

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Expresí matrix metaloproteináz u tubulárních adenomů ve
srovnání s expresí u kolorektálních karcinomů**

Bakalářská práce

David Míšek

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Bioorganická chemie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

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

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Mgr. Marty Khoylou, Ph. D. a že jsem zde uvedl všechny zdroje, ze kterých jsem čerpal. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Olomouci

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval Mgr. Martě Khoylou Ph.D. za obětavé a trpělivé vedení mé práce, za podnětné a cenné rady a za předání mnoha zkušeností. Také bych rád poděkoval MUDr. et MVDr. Jozefu Škardovi Ph.D. za odbornou konzultaci a za patologické vyhodnocení vzorků.

Souhrn

Kolorektální karcinom je závažné nádorové onemocnění s vysokou incidencí ve vyspělých zemích. Vznik kolorektálního karcinomu je dlouhodobý a složitý proces, jedním z enzymů, které jsou úzce spojeny s procesem kancerogeneze a šířením nádoru jsou matrixové metaloproteinázy. Některé enzymy z rodiny metaloproteináz mohou sloužit jako prognostické faktory a proto jsou v kolorektálních adenomech bedlivě sledovány. Tato práce se zaměřila na matrix metaloproteinázu – 19 (MMP-19) jejíž role se v posledních letech studuje a doposud není zcela přesně popsána.

Zaměřili jsme se na porovnání exprese MMP-19 u kolorektálních adenomů a adenokarcinomů. K detekci jsme využili nepřímou imunohistochemickou metodu a sledovali jsme přítomnost enzymu v cytoplazmě buněk, v bazálních buňkách a ve stromálních buňkách. Z analýzy získaných dat jsme zjistili úbytek proteinu v bazálních buňkách adenokarcinomů. Jako negativní faktor pro přežití jsme pozorovali expresi MMP-19 ve stromálních buňkách adenokarcinomů. Naše výsledky naznačují, že MMP-19 hraje roli v procesu maligní transformace adenomu v adenokarcinom a poté její přítomnost ve tkáni klesá.

Summary

Colorectal carcinoma is severe cancer with high incidence in western countries. Development of colorectal cancer is long and complicated process, one of the enzymes which are closely connected with process of carcinogenesis and tumor spreading are matrix metalloproteinases. Some enzymes from this family can serve as a prognostic factors and thus they are being studied and observed in adenomas. This work has focused on Matrix metalloproteinase – 19, which role is not completely understood and its being studied lately.

We focused on comparison of expression MMP-19 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. For detection we used indirect immunohistochemical method and we analyzed presence of enzyme in cell cytoplasm, in basal cells and in stromal cells. We observed lower presence of enzyme in basal cells of adenocarcinoma. As negative factor for survival we observed expression of MMP-19 in stromal cells in adenocarcinomas. Our results suggests, that MMP-19 might have paly role in process of malignant transformation from adenomas to adenocarcinomas and then its presence in tissue is decreasing.

Obsah

| | | |
|-------|--|----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Současný stav řešené problematiky | 2 |
| 2.1 | Kolorektální karcinom | 2 |
| 2.1.1 | Vznik kolorektálního karcinomu | 3 |
| 2.1.2 | Epidemiologie | 4 |
| 2.1.3 | Histologické typy karcinomů | 7 |
| 2.2 | Adenokarcinom | 7 |
| 2.2.1 | Staging | 8 |
| 2.3 | Adenom | 11 |
| 2.3.1 | Histologické rozdělení adenomů | 12 |
| 2.3.2 | Tubulární adenomy | 13 |
| 2.4 | Matrixové metaloproteinázy | 14 |
| 2.4.1 | Rozdělení MMP | 14 |
| 2.4.2 | Struktura MMP | 16 |
| 2.4.3 | Aktivace, inhibice a regulace MMP | 17 |
| 2.4.4 | MMP a kolorektální karcinom | 18 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.4.5 | MMP-19 | 18 |
| 2.4.6 | MMP-19 a kolorektální karcinom | 21 |
| 2.5 | Imunohistochemie | 21 |
| 2.5.1 | Základní typy metod | 22 |
| 2.5.2 | Tkáňové mikroarray | 23 |
| 3 | Cíle práce | 25 |
| 4 | Experimentální část | 26 |
| 4.1 | Materiál a metodika | 26 |
| 4.2 | Imunohistochemická detekce MMP-19 | 27 |
| 4.2.1 | Příprava roztoků | 27 |
| 4.2.2 | Imunohistochemická detekce | 29 |
| 5 | Výsledky | 33 |
| 6 | Diskuze | 42 |
| 7 | Závěr | 44 |
| 8 | Literatura | 45 |
| 9 | Seznam použitých zkratk | 50 |

1 Úvod

Jedním z nejčastějších nádorových onemocnění v České republice je kolorektální karcinom. Na toto závažné nádorové onemocnění tlustého střeva a konečníku ročně v ČR umírá přes 4000 pacientů (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2016-01-05-]). Ke vzniku nádorového bujení přispívá mnoho rizikových faktorů jako životní styl, stravovací návyky a rodinná anamnéza (URL:<<http://www.linkos.cz>> [cit. 2016-4-01]). Důležitý je však také věk, protože s věkem přibývají v tlustém střevě a konečníku nejrůznější polypy jako jsou např. adenomy. Z těchto adenomů vznikají adenokarcinomy, které jsou maligní a jsou nejčastějšími kolorektálními karcinomy (Fleming *et al*, 2012).

Proces přeměny adenomu v adenokarcinom trvá roky a odehrává se při něm spousta molekulárních událostí a účastní se jich mnoho různorodých biologicky aktivních látek. Jedním z nich jsou matrixové metaloproteinázy, což jsou zinkové endopeptidázy, které se účastní především degradace nejrůznějších komponent extracelulární matrix. Hrají svou roli v procesech angiogeneze, metastázování, růstu a šíření buněk (Mueller *et al*, 2000; Rydlová *et al*, 2008). Některé z metaloproteináz se přímo účastní procesu karcinogeneze u různých nádorových onemocnění. Například MMP-12 je pozitivním prediktivním faktorem u kolorektálního karcinomu (Rebecca, 2004).

Jedna z metaloproteináz, MMP-19 vykazuje protektivní i progresivní účinky na vývoj kolorektálního karcinomu (Sena *et al.*, 2012). Anti-angiogenický účinek omezuje vznik nových kapilár a zásobování karcinomu krví. Na druhou stranu je schopna MMP-19 podporovat proliferaci a migraci buněk (Brauer *et al.*, 2004). Některé studie zdůrazňují zvyšování exprese MMP-19 během procesu přeměny normální tkáně v adenom a následně adenokarcinom (Sena *et al.*, 2012). Přesná role MMP-19 v procesu vývoje kolorektálního karcinomu je stále předmětem intenzivního studia a následující rešerše zachycuje složitou problematiku.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC - colorectal carcinoma) je nádorové onemocnění tlustého střeva a konečníku (Hoch, 2005). Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-O) označuje zhoubné novotvary tlustého střeva a konečníku kódy C18 (zhoubný novotvar tlustého střeva) až C20 (zhoubný novotvar konečníku) určujících jejich lokalizaci. Pojem kolorektální karcinom tedy zahrnuje všechny karcinomy v těchto oblastech (Sobinet *et* Wittekind, 2000). Většinu nádorů tlustého střeva tvoří adenokarcinomy. Jsou to nádory vznikající ze žláznatých buněk střevní sliznice. V tlustém střevu se mohou vzácně vyskytovat i jiné zhoubné nádory, např. lymfom nebo karcinoid (URL:<<http://www.linkos.cz>> [cit. 2016-4-01]). U většiny nemocných je přesná příčina vzniku kolorektálního karcinomu neznámá. Jsou ale rizikové faktory, které možnost vzniku onemocnění zvyšují. Věk je jedním z těchto faktorů. Většinou toto onemocnění vzniká ve věku nad 50 let. Dalším rizikovým faktorem jsou některé druhy polypů. Polypy jsou výrůstky ze stěny střeva. Z některých těchto polypů může během dlouhé doby vzniknout karcinom. Dědičné vlivy mají také význam pro vznik kolorektálního karcinomu. Vyšší riziko je v případě výskytu kolorektálního karcinomu v pokrevním příbuzenstvu 1. stupně, tedy u rodičů nebo sourozenců. V některých případech je genetická porucha takového charakteru, že je vznik karcinomu téměř jistý. Patří sem například familiární adenomatózní polypóza (FAP), která se projevuje vznikem mnoha stovek polypů v tlustém střevě a konečníku. Velmi důležitým rizikovým faktorem je složení potravy. Jednoznačně negativní vliv má nadměrný příjem živočišných tuků, červeného masa a uzenin. Riziko zvyšuje častá úprava masa smažením a pečením. Nepřiměřeně vysoký kalorický příjem spojený s obezitou je spojen také s větším rizikem této nemoci. Dalším rizikovým faktorem je nízký příjem vlákniny v zelenině, ovoci, celozrnném pečivu a luštěninách a nedostatek pohybu (Jablonská, 2000; URL:<<http://www.linkos.cz>> [cit. 2016-4-01]).

V časných stádiích onemocnění mohou být potíže nevýrazné. Varovným znamením je krvácení z konečníku nebo příměs krve ve stolici. Nádor může svým růstem vyvolat i střevní neprůchodnost. Kolorektální karcinom může dlouho růst bez jakýchkoliv příznaků a projeví

se až v pokročilém stádiu onemocnění (Jablonská, 2000; URL:<<http://www.linkos.cz>> [cit. 2016-4-01]).

2.1.1 Vznik kolorektálního karcinomu

Naprostá většina kolorektálních karcinomů vzniká maligním zvratem adenomu. Adenom tlustého střeva je proto pokládán za nejzávažnější prekancerózní lézi. V současné době se předpokládá, že vývoj karcinomu probíhá v následujících fázích: normální epitel – ložisko dysplastických aberantních krypt – adenom s nízkým rizikem maligního zvratu – adenom s vysokým rizikem maligního zvratu – maligní zvrát adenomu v adenokarcinom – metastazující adenokarcinom (Jablonská, 2000).

Transformace normálního epitelu v adenom a dále v karcinom je spojena s průběhem několika molekulárních událostí. V současnosti existují 2 hlavní molekulární cesty, které mohou vést až k CRC. Většina CRC existuje díky mutacím, které ústí v tzv. chromozomální instabilitu (CIN). Menší část CRC vykazuje charakteristický vzor genové hypermetylace z nichž část vykazuje tzv. mikrosatelitovou instabilitu (Coufal, 2003; URL:<<http://www.cancer.gov>> [cit. 2016-04-01]). Spektrum somatických změn přispívajících ke karcinogenezi je velké množství, jednotlivé nádory obsahují v průměru 9 mutací (URL:<<http://www.cancer.gov>> [cit. 2016-04-01]).

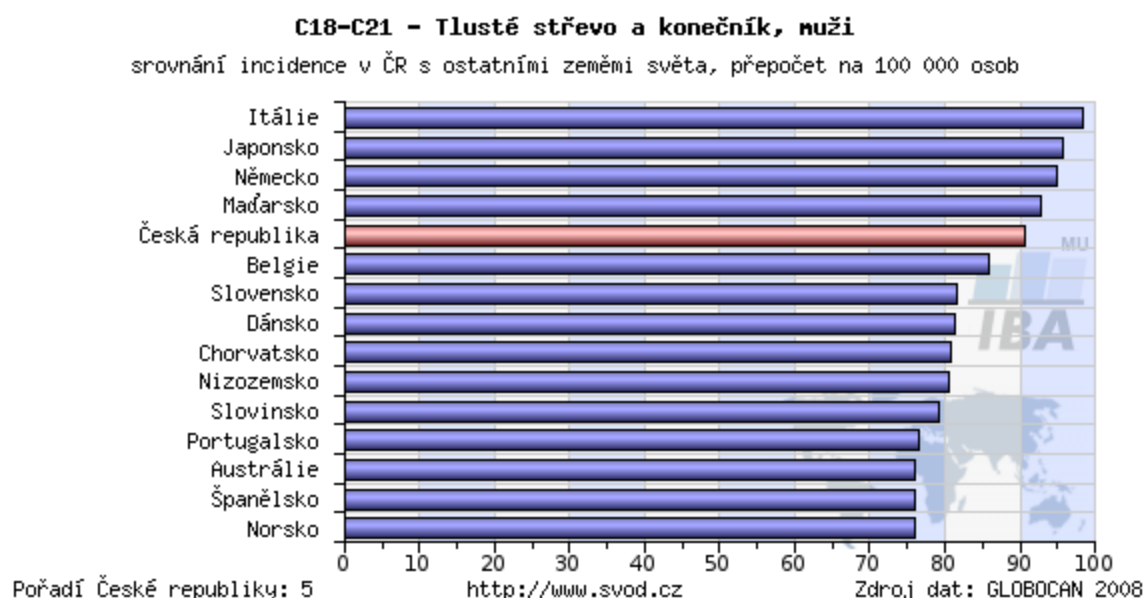
Zhruba u 70 – 75 % případů výskytu karcinomů se jedná o sporadické karcinomy bez zjevného důkazu o nějaké formě dědičnosti. Sporadický výskyt CRC je častý u jedinců obou pohlaví nad 50 let a pravděpodobně vzniká jako důsledek kombinace vlivů vnějšího prostředí, nevhodného stravování, náhodných jevů v metabolických procesech buněk, stárnutí organismu a kumulace somatických mutací v buňce (Vyzula *et* Žaloudík, 2007; URL:<<http://www.cancer.gov>> [cit. 2016-04-01]). Zbýlých 25-30% případů CRC se řadí mezi familiární formy. Zahrnují případy kumulace nádorů v rodině, kdy je incidence CRC zřetelně vyšší než v běžné populaci. Ke kumulaci nádorů může docházet v důsledku kombinace negenetických faktorů a vlivů alterací v genech s nízkou penetrací. Mutace v protoonkogenech a v DNA reparačních genech mohou mít vliv na zvýšenou nádorovou predispozici. U 5 - 10% pacientů lze pozorovat výraznou dědičnou predispozici. Označují se

jako Hereditární syndromy a mohou to být případy s velkým množstvím polypů (FAP- Familiární adenomatózní polypóza) tak i případy bez polypů (HNPCC) Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, také označován jako Lynchův syndrom (Vyzula *et* Žaloudík, 2007).

2.1.2 Epidemiologie

Kolorektální karcinom je jednou z nejčastějších onkologických diagnóz a ve všech vyspělých státech jeho incidence setrvale narůstá. Česká republika navíc obsazuje přední místa v mezinárodním srovnání (Dušek, 2012). Incidence ve světě je nevyšší v západní Evropě (Německo), v severní Americe a v posledních letech se zvyšuje v Japonsku a Itálii (Jablonská, 2000).

Česká republika patří mezi přední země co se incidence a úmrtnosti na 100 000 obyvatel týče. Podle údajů z roku 2013 z Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (IARC) zaujímá Česká republika ve světě 6. místo u mužů a 11. místo u žen (URL:<<http://www-dep.iarc.fr>> [cit. 2016-04-01]). V roce 2008 byla Česká republika ve světě na 5. místě pořadí incidence (viz. **Obr. 1**)



Obr. 1: Srovnání incidence v ČR s ostatními zeměmi světa u mužů (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit.2016-01-05-]).

Následující tabulka podává údaje z národního onkologického registru (NOR). V roce 2010 byla v České republice incidence a mortalita na zhoubné novotvary kolorekta a řitního kanálu na druhém místě u mužů i u žen (viz **Tab. 1**),(NOR, 2013).

Muži

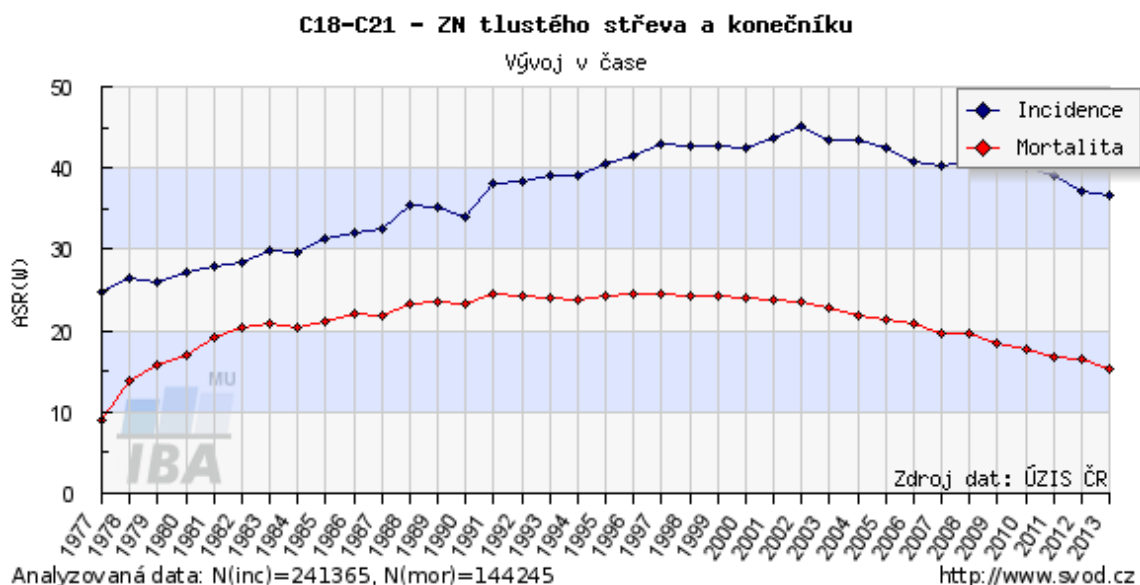
| Diagnóza | Absolutní incidence | Absolutní Mortalita |
|--|---------------------|---------------------|
| C61 ZN Prostaty | 6 771 | 1 348 |
| C18-21 ZN Kolorekta | 4 951 | 2 271 |
| C33–C34 ZN Průdušnice, průdušky, plíce | 4 641 | 4 011 |

Ženy

| Diagnóza | Absolutní incidence | Absolutní Mortalita |
|--|---------------------|---------------------|
| C50 ZN Prsu | 6 498 | 1 655 |
| C18-21 ZN Kolorekta | 3 314 | 1 608 |
| C33–C34 ZN Průdušnice, průdušky, plíce | 1 891 | 1 556 |

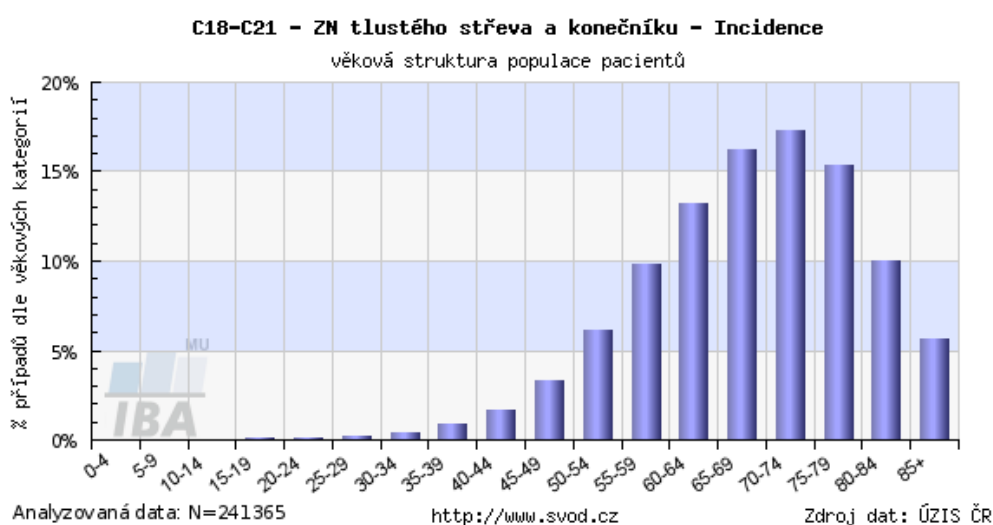
Tabulka 1: Počet nově zjištěných případů mortality a incidence ZN a novotvarů podle diagnóz a pohlaví v ČR, 2010 (NOR, 2013).

Data z NOR ukazují vývoj incidence a mortality v České republice od roku 1977 do roku 2013 (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2016-04-01]). Příznivým trendem je oplošťování křivek mortality, který se objevuje od poloviny 90. let. Za tento pozitivní trend stabilizace a v posledních letech i mírný pokles incidence a mortality je zodpovědná lepší léčebná péče, a to nejen léčba chirurgická a adjuvantní, ale také celková perioperační péče a prevence (Dušek, 2012).



Obr. 2: Vývoj incidence a mortality mezi roky 1977 – 2013 v ČR u obou pohlaví (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit.2016-01-05-]).

Incidence většiny zhoubných nádorů přibývá s věkem. Je to důsledek narůstající informační entropie v genomu s charakteristickými, během života získanými genovými abnormalitami. CRC je jedním z typických nádorů stárnoucí populace (Dušek, 2012). Typický věk českého pacienta s kolorektálním karcinomem sice leží v intervalu 61-77 let, ale 21 % všech nemocných je mladších než 60 let (URL:<<http://www-dep.iarc.fr>> [cit. 2016-04-01]).



Obr. 3: Věková struktura pacientů, obě pohlaví. Data z let 1977 – 2013 (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit.2016-01-05-]).

2.1.3 Histologické typy karcinomů

Z důvodu konzistentnosti a uniformity patologických vyšetření existuje mezinárodně akceptovaná histologická klasifikace navržená Mezinárodní hygienickou organizací (WHO). Tato klasifikace rozlišuje 8 histologických typů CRC (Hamilton *et al.*, 2000; URL:<<http://www.nature.com>> [cit. 2016-04-01]).

Adenokarcinom, Mucinózní adenokarcinom, „Signet-ring cell“ karcinom, Medulární karcinom, Malý buněčný karcinom, Skvamózní karcinom, Adenoskvamózní karcinom a nediferenciovaný karcinom (Hamilton *et al.*, 2000). Adenokarcinom a Mucinózní adenokarcinom se řadí k nejčastějším typům (URL:< <http://oncolex.org>> [cit. 2016-04-01]).

2.2 Adenokarcinom

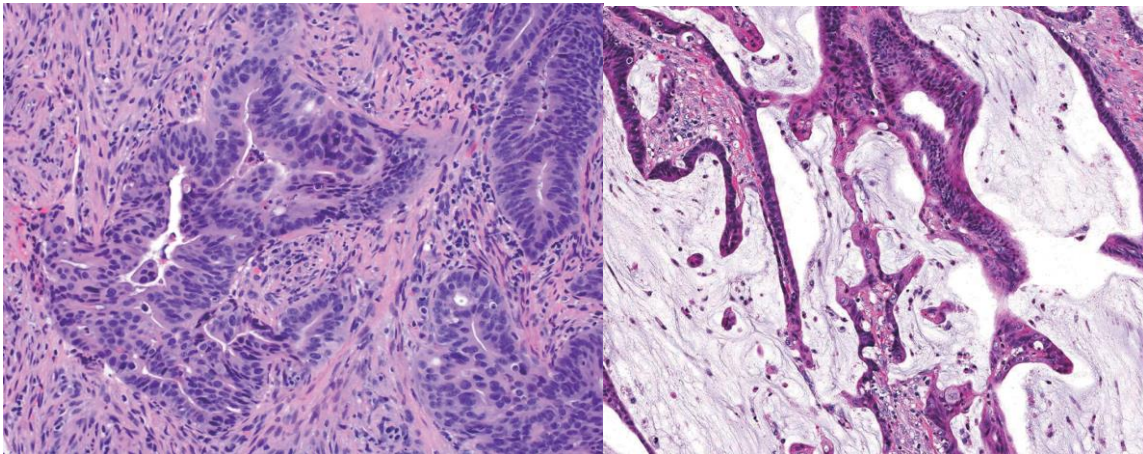
Až 90% kolorektálních karcinomů jsou adenokarcinomy, které vznikají z adenomů (Fleming *et al.*, 2012; URL:<<http://oncolex.org>> [cit. 2016-04-01]). Běžné adenokarcinomy jsou charakterizované žláзовými strukturami, které jsou základem pro histologický nádorový grading (viz **Obr. 4**). Dobře diferenciované karcinomy tvoří žlázové struktury více než z 95% nádoru, středně diferenciované mezi 50 a 95% a slabě diferenciované karcinomy tvoří žlázové struktury v méně než 50% pevného nádoru. Téměř 2/3 adenokarcinomů jsou klasifikovány jako středně diferenciované. Jednotlivé stupně diferenciace uvádí **Tab. 2** (Fleming *et al.*, 2012).

| | |
|----|---------------------------------|
| GX | Grading nemůže být stanoven |
| G1 | Dobře diferenciovaný karcinom |
| G2 | Středně diferenciovaný karcinom |
| G3 | Málo diferenciovaný karcinom |
| G4 | Nediferenciovaný karcinom |

Tab. 2: Kódové označení různých stupňů diferenciace (Holoubec, 2004).

Málo diferenciované karcinomy se šíří a rostou pomaleji než dobře diferenciované, jsou tedy méně rizikové než dobře diferenciované karcinomy (Holoubec, 2004; URL:<<http://www.cancer.org>> [cit. 2016-04-01]).

Klíčovým aspektem mikroskopické analýzy je určení invaze do okolní tkáně. Pokud adenokarcinom pronikl skrze *muscularis mucosae* (vrstvičku hladké svaloviny oddělující mukózu a submukózu), dále do submukózy je adenokarcinom považován za invazivní. Typicky proniká také do blízkosti submukózních krevních cév. Dalším důležitým rysem invaze je přítomnost desmoplazie nebo desmoplastické reakce, typ tkáňové nebo pojivové proliferace v okolí nádorových buněk. Invazivní adenokarcinomy také často vykazují charakteristické nekrotické zbytky u žlázového lumina, tento jev se často nazývá „špinavá nekróza„ (Fleming *et al*, 2012). Invasivní adenokarcinomy jsou zvláště důležité, neboť mají schopnost metastázovat (Jablonská, 2000).



Obr. 4: Na snímku vlevo, lze vidět středně diferenciovaný adenokarcinom obklopený desmoplastickým stromatem. Na snímku vpravo lze vidět Mucinozní karcinom s okolním mucinem (Fleming *et al*, 2012).

2.2.1 Staging

Staging (stádium) podává informaci o šíření nádoru v těle, zda došlo k penetraci střešní stěny, postižení regionálních uzlin a k metastázování. Staging je jedním z nejdůležitějších faktorů pro určení léčby a odhadu jak úspěšné léčení může být. Určuje se na základě výsledků z biopsie a zobrazovacích testů (CT nebo MRI skener). Nejčastěji používaný systém stagingu je TNM systém který navrhla AJCC (American Joint Committee on Cancer). Tento systém je založen na 3 základních informacích (URL:<<http://www.cancer.org>> [cit. 2016-04-01]).

- Jak daleko prorostl primární nádor do střevní stěny a jestli roste do okolních oblastí.
- Jestli nádor prorostl do okolních (regionálních) lymfatických uzlin. Lymfatické uzliny jsou drobné ostrůvky buněk imunitního systému, do kterých se nádor často šíří jako první.
- Jestli se nádor rozrostl (metastázoval) do okolních nebo vzdálených orgánů v těle. CRC může metastázovat téměř kdekoli v těle, nejčastější jsou však plíce a játra.

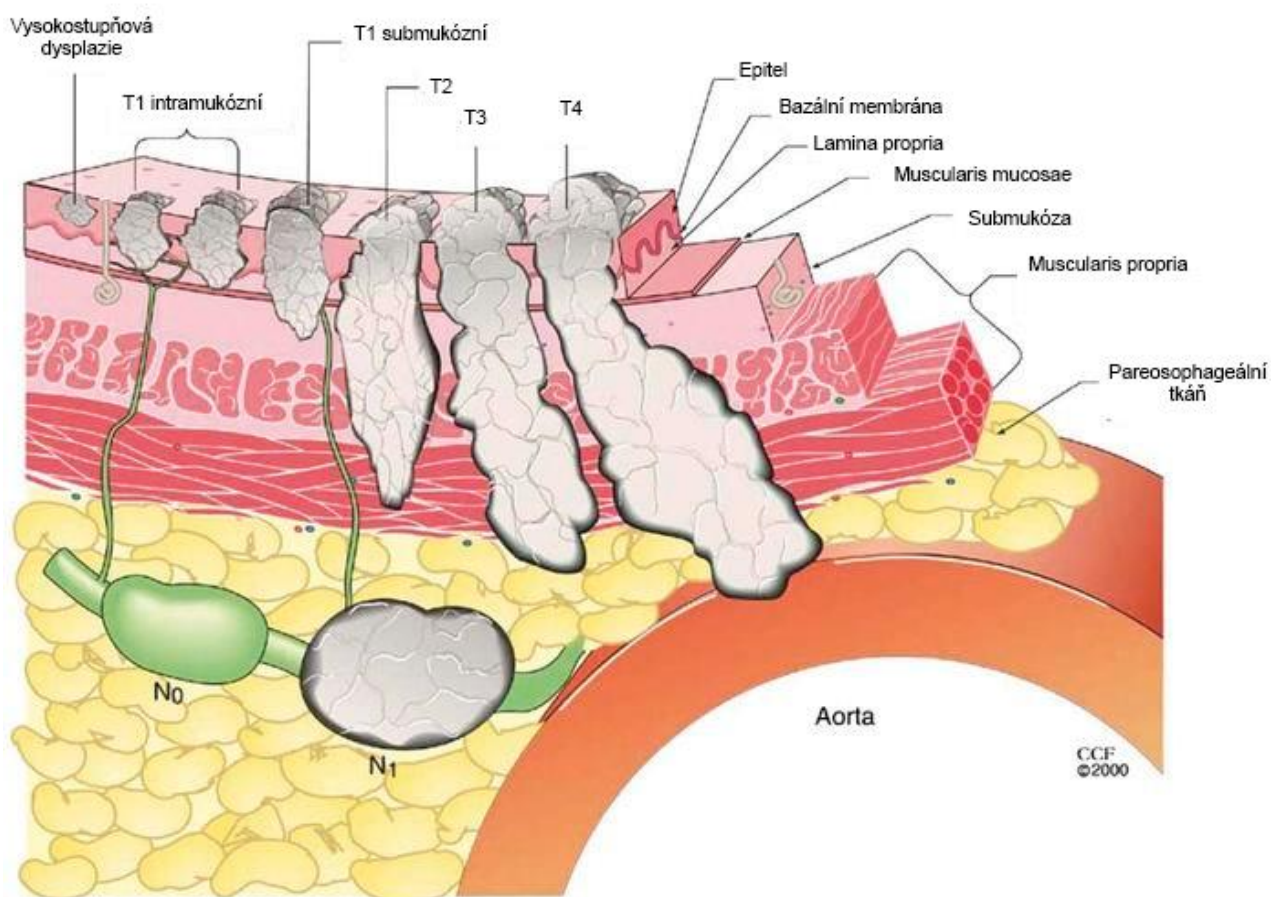
V následující tabulce (**Tab. 3**) je srovnání TNM systému s Dukesovou klasifikací, což je dříve používaný systém (Holoubec, 2004).

| Dukesova klasifikace | Stádium TNM | Nádor (T) | Uzliny (N) | Metastázy (M) |
|----------------------|-------------|-----------|------------|---------------|
| | 0 | Tis | N0 | M0 |
| A | I | T1 | N0 | M0 |
| | | T2 | N0 | M0 |
| B | II | T3 | N0 | M0 |
| | | T4 | N0 | M0 |
| C | III | Tx | N1,-N3 | M0 |
| D | IV | Tx | Nx | M1 |

Vysvětlivky zkratk :

| | | | |
|-----|--|----|--|
| Tis | Karcinoma in situ, neprorůstá mukózou | NX | Uzliny nemohou být posouzeny |
| T1 | Tumor proniká submukózou | N0 | Bez metastáz v regionálních uzlinách |
| T2 | Tumor proniká muscularis propria | N1 | 1-3 metastázy v lymfatických uzlinách |
| T3 | Tumor proniká skrze muscularis propria do subserózy | N2 | Metastázy ve 4 nebo více lymfatických uzlinách |
| T4 | Tumor proniká viscerálním peritoneem nebo do okolních orgánů | N3 | Metastázy v uzlinách podél cévních struktur |
| Tx | Tumor nemůže být detekován | Mx | Přítomnost metastáz nemůže být posouzena |
| | | M0 | Vzdálené metastázy nejsou přítomny |
| | | M1 | Vzdálené metastázy jsou přítomny |

Tab. 3: TNM a Dukesova klasifikace (Holoubec, 2004).



Obr. 5: Schématický nákres šíření karcinomu skrze stěnu tlustého střeva. Označení písmeny T odpovídá TNM systému a označení N0 a N1 odpovídá šíření do uzlin (URL:<<http://www.pinterest.com>> [cit. 2016-04-01]).

2.3 Adenom

Jakýkoliv útvar abnormálního růstu, který se vyvyšuje na střevní sliznici, se nazývá polyp. Benigní nádorové polypy lišící se strukturou a cytologickými vlastnostmi od okolní sliznice se nazývají adenomy a jsou nejčastěji pozorovanou neoplazií. Dle definice, jsou adenomy klonální léze, které vykazují alespoň nízkou úroveň dysplazie charakterizované zvětšenými a protáhlými jádérky buněk, uspořádaných ve vrstevnaté konfiguraci podél bazální membrány (Fleming *et al*, 2012). Adenomy vznikají dysplastickou proliferací epitelu a na základě jejich histologické struktury je dělíme do 3 skupin (Jablonská, 2000). Adenomy jsou benigní (nezhoubný), ale disponují maligním (zhoubným) potenciálem a mohou se tak stát adenokarcinomy skrze tzv. maligní zvrát. Jen u malé části adenomů dochází ke vzniku invazivního karcinomu. Kumulativní riziko vzniku CRC z adenomu je v civilizovaných zemích přibližně 6 procent u osob do 85 let (Jablonská, 2000).

Sklon k takovému zvrátu závisí na velikosti, histologickém typu a stupni dysplazie (Holoubec, 2004). V tubulárních adenomech menších než 1 cm vznikají karcinomy velmi vzácně, u široce přisedlých vilózních adenomů větších než 4 cm je riziko naopak vysoké. Doba trvání maligního zvrátu benigního adenomu není přesně známá, je variabilní ale odhaduje se na 5 - 10 let, nebo i více (Jablonská, 2000).

| Velikost | % adenomů s karcinomem |
|---------------|------------------------|
| do 0,5 cm | < 0,5 |
| 0,5 - 0,1 cm | 2 |
| 1 - 2 cm | 10 |
| 2 cm | 40 |
| Histologie | % adenomů s karcinomem |
| Tubulární | 5 |
| Tubulovilózní | 20 |
| Vilózní | 40 |
| Dysplazie | % adenomů s karcinomem |
| Nízká | 5 |
| Střední | 20 |
| Těžká | 40 |

Tab. 4: Maligní potenciál v závislosti na velikosti, histologii a dysplazii adenomu (Jablonská, 2000).

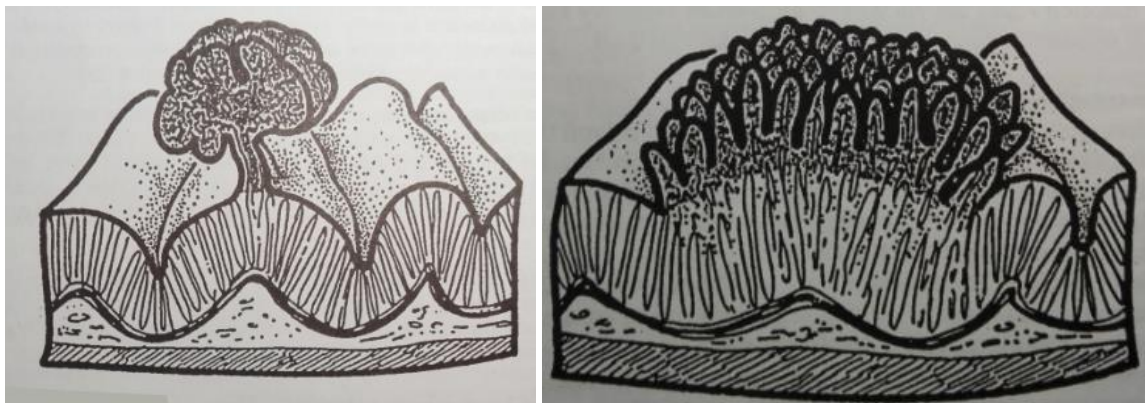
Incidence adenomů se s přibývajícím věkem pacienta výrazně zvyšuje. Adenomy se vyskytují až u 25% pacientů starších 50 let. Do 30 let je výskyt adenomů vzácný s výjimkou FAP (Jablonská, 2000).

2.3.1 Histologické rozdělení adenomů

Tubulární adenomy jsou většinou vystupující, sférické, stopkaté a malé, s nízkým stupněm dysplazie a jsou složeny z jednoduchých kryptických žláz. Tubulární komponenta zaujímá přibližně 75% nádoru. Naopak vilózní komponenta je přítomna v méně než 25% tkáně nádoru.

Vilózní adenomy jsou většinou přisedlé, široké a větší. Jejich vilózní komponenta zaujímá více než 75% nádoru. Tyto nádory jsou považovány za rizikovější, protože mají větší tendenci k malignímu zvratu.

Tubulovilózní adenom se vyznačuje přítomností charakteristických rysů obou předchozích adenomů. Jeden z rysů musí být zastoupen ve více než 25% nádoru (Jablonská, 2000; Fleming, 2012).

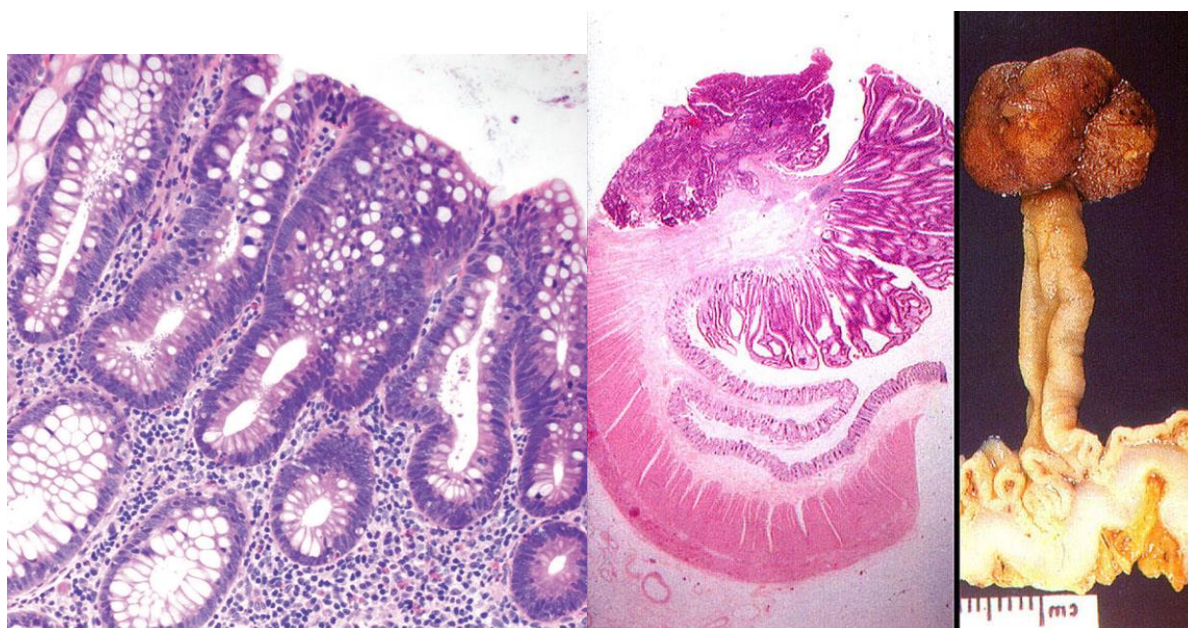


Obr. 6: Schématický náčrt tubulárního adenomu (vlevo) a vilózního adenomu (vpravo). (Jablonská, 2000).

2.3.2 Tubulární adenomy

Tubulární adenomy se u pacientů nejčastěji objevují ve středním až pozdním věku. Ve vzácných případech se mohou objevovat i u mladších pacientů, což je typické pro mutace, které mají dědičný původ (FAP). Tubulární adenom vzniká skrze genetické mutace, které vedou k dysplazii, což je neuspořádaný růst epiteliálních buněk. Většina tubulárních adenomů je velká do 1 cm a pro většinu pacientů je obtížné jejich příznaky odhalit. Typickými příznaky je krvácení z anusu, střevní bolesti a zablokování střeva (pokud je adenom velký) a vzácně i průjem. Většina tubulárních adenomů se však odhalí při kolonoskopii, a pokud jsou odstraněny v počáteční fázi, výrazně se tak snižuje riziko vzniku adenokarcinomu (URL:<<http://www.merckmanuals.com>> [cit. 2016-04-01]).

Tubulární adenomy mají poněkud tmavěji červeně zbarvenou sliznici, než je sliznice v okolí, jejich povrch bývá hladký, někdy jemně granulovaný (Jablonská, 2000).



Obr. 7: Na pravém a prostředním snímku se nachází řez tubulárním adenomem. Na levém snímku se nachází fotografie tubulárního adenomu v celku (URL:<<http://oncolex.org>> [cit. 2016-04-01]; URL:<<http://www.pathologyoutlines.com>> [cit. 2016-04-01]).

2.4 Matrixové metaloproteinázy

Matrix metaloproteinázy (MMP), též známé jako matrixiny, spadají do velké rodiny strukturálně a funkčně příbuzných zinkových endopeptidáz účastnících se především degradace extracelulární matrix (ECM). Řízená degradace ECM je nezbytná pro vývoj embrií, morfogenezi, reprodukci a remodelaci tkání (Nagase *et al.*, 1999). Obecně jsou MMP schopny degradovat (jak *in vivo*, tak *in vitro*) různé proteinové komponenty jako kolageny bazální a interstinální membrány, proteoglykany a fibronectiny (Bode, 2003). Matrixiny jsou také zapojeny do procesů angiogeneze a metastázování (Mueller *et al.*, 2000). Ovlivňují mnoho biologických pochodů během vývoje a fyziologických procesů, důležitých pro tvorbu a údržbu mikroprostředí umožňující růst a šíření buněk. Jsou produkovány škálou různých buněk, jako jsou epitelální buňky, fibroblasty a zánětlivé buňky (Rydlová *et al.*, 2008).

2.4.1 Rozdělení MMP

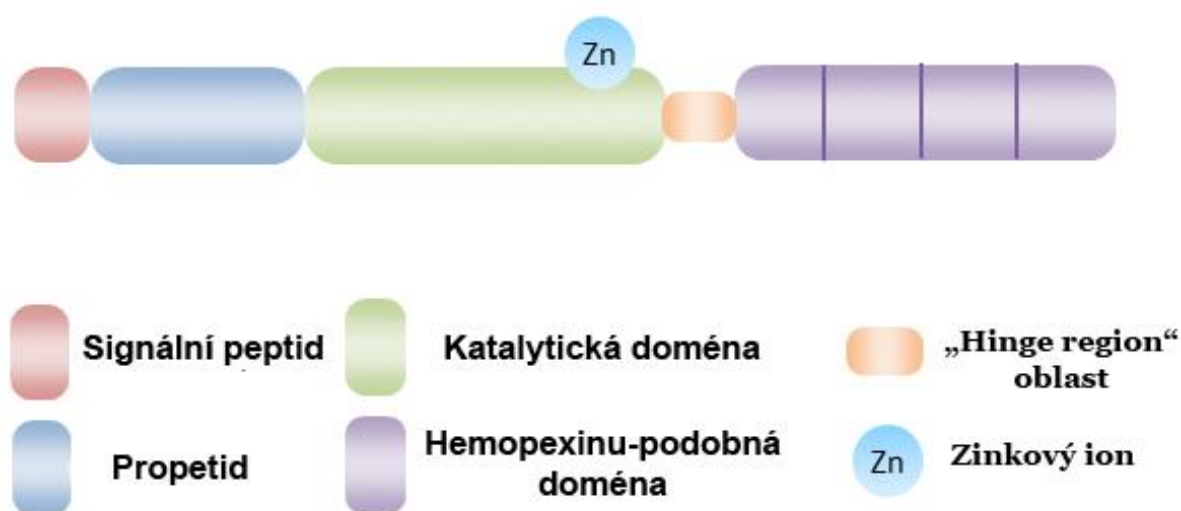
Metaloproteinázy představují relativně velkou skupinu enzymů. V současnosti existují dva klasifikační systémy a to číselný, který obsahuje jak deskriptivní jméno (např. kolagenáza) tak i číslo a také existuje systém dělící enzymy na základě jejich struktury. Ačkoliv číselný systém obsahuje číslo až 28, nereflexuje to skutečný počet známých metaloproteináz, jelikož se postupem času prokázalo, že některé MMP byly pouze duplikáty již známých. Jedná se o MMP-4 až MMP-6. Přehled současně známých MMP udává **Tab. 5.** (Nagase, 2006).

| MMP | Běžný název | Substrát |
|--------------|-------------------------------------|--|
| MMP1 | Kolagenáza 1 | Aggrecan, kolagen I, II, III, VII, VIII, X, XI, fibronectin, laminin, spojovací protein, tenascin, vitronectin, |
| MMP2 | Gelatináza A | Aggrecan, kolagen I, III, IV, V, VII, X, XI, decorin, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, spojovací protein, tenascin, vitronectin, |
| MMP3 | Stromelysin 1 | Aggrecan, kolagen III, IV, V, VII, IX, X, XI, decorin, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, spojovací protein, tenascin, vitronectin, E-cadherin, |
| MMP7 | Matrilysin | Aggrecan, kolagen I, IV, decorin, elastin, fibronectin, laminin, spojovací protein, tenascin, vitronectin, E-cadherin, |
| MMP8 | Kolagenáza 2 Neutrofilkolagenáza | Aggrecan, kolagen I, II, III |
| MMP9 | | Aggrecan, kolagen IV, V, XI, XIV, decorin, elastin, fibronectin, laminin, spojovací protein, vitronectin, |
| MMP10 | Stromelysin 2 | Aggrecan, kolagen III, IV, V, elastin, fibronectin, gelatin, spojovací protein, fibrinogen |
| MMP11 | Stromelysin 3 | Neznámý |
| MMP12 | Macrofágmataloelastáza | Aggrecan, kolagen I, IV, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, vitronectin, |
| MMP13 | Kolagenáza 3 | Aggrecan, kolagen I, II, III, VI, IX, X, XI, XIV, fibronectin, gelatin, |
| MMP14 | MT1- MMP | Aggrecan, kolagen I, II, III, fibronectin, gelatin, laminin, vitronectin, |
| MMP15 | MT2- MMP | kolagen III, fibronectin, |
| MMP16 | MT3-MMP | Neznámý |
| MMP17 | MT4-MMP | Neznámý |
| MMP18 | Kolagenáza 4 | Kolagen I |
| MMP19 | RASI-1 | Kolagen I, IV, fibronectin, gelatin, tenascin |
| MMP20 | Enamalysin | Neznámý |
| MMP21 | XMMP | Neznámý |
| MMP22 | CMMP | Neznámý |
| MMP23 | | Neznámý |
| MMP24 | MT5-MMP | Neznámý |
| MMP25 | MT6-MMP | Neznámý |
| MMP26 | Endometásamatrilysin 2 | Kolagen IV, fibronectin, gelatin, fibrinogen |
| MMP27 | | Neznámý |
| MMP28 | Epilysin | Neznámý |

Tab. 5: Přehled současně známých MMP a jejich substrátů (Nagase, 2006).

2.4.2 Struktura MMP

Typická MMP se skládá z propeptidu obsahujícího asi 80 AMK, z katalytické domény obsahující asi 170 AMK, linkeru zvaného též „Hinge region“ a z hemopexinu-podobné domény (Nagase, 2006).



Obr. 8: Schématické znázornění obecné struktury metaloproteináz (Chan *et* Lung, 2013).

Rozdíly v organizaci domén jsou zodpovědné za rozdílné funkce MMP. Základní struktura katalytické domény obsahuje 5 β -skládaných listů, 3 α -helixy a spojovací smyčku. Dále obsahují 2 ionty zinku (Jeden strukturální a druhý katalytický) a 3 vápenaté ionty stabilizující strukturu (Strenlicht *et* Werb, 2001). Důležitým rysem jsou však sekvence vázající ionty zinku. Sekvence HEXXHXXGXXH obsažená v **katalytické doméně** má 3 histidiny (his218, 222 a 228) které jsou schopny vázat katalytický zinek (Bode, 2003).

Propeptidová doména se skládá ze tří α -helixů a spojovacích smyček. Přesné struktury se zatím podařily určit jen u některých MMP (Bode, 2003). Důležitým prvkem propeptidové domény je však tzv. „Cystein-switch“ motiv PRCGXPD, kde se SH-skupina cysteinu koordinuje k zinku. Propeptidová doména slouží k zachování latentnosti enzymu. Při aktivaci

MMP je vazba cystein-zinek zrušena a zinek koordinuje molekulu vody. Při následném navázání substrátu se tato molekula vody uvolňuje a po deprotonizaci slouží jako nukleofil při hydrolýze peptidové vazby substrátu (Stenlicht *et* Werb, 2001; Nagase, 2006).

2.4.3 Aktivace, inhibice a regulace MMP

Pro správné fungování musí být MMP správně lokalizována a to ve správný čas a správném množství. Jejich adekvátní aktivace a inhibice je tedy klíčová pro zajištění normálních fyziologických funkcí. Důležitá je tedy regulace na transkripční a post-transkripční úrovni. Na úrovni proteinů jsou MMP regulovány mnohými aktivátory a inhibitory.

Specifické biologické účinky jednotlivých MMP jsou dány především různými vzory exprese jejich genů. Exprese je regulována mnohými stimulatory a supresivními faktory, které mohou ovlivňovat více signálních drah. Zvýšení nebo snížení exprese může být například ovlivněno Phorbol estery, integriny, buněčným stresem a změnou tvaru buňky (Stenlicht *et* Werb, 2001).

MMP jsou produkovány jako latentní neaktivní proenzymy nebo zymogeny. Jejich aktivace spočívá v rozštěpení propeptidové domény a uvolnění vazby cystein-zinek. Takové aktivace jsou schopny například jiné, již aktivované MMP nebo několik serinových proteináz schopných štěpit propeptidovou doménu (Stenlicht *et* Werb, 2001).

Aktivita MMP je regulována dvěma hlavními typy endogenních inhibitorů. Jsou to α_2 -makroglobuliny a TIMP. α_2 -makroglobulin je plasmový glykoprotein, který inhibuje většinu proteináz uzavřením proteinu do komplexu makroglobulinu. TIMP jsou inhibitory aktivity MMP v tkáních, v současnosti jsou známy 4 TIMP skládající se ze 184 - 194 AMK. Reverzibilně inhibují MMP ve stechiometrickém poměru 1:1. Pokud je tedy exprese MMP nadměrná a není dostatek TIMP na jejich inhibici, vede to k nerovnováze reparačních systémů. Například při hojení může být ECM nadměrně degradována a naruší se integrita tkáně (Stenlicht *et* Werb, 2001; Nagase, 2006).

2.4.4 MMP a kolorektální karcinom

Mnohé MMP vykazují zvýšenou expresi u nejrůznějších maligních nádorů. Exprese a aktivace se zvyšuje s agresivitou nádoru a metastatickým potenciálem (Rebeca, 2004). Kolorektální karcinomy vykazují expresi MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12 a -14. S postupným vývojem a růstem karcinomu se zvyšuje počet různých MMP, ale také exprimované množství. Stromální buňky v okolí nádoru syntetizují většinu těchto MMP a je pravděpodobné, že nádorové buňky mohou stimulovat stromální expresi skrze interleukiny, interferony a růstové faktory (Rebecca, 2004; Rydlová *et al*, 2008).

Epidemiologické studie zkoumaly expresi MMP jako prognostický faktor a například MMP-12 vykazuje určitý protektivní benefit. Existuje signifikantní korelace mezi ztrátou exprese MMP-12 a invazí nádoru do střevní stěny a uzlin. Pacienti s expresí MMP-12 vykazují vyšší přežití (76%) oproti pacientům bez exprese MMP-12 (36%) a tato MMP je považována za signifikantní determinant celkového přežití. Mechanismus, jakým MMP-12 protektivně působí zatím není znám. Ostatní MMP jsou spojeny s nízkým celkovým přežitím. Pacienti s vysokou expresí MMP-9 vykazují 6x vyšší recidivu oproti pacientům s nízkou expresí (Zeng *et al*, 1996; Rebecca, 2004). 5-ti leté přežití je až 3,5x vyšší u pacientů s nízkou expresí MMP-7 a exprese MMP-1 je také spojena se nízkým přežitím (Adachi *et al*, 2001; Rebecca, 2004). Obecně metaloproteinázy přispívají k nádorové progresi od počátečního růstu až po nádorovou invazi (Rydlová, 2008).

2.4.5 MMP-19

MMP-19 je jedna ze zinek-dependentních endopeptidáz. Někdy se také označuje jako MMP-18 nebo RASI-I. Její umístění je na chromozomu 12q13.2. MMP-19 se exprimuje v široké škále tkání, jako jsou epiteliální buňky nosohltanu, plic, prsa, kůže, střeva, sleziny, pankreasu a vaječnicků. Lokalizována je především v cytoplasmě a sekretovaná je do extracelulární matrix. MMP-19 se skládá z 508 aminokyselin a její molekulová hmotnost je 57357 Da (URL:<<http://www.genecards.org>> [cit. 2016-02-04]).

Jako ostatní metaloproteinázy je i MMP-19 produkována jako inaktivní zymogen a aktivuje se jinými ECM proteinázami. MMP-19 je silně inhibována TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4, TIMP-1 je slabým inhibítorem MMP-19 (Clark *et al*, 2008).

Struktura genu

Zatímco většina MMP je kódována 10 exony, lidská a myší MMP-19 je kódována 9 exony. První exon kóduje celý signální peptid a první část propeptidu, druhý exon kóduje zbytek propeptidu. Třetí exon kóduje část katalytické domény, exon 4 a 5 kódují celý zbytek katalytické domény. Exon 6 kóduje Hingův region a hemopexinu-podobné domény. Exony 7-9 kódují zbytek hemopexinu-podobné domény a exon 9 kóduje C-terminální konec (Mueller *et al*, 2000).

Gen MMP-19 obsahuje 7 554 páru bází a při alternativním splicingu mohou vzniknout různé isoformy. V současnosti známe 3 lidské isoformy a to RASI-I, RASI -9 a RASI-6. V této práci se zabýváme pouze isoformou RASI-I, jelikož ostatní isoformy jsou produkovány v mnohem menší míře (URL:<<http://www.uniprot.org>> [cit. 2016.01-02]; URL:<<http://www.phosphosite.org>> [cit. 2016-01-02]).

Podobně jako spousta jiných MMP, obsahuje gen MMP-19 potenciální místa pro různorodé transkripční faktory. V pozici 29 relativně ke startu transkripce se nachází TATA-box v oblasti promoteru. V pozici 73 se nachází vazebné místo pro transkripční faktor AP-1. Dále existují vazebná místa pro další transkripční faktory jako NFκB, AP-2 a SP-1 (Mueller *et al*, 2000).

Navzdory typickému uspořádání struktur, vykazuje MMP-19 překvapující rozdíly v auto-inhibující sekvenci v propeptidové doméně. Má se za to, že specifická sekvence AMK umožňuje autokatalytickou aktivaci MMP-19 (Stracke *et al.*, 2000). Dalšími odlišujícími prvky jsou rozdíly v oblasti linkeru, přidané zbytky v katalytické doméně a rozdílnost karboxylového koncového úseku (Maud *et Jost*, 2006).

Vlastnosti proteinu

Katalytická doména je zodpovědná za degradaci mnoha různých komponent v ECM, patří mezi ně Kolagen typu IV, nidogen-1, Fibronektin, tenascin-C, isoformy agrecanu a laminin-5-gama-2-řetězec. Je zapojena do mnoha fyziologických aktivit, jako buněčná proliferace, migrace a anti-angiogeneze (Stracke *et al.*, 2000).

MMP-19 a nádorová onemocnění

Vzhledem k schopnosti degradovat různé substráty je schopna MMP-19 působit jak rakovinovou progresi, tak i represi. Přesná role MMP-19 je stále kontroverzní a není zcela objasněna (Sena *et al.*, 2012).

MMP-19 je schopna štěpit insulinu podobné růstové faktory, což způsobuje uvolňování IGF-1 a posiluje proliferaci keratinocytů, migraci a adhesi na kolagen typu I (Brauer *et al.*, 2004). Také je schopná štěpit laminin – 5- gama-2-řetězec v buňkách keratynocytů, což působí na integrin a favorizuje migraci epiteliálních buněk (Brauer *et al.*, 2004).

Pro šíření nádoru je také důležitý proces angiogeneze, což je tvorba nových kapilár zásobující nádor krví. Experimenty na MMP-19 deficitních myších vykazují vyšší angiogenezi a nádorovou invazi (Maud *et Jost*, 2006). Další studie popisují různé mechanismy anti-angiogenního účinku MMP-19. Jednou z možností je štěpení plasminogenu na angiostatinu podobné fragmenty. Tyto fragmenty pak inhibují proliferaci, mikrovaskularizaci a tvorbu kapilárních struktur. Jedná se tedy o anti-angiogenní účinek. Další možností je poškození bazální membrány, jenž podporuje proces diferenciaci endoteliálních buněk. Toho může být dosaženo skrze štěpení některých komponent bazální membrány (Brauer *et al.*, 2004). Jedna ze studií popisuje, že vysoké koncentrace MMP-19 mají negativní vliv na růst endoteliálních buněk. Děje se tak skrze štěpení nidogenu-1 , což vede k inhibici kapilárních struktur (Brauer *et al.*, 2004).

2.4.6 MMP-19 a kolorektální karcinom

V normálním epitelu střeva se MMP-19 nachází v oblastech s proliferujícími buňkami, jako jsou krypty tlustého střeva. Běžně se vyskytuje ve zdravé tkáni v nízkých koncentracích, při přechodu z normální tkáně v nádorovou se však množství MMP -19 signifikantně zvyšuje (Bister *et al.*, 2004).

Studie z roku 2012 potvrdila tento expresní profil s využitím fluorescenční analýzy, metody Western Blotting a také qRT-PCR. Veškeré metody ukazují konzistentní výsledky nízkého výskytu MMP-19 v normální mukóze a následné zvýšení exprese u přechodu mikroadenomů a adenomů na karcinom (Sena *et al.*, 2012).

Další studie z roku 2014 sledující různé exprese potvrzuje, že MMP-19 je pravděpodobně zapojena v progresi kolorektálních nádorových onemocnění. Přesný expresní vzor MMP-19 u kolorektálního karcinomu není však zcela jasný a proto jsou nutné další práce (Sena *et al.*, 2012; Červinková *et al.*, 2014).

2.5 Imunohistochemie

Základním cílem imunohistochemických a imunocytochemických 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 určité struktuře, např. na povrch buňky (Beranová, 2002).

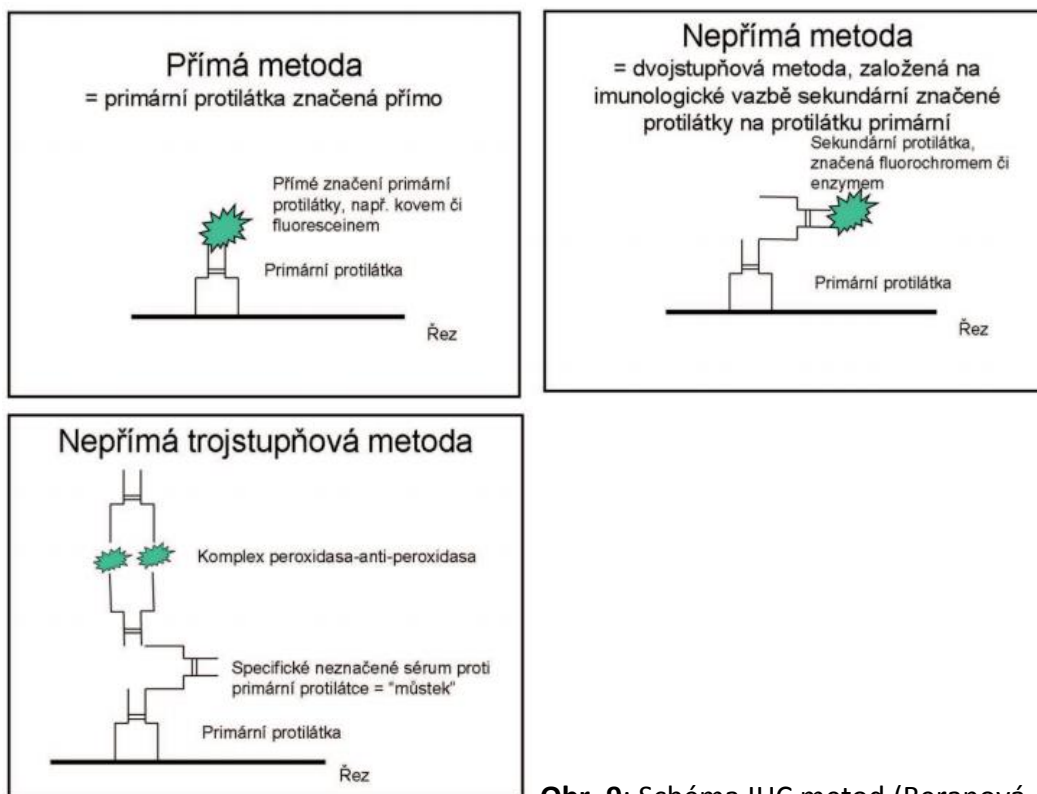
Princip imunohistochemie (IHC) byl znám už od 30. let 20. století, ale až roku 1942 byla publikována první studie identifikující antigeny Pneumokoka v infekční tkáni. V současné době je využívána k diagnostice onemocnění, vývoji léků a výzkumu. Využití specifických nádorových markerů umožňuje rozlišení benigních a maligních nádorů, určování stádia a diferenciaci typu buněk a původu metastáz (URL:<<http://www.thermoscientific.com>> [cit. 2016-02-04]).

2.5.1 Základní typy metod

Přímá metoda využívá nejjednoduššího způsobu lokalizace antigenu ve tkáni. Primární protilátka je přímo označena enzymem, fluoresceinem nebo kovem. Tato metoda není příliš citlivá a je vhodná, pokud je antigen ve tkáni přítomen ve vysoké koncentraci. Má větší uplatnění u nativních tkání, u tkání zalitých do parafínu je málo citlivá (Beranová, 2002).

Nepřímá dvoustupňová metoda je ve srovnání s přímou metodou komplikovanější, ale citlivější. Spočívá v aplikaci neznačené primární protilátky, specifické pro hledaný antigen a následném použití druhé tzv. sekundární protilátky, která je značená a její signál odečítáme (Beranová, 2002).

Nepřímá trojstupňová metoda se používají především v případě, že množství antigenu ve tkáni je opravdu nízké, jsou tedy obecně nejcitlivější. Je to metoda amplifikační a využívá sekundární protilátku, která je neznačená jako můstek pro další komplex, který je značený (Beranová, 2002).

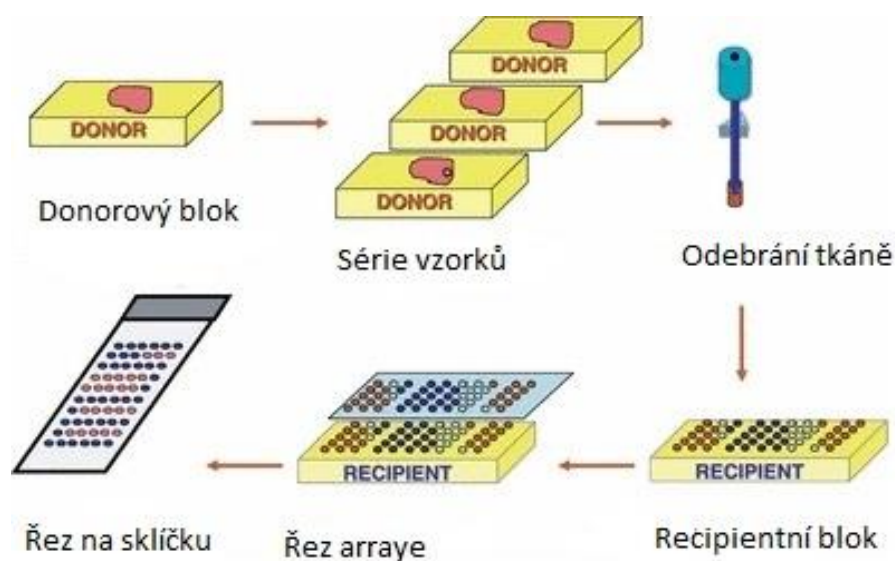


Obr. 9: Schéma IHC metod (Beranová, 2002).

2.5.2 Tkáňové mikroarray

Tkáňová mikroarray je inovativní technika používaná v patologii. Podstatou je koncentrace vzorků do jednoho bloku a možnost analyzovat mnoho vzorku současně. Tkáňové mikroarray (TMA) jsou pevné parafínové bloky obsahující extrahované cylindrické vzorky tkání z různých parafínových bloků (tzv. donorové bloky). Nejprve jsou z donorových bloků připraveny standardní řezy a po provedeném obarvení zkušený patolog vybere v tkáni místo určené k extrakci. Nejčastěji je předmětem zájmu nádorová tkáň. Podle možností instrumentace (automatické nebo poloautomatické přístroje) probíhá extrakce vzorků z označené oblasti. Množství vzorků schopných vložit do recipientního bloku je variabilní a závisí na designu plánované araye, ale především na schopnostech dostupné techniky. Moderní techniky využívají jehel s průměrem 0,6 mm a umožňují tak pohodlné umístění až 600 vzorků na velikost standardního bloku. Aby byla možná následná orientace v recipientním bloku, má každý vzorek své přesné koordináty, které jsou zpracovány v softwaru zařízení a pro snadné použití jsou často převáděny do formátu tabulky Microsoft Excel (Nazar, 2009).

Po zaplnění se recipientní blok krájí na mikrotonu na tenké řezy a stejně jako běžný tkáňový řez je možné provádět následné analýzy (Nazar, 2009).



Obr. 10: Schéma přípravy TMA (URL:< <http://www.researchgate.net>> [cit. 2016-01-02]).

Výhodou je mnohonásobné navýšení využití studované tkáně, jelikož pracujeme s malými vzorky tkáně. Dále je výhodou možnost analyzovat mnohem více vzorků v jednom řezu a zároveň experimentální uniformita. Ke každému vzorečku je přístupováno stejně a mikroarray je přístupná pro použití širokého spektra technik (Imunohistochemické barvení chromogenní nebo fluorescenční, analýza mRNA apod.) Zároveň dochází k úspoře chemikálií, jelikož pouze malé množství chemikálií stačí k analýze velkého množství vzorků. Tato metoda se tedy ukazuje jako velmi účinná u reakcí využívajících drahé reagenty. V neposlední řadě je výhodou nedestruktivnost metody, jelikož z donorových bloků vyřezáváme pouze malé vzorky. Je tak možné dále používat donorové bloky pro jakoukoliv diagnózu. Jedná z nejčastějších kritik TMA je, že opravdu malé vzorky nejsou dostatečně reprezentativní pro celý nádor. Tato úvaha je nejčastější u heterogenních nádorů (adenokarcinom prostaty, Hodgkinův lymfom). V současnosti je k dispozici instrumentace semi-automatická nebo plně automatická (Nazar, 2009).



Obr. 11: Semi-automatický přístroj na tvorbu TMA bloků (URL:<<http://parsgene.com>> [cit. 2016-01-02]).

3 Cíle práce

1. Cílem této práce byla imunohistochemická detekce MMP-19 ve vzorcích kolorektálních adenomů a adenokarcinomů.
2. Porovnání exprese MMP-19 mezi kolorektálním adenomem a adenokarcinomem, korelace délky přežití s expresí MMP-19 ve tkáni, hodnocení pozitivních a negativních rizikových faktorů.

4 Experimentální část

4.1 Materiál a metodika

Chemikálie

Primární protilátka MMP19 (Abcam, kat. č. ab53146), Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP (DakoCytomation, kat.č. K4061), Liquid DAB + Substrate Chromogen Systém (DakoCytomation, kat. č. 3468), pertex (Histolab), dihydrát citrátu sodného (Aldrich, kat. č. 85,578-2) Tween 20 (Sigma, kat. č. P7949), bovinní albuminová frakce V (Sigma, kat. č. 816110) , sušené odtučněné mléko, 10 % NaN₃ (Sigma, kat. č. 26628-22-8), fetální sérum, H₂O₂ 30% obj. (Lechner), dodekahydrát kamence hlinitodraselného (Lachner), hematoxylin (Lachner), NaCl (Mikrochem), KCl (Mikrochem), KCl (Lachner), Aceton (Mikrochem), Xylen (Mikrochem), Ethanol 99,5% obj. (Mikrochem), H₅IO₆ (LEM), HCl (Lachner)

Instrumentace a pracovní pomůcky

Mikrotom (PFM), vodní lázeň 1450 (Sakura), vodní lázeň TW8 (Julaba), termostat IP100-U (Biotech), lednice C4023 (Liebher), digestoř (Merci), mikroarrayer Galileo TMA CK 3500 (ntegrated System Engineering), mikroskop (Axio), pH metr (Denver Instruments), vortex V-1 plus (Biosan), minicentrifuga (Fisher Scientific), magnetická míchačka (Keidolph), digitální váha SBC-21 (Scaltex), digitální timer (Technoline), Kladně nabitá podložní skla (Thermo scientific), krycí skla, barvicí nádoby, parafinový fix Liquid blocker, vlhká komůrka, automatické pipety, špičky, odměrné válce, kádinky, mikrozkmavky, odpadní láhev, buničina, skalpel, pinzeta, gumové rukavice, centrofix.

Biologické vzorky

Z Ústavů klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc nám byly zapůjčeny parafinové bloky s nádorovou tkání.

4.2 Imunohistochemická detekce MMP-19

4.2.1 Příprava roztoků

Zásobní roztok 10x koncentrovaný PBS (10xPBS)

Navážky 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 2,4 g KH_2PO_4 byly rozpuštěny v deionizované H_2O a následně byli doplněny do celkového objemu 1 litru. pH bylo upraveno na hodnotu 6,8. Po naředění na 1xPBS se hodnota pH změnila na 7,4.

1x PBS s Tweenem

100 ml roztoku 10xPBS bylo smícháno s 900 ml deionizované H_2O a 1 ml Tweenu 20. Vždy se připravuje čerstvý roztok.

Roztok pro blokaci endogenní peroxidázy

10 ml 30% roztoku H_2O_2 bylo smícháno s 90 ml 1x PBS s Tweenem. Vždy se připravuje čerstvý roztok.

Blokační mléko

Navážky 3 g sušeného odtučněného mléka, 2 g bovinní albuminové frakce a 1 ml 3% roztoku NaN_3 byly nejprve rozpuštěny v 50 ml roztoku 1x PBS s Tweenem. Po rozpuštění byl objem doplněn do 100 ml roztokem 1x PBS s Tweenem. Vždy se připravuje čerstvý roztok.

Ředící roztok pro primární protilátku

900 μl 1x PBS s Tweenem, 100 μl Fetálního séra a 10 μl 10% roztoku NaN_3 bylo smícháno v mikrozkuhavce. Vždy se připravuje čerstvý roztok.

Ředící roztok pro sekundární protilátku

900 μ l 1x PBS s Tweenem a 100 μ l Fetálního séra bylo smícháno v mikrokumavce. Vždy se připravuje čerstvý roztok.

Kamencový hematoxylin

Roztok kamencového hematoxylinu byl připraven smícháním 50 ml 5% ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), 1 ml 10% hematoxylinu v 96% EtOH, 1 ml 2% H_5IO_6 a 10 kapek 3% koncentrované HCl.

5% zásobní roztok kamence hlinitodraselného ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$): Navážka 5 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ byla rozpuštěna ve 100 ml deionizované H_2O .

10% zásobní roztok hematoxylinu v 96% EtOH: Navážka 1 g hematoxylinu byla rozpuštěna v 10 ml 96% roztoku etanolu.

2% zásobní roztok kyseliny jodisté: Navážka 0,5 g H_5IO_6 byla rozpuštěna ve 25 ml deionizované H_2O .

3% zásobní roztok konc. HCl (35%): Do 91,4 ml deionizované H_2O bylo přidáno po kapkách 8,6 ml konc. HCl.

4.2.2 Imunohistochemická detekce

Příprava TMA řezů

Část vzorků byla hodnocena pomocí tkáňové mikroarraye. Ke kompletaci tkáňové mikroarraye byl využit semiautomatický přístroj Galileo TMA CK 3500. Do pracovní oblasti byl upevněn recipientní blok a donorový blok. Z recipientního bloku byl vyříznut tenký váleček parafínu a do vzniklého prázdného místa byl vložen váleček s vyříznutým vzorkem z donorového bloku. Z každého donorového bloku byly vyříznuty 2 vzorky, které byly v recipientním bloku umístěny na opačných stranách bloku. Pozice jednotlivých vzorků zaznamenával software přístroje.

Po zkompletování mikroarraye byl blok připraven k použití jako běžný parafínový blok s jedním vzorkem.

Příprava tkáňových řezů

Vzorky, zalité v parafínových blocích, byli nařezány na 4 μm tenké řezy a uchyceny na kladně nabitá podložní sklíčka. Sklíčka byla inkubována v termostatu přes noc při teplotě 56 °C.

Deparafinizace tkáňových řezů

Vzorek byl inkubován po dobu 5 minut 3x v roztocích xylenu a poté vždy po 5 minutách v roztoku 99,5% etanolu, následně 80 % etanolu a naposledy 70 % roztoku etanolu. Poté byly vzorky promyty deionizovanou vodou.

Inkubace ve vodní lázni

Vzorky byly inkubovány v předem vyhřátém citrátovém pufru o pH 9 po dobu 40 minut při teplotě 95-99°C. Následně byly vzorky z vodní lázně vytaženy a ponechány 20 minut při laboratorní teplotě. Vzorky byly promyty deionizovanou vodou nejméně 2x a následně byly vzorky ponořeny do roztoku 1x PBS s Tweenem na dobu 5 minut.

Blokace endogenní peroxidázy

Vzorky byly dále ponořeny do čerstvého roztoku pro blokaci endogenní peroxidázy. Inkubace trvala 10 minut a poté byla sklíčka 2x rychle propláchnuta v roztoku 1x PBS s Tweenem.

Oplach

Po rychlém promytí byly vzorky v nádobce ponechány na 5 minut v novém 1x PBS s Tweenem. Stejný krok byl 2x opakován.

Blokace v blokačním mléce

Sklíčka byla následně inkubována v roztoku blokačního mléka po dobu 1 hodiny.

Oplach

Po rychlém promytí (2x) byly vzorky v nádobce ponechány asi na 5 minut v novém 1x PBS s Tweenem. Stejný krok byl 2x opakován.

Aplikace primární protilátky MMP-19

Sklíčka byla opatrně osušena. Pomocí parafínového fixu byla ohraničena oblast kolem řezu. Poté byla do ohraničené oblasti nanесena primární protilátka (200 μ l). Sklíčka byla uložena do vlhké komůrky a byla inkubována v chladu v ledničce přes noc do druhého dne.

Oplach

Následujícího dne, byla sklíčka vložena do nádoby a 2x rychle propláchnuta pufrům 1x PBS s Tweenem. Poté byla sklíčka inkubována v tomto pufru 3x po 5 minutách.

Aplikace sekundární protilátky En Vison+ Dual Link Systém -HRP

Sklíčka byla opatrně osušena a zbavena přebytečného pufru. Následně byla aplikována sekundární protilátka (200 µl) do ohraničené oblasti řezu a sklíčka byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny.

Oplach

Sklíčka byla 2x rychle opláchnuta pufrům 1x PBS s Tweenem. Následně byla sklíčka inkubována 3x5 minut v tomto pufru.

DAB+ vizualizace

Sklíčka byla opatrně osušena a byl odstraněn přebytečný pufr. Poté byl aplikován (200 µl) připravený roztok DAB+ Chromogen systém (1 ml DAB + substrát a 1 -2 kapky Chromogenu).

Sklíčka byla takto inkubována po dobu 10 minut a poté byla opatrně opláchnuta deionizovanou vodou.

Obarvení hematoxylinem

Poté byla sklíčka s řezu vložena do barvicí nádoby s roztokem hematoxylinu. V barvivu byla sklíčka inkubována asi 30 sekund a následně byla sklíčka přenesena do nádoby s deionizovanou vodou. Následně byla nádobka proplachována pod tekoucí pitnou vodou po dobu 2 minut.

Montování skel

Opláchnutá sklíčka byla inkubována po dobu 1 minuty v roztoku acetonu, následně po 1 minutu v roztoku acetonu a xylenu (1:1) a naposledy v roztoku xylenu také po dobu 1 minuty.

Sklíčka byla poté vytáhnutá s xylenu, osušena a zamontována krycím sklem do montovacího média Pertex.

Vyhodnocení

Vyhodnocení prováděl patolog, hodnocena byla pozitivita exprese MMP-19 v cytoplazmě nádorových buněk, v bazálních buňkách bez nádoru a ve stromálních buňkách.

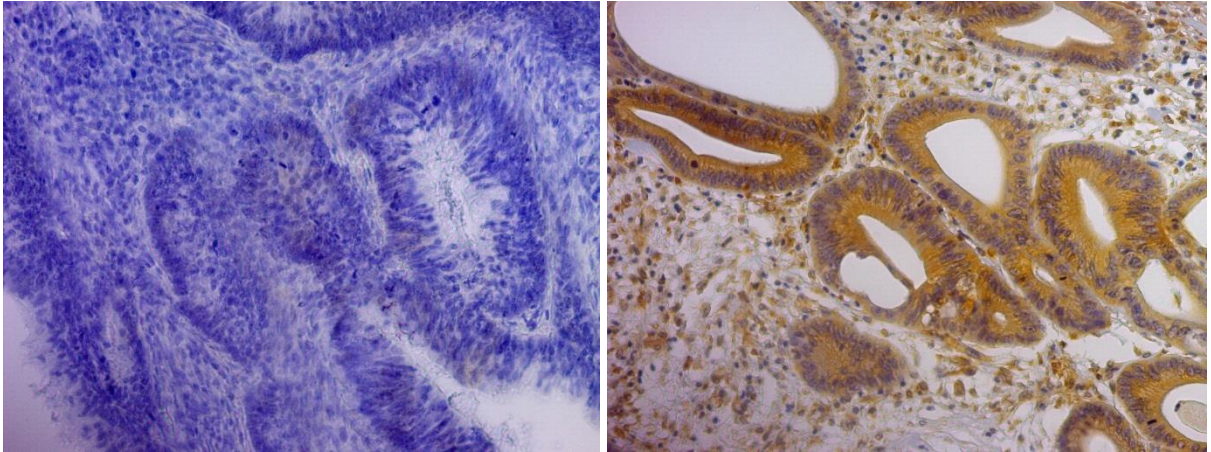
5 Výsledky

Celkem bylo imunohistochemicky otestováno 20 vzorků adenomů a 20 vzorků adenokarcinomů. Všechny vzorky byly testovány nepřímou dvojstupňovou metodou na přítomnost proteinů MMP-19 v cytoplazmě, bazálních buňkách a ve stromálních buňkách. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí H – indexu (pozitivita slabá 1+, střední 2+ a silná 3+, násobena procenty pozitivních buněk). Pozitivní tkáň byla zbarvena do hněda a negativní tkáň zůstávala namodralá (viz. **Obr. 12 a 13**). Slabá pozitivita odpovídá intenzitě zbarvení 10 – 29%, střední odpovídá 30 – 60% a vysoká odpovídá 61 – 100%.

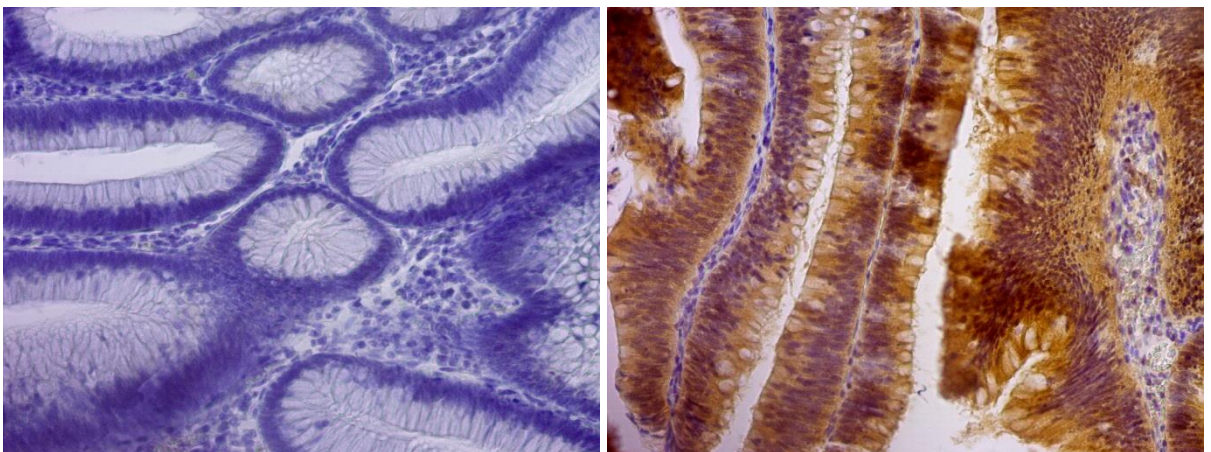
Ve statistickém softwaru R byla zpracovaná získaná data a bylo provedeno srovnání exprese proteinu MMP-19 v jednotlivých částech tkání u adenomů a adenokarcinomů. Byl také sledován vliv histologického typu na celkové přežití (OS – overall survival) prostřednictvím long-rank testu. U vybraných faktorů byly odhadnuty křivky přežívání metodou Kaplan-Meiera. U všech analýz byla stanovena hladina signifikance na 5%.

Statisticky významně se liší exprese u bazálních buněk, exprese je znatelně zvýšena u adenomů. (viz. **Obr. 14 a Tab. 6**). 15 z 20 vzorků adenomů bylo pozitivních a nejčastější intenzita je 2+ (10/20 vzorků = 50%). U adenokarcinomů se vyskytuje MMP-19 v bazálních buňkách výjimečně, v testovaném souboru se jednalo pouze o 1 vzorek z 20.

Pozitivita MMP-19 v cytoplazmě a ve stromálních buňkách se statisticky významně neliší (viz. **Obr. 15-16 a Tab. 6**).



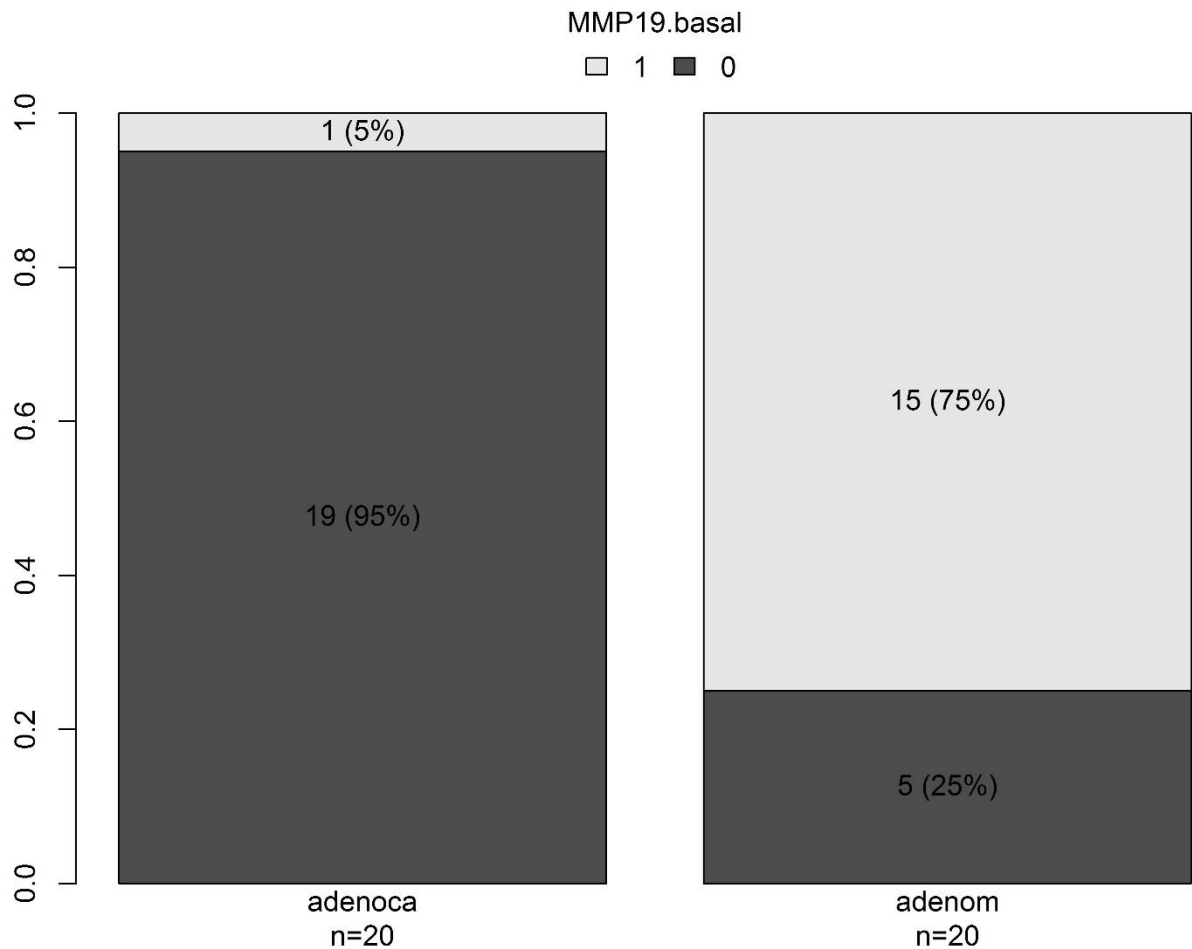
Obr. 12: Na levém obrázku se nachází imunohistochemická detekce proteinu MMP-19 - negativní tkáň adenokarcinomu a na pravém obrázku je ukázka pozitivní detekce (hnědé zbarvení) proteinu MMP-19 u adenokarcinomu.



Obr. 13: Na levém obrázku se nachází imunohistochemická detekce proteinu MMP-19 - negativní tkáň adenomu a na pravém obrázku je ukázka pozitivní detekce (hnědé zbarvení) proteinu MMP-19 u adenomu.

Tab. 6 : Hodnocení positivity a intenzity u adenomů a adenokarcinomů v jednotlivých částech tkáně. 1 = pozitivní, 0 = negativní.

| | Intenzita | adenokarcinom | adenom |
|-----------------------|------------------|----------------------|---------------|
| cytopazma | 0 | 1/20 | 3/20 |
| | 1 | 19/20 | 17/20 |
| Int.cytoplazma | 0 | 1/20 | 3/20 |
| | 1+ | 2/20 | 6/20 |
| | 2+ | 9/20 | 7/20 |
| | 3+ | 8/20 | 4/20 |
| bazální | 0 | 19/20 | 5/20 |
| | 1 | 1/20 | 15/20 |
| Int.bazální | 0 | 19/20 | 5/20 |
| | 1+ | 1/20 | 2/20 |
| | 2+ | 0/20 | 10/20 |
| | 3+ | 0/20 | 3/20 |
| stromální | 0 | 14/20 | 10/20 |
| | 1 | 6/20 | 10/20 |
| Int.stromální | 0 | 14/20 | 10/20 |
| | 1+ | 3/20 | 5/20 |
| | 2+ | 2/20 | 4/20 |
| | 3+ | 1/20 | 1/20 |

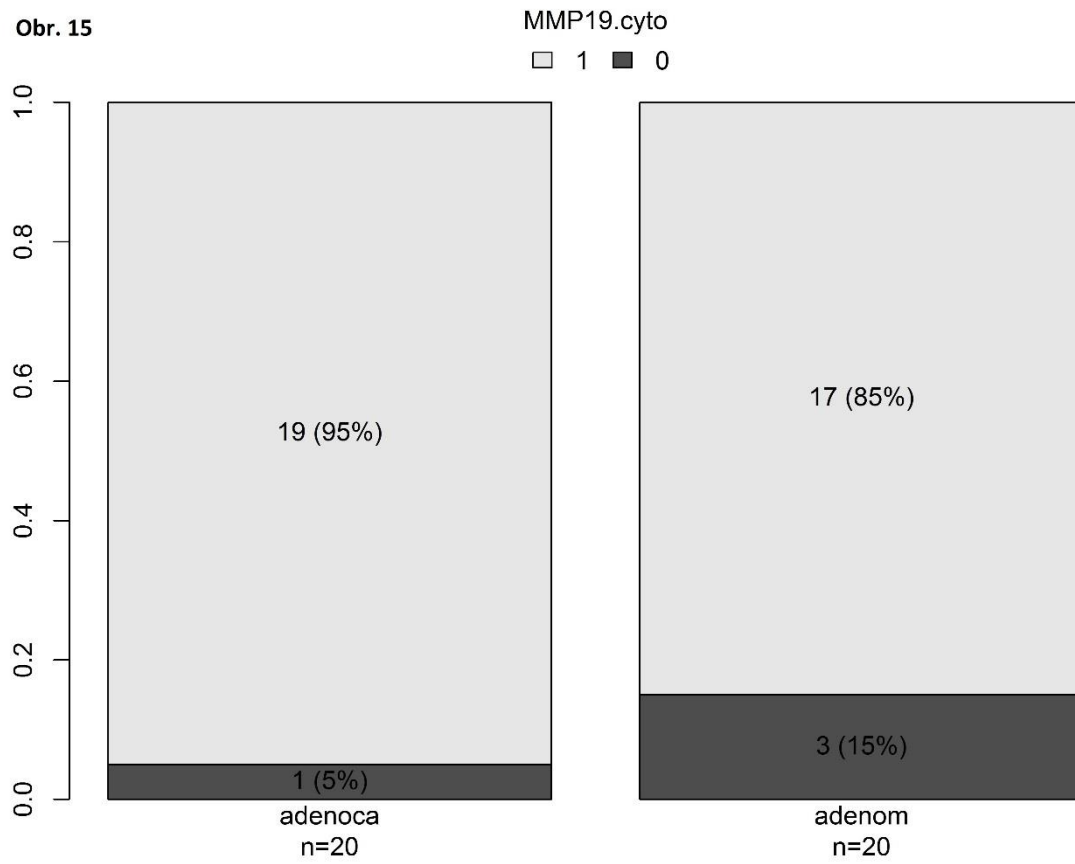


Obr. 14: Pozitivita MMP-19 v bazálních buňkách u adenomu (adenom) a adenokarcinomů (adenoca), n = počet vzorků ve skupině, 1 = pozitivní, 0 = negativní , p-value < 0,001.

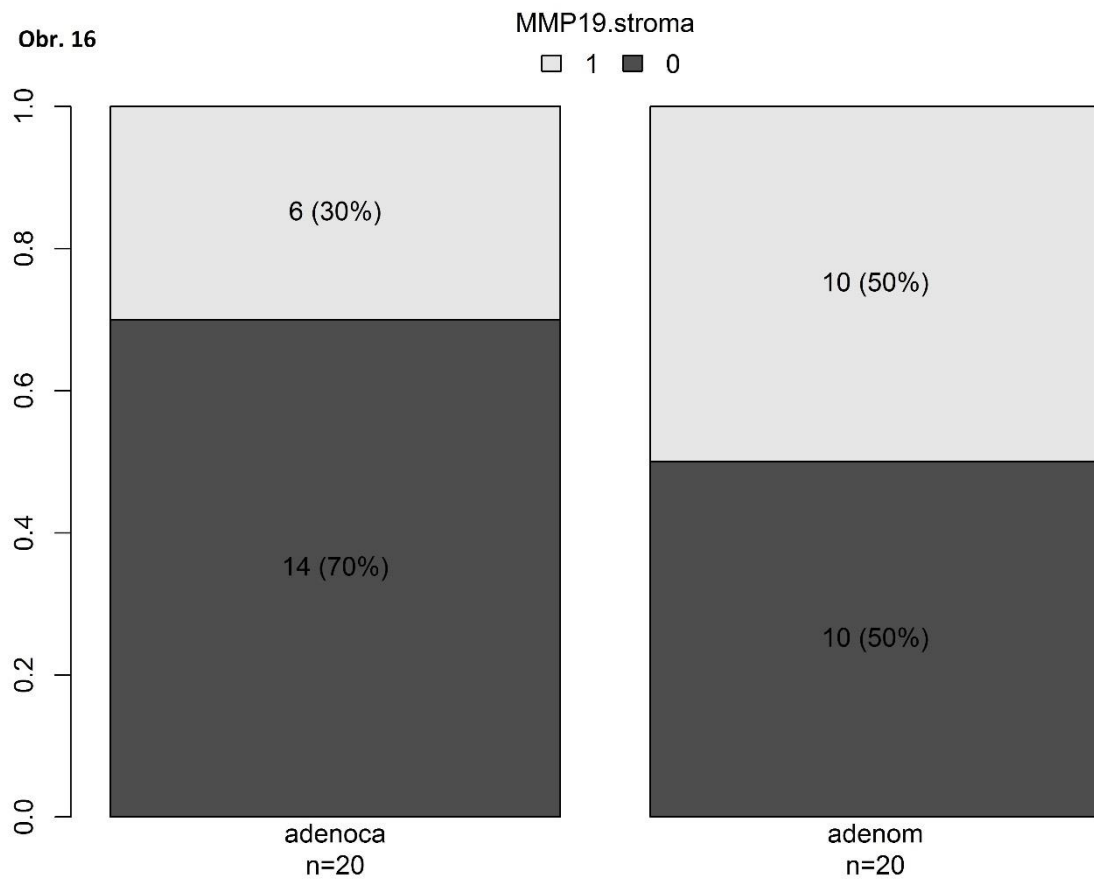
Obr. 15: Pozitivita MMP-19 v cytoplazmě u adenomu (adenom) a adenokarcinomů (adenoca), n = počet vzorků ve skupině, 1 = pozitivní, 0 = negativní, p-value = 0,605.

Obr. 16: Pozitivita MMP-19 ve stromálních buňkách u adenomu (adenom) a adenokarcinomů (adenoca), n = počet vzorků ve skupině, 1 = pozitivní, 0 = negativní, p-value = 0,333.

Obr. 15



Obr. 16



Podle očekávání, ve skupině adenomů žádný z pacientů nezemřel a adenokarcinom se tedy jeví jako rizikový faktor. U adenokarcinomů za sledované období zemřelo 16 z 20 lidí a medián přežití je 28,2 (95%CI = 23,3) měsíců. Procentuální šance přežití jednoho roku je 80±8,9 % (viz. **Obr. 17** a **Tab. 7**).

| histologie | N | events (%) | medián (95%CI) | 1y-surv±SE (%) | logrank, pV |
|---------------|----|------------|----------------|----------------|-------------|
| adenokarcinom | 20 | 16 (80%) | 28.2 (23.3,NA) | 80±8.9 | 0.033 |
| adenom | 8 | 0 (0%) | NA (NA,NA) | 100±0 | |

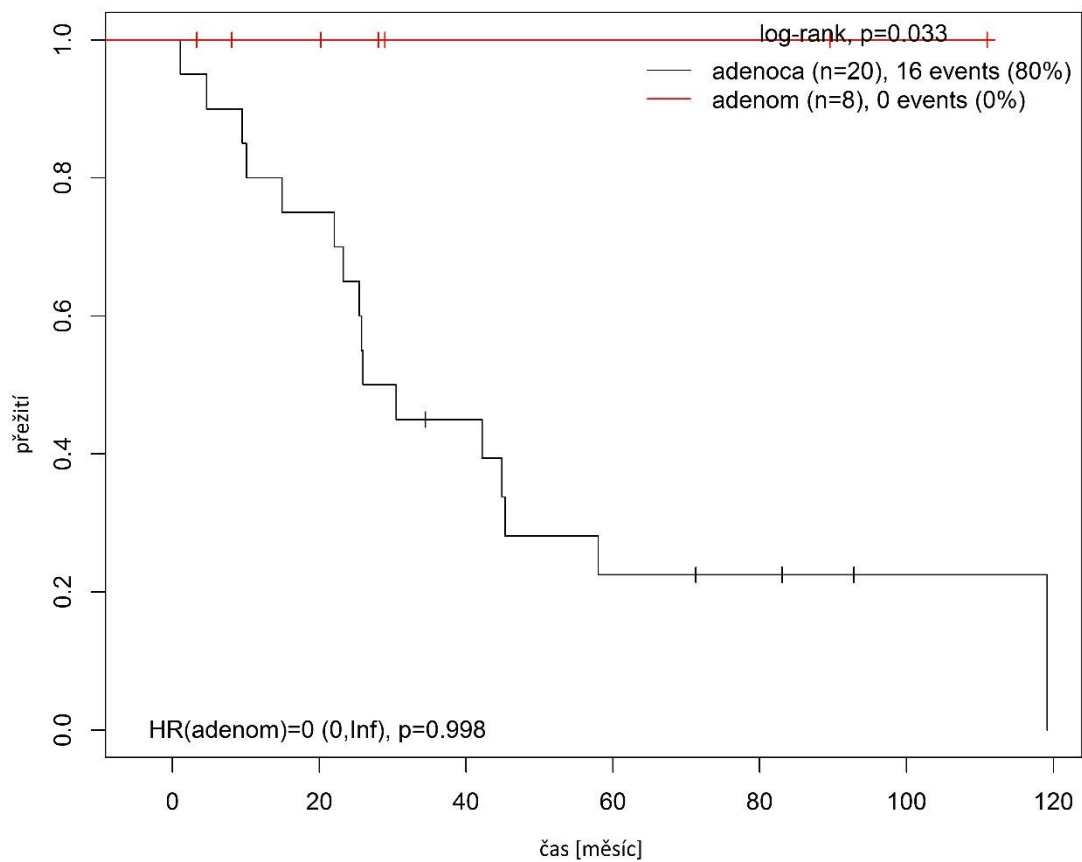
Tab. 7 : Vliv histologie na přežití, testované pomocí long-rank testu (p-value). N = počet pozorování, events = počet událostí (úmrť), 1y-surv±SE (%) = procentuální šance přežití jednoho roku.

Medián přežití u pacientů s diagnózou onemocnění C18 (zhoubný novotvar tlustého střeva) je 45,1 (95%CI = 25,5) měsíců. U pacientů s diagnózou C19 (zhoubný novotvar rektosigmoideálního spojení) je medián přežití 9,5 (95%CI = NA) měsíce a je až 14x rizikovější (Hodnota HR = 14,43 [95%CI = NA]). Pacient s diagnózou C19 byl v testovaném souboru pouze jeden a proto těmto údajům nepřikládáme statistickou důležitost (Viz. **Obr. 18** a **Tab. 8**).

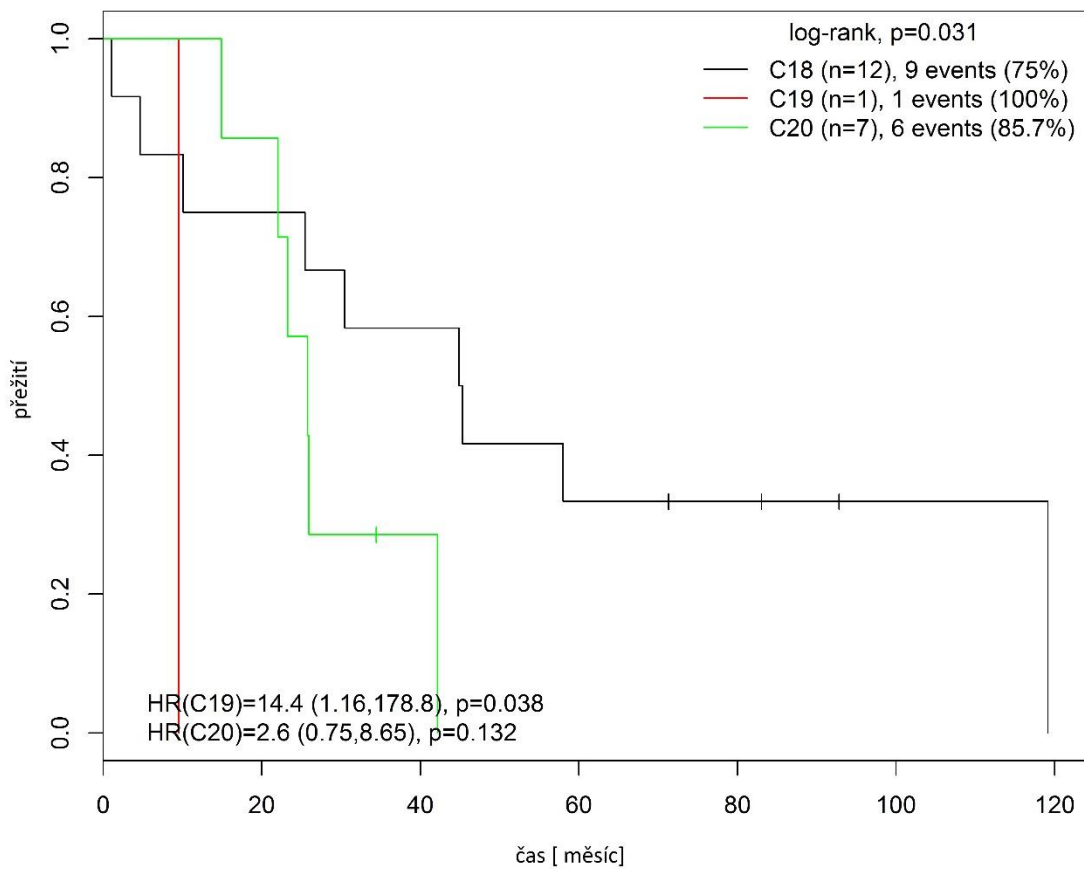
| Diagnóza | N | events (%) | medián (95%CI) | 1y-surv±SE (%) | logrank, pV |
|----------|----|------------|----------------|----------------|-------------|
| C18 | 12 | 9 (75%) | 45.1 (25.5,NA) | 75±12.5 | 0.031 |
| C19 | 1 | 1 (100%) | 9.5 (NA,NA) | 100±0 | |
| C20 | 7 | 6 (85.7%) | 25.8 (22,NA) | 75±12.5 | |

Tab. 8 : Vliv diagnózy onemocnění na přežití, testované pomocí long-rank testu (p-value). N = počet pozorování, events = počet úmrť, 1y-surv±SE (%) = procentuální šance přežití jednoho roku.

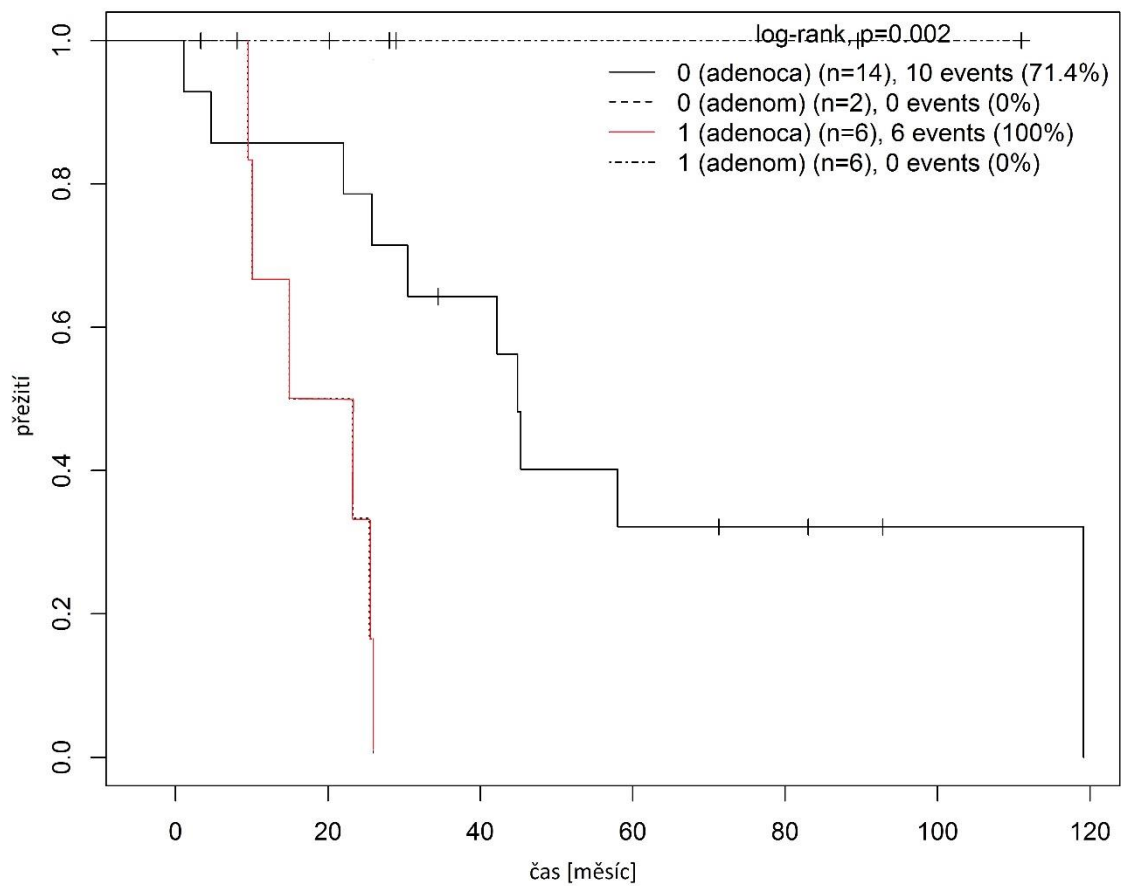
Ve skupině adenokarcinomů ukázal long-rank test jako statisticky významný faktor pozitivitu ve stromálních buňkách (p-value = 0,001), (Viz. **Obr. 19**). Pro přežívání je pozitivita MMP-19 riziková s hodnotou HR = 21,8 (95%CI = 3,45 – 137,25).



Obr. 17: Kaplan-Meierův odhad přežití u adenomů a adenokarcinomů v závislosti na histologickém typu. N = počet pozorování, events = počet událostí (úmrť), p-value = 0,033.



Obr. 18 : Kaplan-Meierův odhad přežití vzhledem k diagnóze onemocnění. N = počet pozorování, events = počet událostí (úmrtí), p-value = 0,031.



Obr. 19: Kaplan-Meierův odhad přežití u pacientů s pozitivní MMP-19 ve stromálních buňkách u adenokarcinomů. N = počet pozorování, events = počet událostí (úmrtí), p-value = 0,002.

6 Diskuze

Cílem práce bylo prozkoumat expresi proteinu MMP-19 pomocí imunohistochemické detekce a následně porovnat výsledky mezi adenomy a adenokarcinomy. Dále bylo cílem pozorovat možnou korelaci mezi celkovým přežitím (OS) a detekcí MMP-19 v adenokarcinomech.

Z výsledků této práce se jeví, že se MMP-19 v bazálních buňkách ztrácí po přeměně adenomu v adenokarcinom. Práce z roku 2002 ukazuje podobné chování MMP-19 u karcinomu kůže. Zvýšená exprese MMP-19 se objevuje u bazálních keratinocytů na povrchu hyperproliferujícího epitelu, ale exprese se snižuje, pokud se bazální keratinocyty stanou maligní (Impola *et al.*, 2002).

Dále naše výsledky ukazují expresi MMP-19 ve stromálních buňkách jako negativní faktor pro celkové přežití. Podle práce autorů Sena *et al.* se MMP-19 exprimuje převážně ve stromálních buňkách a výskyt se zvyšuje u stromálních buněk v karcinomech (Sena *et al.*, 2012). Výsledky naší práce sice ukazují statisticky nevýznamný rozdíl mezi adenomy a adenokarcinomy, ale zhoršené přežití u pacientů s výskytem MMP-19 ve stromálních buňkách ukazuje shodu s autory, podle kterých je přítomnost MMP-19 ve stromálních buňkách důležitým faktorem pro karcinogenezi a progresi karcinomu, což vede k horšímu přežití (Sena *et al.*, 2012).

Práce (Červinková *et al.*) z roku 2014 popisuje snížení exprese MMP-19 ve vzorcích kolorektálních karcinomů. Nalezené publikace zabývající se měřením MMP-19 ve vzorcích adenomů a adenokarcinomů však nerozlišují expresi v cytoplazmě u bazálních buněk a u stromálních buněk. Pouze jediná nalezená práce popisuje expresi ve stromálních buňkách, makrofázích a fibroblastech (Sena *et al.*, 2012).

Hodnocení výsledků nám stěžuje malý soubor pacientů, na základě získaných výsledků však můžeme říci, že byla pozorována nižší exprese MMP-19 u bazálních buněk adenokarcinomů než v adenomu a naše výsledky jsou tak v souladu s trendem obecného útlumu exprese v karcinomech (Červinková *et al.*, 2014). Zároveň byla však pozorována lehce zvýšená, avšak

statisticky nevýznamná exprese ve stromálních buňkách, což je v rozporu s předchozími tvrzeními, ale v souladu s prací (Sena *et al.*) z roku 2012.

Statistická analýza ukázala diagnózu C19 jako rizikový faktor. Tento údaj však nevnímáme jako relevantní, neboť v testovaném vzorku byl pouze jeden pacient s C19. Opět se tedy odkazujeme na nutnost většího souboru pacientů v zájmu získání relevantnějších dat.

Různorodost a častá protichůdnost tvrzení jednotlivých autorů dokazují, že přesná role a funkce MMP-19 není zcela prozkoumána. Většina prací navíc pozoruje tento protein v různých typech buněk a v různých fázích onemocnění. Jak naznačuje práce Červinkové, může svou roli sehrát i nevhodně zvolená protilátka neschopná detekovat MMP-19 bez propeptidové domény. Je tedy patrné, že pro využití MMP-19 jako prognostického faktoru je zapotřebí mnoha dalších studií, objasňujících různou expresi v různých tkáních a stádiích onemocnění.

7 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala detekcí proteinu MMP-19 ve vzorcích adenomů a adenokarcinomů. Byla sledována exprese proteinu MMP-19 v cytoplazmě buněk, v bazálních buňkách a ve stromálních buňkách.

V teoretické části této práce je shrnuta problematika kolorektálního karcinomu a adenomů. Také jsou popsány metaloproteinázy a především MMP-19, její vztah k nádorovým onemocněním a ke kolorektálnímu karcinomu. V poslední části je krátce shrnuta imunohistochemie a využití moderních technik tkáňových mikroaray (TMA).

V experimentální části je následně popsána příprava vzorků k detekci, tvorba TMA a samotná imunohistochemická detekce.

Z výsledků naší statistické analýzy jsme zjistili, že výskyt MMP-19 ve vzorcích adenomů je výrazně vyšší u bazálních buněk a nižší u bazálních buněk adenokarcinomů. Výskyt v cytoplazmě a ve stromálních buňkách se výrazně nelišil. Přežití bylo horší u pacientů s adenokarcinomem, neboť ve skupině adenomů nikdo nezemřel. U karcinomů jsme zjistili, že výskyt MMP-19 ve stromálních buňkách se jeví jako negativní faktor vzhledem k přežití.

Na základě těchto výsledků soudíme, že MMP-19 hraje roli v procesu maligního zvratu adenomu na adenokarcinom a je tedy rizikovým faktorem. Zároveň předpokládáme, že po maligním zvratu přítomnost MMP-19 klesá, jak jsme pozorovali v bazálních buňkách a jak je popsáno v literatuře. Je ale nutné analyzovat větší soubor pacientů, abychom toto chování MMP-19 lépe pochopili a spolehlivě doložili.

8 Literatura

ADACHI Y., YAMAMOTO H., ITOH F., ARIMURA Y., NISHI M. (2001) Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int. J Cancer* 95: 290–294.

BISTER V.O, SALMELA M.T., KARJALAINEN M.L., URJA J., LOHI J., PUOLOKKAINEN J., LOPEZ-OTIN C., SAARIALHO-KERE E. (2004) Differential Expression of Three Matrix Metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in Normal and Inflamed Intestine and Colon Cancer. *Digestive Diseases and Sciences* 49(4) 653–661.

BODE W. (2003) Structural basis of matrix metalloproteinase function. *Biochemical Society* 70, 1–14.

BRAUER R., BECK I.M., RODERFELD M., ROEB E., SEDLACEK R. (2004) Matrix metalloproteinase-19 inhibits growth of endothelial cells by generating angiostatin-like fragments from plasminogen. *BMC Biochemistry*, 12:38.

CHAN K.C., LUNG M.L. (2013) MMP19 (matrix metalloproteinase 19). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 18(5): 327-329.

CLARK I.M., SWINGLER T.E., SAMPIERI C.L., EDWARDS D.R. (2008) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40: 1362–1378.

COUFAL O, (2003) Prognostické a prediktivní faktory u kolorektálních karcinomů. Disertační práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce Doc. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.

ČERVINKOVÁ M., HORÁK P., KANCHEV I., MATĚJ R., FANTA J., SEQUENS R., KAŠPÁREK P., SARNOVÁ L., TUREČKA J., SEDLÁŠEK R. (2014) Differential Expression and Processing of Matrix Metalloproteinase 19 Marks Progression of Gastrointestinal Diseases. *Folia Biologica* (60), 113-122.

FLEMING M., SREELAKSHMI R., SERGEI F. T. HANLIN L. W. (2012) Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.*, 3(3).

HOCH, J. (2005) Návrh standardu chirurgické léčby kolorektálního karcinomu. *Bulletin HPB chirurgie*, 13(2).

IMPOLA U., TORISEVA M., SUOMELA S., JESKANEN L., HIETA N., JAHKOLA T., GRENMAN R., KAHARI VM., SAARALLHO-KERE U. (2003) Matrix metalloproteinase-19 is expressed by proliferating epithelium but disappears with neoplastic dedifferentiation. *Int J Cancer*. 103(6):709-16.

JOST M., FOLGURELAS A.R., FRÉRART F., PENDÁS A.M., BLACHER S., HUARDS X., BERNDT S., MUNAUT C., CATALDO D., ALVAREZ J., MELEN-LAMALE L., FOIRDART J-M., LOPEZ-OTIN C., NOEL A. (2006) Earlier Onset of Tumoral Angiogenesis in Matrix Metalloproteinase-19–Deficient Mice. *Cancer Res*; 66:5234-5241.

MUELLER M.S., MAUCH S., SEDLACEK R. (2000) Structure of the human MMP-19 gene. *Gene* 252, 27–37.

NAGASE H, WOESSNER J. F. (1999) Minireview: Matrix Metalloproteinases. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 274 (31) 21491–21494.

NAGASE H., VISSE R., MURPHY G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69, 562 – 573.

NAZAR M.T.J (2009) Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med.*; 29(2): 123–127.

REBECCA A., WAGENAAR-MILLER, GORDEN L, LYNN M. M. (2004) Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: Is it worth talking about? *Cancer and Metastasis Reviews* 23: 119–135.

RYDLOVA M., HOLUBEC L., LUDVIKOVA M., KALFERT D., FRANEKOVA J., POVYSIL C., LUDVIKOVA M., (2008) Biological Activity and Clinical Implications. of the Matrix Metalloproteinases. *ANTICANCER RESEARCH* 28: 1389-1398.

SENA P., MARIANI F., MARZONA L., BENINCASA M., PONZ DE LEON M., PALUMBO C., RONCUCCI L. (2012) Matrix metalloproteinases 15 and 19 are stromal regulators of colorectal cancer development from the early stages. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 41: 260-266.

SENGUPTA N., MACDONALD T. T. (2007) The Role of Matrix Metalloproteinases in Stromal/Epithelial Interactions in the Gut. *PHYSIOLOGY* 22: 401–409.

STERNLICHT M.D., WERB Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17: 463–516.

STRACKE J.O., HUTTON M., STEWART M., PENDÁS A.M., SMITH B., LÓPEZ-OTIN C., MURPHY G., KNAUPER V. (2000) Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Human Matrix Metalloproteinase 19. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 275, (20): 14809–14816.

YANG W., ARII S, GORNIN-RIVAS M.J., MORI A., ONODERA H., IAMURA M. (2001) Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer . Cancer* 91: 1277–1283.

ZENG Z.S., HAUNG Y., COHEN A.M., GUILLEM J.G. (1996) Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue rna levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 14: 3133–3140.

Internetové zdroje:

<http://www.cancer.gov>

<http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/overviewguide/colorectal-cancer-overview-what-is-colorectal-cancer>

<http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>

<http://www.genecards.org>

<http://www.linkos.cz>

<http://www.merckmanuals.com/professional/gastrointestinal-disorders/tumors-of-the-gi-tract/polyps-of-the-colon-and-rectum>

<http://www.nature.com/modpathol/journal/v16/n4/full/3880775a.html>

<http://oncolex.org/Colorectal-cancer/Background/Histology.aspx>

<http://www.pinterest.com/surgicaltechnol/general-surgerycolorectal-surgery>

<http://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumorcarcinomaarising.html>

<http://www.phosphosite.org/>

<http://parsgene.com/en/product/%D8%B1%DB%8C%D8%B2%D8%A2%D8%B1%D8%A7%DB%8C%D9%87-%D9%87%D8%A7%DB%8C-%D8%A8%D8%A7%D9%81%D8%AA%DB%8C/>

<http://www.svod.cz>

<http://www.uniprot.org>

Knihy :

BERANOVÁ M., TONAT Z. (2012) Principy a příklady imunohistochemie. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni.

DUŠEK L. (2012) Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat.. ISBN 978-80-87347-07-2.

HAMILTON,, S. R. LAURI A. A. (2000) World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. ISBN 92 832 2410 8.

HOLOUBEC L. (2004) Kolorektální karcinom: Současné možnosti diagnostiky a léčby. 2004 ISBN 8024706369.

JABLONSKÁ M. (2000) Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-777-X.

ÚZIS ČR, NOR ČR (2013) Novotvary 2010 ČR: Cancer Incidence 2010 in the Czech Republic. ISBN 978-80-7472-034-5.

SOBIN, L (ed.), WITTEKIND C., TNM klasifikace zhoubných novotvarů. 5. vyd. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2000. ISBN 80-7280-025-6.

VYZULA R., ŽALOUDÍK J. (2007). Rakovina tlustého střeva a konečníku: vybrané kapitoly. ISBN 978-80-7345-140-0.

9 Seznam použitých zkratk

AJCC - American Joint Committee on Cancer

AMK - Aminokyselina

CRC - Kolorektální karcinom

CIN - Chromozomální instabilita

CT - Počítačová tomografie

DNA - Deoxyribonukleová kyselina

DAB - 3,3-diaminobenzidin

ECM - Extracelulární matrix

FAP - Familiární adenomatózní polypóza

IHC - Imunohistochemie

IARC - Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny

MKN - Mezinárodní klasifikace nemocí

MMP - Metaloproteináza

MRI - Magnetická rezonance

mRNA - Messenger ribonukleová kyselina

NOR - Národní onkologický registr

NFκB - Vazebný faktor

OS - Celkové přežití

PBS - Promývací pufr

qRT-PCR - Real time polymerase chain reaction

RAS-1 - Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed – 1

RAS-6 - Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed – 6

RAS-9 - Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed – 9

SP-1 - Vazebný faktor

TNM - Tumor node metastasis

TIMP - Tkáňový inhibitor metaloproteináz

WHO - Světová zdravotnická organizace

TMA - Tkáňová mikroaray