětlivých procesech a proto byl také původně izolován ze synoviálních cév u pacienta s revmatoidní artritidou pod názvem RASI-1 [42, 51].

Jako všichni členové MMP je i MMP-19 syntetizován jako zymogen, ze signálního peptidu. Nachází se v latentní fázi v ECM a pro aktivaci vyžaduje proenzym aktivačního procesu. Sám má však sklony k vlastní aktivaci. Studie prokázaly, že MMP-19 je silným hráčem při degradaci složek bazální membrány, jako je kolagen typu IV., lamini, fibrinogen a gelatinázy I. Avšak MMP-19 má též antiangiogenní vlastnosti, které mohou být zodpovědné za své tumor supresorové aktivity [39, 52].



Obrázek 8: Znázornění struktury MMP-19 [53]

Strukturně obsahují MMP-19 základní domény všech MMP včetně signálního peptidu, katalytické domény a hemopexinové domény. MMP-19 se liší od ostatních tím, že má závěsnou oblast bohatou na kyselé aminokyseliny a navíc obsahuje místa potenciální pro glykosilaci v hemopexinové doméně.

2.3. Metastazování

Schopnost napadnout tkáň a tvořit kolonie na vzdálených místech je neodmyslitelným rysem zhoubných novotvarů. Metastatické onemocnění je hlavní příčinou úmrtí u pacientů s rakovinou [54]. Je to složitý proces, který sestává z mnoha stadií a závisí na řadě různých interakcí mezi nádorovými buňkami, mimobuněčnou maticí (ECM) a cílovou tkání. [55]. Metastatický proces, je-li úspěšně nastartován, je projevem systémového selhání organismu. Přestože se jedná o celou kaskádu dějů, možnost zásahu je v podstatě v každém stupni této kaskády a úspěšná intervence na kterémkoliv úseku tohoto procesu, může znamenat zastavení procesu metastazování [56].

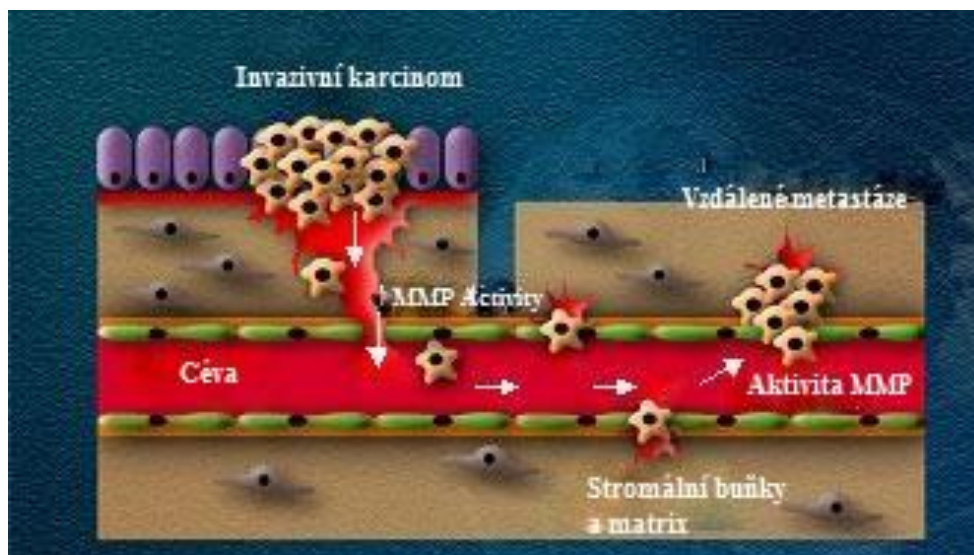
Nádorová invaze je považována za dynamický a komplexní proces, který zahrnuje odtržení maligních buněk z místa původu, průchod extracelulární matrix a bazální membránou a invazi do lymfaticko-cévních kanálů [54].

V první řadě se musí vitální nádorová buňka uvolnit z primárního nádoru a skrze stroma, bazální membránu a endotel vycestovat do cévy. Pomocí krevního nebo lymfatického systému se musí dostat do tkáně, ve které jsou příhodné podmínky pro další růst metastázy. V této tkáni, či orgánu se musí zastavit, respektive přichytit k endotelu příslušné tkáně (Obr. 9).

Angiogeneze, tvorba nových cév, je základem nejen pro růst nádoru, ale i pro úspěšnou invazi tumoru a metastazování [57]. Pro růst nádoru nad velikost 1–2 mm³ musí dojít k nastartování angiogeneze a k vytvoření vaskulárního zásobení nádoru. Angiogeneze je komplexní proces, zahrnující degradaci bazální membrány původní cévy, proliferaci endotelu k místu působení angiogenetického stimulu, až vznik funkční cévy obklopené novotvořenou bazální membránou a pericyty. Angiogeneze je regulována řadou angiogenních (př. VEGF – vascular endothelial growth factor) a antiangiogenních (př. trombospondinu) faktorů. Významným stimulem k sekreci mnoha angiogenních faktorů je hypoxie. U mnoha nádorových onemocnění je zvýšená angiogeneze považována za negativní prognostický faktor, který znamená zvýšenou agresivitu nádoru a riziko metastáz [58].

Samotný vznik a růst nádoru se neděje izolovaně, ale na pozadí organismu, ve kterém vznikl. Pokud však již detekujeme vitální nádorovou tkáň, je nutno předpokládat, že obranné mechanismy hostitele byly do značné míry překonány a samotný nádor si selekcí stále životaschopnějších buněk zajistil výhodné podmínky pro další proliferaci na úkor hostitelského organismu. Proto zcela zásadní úlohu v nádorovém růstu a protinádorové obraně má přirozená imunita hostitele [56].

Nádorové buňky často (ale ne vždy) obsahují specificky změněné, pro organizmus cizí nádorové antigeny. Většinou to jsou bílkoviny (proteiny), glykoproteiny nebo karbohydráty, kterými na sebe nádorová buňka imunitní systém upozorňuje. Normální zdravá buňka totiž na svém povrchu stále vystavuje buňka/tělo vlastní bílkoviny v komplexu s glykoproteiny. Jsou to transplantační antigeny, povrchové receptory imunokompetentních buněk, které tak dávají tělu signál, že buňka obsahuje jen vlastní proteiny, není nebezpečná a není třeba ji likvidovat. V případě nádorové změny (maligní transformace) buňky dochází často (ale ne vždy) k mutační změně vlastních bílkovin, vzniká pro nádor specifický protein, nádorový antigen. Jakmile je takový cizí, tělu neznámý protein vystaven na povrchu buňky v komplexu s glykoproteiny, T lymfocyty je rozpoznají jako nebezpečné a zlikvidují je. Cytotoxické lymfocyty jsou pro tento účel vybaveny řadou zabíjecích mechanismů navozujících buněčnou smrt, apoptózu a cytolýzu [59].



Obrázek 9: Schéma šíření nádorových buněk krevní cestou [60].

Invaze nádorových buněk z tkání do cév a následně z cév do tkání, místa vzdálené metastáze, může mít uplatnění v procesu metastazování. Do procesu se zapojují i buňky stromální.

2.3.1. MMP a metastazování

Progrese nádoru je složitý, vícestupňový proces, při kterém normální buňka podstoupí genetické změny, které mají za následek změnu fenotypu a získají tak schopnost se šířit a kolonizovat na vzdálená místa v těle. Mnoho faktorů regulujících růst a šíření zhoubných nádorů a interakcí mezi nádorem a jeho okolí mikroprostředí, může vést ke vzniku významných proteinových produktů, které jsou velmi důležité pro každý krok progrese nádoru. Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou rodina degradačních enzymů s jednoznačnými odkazy na malignity. Jsou spojeny s invazí nádorových buněk do bazální membrány a stromatu, do cév s následkem penetrace a metastazování. Jsou zapleteny v primárním i metastatickém nádorovém bujení a angiogenezi [62]. Podílejí se na řadě fyziologických a patologických procesů. Vzhledem k jejich schopnosti štěpit a přetvářet složky okolních tkání, může MMP ovlivnit migraci buněk, diferenciaci, zánětlivé procesy, neovaskularizaci, hojení ran, apoptózu i tvorbu nádorů a dalších nemocí [35]. Proces migrace nádorových buněk podpůrnou tkání, transport bazální membránou a narušování intracelulární integrity vazeb by se neobešel bez těchto specifických enzymů degradiujících membránu matrix.

MMP hrají klíčovou roli v procesu metastazování, jelikož mohou být produkovány nejen nádorovými buňkami, ale často ve větší míře i buňkami stromatu [56]. MMP jsou vylučovány jako latentních, neaktivní zymogeny různými typy stromálních a epitelálních buněk včetně mezenchymálních buněk, monocytů, makrofágů, neutrofilů, keratinocytů a nádorových buněk. K aktivaci na aktivní enzym obvykle dochází v pericelulárním nebo extracelulárním prostoru [63]. MMP pracují společně na vytvoření kaskády aktivace, přičemž poté, co je aktivována jedena MMP, katalyzuje přeměnu jiných MMP zymogenů v jejich aktivní formy tak, aby byly schopny degradovat všechny třídy ECM.

Aktivace MMP probíhá čtyřmi způsoby a to na úrovni transkripce, v místě aktivace z prekurzorů zymogenů, interakcí se specifickými složkami ECM a inhibitory TIMP [63, 64]. Endogenní inhibitory MMP jsou inhibující tkáň TIMP, tvořené stejným buňky, které produkují MMP a ty tvoří komplexy s MMP v poměru 1:1. TIMP kontrolují aktivitu MMP ve tkáních. V případě, že produkce MMP je příliš vysoká a inhibice TIMP pro kontrolu záplavy MMP je nedostačující, dojde k nerovnováze v rozdělení ECM a celkové opravě systému. Například, pokud dojde k nadměrné degradaci ECM a léčivé reakce nemůže udržet celistvost systému, dojde ke konstrukčním ztrátám tkání a tvorbě nemocí [65, 66].

Léčebné inhibice MMP

Významná role MMP v progresi tumoru a metastáz vedla k agresivnímu vývoj terapeutických látek, které blokují aktivitu enzymů v těchto procesech. Jedním přístupem byl vývoj pseudopeptidů, které kopírují konstrukční prvky substrátů MMP a tím působí jako konkurenční reverzibilní inhibitory. Jiný přístup je využití pohledu z x-ray pro stanovení krystalografických trojrozměrných struktur MMP k výrobě nonpeptidických molekul, které se selektivně váží na zinek-vazebné místo v MMP. Výsledné syntetické MMP mohou být buď širokospektrální, nebo selektivní inhibitory. Širokospektrální inhibitory účinně blokují více MMP, které mohou být zapojeny do celé řady procesů, které mají vliv na růst nádoru, invazi, angiogenezi a metastázy, ale vzhledem k úzkým spektrům byly inhibitory navrženy tak, aby blokovali aktivitu vybraných MMP, které jsou úzce spojeny se specifickými aspekty těchto procesů [62].

MMP se používají též jako markery pro některé zhoubné nádory tlustého střeva, štítné žlázy, močového měchýře, karcinomu prsu a jiných [35]. Potlačení působení MMP představuje nový terapeutický přístup k léčbě jednotlivých druhů rakoviny [54].

Použitím metod jako imunohistochemie a PCR technik, se studuje přítomnost jednotlivých členů rodiny MMP pro všechny typů nádorů. Je dokázáno, že pro zhoubné nádory je charakteristická zvýšená exprese MMP a je prokázána i přítomnost specifických MMP v případě některých karcinomů [57]. Metaloproteinázy byly také považovány za jeden z mechanismů, který nádorové buňky vyvinuly, aby unikly z protinádorové imunitní reakce hostitele [67]. Nedávno však byla u MMP-8 zjištěna opačná funkce stimulující protinádorovou imunitní odpověď, přičemž předpokládaným mechanismem je aktivace některých zánětlivých mediátorů. U knock-outovaných myších samců postrádajících MMP-8 byl prokázán deficit v zánětlivé reakci a nárůst kancerogeneze kůže v porovnání s wild-type jedinci [68].

2.3.2. MMP-19 a metastazování

MMP mají komplexní roli v rozvoji rakoviny díky své schopnosti podílet se na proteolytickém zpracování široké škály substrátů. MMP jsou obecně považovány za molekuly usnadňující invaze a migraci nádorových buněk tím, že umí degradovat ECM. Však tato pro-onkogenní role MMP zpochybňuje vlastnosti, které vykazují některé MMP. V souladu s těmito složitými funkcemi MMP při rakovině, hraje MMP-19 dvojí roli v progresi nádoru. Zvyšuje migraci nádorových buněk během pozdějších fází melanomu [69]. Je regulována v bazálních i dlaždicových buňkách karcinomu v nádorové dediferenciaci stejně jako při rakovině tlustého střeva a nosohltanu [69, 70, 71]. Nedávné studie v tomto ohledu navrhly delecí alel a podpoření hypermetylace promotoru, jako mechanismu na ztišení MMP-19 při progresi nádoru. MMP-19 má též antiangiogenní vlastnosti, které mohou být zodpovědné za své tumor supresorové aktivity [39, 69]. Studie, věnující se testování myši s deficitem MMP-19 prokazují, že jsou tyto peptidázy zapojeny do procesu remodelaci tkání, adipogeneze a progresu nádorů [72, 73]. Pro určení funkce MMP-19 byly vytvořeny myši s deficitem MMP-19, kdy pomocí cílené mutagenese dojde k přerušení katalytické domény na genu MMP-19. U mutantních myši s deficitem MMP-19 se potvrdila i dvojí úlohu tohoto metalopeptidu na rakovinu. Celkově tyto údaje ukazují, že MMP-19 negativně regulují časná stadia invaze nádorových buněk, avšak citlivost MMP-19 se může po rozvinutí nádoru zmenšit. Tyto zdánlivě paradoxní výsledky mohou odrážet různé role MMP-19 ve vývoji rakovinné progresu, ale pochopením individuální funkce každého MMP zlepší protinádorovou strategii [39]. MMP-19 ovlivňuje buněčnou proliferaci, adhezi a migraci, ale jeho fyziologická role *in vivo* je málo objasněná [74].

Analýzou genové exprese MMP v rakovině kolorekta se zjistilo, že exprese tkáně v kolorektálním karcinomu se výrazně odlišuje od exprese metastatických tkání jaterních lézí, a to i u stejného jedince. Je také zajímavé, že genová exprese může být zcela odlišná mezi primární lézí a samotných metastáz [75]. Profil MMP -19 popsaly nedávné studie analýzou ve vzorcích normální kolorektální sliznice a adenomu pomocí metod Western blotting a qRT-PCR (kvantitativní reverzní transkripce-polymerázovou řetězovou reakcí). Obě metody, jak qRT-PCR, tak Western blot ukázaly, že se hodnoty MMP-19 v průběhu rakoviny tlustého střeva zvyšují různými expresemi. V progresi lézí tlustého střeva bylo zaznamenáno zvyšující se množství MMP-19. Tyto exprese jsou pravděpodobně způsobeny díky různým rolím MMP při vzniku kolorektálních nádorů. Role MMP-19 v procesu invaze tumoru je sporná jako pro všechny ostatní MMP. MMP-19 zvyšuje regulaci astrocytů v melanomu [69, 76] a to má za následek zvýšení keratinocytů při buněčné proliferaci, migraci a adhezi na kolagenu I prostřednictvím IGF-signální dráhy [77]. Tato zjištění naznačují, že MMP-19 může hrát roli při maligní transformaci. Na druhou stranu, některé studie tvrdí, že MMP-19 má sníženou nebo dokonce mizivou regulaci během nádorové progresi v prsu a kůži [70, 71, 78]. Evidentně se však MMP podílí na důležitých biologických rolích včetně apoptózy, proliferace a diferenciaci buněk [79]. Mnoho studií spojujících MMP s biologickými procesy v rozvoji a progresi nádoru poskytují prověřený model nádorů pro studium kolorektálního karcinomu. Kromě toho, nádor kolorekta je jedním z nejčastějších malignit po celém světě a tedy z hlavních příčin úmrtí na rakovinu. Poznatky týkající se role těchto proteinů v nádorové progresi byly popsány pro lepší pochopení biologických funkcí MMP [80].

Mezi další schopnosti MMP-19 je také štěpení v *in vitro* studiích insulinu podobný růstový faktor IGFBP-3 (insulin growth factor binding protein), což naznačuje, že by mohl kontrolovat aktivitu růstových faktorů podobných insulinu a tím regulovat růst nádorových buněk [39].

Několik studií uvádí, že MMP-19 může hrát významnou roli při zánětlivých procesech. Proto byl tento enzym původně identifikován jako autoantigen u pacientů s revmatoidní artritidou [81]. V nedávné době bylo dokázáno, že MMP-19 působí jako molekulární mediátor při zánětu dýchacích cest. Zabraňuje ukládání glykoproteinu a tenascin-C do stěn dýchacích cest, čímž podporuje zánětlivou adhezi buněk a akumulaci díky své schopnosti interakce s integriny [1, 82]. V tomto ohledu se uvádí i fakt, že MMP-19 je také důležitým faktorem při kožních imunitních reakcích a ovlivňuje vývoj T-buněk [74].

2.3.3. Metody detekce MMP

MMP jsou často předmětem studií kvůli jejich roli v mnoha fyziologických a patologických procesech [83, 84]. Mohou být proto používány jako markery pro některé zhoubné nádory, jako nádory kolorekta, štítné žlázy močového měchýře a prsu [85]. Mnoho metod bylo vyvinuto pro klinické a výzkumné účely pro lepší pochopení jejich biologické funkce. Běžně používané a zvláště vhodné techniky pro detekci MMP v klinickém výzkumu jsou metody enzymatické, imunochemické a fluorimetrické. Ve studiích *in vivo* nabízí tyto zobrazovací metody mnoho výhod pro výzkum rakoviny a v diagnóze.

Fluorimetrické metody

Fluorimetrické metody využívají fluorescenčně značených substrátů pro detekci a stanovení různých MMP. Běžně používaný fluorescenční štítek při detekci enzymatické aktivity MMP je fluorescein isothiokyanát (FITC). Po rozkladu substrátu se uvolní fluorescenční molekuly a to způsobí uvolněné fluorescence. Fluorescence je přímo úměrná degradaci substrátu [94]. Dostupnost různých fluorescenčních sond, včetně infračervených (IR) fluorescenčních sond umožňuje současně detekovat a kvantifikovat několik různých typů MMP [86-88].

Enzymatické metody

Použití modifikovaných substrátů

Želatina je substrátem pro některé MMP a je tedy často používanou modifikací v testech na MMP. Biotinylovaná želatina používaná jako substrát pro některé MMP degraduje metaloproteinázy. Fragmenty jsou zachyceny na mikrotitračním povrchu a vizualizují se křenuvou peroxidázou (HRP) konjugovanou s avidinem. Činnost HRP je pak detekována pomocí chromogenního substrátu. Absorbance konečného barevného produktu je přímo úměrná množství zbývající želatiny, která je nepřímo úměrná činnosti gelatinázy [35, 89-91].

Zymografie

Zymografie je jednoduchá kvantitativní metoda, které může být použita pro přímé stanovení a studium prostorového rozložení MMP a jejich inhibitorů [92]. Metoda zahrnuje elektroforetickou separaci proteinů podle denaturace (sodium-dodecylsulfát) a to bez omezení podmínek prostřednictvím polyakrylamidovém gelu, který obsahuje substráty (např. želatinu, kasein nebo kolagen) [35].

Imunohistochemické metody

Western blotting

Velmi citlivá kvalitativní metoda je kvalitativní a vyžadující možnosti blottingu, přenosu elektroforeticky rozdělených protilátek na adekvátní membránu s následnou vizualizací dané protilátky reakcí s patřičným antigenem. Metoda se nyní využívá například při stanovení protilátek proti jednotlivým antigenním determinantám borelií a při stanovení protilátek proti extrahovaným nukleárním antigenům [93].

ELISA (enzym-linked immunosorbent assay)

Nejčastěji využívaná metoda v klinické diagnostice pro stanovení proteinu (antigenu) nebo protilátky ve vzorku. Využívá několik protilátek – první (primární) se specificky váže ke stanovovanému antigenu a druhá, detekční (sekundární), reaguje se vzniklým komplexem primární protilátka-antigen. Na sekundární protilátku je navázán enzym pro detekci signálu (odtud název enzym-linked). Analýza se zpravidla provádí v mikrotitračních destičkách [94].

2.4. Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) se rozvíjela jako jedna z modernějších metod, které původně vycházely z tzv. histochemie. Původní histochemie vznikala přibližně od 30. let 20. století na hranici histologie a analytické chemie a biochemie. Jejím cílem je identifikovat a lokalizovat chemické látky v místě jejich výskytu v tkáních na úrovni histologické či cytologické [95].

Základním cílem imunohistochemických a imunocytologických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, tj. na principu vazby antigenu a protilátky. Tuto vazbu si můžeme obrazně představit jako vztah specifického klíče (protilátky, která je zpravidla volná) k zámku (tkáňovému antigenu, jenž je zpravidla pevně fixován na určitou strukturu, např. na povrch buňky. Existují ovšem i obrácené modifikace, kdy naopak protilátky nacházející se v tkáni můžeme detekovat tak, že k nim přidáme v roztoku příslušné antigeny [13].

Jde o vyšetření, kdy na principu vazby antigen-protilátka s následnou barevnou zobrazovací akcí lze klasickým parafinovým histologickým řezu prokazovat a lokalizovat vlastně jakoukoliv určenou látku s antigenní povahou, proti které lze připravit příslušnou primární protilátku. Imunohistochemická vyšetření významně pomáhají ve zpřesnění a objektivizaci histologické diagnózy. Kromě určení směru diferenciaci či původu buněk umožňují např. i určovat proliferující nebo imortalizované buňky v nádoru i nenádorové tkáni [96].

Použité protilátky mohou být buď polyklonální nebo monoklonální. Polyklonální protilátky představují množinu imunoglobulinů, která reaguje s řadou antigenních epitopů na konkrétní molekule. Velmi často se jedná o sérum imunizovaného zvířete. Znárodnění výsledku průkazu přítomnosti určitého antigenu je různá. V principu je možno použít dvě základní metody průkazu: přímou (jednokrokovou) či nepřímou (minimálně dvou krokovou) metodou [97].

2.4.1. Typy imunohistochemických metod

Přímá metoda

Jde o nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni [13]. Při přímé metodě je protilátka žádané specificity konjugována s fluoroforem nebo enzymem. Při tom se však enzym (fluorofor) konjugovaný se specifickou protilátkou může navázat na její doménu, kterou se váže na antigenním determinantu, a tak stericky zabrání této specifické vazbě [98]. Přímé metody lze užít, je-li antigen ve studované tkáni přítomen v dostatečně vysoké koncentraci. Nejlépe se uplatňují na nativní řezy, k tkáním zalitým do parafínu jsou málo citlivé. I přes nenáročnost provedení jsou v současné době málo používané [99].

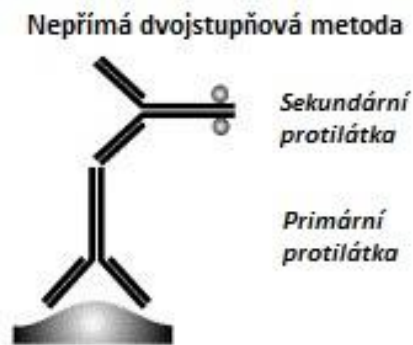


Obrázek 10: Schéma přímé metody

Podstatou je přímé značení protilátky např kovem nebo fluoresceinem

Nepřímá dvojestupňová metoda

U dvojestupňových metod je enzym nebo fluorofor navázaný na sekundární protilátku, která se naváže na specifickou protilátku primární. Předností nepřímých metod je i jejich větší citlivost, což je způsobeno tím, že na každou primární protilátku může být navázáno několik molekul značené sekundární protilátky [98]. Nepřímé IHC metody jsou ve srovnání s přímými sice komplikovanější, ale výhodou je, že mohou být mnohem citlivější [13].

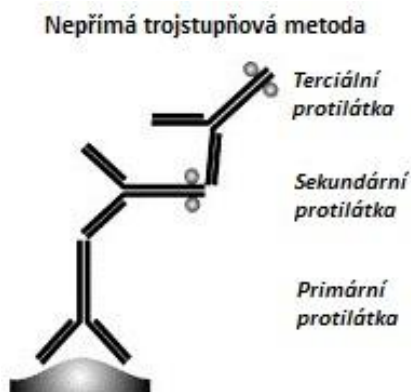


Obrázek 11: Schéma nepřímé dvojestupňové metody

Dvojestupňová metoda je založená na imunologické vazbě sekundární značené protilátky na protilátku primární.

Nepřímé trojestupňové metody

Jedná se o amplifikační metody sloužící k zesílení signálu v případě, že množství molekul antigenu v tkáni je nízké. V první fázi reaguje primární specifické antisérum s antigenem prokazovaným v tkáni. Ve druhé fázi je aplikována neznačená specifická protilátka proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi. Ve třetí fázi nanášíme značený komplex, například PAP, tj. peroxidáza-anti-peroxidázový komplex. Metodika je citlivější než obě metody předešlé, avšak časově náročnější [13].



Obrázek 12: Schéma nepřímé trojestupňové metody

V této metodě se nejdříve váže primární protilátka proti hledanému antigenu. Ve druhé fázi se přidává protilátka, která je namířena proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi. Tato protilátka také není značena. Je označována jako protilátka spojovací.

Peroxidáza-anti-peroxidázový komplex (PAP)

U metody PAP (peroxidáza-antiperoxidáza) se využívá rozpustný komplex skládající se z tří molekul peroxidázy a dvou králičích protilátek proti peroxidáze (K_{pap}). Tento komplex je vázán na primární protilátku přemosťující protilátku. Primární protilátka je králičí, zaměřená proti lidským antigenům (K anti-hum), sekundární protilátka je zpravidla prasečí, zaměřená proti králičí, tedy primární protilátce (anti-K) [98].

Avidin-biotin komplex (ABC)

Nejvíce používaná trojstupňová metoda je avidin-biotin komplex (ABC) nebo také streptavidin-biotin komplex (SABC). Avidin je proteinem vaječného bílku. Streptavidin je avidin izolovaný z bakterie, výraznější reakcí [99]. ABC metody využívají k detekci protilátek vysoké vazebné afinity mezi avidinem-biotinem. Na primární specifickou protilátku naváže sekundární protilátka konjugovaná s biotinem. Třetím stupněm je komplex avidin - biotin - peroxidáza, který se na sekundární biotinylovanou protilátku pevně naváže a propůjčí sestavě výrazné zesílení signálu. V dalším se pak vizualizuje vhodným systémem [98].

2.4.2. Tvorba parafinových bloků

1. Odběr vzorků z resekované tkáně

Před fixací vybere patolog vhodné, reprezentativní vzorky tkání pro histologické vyšetření. Odebíraná tkáň nesmí být nekrotická [100]. Celý postup zahrnuje šest po sobě jdoucích etap. Jsou to: odběr materiálu, jeho fixace, zalévání materiálu, krájení řezů, barvení řezů a jejich montování. Odebraný materiál se musí pečlivě označen a odeslán do laboratoře s tzv. histologickou průvodkou, obsahující základní identifikační údaje (jméno pacienta, orgán, druh fixační tekutiny, požadované vyšetření, datum odběru, aj.).

2. Fixace materiálu

Tkáně a orgány po zástavě přísunu kyslíku rychle podléhají autolýze, která je způsobena degradací buněčného obsahu uvolněnými enzymy. K zamezení autolýzy se používá fixace, jejíž podstata tkví v koagulaci a denuraci bílkovin buněk a tkání. Fixace vzorků z tkání a orgánů se provádí pomocí fixačních prostředků [101]. Jako fixační tekutina se zpravidla používá 10% roztok formaldehydu (někdy s různými přísadami). Fixace trvá (podle velikosti vzorku) zhruba 24 hodin [100].

3. Sycení tkání parafinem a zalévání materiálu

Parafin je nerozpustný ve vodě, proto je celý proces zalévání poměrně dlouhý, musí zahrnovat odvodnění vzorku (vzestupná alkoholová řada - 60, 80, 90, 96 a 100%), prosycení látkou, která rozpouští parafin a je mísená s alkoholem (např. xylen, metylsalicylát) - zde dochází k projasnění vzorku. Dále se vzorky postupně prosycují parafinem ve 3 lázních při teplotě 62°C, aby se odstranil xylen. Tento postup je s větší částí možno provést automaticky v přístroji – autotechnikon. Prosycený vzorek se pak zalévá v zalévacích komůrkách parafinem a po zchladnutí se získá tkáňový bloček, který je připravený ke krájení [102].

4. Řezání tkáně, příprava histologických řezů

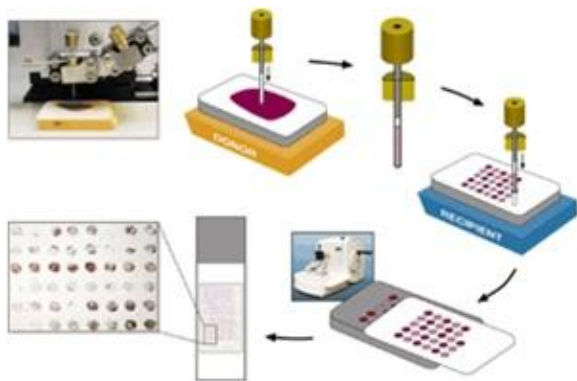
Po zalití do bločku jsou z bločků odkrajovány tenké řezy pro další histologická vyhodnocení. Pro krájení se používá zařízení zvané mikrotom. Velmi ostrý nůž nebo speciální žiletka odkrajuje z parafinového bločku plátky silné přibližně 4µm. Tenké řezy jsou poté rozprostřeny na vodní lázeň a odtud přeneseny na podložní sklička. Takto připravená a popsaná podložní sklička se mohou dále dehydratovat, deparafinizovat a barvit [100].

2.4.3. Tkáňové mikroarray

Technika tkáňové mikroarray (Tissue mikroarray = TMA) otevírá nové možnosti vyšetření, v němž se spojuje tradiční histologie s technikou molekulové biopsie. Tato technologie spojuje desítky až stovky parafinových vzorků vložených do jednoho recipientního parafinového bloku tak, že z původního (donorového) tkáňového bloku s označeným místem určeným pro zkoumání se vykrojí vzorky o průměru většinou 1,8 mm - 3 mm [103, 104]. Tyto vyřezané tkáně z různých míst téhož tumoru se poté postupně vkládají do recipientních bloků. Tím se získá recipientní blok se stovkami různých vzorků, z něhož se udělají tisíce řezů, které se pak testují imunohistochemicky na přítomnost nebo nepřítomnost různých antigenů nebo se využijí pro molekulární biologické vyšetření. Výsledky se ukládají do databází a v korelaci s klinickým průběhem a hodnotí se pomocí počítačů [103].

TMA umožňuje výzkumníkům provádět mikroskopické studie na recipientních blocích, což zajišťuje snížení množství potřebných materiálů a reagensů potřebných pro vizualizaci cíle. Další výhodou je jednotné barvení a čtení, čímž se zlepšuje jejich reprodukovatelnost [105].

Tato technologie by neměla být zaměňována s DNA microarray, kde každá malá skvrna představuje jedinečné klonování cDNA nebo oligonukleotidu. V tkáňové microarray obsahují tkáňové bloky části unikátních tkání a tumorů [106].



Obrázek 13. Schéma přípravy TMA bloku [107]

Z donorového bloku vyřežeme dutou jehlou tkáň, kterou poté vložíme do recipientního bloku. Po zaplnění celého recipientního bloku se TMA blok nařeže na tenké plátky a uchytí na podloží sklíčko.



Obrázek 14. Galileo TMA CK 3500 [104]

Přístroj používaný v rámci této práce.

3. PRAKTICKÁ ČÁST

V souboru 30 pacientů byly metodou imunohistochemické detekce proteinu MMP-19 hodnoceny vzorky nádorové tkáně střeva. Skupinu pacientů tvořili ženy i muži ve věku od 44-84 let. Poměr pohlaví v naší skupině je vyrovnaný a průměrný věk se pohybuje okolo 66 let. Vzhledem k zachování anonymity byli pacienti označeni čísly.

4. MATERIÁL A METODA

4.1. Biologický materiál

Z Ústavů klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc nám byly zapůjčeny parafinové bloky s nádorovou tkání, z kterých jsme vytvořili proteinové array.

4.2. Chemikálie

Deionizovaná voda, etanol (70 %, 80 %, 100%), xylén (LachNer), aceton (LachNer), citrát sodný dihydrát (Aldrich, kat. č. BA-9200), KCl, NaCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Tween 20 (Sigma, kat. č. 37470), HCl, 30% H_2O_2 , Tween 20 (Sigma, kat. č. 37470), bovinní albumin frakce V (Sigma, kat. č. 85040C-1K), sušené odtučněné mléko (Laktino), 10 % NaN_3 (Sigma, kat. č. 26628-22-8), fetální sérum, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, kat. č. A-6435), hematoxylin (Sigma, HI-00801), primární protilátka MMP19 - 5, Dako EnVisionTM + Dual Link System-HRP (K4061), Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, kat. č. K3466), pertex (Histolab AB, Bamed), hematoxylin (Sigma, kat. č. H 3136)

4.3. Přístrojové vybavení

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

4.4. Materiál

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

4.5. Imunohistochemická detekce protilátek: MMP19 - 5

4.5.1. Příprava vzorků

Tvorba tkáňových mikroarray

Parafinové bloky byly zpracovány do TMA tkáňových bloků (tissue arrays) pomocí manuálního přístroje Galileo TMA CK 3500. Po nastavení přístroje na požadované parametry jsme začali postupně vyřezávat dutou jehlou o průměru 1 mm mikro-válce a vkládali je do nového, recipientního bloku. Vyřezávali jsme vždy oblast označenou, jako primární nádor, další výřez mimo nádorovou tkáň a na konci série jsme zařadili ještě dva bloky tkání jako negativní kontrolu.

Krájení tkáňových mikroarray

Vzorek, ve formě bločku, byl nařezán na 4 μm tenké řezy a uchycen na pozitivně nabitá podložní sklíčka. Tato sklíčka se poté přes noc inkubovala při teplotě 56 °C a po inkubaci byla připravena pro další histologická vyšetření.

4.5.2. Příprava roztoků

a) 10 mM Citrátový pufr (pH 6)

Pro přípravu 10 mM citrátový pufr o pH 6,0 navážení 2,9 g citrátu sodného dihydrátu. Navážku rozpustíme v 1 litru deionizované vody a upravíme pH na námi požadovanou hodnotu 6,0 pomocí HCl. (Skladujeme za chladu v ledničce při teplotě +1 až +10°C).

b) Zásobní roztok 10x koncentrovaný PBS

Navážíme si 80 g NaCl, 2 g KCl a 32,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. Navážky rozpustíme v deionizované vodě a doplníme do 1 litru. Upravíme pH na hodnotu 7,4.

c) 1x PBS sTweene 20 – promývací pufr

Smícháme 100 ml 10xPBS, 900 ml deionizované vody a 1 ml Tweenu 20. (Před každým použitím připravíme čerstvý!)

d) Roztok, pro blokaci endogenní peroxidázy

Rožtok připravíme smícháním (10 ml 30% H_2O_2 a 90 ml PBS s Tweenem) 3% peroxid.

e) Blokační mléko

Navážíme si 3 g sušeného odtučněného mléka, a 2g 2% (ALB) bovinní albuminové frakce. Rozpustíme je spolu s 1 ml 3% NaN₃ nejprve v 50 ml 1x PBS s Tweenem a poté dolijeme do 100 ml.

f) Ředící roztok pro primární protilátku

Ředící roztok připravíme smícháním 900 µl 1x PBS, 100 µl Fetálního séra a 10 µl 10% NaN₃. (Roztok připravujeme vždy čerstvý.)

g) Ředící roztok pro sekundární protilátku

Ředící roztok připravíme smícháním 900 µl 1x PBS a 100 µl Fetálního séra. (Roztok připravujeme vždy čerstvý.)

h) Hematoxylin

Odměříme 50 ml 5% kamence hlinitodraselného, 1 ml 10% hematoxylinu v 96% EtOH, 1 ml 2% kyseliny jodisté, 10 kapek 3% konc. HCl. Skladujeme při laboratorní teplotě (18°C – 27°C).

5% zásobní roztok kamence hlinitodraselného (KAl(SO₄)₂·12H₂O):

Navážku 5 g KAl(SO₄)₂·12H₂O rozpustíme ve 100 ml deionizované H₂O

10% zásobní roztok hematoxylinu v 96% EtOH:

Navážku 1 g hematoxylinu rozpustíme v 10 ml 96% EtOH

2% zásobní roztok kyseliny jodisté:

Navážku 0,5 g H₅IO₆ rozpustíme ve 25 ml deionizované H₂O

3% zásobní roztok konc. HCl (35%):

Do 91,4 ml deionizované vody přidáme po kapkách 8,6 ml konc. HCl.

4.6. Samotná imunohistochemická detekce

4.6.1. Deparafinizace řezů:

Po inkubaci je nutné vzorky deparafinizovat (pomocí xylenu) a dehydratovat (alkoholovou řadou). Připravíme si tedy šest barvicích nádobek s víčkem. Do třech nalijeme xylen a do dalších pak 70 %, 80 % a 99,5 % ethanol.

Deparafinizaci vzorků provádíme tak, že sklíčka inkubujeme v barvicích nádobkách 5 minut dle níže uvedeného schématu:

Xylen – 5 min.

Xylen – 5 min.

Xylen – 5 min.

99,5 % etanol – 5 min

80 % etanol – 5 min

70 % etanol – 5 min

Po vyjmutí preparátů z ethanolu sklíčka osušíme přitisknutím hrany skla na savou podložku a vložíme do barvicí nádoby s destilovanou vodou. Skla 3x promyjeme deionizovanou vodou.

4.6.2. Postup imunohistochemické detekce

Zpracování řezů ve vodní lázni

Barvicí nádobku, vhodnou pro zahřívání ve vodní lázni, naplníme roztokem citrátového pufru a předehejeme ji na 95-99°C. Po vyhřátí ponoříme preparáty do takto předeřátého pufru a inkubujeme po dobu 40-ti minut na 95-99°C. Inkubované vzorky vytáhneme z lázně a necháme zchladnout asi 20 minut při pokojové teplotě. Po zchladnutí vylijeme z barvicí nádoby citrátový pufr a nahradíme ho deionizovanou vodou. Opláchneme preparáty destilovanou vodou ještě 2 x a ponoříme do kyvety s 1x PBS koncentrovaným pufrem na 5 minut.

Blokace endogenní peroxidázy

Po fixaci, deparafinizaci, rehydrataci a odmaskování umístíme preparáty do předem připraveného (vždy čerstvého) roztoku pro blokaci endogenní peroxidázy. Inkubujeme 10 minut při laboratorní teplotě a poté 2x rychle opláchneme v roztoku 1x PBS s Tweenem.

Oplach preparátu

Po rychlém promytí necháme vzorky v kyvetě na 5 minut opláchnout v novém 1x PBS s Tweenem. To pak ještě 2x opakujeme.

Blokace v blokačním mléce

Vzorky ponoříme do kyvety s předem připraveným roztokem blokačního mléka a při laboratorní teplotě je inkubujeme 1 hodinu.

Oplach preparátu

Po hodině 2x rychle propláchneme v kyvetě v pufru 1x PBS s Tweenem a poté opět opakujeme promytí 2x po pěti minutách v nové roztoku 1x PBS s Tweenem.

Aplikace primární protilátky MMP-19.5

Před nanesením protilátky sklíčka osušíme. Řez nesmí vyschnout! Parafínovým fixem ohraničíme nanesenou tkáň, aby nám látka nestékala, a nanese 200 µl primární protilátky. Preparáty vložíme do vlhké komůrky, uzavřeme ji a inkubujeme řez s protilátkou v chladu v ledničce přes noc.

Oplach preparátu

Následující den vyjmeme vzorky z komůrky, vložíme je do kyvety s 1x PBS s Tweenem, 2x rychle propláchneme tímto pufrem, přilijeme nový pufř a necháme po 5-ti minutách 2x v tomto pufřu inkubovat.

Aplikace sekundární protilátky En Vison+ Dual Link Systém -HRP

Odstraníme přebytečný pufř a oťřeme podložní skla. Přidáme 200 µl neředěného polymeru/HRP a pokryjeme jím vzorek. Inkubujeme 30 minut.

Oplach preparátu

Opatrně opláchneme pufřovým promývacím roztokem a vložíme na 5 minut do čerstvé pufřové lázně a poté opět opakujeme promytí 2x po pěti minutách v nové roztoku 1x PBS s Tweenem.

DAB+ vizualizace

Těsně před nanesením si připravíme roztok důkladným promísením 1ml substrátového pufru DAB+ s 1 kapkou (25-30 μ l) chromogenu DAB+.

Odstraníme přebytečný pufr a otřeme podložní skla. Přidáme 200 μ l pracovního roztoku DAB+ a pokryjeme jím vzorek. Inkubujeme 10 minut. Opatrně opláchneme v deionizované vodě. Odpadní roztok DAB+ vylijeme do nádobky na nebezpečné materiály!

Podbarvení hematoxylinem

Po promytí a vizualizaci preparáty vložíme do barvicí nádobky s hematoxylinovým barvivem inkubujeme asi 30 sekund při laboratorní teplotě. Po 30 sekundách preparáty vytáhneme, dáme do barvicí nádobky s destilovanou vodou a tu pak umístíme pod tekoucí vodou na 3 minuty. Následně preparáty opláchneme v destilované vodě.

Odvodnění a montování

Před zahájením dehydratace si nachystáme do barvicích nádobek 75 % ethanol, 95 % etanol, 100 % etanolu a xylem na projasnění vzorků. Preparáty opláchneme nejdříve v 75 % etanolu – 30 sekund, poté 95 % etanolu – 30 sekund a následně ve 100 % etanolu – 30 sekund. V xylenu inkubujeme 1 minutu.

Preparáty vytáhneme z xylenu, osušíme a zamontujeme do montovacího media Pertex. Takto hotové preparáty jsme hodnotili pod světelným mikroskopem.

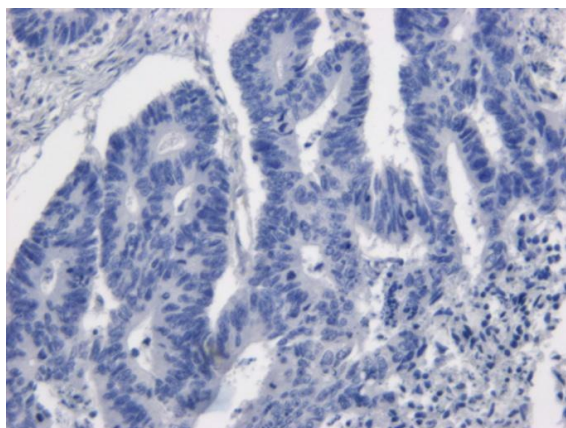
5. VÝSLEDKY

Imunohistochemická detekce MMP-19 byla provedena na souboru 30 pacientů, u kterých byl diagnostikovaný nádor tlustého střeva. Dva patientské vzorky byly nezhodnotitelné a dále nebyly zahrnuty do výsledné analýzy. U 8 pacientů (4, 8, 12, 14, 20, 26, 27, 27) bylo prokázáno, že se nejedná o karcinom, ale pouze o nízcce diferenciovaný neuroendokrinní tumor tzv. karcinoid (= semimaligní tumor, který se někdy chová nezahoubně, někdy však tvoří metastázy). Všechny 8 pacientů bylo zařazeno do statistik, jelikož se jednalo o maligní nádory.

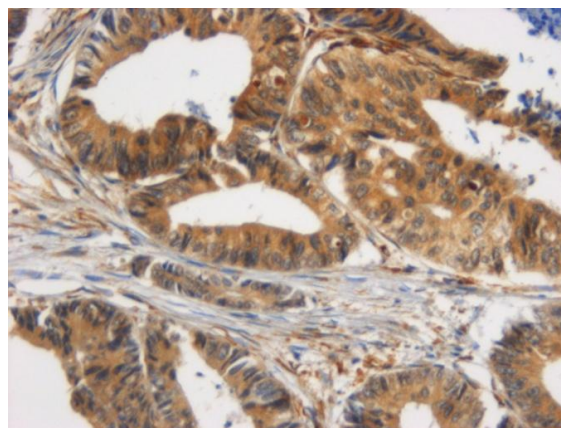
Pro účely této práce se testovala exprese MMP-19 v jednotlivých typech buněk. Úplná exprese MMP-19 v nádorových buňkách byla z 28 vzorků u 19 (67,86 %). 5 vzorků (17,85 %) bylo středně pozitivních, 2 vzorky (7,14 %) vykazovaly nízkou pozitivitu a u 2 (7,14 %) z 28 byla exprese negativní. Vysoce pozitivní exprese bazálních nenádorových buněk byla zaznamenána u 18 vzorků (64,3%), 1 vzorek (3,57 %) byl středně pozitivní a zbylých 9 vzorků (32,14 %) nebyly napadeny žádné bazální buňky. Expresi stromálních buněk vykazovalo 20 vzorků (71,43 %), středně pozitivní byly 3 vzorky (10,71 %) a 5 (17,86 %) z celkového počtu 28 testovaných vzorků vykazovalo negativitu exprese stromálních buněk.

Tabulka 2. Exprese proteinu MMP-19 v procentovém zhodnocení

Intenzita exprese	Nádorové buňky	Bazální nenádorové buňky	Stromální buňky
Vysoká pozitivita (100 – 61 %)	19 (67,86 %)	18 (64,3%)	20 (71,43 %)
Střední pozitivita (60 – 30 %)	5 (17,85 %)	1 (3,57 %)	3 (10,71 %)
Nízká pozitivita (29 – 10 %)	2 (7,14 %)	0	0
Negativita (9 – 0 %)	2 (7,14 %)	9 (32,14 %)	5 (17,86 %)



Obrázek 13. Vizualizace MMP-19 imunohistochemikou detekcí. Negativní tkáň. (20x zvětšení)



Obrázek 14. Vizualizace MMP-19 imunohistochemikou detekcí. Pozitivní tkáň. (20x zvětšení)

Kromě testování exprese MMP-19 v buňkách byly také dohledány další informace, ve spolupráci s patologem, podstatné pro naši analýzu (Tab. 3).

V našem souboru 17 pacientů (60,71 %) mělo adenokarcinom. U dalších 3 pacientů (10,71 %) byla nalezena duplicita s jiným typem nádoru, u 1 pacienta (3,57%) byla nalezena triplicita (nízce diferenciovaný neuroendokrinní tumor/ chronická leukémie/ adenokarcinom), v 6 případech (21,43 %) šlo o adenokarcinom s nízce diferenciovaným neuroendokrinním tumorem a u 1 pacienta (3,57%) byl diagnostikován pouze nízce diferenciovaný neuroendokrinní tumor.

Výskyt vzdálených metastáz byl potvrzen u 11 (39,29 %) pacientů. Z hodnocení podle klinické klasifikace o počtu vzdálených metastáz (M) vyplývá, že 11 (39,29%) pacientů mělo více než jednu vzdálenou metastázu, klasifikováno jako M1 a u 17 (60,71 %) se vzdálené metastáze neobjevily vůbec, kalcifikováno jako M0. Co se umístění vzdálených metastáz týče, tak u 9 (32,14 %) se vyskytly na játrech, u 2 případů (7,14 %) pak v měkkých tkáních.

U 12 pacientů (42,86 %), byly nalezeny metastázy v mízních uzlinách a u zbylých 16 pacientů (57,14 %) nebyly metastázy v uzlinách nalezeny vůbec. Podle klinické klasifikace o počtu metastáz v mízních uzlinách (N), byly u 2 případů (7,14 %) diagnostikovány metastázy ve stádiu N3 (metastázi větší než 6 cm), u 6 (21,42 %) ve stádiu N2 (velikost metastáz mezi 3-6 cm) a u 3 (10,71 %) ve stádiu N1 (metastáza na jedné uzlině do 3 cm).

U našeho souboru byly dohledány také hodnoty pT nádoru, které podle patologické klasifikace hodnotí závažnost prorůstání nádorových buněk do hloubky střeva. Nádor postihující submucosu, tedy kategorie pT1 postihla v naší skupině 3 pacienty (10,71 %), 6 pacientů (21,43 %) bylo zařazeno do kategorie pT2, nádor postihuje svalovou vrstvu sliznice. 14 pacientů (50 %) je v kategorii pT3, u nich nádor postihuje nebo se šíří do neperitonealizované perikolické nebo periktální tkáně a 3 pacienti (10,71 %) byly zařazeny do kategorie pT4, kdy nádor přímo postihuje i jiné orgány či struktury. U 2 (7,14 %) pak pT nebylo možno dohledat.

Stupeň diferenciaci tzv. grading nádoru (G), charakterizuje morfologické změny neoplastické populace buněk. Stupeň G1 tj. dobře diferencovaný nádor u naší studované skupiny byl popsán u 9 pacientů (32,14 %), středně diferencovaný nádor tj. stupeň G2 mělo 12 pacientů (42,86 %) a u 4 byl níže diferencovaný nádor, odpovídající stupně G3.

Tabulka 3. Přehled míry exprese MMP-19 v jednotlivých typech buněk a souhrn výskytu metastáz s jejich diagnózou

Vzorek	Typ karcinomu	Nádorové buňky	Bazálních nenádorové buňky	Stromální buňky	Uzlinové metastázi	Počet uzlinových metastáz (N) ¹	Vzdálené metastázi	Umístění vzdálených metastáz	Počet vzdálených metastáz (M) ²	pT ³	Diagnóza ⁴	Diferenciace ⁵	Duplicita
1.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	0	0	0	x	x	1	C20	G1	0
2.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	0	0	0	x	x	2	C20	G2	0
3.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	1	2	0	x	x	3	C20	G1	0
4.	karcinoid/adenokarc.	100%	0 %	100 %	1	2	1	játra	5	3	C18.7		duplicita
5.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	1	2	1	játra	2	3	C18	G1	0
6.	adenokarcinom	65%	100 %	100 %	1	3	1	játra	3	4	C20	G2	0
7.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	1	1	1	játra	2	3	C18	G2	0
8.	karcinoid/adenokarc.	100%	100 %	100 %	1	3	1	játra	mnohočetné	3	C18		duplicita
9.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	0	0	0	x	x	3	C20	G3	0
10.	adenokarcinom	50%	0	0	0	0	0	x	x	3	C20	G2	0
11.	adenokarc./melanom	100%	100 %	100 %	0	0	0	x	x	0	C18	G2	duplicita
12.	Karcinoid	10%	0	50 %	0	0	0	x	x	0	nedohledáno		0
13.	adenokarcinom	0%	0	0	0	0	0	x	x	1	C20	G1	0
14.	karcinoid/adenokarc.	100%	100 %	100 %	1	2	1	játra	3	2	C18	G2	duplicita
15.	adenokarc./ca.plic	100%	100 %	100 %	1	1	0	x	x	3	C18	G3	duplicita
16.	adenokarcinom	20%	0	40 %	0	0	0	x	x	1	C19	G2	0
17.	adenokarc./ca.prostaty	50%	100 %	100 %	0	0	0	x	x	3	C18.7	G2	duplicita
18.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	0	0	1	játra	2	3	C18	G2	0
19.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	0	0	1	játra	1	3	C20	G2	0
20.	karcinoid/adenokarc.	0	0	0	0	0	0	x	x	2	C20	G1	duplicita
21.	adenokarcinom	100 %	100 %	100 %	1	2	1	měkké	1	4	C18	G3	0
22.	adenokarcinom	60 %	100 %	100 %	1	3	1	měkké	1	4	C18	G3	0
23.	adenokarcinom	100 %	100 %	100 %	1	2	1	játra, kosti		3	C20	G1	0
24.	adenokarcinom	100 %	100 %	0	0	0	0	x	x	3	C18	G2	0
25.	adenokarcinom	100 %	60 %	60 %	0	0	0	x	x	2	C20	G1	0
26.	karcinoid/adenokarc.	100 %	0	0	0	0	0	x	x	3	C20	G1	duplicita
27.	karcinoid/adenokarc.	50 %	0	100 %	0	0	0	x	x	2	C 20	G1	duplicita
28.	karcinoid/leuk/adenom.	100 %	0	100 %	1	1	0	x	x	2	C18.7	G2	triplicita

Vysvětlivky [108]:

1. Regionální místní uzliny – N (Regionálními místními uzlinami jsou místní uzliny krční)

- NX regionální místní uzliny nelze hodnotit
- N0 v regionálních místních uzlinách nejsou metastázy
- N1 metastáza v jediné místní uzlině, 3 cm nebo méně v největším rozměru
- N2 metastáza v místních uzlinách od 3cm (nebo méně v největším rozměru) až 6cm (v největším) rozměru), tedy od jedné jednostranné místní uzliny po oboustranné či druhostranné místní uzliny
- N3 metastázy v místní uzlině (uzlinách) větší než 6 cm v největším rozměru

2. Vzdálené metastázy – M

- MX vzdálené metastázy nelze hodnotit
- M0 nejsou vzdálené metastázy
- M1 vzdálené metastázy

3. Patologická klasifikace pT (prorůstání nádorových buněk do hloubky)

- pT1 – nádor postihuje submukózu
- pT2 - nádor postihuje tunica muscularis propria
- pT3 - nádor postihuje nebo se šíří do neperitonealizované perikolické nebo periktální tkáně
- pT4 – nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury a/nebo prorůstá na viscerální peritoneum

4. Diferenciace (morfologické změny neoplastické populace buněk)

- G1 velmi diferencovaný nádor
- G2 středně diferencovaný nádor
- G3 nediferencovaný nádor

5. Diagnóza:

- C20 zhoubný novotvar konečníku – rekta
- C18 zhoubný novotvar tlustého střeva
- C18.7 esovitý tračník – colon sigmoideum
- C19 zhoubný novotvar rektosigmoideálního spojení

6. Výsledky

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru Statistica 8. Jako statisticky významná byla považována hladina testu $\alpha < 0,05$. Při testování byl použit χ^2 test nezávislosti v kontingenčních tabulkách. Za pozitivní byly považovány všechny buňky s intenzitou exprese vyšší nebo rovnou 10 %.

Bylo zjištěno, že nádorové buňky ovlivňují expresi proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk ($p < 0,008$) (**Tab. 4**) a i u stromálních buněk ($p < 0,019$) (**Tab. 5**). Taktéž bylo prokázáno, že bazální nenádorové buňky statisticky významně ovlivňují expresi proteinu MMP-19 u stromálních buněk ($p < 0,011$) (**Tab. 6**).

Dále bylo porovnáváno, zdali exprese proteinu MMP-19 má vliv na tvorbu vzdálených metastáz a popřípadě existuje-li nějaký vztah s jejich umístěním. Bylo zjištěno že, exprese proteinu MMP-19 u nádorových buněk ($p < 0,14$) (**Tab. 9**) nemá vliv na přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz. Ale u bazálních nenádorových buněk ($p < 0,036$) (**Tab. 18**) a u stromálních buněk ($p < 0,047$) (**Tab. 27**) byla nalezena statisticky významná hladina exprimovaného proteinu MMP-19. Expresí proteinu MMP-19 v bazálních nenádorových buňkách a stromálních buňkách má vliv na přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz. Nádorové buňky ($p < 0,54$) (**Tab. 10**), bazální nenádorové buňky ($p < 0,21$) (**Tab. 19**) a ani stromální buňky ($p < 0,27$) (**Tab. 28**) nemají vliv na umístění vzdálených metastáz. Co se týče uzlinových metastáz, nebyl potvrzen vliv exprese proteinu MMP-19 jak v nádorových buňkách ($p < 0,11$) (**Tab. 7**), tak i v bazálních nenádorových buňkách ($p < 0,13$) (**Tab. 16**) na jejich tvorbu. Ale u stromálních buněk ($p < 0,033$) (**Tab. 25**) byl prokázán vliv exprimovaného proteinu MMP-19 na tvorbu uzlinových metastáz. Nebyl prokázán vliv exprese MMP-19 jak v nádorových buňkách ($p < 0,48$) (**Tab. 8**), tak ve stromálních buňkách ($p < 0,21$) (**Tab. 26**) a i v bazálních nenádorových buňkách ($p < 0,38$) (**Tab. 17**), na počet uzlinových metastáz.

U našeho souboru byla také zjišťována statistická významnost exprese proteinu MMP-19 na prorůstání nádorových buněk a na stupni diferenciací nádoru. Nádorové buňky ($p < 0,13$) (**Tab. 11**), bazální nenádorové buňky ($p < 0,29$) (**Tab. 20**) a stromální buňky ($p < 0,79$) (**Tab. 29**) nemají vliv na žádnou z kategorií prorůstání nádorových buněk. Taktéž nádorové buňky ($p < 0,14$) (**Tab. 13**), bazální nenádorové buňky ($p < 0,24$) (**Tab. 22**) a stromální buňky ($p < 0,35$) (**Tab. 31**) nemají vliv na stupeň diferenciací nádoru.

Dále bylo porovnáváno, zdali existuje nějaká závislost výskytu proteinem MMP-19 u pacientů s adenokarcinomem a nízkce diferenciovaným neuroendokrinním tumorem. Nebyla nalezena žádná závislost mezi nádorovými buňkami ($p < 0,12$) (**Tab. 12**), stromálními buňkami ($p < 0,53$) (**Tab. 30**) a adenokarcinomem a nízkce diferenciovaným neuroendokrinním tumorem. Ale byla nalezena závislost mezi bazálními nenádorovými buňkami a adenokarcinomem a nízkce diferenciovaným neuroendokrinním tumorem ($p < 0,002$) (**Tab. 21**).

Dále bylo hodnoceno, zdali má vliv exprese proteinu MMP-19 na lokalizaci nádorového onemocnění a na výskyt dalšího nádorového onemocnění. U našeho studovaného souboru bylo prokázáno že, exprese proteinu MMP-19 u nádorových buněk ($p < 0,10$) (**Tab. 14**), bazálních nenádorových buněk ($p < 0,22$) (**Tab. 23**) a stromálních buněk ($p < 0,76$) (**Tab. 32**) nemá žádný vliv na lokalizaci nádorového onemocnění. Taktéž nebyla nalezena závislost mezi pacienty s duplicitními nebo triplicitními nádory a expresí proteinu MMP-19 u nádorových buněk ($p < 0,94$) (**Tab. 15**), bazálních nenádorových buněk ($p < 0,17$) (**Tab. 24**) ani u stromálních buněk ($p < 0,84$) (**Tab. 33**).

Tabulka 4. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. bazální nádorové buňky.

	Bazální nádorové buňky		
Nádorové buňky	0-10%	11-100%	součet v řádku
0-10%	3	0	3
11-100%	6	19	25
Celk.	9	19	28
			$p < 0,008$

Expres proteinu MMP-19 u nádorových buněk má vliv na pozitivitou/negativitou bazálních nenádorových buněk.

Tabulka 5. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. stromální buňky.

Nádorové buňky	Stromální buňky		součet v řádku
	0-10%	11-100%	
0-10%	2	1	3
11-100%	3	22	25
Celk.	5	23	28
			p<0,019

Expres proteinu MMP-19 u nádorových buněk má vliv na pozitivitu/negativitu stromálních buněk.

Tabulka 6. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. stromální buňky.

Bazální nenádorové buňky	Stromální buňky		součet v řádku
	0-10%	11-100%	
0-10%	4	5	9
11-100%	1	18	19
Celk.	5	23	28
			p<0,011

Expres proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk má vliv na pozitivitu/negativitu stromálních buněk.

Tabulka 7. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. metastázi v uzlinách.

Nádorové buňky	Metastázi v uzlinách		součet v řádku
	nepřítomné (0)	přítomné (1)	
0-10%	3	0	3
11-100%	6	19	25
Celk.	9	19	28
			p<0,11

Expres proteinu MMP-19 u nádorových buněk nemá vliv na přítomnost nebo nepřítomnost uzlinových metastáz.

Tabulka 8. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. počet metastáz v uzlinách.

Nádorové buňky	Počet uzlinových metastáz				součet v řádku
	0	1	2	3	
0-10%	3	0	0	0	3
11-100%	13	3	6	3	25
Celk.	16	3	6	3	28
					p<0,48

Expres proteinu MMP-19 u nádorových buněk nemá vliv na počet uzlinových metastází.

Tabulka 9. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. vzdálené metastázi.

Nádorové buňky	Vzdálené metastázi		součet v řádku
	nepřítomné (0)	přítomné (1)	
0-10%	3	0	3
11-100%	14	11	25
Celk.	17	11	28
			p<0,14

Expres proteinu MMP-19 u nádorových buněk nemá vliv na přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz.

Tabulka 10. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. počet metastáz v uzlinách.

Nádorové buňky	Umístění vzdálených metastáz				součet v řádku
	nepřítomné (0)	jaterní metastázi	metastázi v měkkých tkáních	metastázi v játrech a kostech (kyčle)	
0-10%	3	0	0	0	3
11-100%	14	8	2	1	25
Celk.	17	8	2	1	28
					p<0,54

Expres proteinu MMP-19 u nádorových buněk nemá vliv na umístění vzdálených metastáz.

Tabulka 11. Závislost MMP-19 pozitívnych a negatívnych nádorových buněk vs. stádia prorůstání nádorových buněk.

	pT (prorůstání nádor. buněk do hloubky)					
Nádorové buňky	pT 0	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4	součty v řádku
0-10%	1	1	1	0	0	3
11-100%	1	2	5	14	3	25
Celk.	2	3	6	14	3	28
						p<0,13

Expresie proteinu MMP-19 u nádorových buněk nemá vliv na žádnou z kategorií prorůstání nádorových buněk.

Tabulka 12. Závislost MMP-19 pozitívnych a negatívnych nádorových buněk u adenokarcinomu a níže diferenciovaném neuroendokrinním tumoru.

	Typy karcinomů		
Nádorové buňky	adenokarcinom	níže diferenciovaný neuroendokrinním tumoru	součet v řádku
0-10%	1	2	3
11-100%	19	6	25
Celk.	20	8	28
			p<0,12

Nebyla nalezená žádná závislost mezi expresí proteinu MMP-19 u nádorových buněk a adenokarcinomem nebo níže diferenciovaným neuroendokrinním tumorem.

Tabulka 13. Závislost MMP-19 pozitívnych a negatívnych nádorových buněk vs. stupeň diferenciace nádoru.

	Stupeň diferenciace nádoru			
Nádorové buňky	G1	G2	G3	součet v řádku
0-10%	2	0	0	2
11-100%	7	12	4	23
Celk.	9	12	4	25
				p<0,14

Expresie proteinu MMP-19 u nádorových buněk nemá vliv na stupeň diferenciace nádoru.

Tabulka 14. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. lokalizace nádorového onemocnění.

Nádorové buňky	Vzdálené metastázi		součet v řádku
	Nádor recta C 20	Nádory tl. střeva C 18	
0-10%	2	0	2
11-100%	10	15	25
Celk.	12	15	27
			p<0,10

Expres proteinu MMP-19 u nádorových buněk nemá vliv na lokalizaci nádoru.

Tabulka 15. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních nádorových buněk vs. duplicitní a triplicitní malignity.

Nádorové buňky	Duplicitní malignity			součet v řádku
	Primární nádor	Počet pacientů s duplicitní nádory	Počet pacientů s triplicitními nádory	
0-10%	2	1	0	3
11-100%	16	8	1	25
Celk.	18	9	1	28
			p<0,94	

Nebyla nalezena závislost mezi pacienty s duplicitními nebo triplicitními nádory a pozitivitou nebo negativitou proteinu MMP-19 u nádorových buněk.

Tabulka 16. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. metastázi v uzlinách.

	Metastázi v uzlinách		
Bazální nenádorové buňky	nepřítomné (0)	přítomné (1)	součet v řádku
0-10%	7	2	9
11-100%	9	10	19
Celk.	16	12	28
			p<0,13

Expres proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk nemá vliv na přítomnost nebo nepřítomnost uzlinových metastáz.

Tabulka 17. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. počet metastáz v uzlinách.

	Počet uzlinových metastáz				
Bazální nenádorové buňky	0	1	2	3	součet v řádku
0-10%	7	1	1	0	9
11-100%	9	2	5	3	19
Celk.	16	3	6	3	28
					p<0,38

Expres proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk nemá vliv na počet uzlinových metastázi.

Tabulka 18. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. vzdálené metastázi.

Bazální nenádorové buňky	Vzdálené metastázi		součet v řádku
	nepřítomné (0)	přítomné (1)	
0-10%	8	1	9
11-100%	9	10	19
Celk.	17	11	28
			p<0,036

Expresí proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk má vliv na přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz.

Tabulka 19. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. počet metastáz v uzlinách.

Bazální nenádorové buňky	Umístění vzdálených metastáz				součet v řádku
	nepřítomné (0)	jaterní metastázi	metastázi v měkkých tkáních	metastázi v játrech a kostech (kyčle)	
0-10%	8	1	0	0	9
11-100%	9	7	2	1	19
Celk.	17	8	2	1	28
					p<0,21

Expresí proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk nemá vliv na umístění vzdálených metastáz.

Tabulka 20. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. stádia prorůstání nádorových buněk.

Bazální nenádorové buňky	pT (prorůstání nádor. buněk do hloubky)					součet v řádku
	pT 0	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4	
0-10%	1	2	3	3	0	9
11-100%	1	1	3	11	3	19
Celk.	2	3	6	14	3	28
						p<0,29

Expresí proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk nemá vliv na žádnou z kategorií prorůstání nádorových buněk.

Tabulka 21. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk u adenokarcinomu a níže diferenciovaném neuroendokrinním tumoru.

Bazální nenádorové buňky	Typy karcinomů		součet v řádku
	adenokarcinom	níže diferenciovaný neuroendokrinním tumoru	
0-10%	3	6	9
11-100%	17	2	19
Celk.	20	8	28
			p<0,002

Byla nalezena závislost mezi expresí proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk a adenokarcinomem a níže diferenciovaným neuroendokrinním tumorem.

Tabulka 22. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. stupeň diferenciace nádoru.

Bazální nenádorové buňky	Stupeň diferenciace nádoru			součet v řádku
	G1	G2	G3	
0-10%	4	3	0	7
11-100%	5	9	4	18
Celk.	9	12	4	25
				p<0,24

Expres proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových nemá vliv na stupeň diferenciace nádoru.

Tabulka 23. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. lokalizace nádorového onemocnění.

Bazální nenádorové buňky	Vzdálené metastázi		součet v řádku
	Nádor recta C 20	Nádory tl. střeva C 18	
0-10%	5	3	8
11-100%	7	12	19
Celk.	12	15	27
			p<0,22

Expres proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových nemá vliv na lokalizaci nádoru.

Tabulka 24. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních bazálních nenádorových buněk vs. duplicitní a triplicitní malignity.

	Duplicitní malignity			
Bazální nenádorové buňky	Primární nádor	Počet pacientů s duplicitní nádory	Počet pacientů s triplicitními nádory	součet v řádku
0-10%	4	4	1	9
11-100%	14	5	0	19
Celk.	18	9	1	28
				p<0,17

Nebyla nalezena závislost mezi pacienty s duplicitními nebo triplicitními nádory a pozitivitou nebo negativitou proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk.

Tabulka 25. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. metastázy v uzlinách

	Metastázy v uzlinách		
Stromální buňky	nepřítomny (0)	přítomny (1)	součet v řádku
0-10%	5	0	5
11-100%	11	12	23
Celk.	16	12	28
			p<0,033

Expresí proteinu MMP-19 u stromálních buněk má vliv na přítomnost nebo nepřítomnost uzlinových metastáz.

Tabulka 26. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. počet uzlinových metastáz.

Stromální buňky	Počet uzlinových metastáz				součet v řádku
	0	1	2	3	
0-10%	5	0	0	0	5
11-100%	11	3	6	3	23
Celk.	16	3	6	3	28
p<0,21					

Expres proteinu MMP-19 u stromálních buněk nemá vliv na počet uzlinových metastáz.

Tabulka 27. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. vzdálené metastázy.

Stromální buňky	Vzdálené metastázy		součet v řádku
	nepřítomny (0)	přítomny (1)	
0-10%	5	0	5
11-100%	12	11	23
Celk.	17	11	28
p<0,047			

Expres proteinu MMP-19 u stromálních buněk má vliv na přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz.

Tabulka 28. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. počet metastáz v uzlinách.

Stromální buňky	Umístění vzdálených metastáz				součet v řádku
	nepřítomné (0)	jaterní metastázi	metastázi v měkkých tkáních	metastázi v játrech a kostech (kyčle)	
0-10%	5	0	0	0	5
11-100%	12	8	2	1	23
Celk.	17	8	2	1	28
					p<0,27

Expres proteinu MMP 19 u stromálních buněk nemá vliv na umístění vzdálených metastáz.

Tabulka 29. Závislost MMP19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. stádia prorůstání nádorových buněk.

Stromální buňky	pT (prorůstání nádor. buněk do hloubky)					součet v řádku
	pT 0	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4	
0-10%	0	1	1	3	0	5
11-100%	2	2	5	11	3	23
Celk.	2	3	6	14	3	28
					p<0,79	

Expres proteinu MMP-19 u stromálních buněk nemá vliv na žádnou z kategorií prorůstání nádorových buněk.

Tabulka 30. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk u adenokarcinomu a níže diferenciovaném neuroendokrinním tumoru.

Stromální buňky	Typy karcinomů		součet v řádku
	adenokarcinom	níže diferenciovaný neuroendokrinním tumoru	
0-10%	3	2	5
11-100%	17	6	23
Celk.	20	8	28
			p<0,53

Nebyla nalezena závislost mezi expresí proteinu MMP-19 u stromálních buněk a adenokarcinomem a níže diferenciovaným neuroendokrinním tumorem.

Tabulka 31. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. stupeň diferenciace nádoru.

Stromální buňky	Stupeň diferenciace nádoru			součet v řádku
	G1	G2	G3	
0-10%	3	2	0	5
11-100%	6	10	4	20
Celk.	9	12	4	25
				p<0,35

Expres proteinu MMP-19 u stromálních buněk nemá vliv na stupeň diferenciace nádoru.

Tabulka 32. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. lokalizace nádorového onemocnění.

Stromální buňky	Vzdálené metastázi		součet v řádku
	Nádor recta C 20	Nádory tl. střeva C 18	
0-10%	4	1	5
11-100%	8	14	22
Celk.	12	15	27
			p<0,76

Expresí proteinu MMP-19 u stromálních buněk nemá vliv na lokalizaci nádoru.

Tabulka 33. Závislost MMP-19 pozitivních a negativních stromálních buněk vs. duplicitní a triplicitní malignity.

Stromální buňky	Duplicitní malignity			součet v řádku
	Primární nádor	Počet pacientů s duplicitní nádory	Počet pacientů s triplicitními nádory	
0-10%	3	2	0	5
11-100%	15	7	1	23
Celk.	18	9	1	28
				p<0,84

Nebyla nalezena závislost mezi pacienty s duplicitními nebo triplicitními nádory a pozitivitou nebo negativitou proteinu MMP-19 u stromálních buněk.

6. DISKUZE

Experimentální část této práce byla věnovaná detekci méně známého člena rodiny matrix metaloproteináz, a to MMP-19. Tento protein byl sledován u vybrané skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem se zaměřením na proces metastazování.

Z našich výsledků vyplývá, že nádorové buňky ovlivňují expresi proteinu MMP-19 u bazálních nenádorových buněk i stromálních buněk, což svým pozorováním potvrdili i Sena a kol. (2012) [80]. Věnovali se MMP-19, jako stromálnímu regulátoru kolorektálního karcinomu v jeho raných fázích. Protein MMP-19 je exprimován ve stromálních buňkách normální sliznice a jeho přítomnost dosahuje maximálních hodnot v nádorových procesech. Autoři zdůraznili důležitost funkce MMP-19 převážně ve stromatu při tvorbě nádorů. Barvení MMP-19 pak prokázalo nárůst exprese porovnáním normální sliznice střeva a sekvence microadenom-karcinomu. To je v souladu i s naším tvrzením o korelaci bazálních nenádorových buněk a adenokarcinomu. V našem souboru pacientů byly i případy výskytu nízcí diferencionavého neuroendokrinního tumoru u něhož byla taktéž prokázána korelace s nenádorovými buňkami. Z toho vyplývá, že tento protein může hrát roli při maligních transformacích. Však tyto různé vzory exprese vznikly pravděpodobně v důsledku různých rolí proteinu v kolorektálním karcinomu.

Bister a kol. (2004) [71] naopak tvrdí, že MMP-19 má sníženou regulaci v invazivním epitelu tlustého střeva a v progresi nádoru oproti ostatním MMP. To mohlo být způsobeno příležitostnou detekcí nádorových buněk a fibroblastů, jak sami popsali. Tvrzení o expresi MMP-19 v normální, nenádorové sliznici tlustého střeva je opět shodné.

Sena a kol. se věnovali i studii identifikace typů stromálních buněk produkujících MMP-19. MMP-19 byla exprimována stromálními fibroblasty ve vysokém procentu, makrofágy pak v menší množství, což je v souladu s údaji o typech těchto buněk exprimujících MMP-19 (Mauch a kol. 2002, Hieta a kol. 2003) [43, 109]. Několik studií na geneticky upravených myších modelech prokázaly při vzniku rakoviny přímou účast rezidentní fibroblastů (Kalluri a kol. 2003) [110]. Genetické a buněčné studie ukazují, že růst nádoru není určen jen maligními nádorovými buňkami, ale i nádorovým stroma (Lynch a kol. 2002) [111].

K dispozici jsou také přesvědčivé důkazy o významném vztahu mezi stromálními buňkami a buňkami kolorektálního karcinomu (nádorovými buňkami) v podpoře produkce MMP-19 buď v nádorových buňkách nebo ve stromálních buňkách (Liotta a kol. 2001, Lynch a kol. 2002) [111, 112]. Statisticky jsme k tomuto závěru došli i my.

Ze zhodnocení výsledků v této práci ještě vyplývá, že exprese proteinu MMP-19 má vliv na tvorbu vzdálených metastáz. Tohle popsali Zitka a kol.(2010) [110]. Tvrdí, že schopnost rakovinných buněk založit vzdálené kolonie je určující charakteristikou maligních tumorů. Okolní mikroprostředí nádoru aktivně napomáhá progresi tumoru, působí na invazi, vývoj rakoviny a tvorbu vzdálených metastáz. Důležité jsou mezibuněčné komunikace mezi nádorovými buňkami a buňkami stromatu.

V literatuře jsou uvedeny různé kontroverzní výsledky. MMP-19 je spojena s časnou nádorovou transformací z benigních lézí do mikro-invazivních karcinomů. Jasná role MMP při procesu metastazování však není objasněna. Protože exprese daného proteinu nebyla studována v pokročilých stádiích karcinomu kolorekta a byla studována na malém souboru pacientů, z uvedeného důvodu má daná práce význam pro nasměrování větší klinické studie v rámci magisterské práce, která bude zaměřena na ověření prognostického významu exprese MMP-19 ve stromatu a v nádorovém epitelu u časných a pokročilých stádií karcinomu střev.

7. ZÁVĚR

V této práci jsme hodnotili míru exprese proteinu MMP-19 v nádorové tkáni, v bazální nenádorové tkáni a ve stromálních buňkách. Posuzovali jsme vztah mezi pozitivitou/negativitou nádorových buněk a pozitivitou/negativitou stromálních buněk vzhledem k výskytu vzdálených metastáz, k tvorbě metastáz v uzlinách, k diferenciaci nádoru a pT nádoru. Veškeré tyto výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí softwaru Statistica 8. Bylo zjištěno, že nádorové buňky ovlivňují expresi proteinu MMP-19, a to jak u bazálních nenádorových buněk, tak u stromálních buněk. Bazální nenádorové buňky ovlivňují expresi proteinu MMP-19 i u stromálních buněk. Dále byl prokázán vliv exprimovaného proteinu MMP-19 na tvorbu uzlinových metastáz. Nalezen byl i vztah mezi bazálními nenádorovými buňkami a adenokarcinomem i s níže diferenciovaným neuroendokrinním tumorem. Uvedené výsledky jsou však jenom předběžné, jelikož byly vypracovány pro malou skupinu pacientů, nicméně naznačují určitý trend, který bude ověřený na větším souboru pacientů v rámci magisterské práce.

Seznam použitých zkratk

ABC	Avidin-biotinový komplex
ALB	Bovinní albuminové frakce
Anti-K	Prasečí protilátka, zaměřená proti králičí primární protilátce
BAX	Protein podílející se na regulaci apoptotického procesu
BLC-2	Protein, se schopností regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány
CA-MMP	Proteinázy zprostředkovávající adhezi
CBD	Kolagen vázající doména
cDNA	DNA knihovna klonovaných fragmentů
CDK	Cyklindependetní kinázy
CMMP	MMP naklonovaná z kuřecích embryonálních fibroblastů
CRC	Kolorektální karcinom
DAB+	Chromogen 3,3-diaminobenzidin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina, nositel genetické informace
ELISA	Enzymová imuno-analýza antigenu
EMC	Extracelulární matrix
FITC	Fluorescein isothiokyanát
G	Grading vyjadřuje stupeň diferenciacie nádoru podle buněčné zralosti
G ₀	Fáze buněčného cyklu, kdy se buňka již dále nedělí
G ₁	Fáze buněčného cyklu, navazující na mitózu
G ₂	Fáze buněčného cyklu, která následuje po S fázi
HPX	Hemopexinová doména nezbytná a charakteristická pro kolagenózy
HRP	Kořenová peroxidáza
IGFBP	Inzulinu podobný růstový faktor-binding protein
IGF	Inzulinu podobný růstový faktor
IHC	Imunohistochemie
IR	Infračervená fluorescence
K anti-hum	Králičí protilátka zaměřená proti lidským antigenům
Kpap	Králičí protilátka proti peroxidáze
LF	Lékařská fakulta
LOD	Fluorimetrická metoda s nízkými limity detekce
M	Fáze buněčného cyklu, v níž probíhá buněčné dělení
MMP	Matrix metaloproteinázy

MT-MMP	Membránový typ matrix metaloproteináz
NOXA	Proapoptický kódující protein
PAP	Peroxidáza-anti-peroxidázový komplex
PAR	Proteinázami aktivovaný receptor
PBS	Fosfátový pufr
PCR	Metoda založená na polymerní řetězové reakci (Polymerase Chain Reaction)
pT	Peritoneální nádor, klasifikace nádoru podle určitého stádia prostupnosti do střevní stěny
PUMA	Cílový gen transkripčního faktoru p53
pRB	Retinoblastomový protein, jaderný transkripční faktor
p53	Tumor supresorový protein
qRT-PCR	Kvantitativní reverzní transkripce-polymerázovou řetězovou reakcí
R	Bod restrikce (Restriction.Point, R-point)
RASI	Gen přítomný v synoviální tkáni revmatoidní artritidy
S	Fáze buněčného cyklu, během které je zdvojena genetická informace
SABC	Streptavidin-biotinový komplex
TMA	Blok tkáňové mikro-array
TIMPs	Tkáňové inhibitory matrix metaloproteinázy
UP	Universita Palackého
VEGF	Vaskulární endoteliový růstový faktor - signální protein produkovaný buňkami stimulující angiogenezi
XM-MMP	Membránová MMP z Drápatky vodní (<i>Xenopus laevis</i>)

8. LITERATURA

1. Kiss, I. – Tomášek, J. O nádorech tlustého střeva a konečníku, Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Linkos, 2006
2. Petruželka, L. - Konopásek, B. a kol. Klinická onkologie. Praha, Karolinum, 2003, s. 274, ISBN 80-246-0395-0.
3. L. Dušek, L. - Mužík, J. - Malúšková, D. - Májek, O. - Pavlík, T. - Abrahámová, J. - Vyzula, R. – Fínek, J. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v ČR, výtah z kapitoly Ladislav Dušek, L. a kol. Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat, Fakultní nemocnice v Motole, 2012, Praha, s. 204, ISBN 978-80-87347-07
4. Vyzula, R. Kolorektální karcinom – vedoucí pozice v incidenci na světě, významný zdravotní problém České republiky, Klinika komplexní onkologické péče MOÚ, 2009, Brno
5. Kocáková I. Cetuximab – biologická léčba metastazujícího kolorektálního karcinomu Remedia 2005; vol. 15, s. 463–468.
6. <http://www.svod.cz/analysez.php#>
7. <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=vek#>
8. <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>
9. Regionální diferenciacie výskytu kolorektálního karcinomu v ČR (online, cit. 2006-4-11). Dostupné http://www.demografie.info/?cz_detail_clanku&artclID=399
10. Peta, M. - Holubec, L.jr. - Černá, M. - Topolčan, O. - Fínek, J., - Holubec, L. sen. - Kormunda, S. – Svobodová, Š. - Svačina, Š. - Matoulek, M. - Černý. R. Expresse matrixových metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2, MMP-7) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 1 a 2 (TIMP-1, TIMP-2) u kolorektálního karcinomu měřená kvantitativní RT- PCR. Edukační Sborník, XXVIII. Brněnské onkologické dny. 5/2004, s. 76-78. ISBN 80-86793-01-X
11. Stádia kolorektálního karcinomu (online, cit. 2011-01-30)
Dostupné: http://www.labtestsonline.cz/condition/Condition_ColonCancer.html?idx=5
12. <http://www.rakovinastreva.cz/diagnoza/stadia-onemocneni/>

13. Králíčková, M. - Tonar, Z. Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty. Ústav histologie a embryologie LF UK. Plzeň, 2002, s. 5-7
14. Visse, R. – Nagase, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, *Circ Res.* 2003, Vol. 92, p. 827-839
15. Nagase, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *Biological Chemistry*, 1997, Vol. 378(3-4), p. 151-160
16. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999, Vol. 274, p. 21491–21494.
17. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001, Vol. 17, p. 463–516.
18. Woessner JF. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP, eds. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego, Calif: Academic Press, 1998, p. 1–13.
19. Crawford, H. C. – Matrisian, L. M. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invas Metast.* 1994-95, vol. 14, s. 234 – 235.
20. Kukačka, J. – Kizek, R. – Průša, R. Budoucnost zinkových metaloproteinů v laboratorní medicíně *Klin. Biochem. Metab.* 2008, vol. 16 (37), s. 161–170.
21. Z vědeckých pracovišť, Online cit. Dostupné: <http://www.ocol.cz/cs/novinky/clen-kr-oco-obdrzel-pawlikovu-cenu>
22. Curry T.E. - Osteen K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev.* 2003, vol. 24, p. 428-65.
23. <http://www.okbpavlin.cz/prirucka/KZAAE.htm>
24. Babičková, L. Prognostický význam promotorového polymorfismu matrix metaloproteinázy-1 na časnost metastazování bronchogenního karcinomu, Brno 2001, s. 31, Kandidátská disertační práce na Lékařské fakultě Masarykovy University, Klinika nemocí plicních a tuberkulózy Fakultní Nemocnice Brno, Bohunice. Vedoucí práce Prof. MUDr. Janě Skříčkové, CSc.

25. Van Wart, H. E. - Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, p. 5578 - 5582 .
26. Becker, J. W. - Marcy, A. I. - Rokosz, L. L. - Axel, M. G. - Burbaum, J. J. - Fitzgerald, P. M. - Cameron, P. M. - Esser, C. K. - Hagmann, W. K. - Hermes, J. D. - Springer J. P. Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme, *Protein Sci*, 1995, Vol. 4, p. 1966 - 1976 .
27. Bode W. - Gomis-Ruth F. X. - Stöcker W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins', *FEBS Lett.* 1993, Vol. 331, p. 134 - 140 .
28. Allan J. A. - Docherty A. JP - Barker P. J. - Huskisson N. S. - Reynolds J. J. - Murphy G. , *Biochem. J.*, 1995, Vol. 309, p. 299 - 306 .
29. Allan J. A. - Docherty A. J.P. - Barker P. J. - Huskisson N. S. - Reynolds J. J. - Murphy G. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen, *Biochem. J.*, 1995, Vol. 309, p. 299 - 306 .
30. Bode W. A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain, *Structure*, 1995, Vol. 3, p. 527 - 530 .
31. Murphy G. - Willenbrock F. - Ward R. V. - Cockett M. I. - Eaton D. - Docherty A. J.P *Biochem. J.*, 1992, Vol. 283, p. 637 - 641 .
32. Strongin A. Y. - Collier I. - Bannikov G. - Marmer B. L. - Grant G. A. - Goldberg G. I. Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase isolation of the activated form of the membraně metalloproteinase, *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, p. 5331 - 5338
33. De Souza S. J. - Pereira H. M. - Jacchieri S. - Brentani R. R. Collagen/collagenase interaction: does the enzyme mimic the conformation of its own substrate?, *FASEB J.*, 1996, Vol. 10, p. 927 - 930 .

34. Mueller, M. S.- Mauch, S. – Sedlacek, R. Structure of the human MMP-19 gene. Elsevier Science, 2000, vol. 252, s. 27–37.
35. Krizkova, S. – Zitka, O. – Adam, V. – Kizek, R. – Masarik, M. – Stiborova, M. – Eckschlager, T. – Chavis, G.J. Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity, Trends in Analytical Chemistry, 2011, Vol. 30, s. 1821-1824
36. Bode, W. Structural basis of matrix metalloproteinase function. In Proteases and the Regulation of Biological Processes. Portland Press Ltd, London, 2003, vol. 70, s. 1-14.
37. Lafleur, M. A. - Handsley, M. M. – Edwards, D. R. Structure - dependent subgrouping of the matrix metalloproteinases (MMPs), Clinical and Biomedical Computing Unit, 2003, Vol. 5
38. Lennarz, W.J. - Lane, M. D. Encyclopedia of biological chemistry. Oxford: Elsevier academic press, 2004, s. 657-665
39. Rawlings, N. D. – Salvesen G. S. Handbook of proteolytic Enzymes Academic Press, 3.vyd. 2012, ISBN 978-0-12-382219-2
40. Pendas, A.M. – Knauper, V. – Puentex, 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, Vol. 7, p. 4281-4286.
41. 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, Vol 2, p. 494-498
42. Palosri, H. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue, *Acta Univ. Oul. D*, 2003, Vol. 739, p. 33
43. 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, Vol. 3, p. 1244-1251.
44. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=MMP-19>

45. Bister, V.O. – Salmela, M.T. – Karjalainen-Lindsberg, M.L. – Uria, 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, Vol. 4, p. 653-661.
46. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/22549/novelmat.pdf?sequence=2>
(Stracke et al. 2000a,2000b).
47. Fanjul-Fernandez, M. – Folgueras, A.R. – Cabrera, S. – Lopez-Otin, C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models, *Biochem. Biophys. Acta* 1803, 2010, p. 3-19
48. Poente, X.S. – Sanchez, L.M. – Overall, C.M. – Lopez-Otin, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach, 2003, *Nat. Rev. Genet.*, Vol. 4, p. 544-588
49. Page-McCaw, A. – Ewald, A.J. – Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol. 8, p. 221-233
50. MMP19 matrix metalloproteinase 19 (online, cit. 2013-04-16) Dostupné: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4327>; Poskytnuté RefSeq, leden 2013
51. Kolb, C. – Mauch, S. – Peter, H.H. – Krawinkel, U. – Sedlacek, R. The matrix metalloproteinase RAS1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunol Lett*, 1997, Vol. 1-3, p. 83-88.
52. Chn, K.C.K.J. – Lung, H.L. – Sedlacek, R. – Zhang, Z.F. – Lud, D.Z. – Feng, Z.B. – Chen, S. – Chen, H. – Chan, K.W. – Tsao, S.W. – Chua, D.T. Zabarovsky, E.R. – Stanbridge, E.J. – Lung, M.L. Catalytic activity of matrix metalloproteinases-19 is essential for tumor suppressor and anti-angiogenic activities in nasopharyngeal carcinoma, *Int. J. Cancer*, 2010, Vol. 29, p. 1826-1837
53. <http://herkules.oulu.fi/isbn9514270789/html/x561.html>
54. Curran, S. - Murray G.I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *Journal of pathology, J. Pathol.*, 1999, vol. 189, s. 300–308
55. Becker, H.D. – Hohenberger, W. – Junginger, T. – Schlag, P.M. *Chirurgická onkologie*, Grada Publishing a.s. 1.vyd. 2005, Kap. 1, ISBN 8024707209, 9788024707204

56. Klein, J. Chirurgie karcinomu plic, Grada Publishing a.s., 2006, Kap. 1, ISBN 9788024713847
57. Curran, S. - Murray, G.I Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis, European Journal of Cancer, 2000, Vol. 36, p. 1621–1630
58. Lukešová, Š. - Kopecký, O. - Dvořák, J. - Hlávková, D. - Vroblová, V. Nádorová angiogeneze, Vnitř Lék, 2006, Vol. 52(9), s. 797
59. Říhová B. Protinádorová imunita a nové přístupy při léčení nádorových onemocnění. Projekt Otevřená věda – sborník, Akademické a univerzitní centrum Nové hrady, 2005, s. 41-53.
60. http://www.angioworld.com/cast/cast_4.htm
61. Slezáková, L. a kolektiv Ošetrovatelství v chirurgii I., Grada Publishisg a.s. 2010, Kap. 1, ISBN 978-80-247-3129-2
62. Nelson, A. R. – Fingleton, B. - Mace Rothenberg, L. – Lynn, M.M. Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications, JCO, 2000, Vol. 18, p. 1135
63. Sternlicht, M.D, - Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 17, 2001, s. 463–516.
64. Brew, K – Dinakarandian, D. – Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta1477, 2000, p. 267–283.
65. Sengupta, N. - MacDonald, T. T. The Role of Matrix Metalloproteinases in Stromal/ Epithelial Interactions in the Gut, PHYSIOLOGY 22, 2007, p. 401–409
66. Kirkegaard, T. – Hansen, A. – Bruun, E. – Brynskov, J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. Gut 53, 2004, p. 701–709.
67. Cousenes L.M., Fingleton B., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science. 2002, Vol. 295, p. 2387 – 92.
68. Balbin M., Fueyo A., Tester A.M., Pendas A.M., Pitiot A.S., Astudillo A., Overall C.M., Shapiro S.D., Lopez-Otin C. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. Nat Genet. 2003, Vol. 35, p. 252 – 7.

69. Müller, M. – Beck, I.M. – Gadesmann, J. – Karschuk, N. – Paschen, A. – Proksch, E. – Djonov, V. – Reiss, K. – Sedlacek, R. MMP19 is upregulated during melanoma progression and increases invasion of melanoma cells, *Mod Pathol*, 2010, Vol. 23, s. 511-521
70. Impola, U. – Toriseva, M. – Suomela, S. – Jeskanen, L. – Hieta, N. – Jahkola, T. – Grenman, R. – Kähäri, V.M. - Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinase-19 is expressed by proliferating epithelium but disappears with neoplastic dedifferentiation. *Int J Cancer*, 2003, Vol. 103, p. 709-716
71. Bister, V.O. – Salmela, M.T. - Karjalainen-Lindsberg, M.L. – Uria, 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. *Dig Dis Sci*, 2004, Vol 49, p. 653-661
72. Jost, M. – Folgueras, A.R – Frérart, F. et al. Earlier Onset of Tumoral Angiogenesis in Matrix Metalloproteinase-19–Deficient Mice, *Cancer Res*, 2006, Vol. 66, p. 5234-5241
73. Pendas, A.M - Folgueras A.R – Llano, E, et al. Diet-induced obesity and reduced skin cancer susceptibility in matrix metalloproteinase 19-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 2004, Vol. 24, p. 5304–13
74. Beck, I.M. - Ruckert, R. - Brandt, K. - Mueller, M.S. - Sadowski, T. - Brauer, R. - Schirmacher, P. - Mentlein, R. - Sedláček, R. MMP19 is essential for T cell development and T cell-mediated cutaneous immune responses, Institute of Biotechnology, Prague, 2008, Kap. 1, ISBN 1932-6203
75. Toshimichi Asano, T. M.D. - Tada Mitsuhiro , M.D. - Shaoqiang Cheng, M.D. et al. Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma, *Journal of Surgical Research*, 2008, Vol. 146, p. 32-42
76. Lettau, I. – Hattermann, K. - Held-Feindt, J. – Brauer, R. – Sedlacek, R. – Mentlein, R. Matrix metalloproteinase-19 is highly expressed in astroglial tumours and promotes invasion of glioma cells, *Neuropathol Exp Neurol*, 2010, Vol. 69, s 215-223
77. 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, Vol. 14, p. 4569-4580

78. Djonov, V. – Högger, 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, Vol. 195, s. 147-155
79. Abraham, R. – Schafer, J. – Rothe, M. – Bange, J. – Knyazev, P. – Ullrich, A. Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells. *J Biol Chem*, 2005, Vol. 280, s. 34123-34132
80. Sena, P. – Mariani, F. – Marzona, L. – Benincasa, M. – Leon, P.M. – Palombo, C. – Roncucc, L. Matrix metalloproteinases 15 and 19 are stromal regulators of colorectal cancer development from the early stages, *International journal of oncology*, 2012, Vol. 41, p. 260-266
81. Corbett research: Protocol for DNA Amplification Detection in Real-Time PCR Using Sybr-green I Intercalating Dye
82. Fingleton, B.M – Heppner Goss, K.J – Crawford, H.C – Matrisian, L.M. Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS* 1999, vol. 107, p. 102-110
83. Murphy, G. - Nagase, H. Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment, *Febs J*, 2010, Vol. 278, p. 2.
84. Murphy, G. - Nagase H. Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity, *Molecular Aspects of Medicine*, 2008, Vol. 29, p. 290–308
85. Dollery, C.M. – McEwan, J.R. - Henney, A.M. Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease, *Circulation Research*, 1995, Vol. 77, p. 863
86. Weissleder, R. - Tung, C.H. - Mahmood, U. - Bogdanov, A. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes, *Nat. Biotechnol.*, 1999, Vol. 17, p. 375.
87. Machado, D.E. - Berardo, P.T. - Palmero, C.Y. - Nasciutti, L.E. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases, *J. Exp.Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 29, p. 9.
88. Tung, C.H. - Mahmood, U. - Bredow, S. - Weissleder, R. In vivo imaging of proteolytic enzyme activity using a novel molecular reporter, *Cancer Res*, 2000, Vol. 60, p. 4953.

89. Cheng, X.C. - Fang, H. - Xu, W.F. - J. Advances in assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors, *Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 2008, Vol. 23, p. 154.
90. Cawston, T.E. Measurement of activity of collagenolytic MMP and inhibitors of MMPs using radiolabeled collagen substrate, *Nat. Protoc.*, 2009, Vol. 4, p. 286.
91. Koritsas, V.M. - Atkinson, H.J. An assay for detecting nanogram levels of proteolytic enzymes, *Anal. Biochem.*, 1995, vol. 227, p. 22.
92. Kupai, K. - Szucs, G. - Cseh, S. - Hajdu, I. - Csonka, C. - Csont, T. – Ferdinandy, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2010, Vol. 61, p. 205
93. Bartunková, J. – Paulík, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing a.s., 2011, 2. Vyd. Kap. 3, ISBN 9788024735337
94. Penka, M. - Tesarova, E. a Kolektiv Hematologie a transfuzní lékařství I – Hematologie, Grada Publishing a.s., 2011, Kap. 3, ISBN 9788024734590
95. <http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node4.html>
96. Kuchynka, P. a kolektiv, *Oční lékařství*, Grada Publishing a.s., 1.vyd. 2007, Kap. 5, ISBN 978-80-247-1167-8
97. Bartůňková, J. - Paulík, M. a kolektiv, *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing a.s., 2005, Kap. 2, ISBN 978-80-247-0691-1
98. Dvořák, K. – Dvořáková, Z. – Feit, J. – Lukáš, Z. – Mardová, J. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*, 2008
99. Beranová, E. Zavedení imunohistochemické detekce rychlého a pomalého myozinu k typové klasifikaci svalových vláken v myopatologické diagnostice. Brno, 2010, s. 34-36. Bakalářská práce na Ústavu patologie LF MU a FN Brno. Vedoucí práce MUDr. Ondřej Souček
100. Feit, J. Atlas patologie pro studenty medicíny. On-line. 10.12.2011. http://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/sect_main.html
101. Čech, S. – Horký, D. *Přehled obecné histologie*, Vydala Masarykova univerzita v Brně, 1. vyd. 2005, Kap. 1.

102. Vyhlídalová, P. Příprava a charakterizace vodních roztoků a filmů atelokolagenu I. Zlín, 2010, s. 26, 27. Diplomová práce na Universitě Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
103. Masopust, J. Nádorové markery, Včera, dnes a zítra (3. část), Labor Aktuell 2004
104. Galileo TMA CK Family, Integrated system engineering srl, Dostupné: <http://www.isenet.it/product.php?id=1>
105. Schneider, P. Proteomics goes cellular, Strategic insights, 2004. Online dostupné. http://www.bio-itworld.com/archive/021804/strategic_proteomics.html
106. Pathology, (online, cit. 2011-03-15) Dostupné: <http://medicine.yale.edu/pathology/research/tissueservices/tissuemicroarrayfacility/what.aspx>
107. <http://www.actasurologicas.info/eng/jan2006/v30n1p25.htm>
108. Vomik, M. Karcinomy hlavy a krku, (Online, dostupné: <http://www.lfhk.cuni.cz/onkol/NEW/standardy-hlava-krk.html>)
109. Hieta N, Impola U, López-Otín C, Saarialho-Kere U and Kähäri VM: Matrix metalloproteinase-19 expression in dermal wounds and by fibroblasts in culture. *J Invest Dermatol*, Vol. 121, p.997-1004, 2003.
110. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis, 2003, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, Vol. 3, p. 422-433, 2003.
111. Lynch, C.C. – Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases in tumour-host cell communication. *Differentiation*, 2002, Vol. 70,p. 561-573
112. Liotta, L.A. – Kohn, E.C. The microenvironment of the tumourhost interface. *Nature*, 2001, Vol. 411, p. 375-379