

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Trněná
Studijní program:	Organická chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.
Konzultant práce:	MUDr. MVDr. Jozef Škarda, PhD.
Termín odevzdání práce:	22. 7. 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 dne.....2013

.....

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, 779 00 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 tlustého střeva je dlouhodobý a vícestupňový proces, který závisí na řadě interakcí mezi nádorovými buňkami, extracelulární matrix a cílovou tkání. Významnou roli v procesu vzniku nádorů a metastazování hrají matrix metaloproteinázy (MMP). MMP jsou dobře známy díky své schopnosti štěpit proteiny extracelulární matrix a podílet se na řadě fyziologických a patologických procesů jako jsou angiogeneze, záněty, apoptóza a nádory. 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. V této práci byla sledována imunohistochemická exprese MMP-19 ve formalinem fixovaných a do parafinu zalitých vzorcích kolorektálního karcinomu, pomocí standardní dvoustupňové imunohistochemické metody s použitím diaminobenzidinu, jako chromogenního substrátu. Uvedená exprese byla korelována s výskytem metastáz do lymfatických uzlin, jater a měkkých tkání. Zároveň byla uvedená exprese korelována s gradingem a s hloubkou invaze nádoru. V rámci našeho souboru bylo prokázáno, že exprese proteinu MMP-19 v nádorovém epitelu koreluje ve vztahu k tvorbě uzlinových metastáz.

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

Počet stran: 50

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: Institute of Molecular and Translational Medicine
Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University
Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
Czech Republic

Supervisor: Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract:

Colon cancer is one of the most often oncological diagnose in the Czech Republic and in all developed countries. Cancerogenesis is a multistep, long lasting process which is dependent on a series of interactions among tumorous cells, extracellular matrix and target tissue. Matrix metalloproteinases (MMP) play a very important role in formation and metastasis. MMP are able to degrade proteins of extracellular matrix and are involved in a lot of physiological and pathological functions such as angiogenesis, inflammation, apoptosis and tumors. MMP-19 plays a key role in the process of metastasizing of colorectal carcinoma and also in the primary tumor progression , as described in previous in vitro studies. This work deals with the detection of immunohistochemical expression of MMP-19 in formalin-fixed and paraffin-embedded samples of colorectal cancer by using the standard two-step immunohistochemical method by using the diaminobenzidine as a chromogenic substrate. The expression was correlated with the occurrence of lymph node liver nad soft tissue metastasis. It was also mentioned, that the expression correlated with grading and with depth of tumor invasion. We demonstrated, that the expression of MMP-19 correlated with lymph node metastases.

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

Number of pages: 50

Language: Czech

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM (CRC).....	2
2.1.1	Epidemiologie.....	2
2.1.2	Biologická aktivita CRC.....	4
2.1.3	Diagnostika	4
2.2	MATRIX METALOPROTEINÁZY (MMP).....	7
2.2.1	Funkce MMP	7
2.2.2	Historie MMP	7
2.2.3	Rozdělení a struktura MMP	8
2.2.4	Regulace aktivity MMP	11
2.3	MMP-19.....	12
2.3.1	Charakteristika MMP-19	12
2.3.2	Struktura MMP-19.....	12
2.3.3	Aktivita a specifita	13
2.4	METASTAZOVÁNÍ.....	14
2.4.1	Molekulární mechanismy v procesu metastazování	14
2.4.2	MMP a metastazování	16
2.4.3	MMP-19 a metastazování	18
2.5	IMUNOHISTOCHEMIE	20
2.5.1	Typy imunohistochemických metod.....	21
2.5.2	Tvorba parafinových bloků.....	23
2.5.3	Tkáňové mikromarray.....	24
3	PRAKTICKÁ ČÁST	25
3.1	MATERIÁL A METODA.....	25
3.1.1	Biologický materiál	25
3.1.2	Chemikálie	25
3.1.3	Přístrojové vybavení	25
3.1.4	Materiál.....	25
3.1.5	Imunohistochemická detekce protilátek: MMP19 - 5	26
3.1.6	Samotná imunohistochemická detekce	28
4	VÝSLEDKY	31
5	DISKUZE	38
6	ZÁVĚR	40
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	41
8	LITERATURA.....	42
9	PŘÍLOHY.....	51

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 a věnuje se i popisu imunohistochemie, která byla použita v této práci.

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

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kolorektální karcinom (CRC)

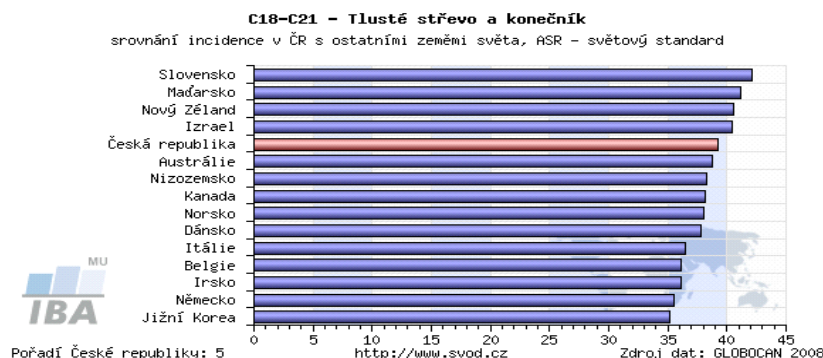
2.1.1. Epidemiologie

Kolorektální karcinom 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). Celosvětově 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 vede ke zvyšování prevalence, tedy počtu žijících osob, u kterých byl v minulosti diagnostikován a léčen CRC (Dušek a kol., 2012).

Jedním z nejpostiženějších států na světě je Česká Republika (společně se Slovenskem a Maďarskem) (Petruželka a Konopásek, 2003). Dle dat studie Estimates of the Cancer Incidence and Mortality in Europe in 2006 (Ferlay a kol. 2007) (incidence kalkulovaná na evropský věkový standard) je ČR s roční incidencí 94,4 / 100 000 mužů na 2. místě v Evropě a s roční incidencí 46,0 / 100 000 žen na 3. místě. 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). Onemocní každý 20. obyvatel (Kocáková, 2005). Populační zátěž je skutečně vysoká, ročně je v ČR nově diagnostikováno 7800–8100 pacientů s tímto karcinomem a 3800–4200 pacientů na něj zemře (Dušek a kol., 2012, Ferlay a kol, 2010).

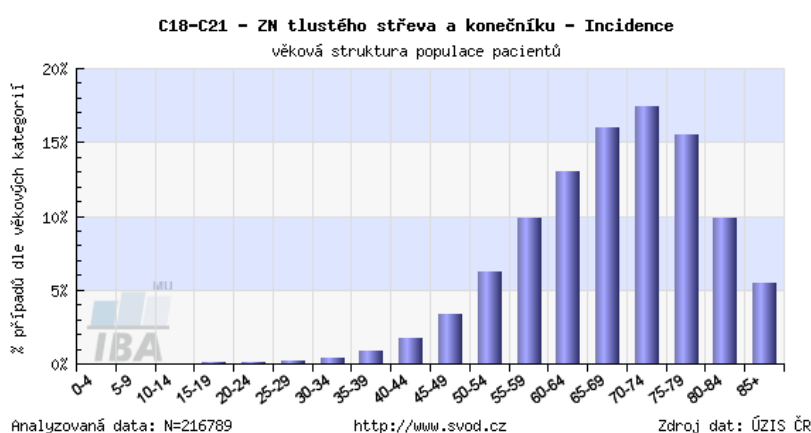
Obecně lze říci, že incidence CRC přirozeně narůstá s věkem, stejně jako je tomu u většiny ostatních nádorů. Stále platí, že CRC je častější v ekonomicky vyspělejších zemích, což může být spojeno s vyšším příjmem živočišných tuků, s nedostatkem vlákniny v potravě a nedostatkem fyzické aktivity, spojeným s obezitou (Vyzula, 2009).

Hlavním zdrojem dat o epidemiologii zhoubných nádorů je Národní onkologický registr ČR (NOR). Dnes je NOR nedílnou součástí komplexní onkologické péče a při 100% pokrytí české populace obsahuje za období 1977–2009 více než 1,7 milionu záznamů. Registrace novotvarů je legislativně zakotvena a je povinná. Z tohoto počtu pak téměř 12 % záznamů představují zhoubné nádory tlustého střeva a konečníku (Dušek a kol., 2012).



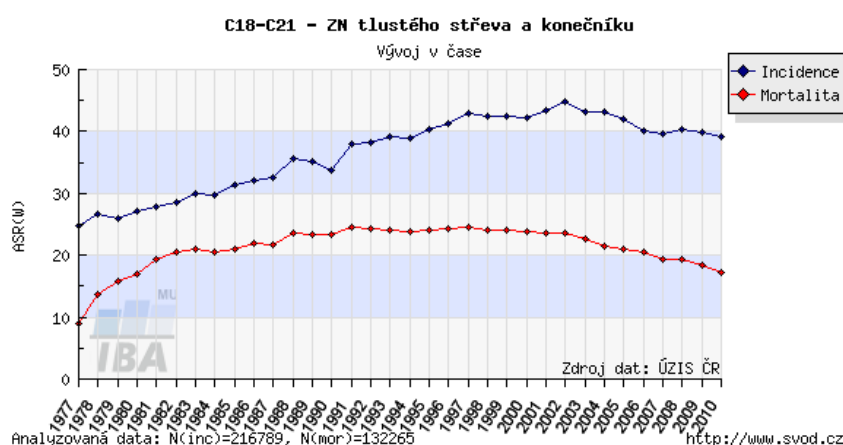
Obrázek 1: Incidence CRC ve světě ve srovnání s ČR (URL:<<http://www.svod.cz/>>).

Česká Republika je v incidenci kolorektálního karcinomu na předních místech.



Obrázek 2: Incidence věkového zastoupení pacientů s CRC (URL:<<http://www.svod.cz/>>).

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



Obrázek 3: Incidence a mortalita (URL:<<http://www.svod.cz/>>).

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

2.1.2. Biologická aktivita CRC

Kolorektální karcinom je solidní nádor zažívacího traktu, který se šíří lokálně lymfaticky a hematogenně. Lokální šíření se děje plošně, stěnou střeva a jejími vrstvami, včetně prorůstání mimo střevo do přilehlých tkání a orgánů, výjimečně formou implantačních metastáz v úsecích distálně od nádoru. Lymfatické šíření spočívá v nádorovém postižení spádových uzlin nebo nádorovém postižení lymfatických cév (nádorová lymfoangiopatie). Hematogenní šíření spočívá v zanesení uvolněných životaschopných nádorových buněk krevním proudem do dalších orgánů, především do jater a plic, důsledkem je vznik vzdálených metastáz. Karcinom se může šířit jinými formami - angioinvasí, neuroinvasí, vytvářením shluků nádorových buněk ("budding") apod. (URL:<<http://www.hpb.cz/>>).

Naprostou většinu nádorů tlustého střeva a konečníku tvoří adenokarcinomy (maligní nádory ze žláзовého epitelu). Vznik karcinomů tlustého střeva je mnohastupňový proces. Na sliznici tlustého střeva nejprve vzniká benigní polyp, ve kterém dochází k dalším změnám buněk, které nakonec vyústí v karcinom (Petruželka a Konopásek, 2003). Je to důsledek vzniku různých genových abnormalit, většinou zřejmě spojených s delecí supresorových genů. (URL:<<http://www.mojemedicina.cz/>>). 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 (Petruželka a Konopásek, 2003).

2.1.3. Diagnostika

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 daných vyšetření může onkolog stanovit stádium kolorektálního karcinomu (obr. 4), které je rozhodující pro prognózu a léčbu nádorového onemocnění (URL:<<http://www.labtestsonline.cz/>>).

Stadium vyjadřuje stupeň pokročilosti choroby a jeho určení má zásadní význam pro volbu vhodného terapeutického postupu. Jednotlivá stadia jsou definována následovně:

TMN klinická klasifikace

T – Primární nádor	
TX	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
Tis	Karcinom in situ: intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae ¹
T1	Nádor postihuje submukózu
T2	Nádor postihuje tunica muscularis propria
T3	Nádor prorůstá přes muscularis propria do subserózy nebo neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně
T4	Nádor přímo porušuje jiné orgány či struktury ² a / nebo perforuje vescerální peritoneum

Poznámka: ¹ Tis zahrnuje nádorové buňky, jež nepřesahují bazální membránu žlázek (intraepiteliálně) či lamina propria mucosae (intramukózně) bez šíření přes muscularis mucosae do submukózy.

² Přímé šíření u T4 zahrnuje též invazi do jiných segmentů kolorekta přes serózu, např. invazi do sigmatu z karcinomu céka.

N- Regionální mízní uzliny	
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	V regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	Metastázy v 1 až 3 regionálních mízních uzlinách
N2	Metastázy ve 4 nebo více regionálních mízních uzlinách

Poznámka: Nádorový uzlík o průměru více než 3 mm v perirektálním nebo perikolické tukové tkáni bez histologického průkazu zbytku mízní uzliny v uzlíku, se klasifikuje jako metastázy v regionální mízní uzlině. Nádorový uzlík v průměru do 3 mm se však klasifikuje v kategorii T, jako diskontinuální šíření, tj. T3.

M – Vzdálené metastázy	
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Nejsou vzdálené metastázy
M1	Vzdálené metastázy

Diferenciace

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

Diagnóza:

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



Obrázek 4: Grafické znázornění stádií nádoru CRC (URL:<<http://www.rakovinastreva.cz/>>). 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 nevyléčitelnou chorobu (URL:< <http://www.labtestsonline.cz/>>). Hlavním léčebným cílem u pacientů s metastatickým onemocněním je prodloužení přežití a zlepšení kvality života (Kocáková, 2005).

2.1.4. Příčiny vzniku CRC

Ve světě obecně platí, že u žen je pravděpodobnost výskytu CRC větší, než u mužů. V České Republice však častěji onemocní muži. Příčina vzniku kolorektálního karcinomu zatím není zcela jasná. Pravděpodobně jde o souběh několika faktorů. Máme za to, že jedním z nich je nedostatek vlákniny, nadbytek červeného masa a živočišných tuků v naší stravě. Je to spojeno i s častější nadměrnou konzumací piva, která riziko výskytu rakoviny výrazně zvyšuje, dále také nadváha, kouření, konzumace alkoholu nebo nedostatečný příjem ochranných látek, např. vitamínu C či kyseliny listové (URL:<<http://www.demografie.info/>>). Nezanedbatelnou úlohu ale hrají i vrozené dispozice (URL:<<http://www.molnar.medikus.cz/>>).

Významným rizikovým faktorem pro rozvoj kolorektálního karcinomu jsou střevní polypy. Jsou to nezhoubné výrůstky sliznice střeva. Najdeme je u mnoha lidí starších 50 let. Většinou nepůsobí žádné obtíže. Některé z nich (adenomy), se ale mohou zvrhnout a dát základ pro růst nádoru (URL:<<http://www.demografie.info/>>).

2.2. Matrix metaloproteinázy (MMP)

2.2.1. Funkce 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. Mnoho MMP hraje zásadní roli v patogenezi revmatoidní artritidy, nádorové angiogenezi a metastazování (Mueller a kol., 2000). Makromolekuly extracelulární matrix (ECM), jsou důležité pro tvorbu buněčného prostředí, potřebného při vývoji a morfogenezi (Nagase a kol., 1999, Sternlich a kol., 2001). 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 onemocněním, jako je artritida, rakovina, ateroskleróza, vředy a fibrózy (Woessner a kol., 1998).

Podstatou MMP je schopnost vázat ve svém aktivním místě Zn^{2+} , který je nezbytný pro funkci a aktivitu enzymu. Mohou ale vázat i jiné ionty, např. Ca^{2+} , který je důležitý pro optimální konformaci molekuly (Crawford a kol., 1994-5). 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 (Kukačka a kol., 2008).

2.2.2. Historie MMP

První člen enzymatické rodiny metaloproteináz byl popsán v roce 1962 vědci Jerome Gross a Charles M. Lapiere - v tu dobu označován jako kolagenóza (Gross a kol., 1962). Byl objeven ve tkáni očásku žabího pulce a tento objev byl publikován ve článku s názvem „Jak se z žabího pulce stal princ“ (Brinckerhoff a Matrisian, 2002). V roce 1968 byl izolován z lidské kůže, z čehož se zjistilo, že je syntetizován jako zymogen, tedy inaktivní forma. Později se prokázal u obratlovců a následně u bezobratlých a rostlin. V roce 1990 byl popsán princip udržení inaktivní formy – latence metaloproteináz mechanismem tzv. cysteinového spínače (cysteine switch) (Curry a kol., 2003). Jde o mechanismus, při kterém propeptid Cys účinkuje jako čtvrtý ligand katalytického zinku, čímž zabráňuje tvorbě vazby na molekulu vody, která hraje roli při hydrolýze peptidového substrátu (Sternlicht a Werb, 2001).

Později umožnila kompletní sekvence genomu člověka identifikovat sestavu MMP, které jsou produkovány lidskými buňkami. Identifikovalo se 24 různých genů kódujících členy rodiny MMP (Puente a kol., 2003).

2.2.3. Rozdělení a struktura MMP

Na základě organizace domén jsou MMP seskupeny podle jejich substrátové specifity a primární struktury do šesti skupin na kolagenázy, gelatinázy, stromelyziny, matrilýziny, MMP membránového typu a ostatní MMP (tab.1) (Mueller a kol., 2000, Lennarz a Lane, 2004). *Kolagenázy* (MMP-1, 8, 13, 18) štěpí intersticiální kolagen. Substrát rozpoznávají přes hemopexinovou doménu (Visse a Nagasse, 2003). *Gelatinázy* (MMP- 2, 9) jsou schopny enzymaticky zpracovat substráty ECM, jako například kolagen I a IV. Pro gelatinázy je charakteristická přítomnost domény vázající kolagen (CBD), který se vyskytuje na jejich katalytické doméně (Patterson a kol., 2001). *Stromelyziny* (MMP- 3, 10, 11) jsou schopny hydrolyzovat kolagen typu IV, ale nejsou schopny štěpit fibrilární kolagen typu I (Murphy a kol., 1993). *Matrilýziny* (MMP- 7, 26) nemají hemopexinovou doménu, jsou schopny zpracovat kolagen typu IV, ale naopak kolagen typu I. nezpracují (Marchenko a kol., 2004). *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 (English a kol., 2000). *Další MMP* (MMP- 12, 19, 20, 21, 23, 27, 28) z nichž některé MMP, konkrétně (MMP-12), RASI-1 (MMP-19), MMP-21 a MMP-28 nemohou být zahrnuty do žádné z výše uvedených tříd (Nagase a kol., 2006).

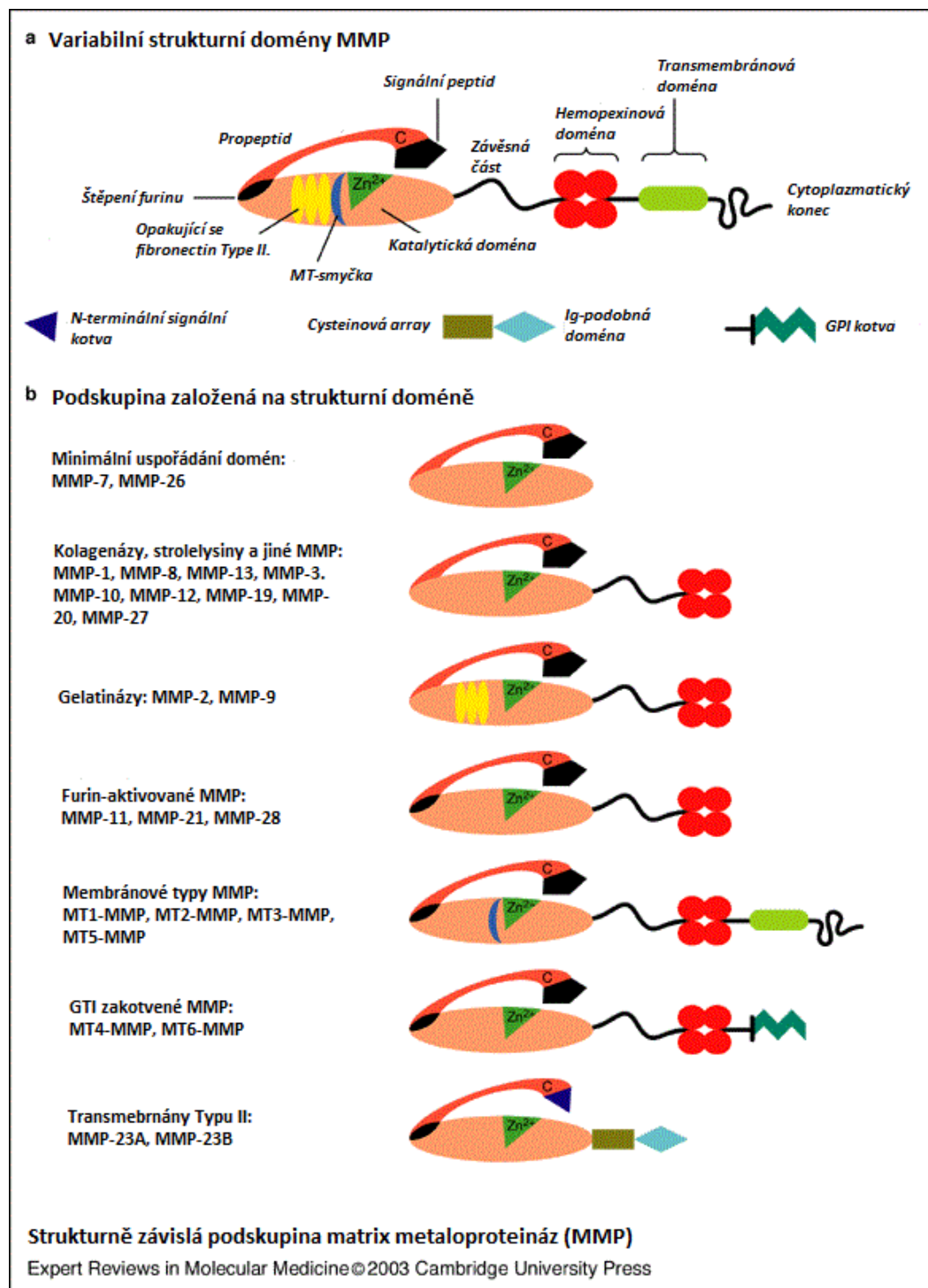
Co se struktury týče, tak většina matrix metaloproteináz obsahuje propeptid, katalytickou doménu a C terminální doménu (Babičková, 2001). Propeptid je tvořen asi 80 aminokyselinami a má jedinečnou konzervativní PRCG sekvenci. Cystein v tomto pořadí ("cystein switch") plní zásadní funkci pro zachování katalytické latence ligandu zinku (Van Wart a kol., 1990, Becker a kol., 1995). Cystein "switch" v propeptidu je běžným konstrukčním vzorem, kde se tři histidiny v souřadnici s cysteinem v propeptidu zkoordinují s katalytickým iontem zinku (Allan a kol., 1995, Steffensen a kol., 1995). Pomocí propeptidové domény jsou transmembránové MMP zakotveny v cytoplasmatické membráně. Před propeptidem (na N-terminálním konci enzymu) se nachází signální propeptid, řídící sekreci MMP z buňky. Skupina MMP, které jsou aktivovány intracelulárně, obsahují navíc mezi propeptidem a katalytickou doménou sekvenci 10 aminokyselin, jejichž štěpením dochází k odštěpení propeptidu (Babičková, 2001).

Katalytická doména je tvořena asi 170 aminokyselinami a obsahuje zinek závazný vzor HE XX HXX G XX H (Bode a kol., 1993). Katalytické domény matrixinů mají další strukturní ionty zinku a 2-3 ionty Ca^{2+} , které jsou nezbytné pro stabilitu a výraz enzymové aktivity (Allan a kol., 1995, Steffensen a kol., 1995). 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 (Bode, 1995). Funkce prolinu, jako spojovacího peptidu, který se spojuje na katalytické doméně hemopexinu není známá, ale jeho interakce s interakce s trojitou šroubovicí kolagenu se předpokládá na základě molekulárního modelování (De Souza a kol., 1996). 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 (obr. 5) (Krizkova a kol., 2011). Díky metodám rentgenové krystalografie a NMR je dnes známá struktura mnoha MMP (Bode, 2003).

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	Metaloeleatáza
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-23	CA-MMP	Femalyzin
MMP-25	MT-6 MMP	Leukolyzin
MMP-26	Matrilysin 2	Endometáza
MMP-28	Epilyzin	



Obrázek 5: Struktura matrix metaloproteinázy (URL:<<http://journals.cambridge.org/>>).

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

2.2.4. Regulace aktivity MMP

K dosažení běžných (nebo patologických) funkcí chodu organismu, musí být MMP přítomny ve správném typu buněk a docházet k aktivaci a inhibici ve správný čas. MMP jsou přísně regulovány na transkripční i post-transkripční úrovni a jsou kontrolovány prostřednictvím svých aktivátorů a inhibitorů. Aktivace MMP je velmi složitý proces a za fyziologických podmínek jsou rozpoznány tři základní úrovně a to regulace transkripce, aktivace prekursorů zymogenů a inhibice enzymatické aktivity (Sternlicht a Werb, 2001, Brew a kol., 2000).

Regulace transkripce

Vzhledem k substrátové specifitě MMP, je biologická funkce tohoto proteinu dána do značné míry jejich vzorem exprese. Rozdíly v časové, prostorové a indukované expresi svědčí o jejich jedinečných rolích. Genová exprese MMP je regulována četnými stimulačními a potlačujícími faktory, které ovlivňují více signálních drah (Fini a kol., 1998). Expresi může být snižována i zvyšována estery, integriny, proteiny EMC a i buněčným stresem. Expresi ovlivňují i post-transkripční mechanismy.

Aktivace prekursorů zymogenů

MMP se nejprve syntetizovaly ve formě neaktivních proenzymů nebo zymogenů. Za latenci je zodpovědný nepárový Cys v blízkosti C-terminálního konce propeptidu. Tento sulfohydryl působí jako čtvrtý ligand pro aktivitu iontu zinku a aktivace vyžaduje, aby tento Cys-Zn spínač zahájil normální proteolytické odstranění propeptidu nebo porušil interakce Cys-Zn (Van Wart a Birkedal-Hansen, 1990). To může zapříčinit thiolová skupina, která nahradí molekulu vody, která pak může napadnout peptidovou vazbu v MMP. Extracelulární aktivace většiny MMP může být zahájena i jinými aktivními MMP nebo serinovými proteázami, které mohou štěpit peptidové vazby uvnitř MMP (Woessner a Nagase, 2000).

Inhibice enzymatické aktivity

Inhibitory MMP, neboli TIMPs (tkáňové inhibitory MMP), jsou inhibující tkáň, tvořené stejnými buňkami, které produkují MMP. Dohromady tvoří komplex v poměru 1:1. TIMP kontrolují aktivitu MMP v 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 léčivá reakce nemůže udržet celistvost systému, dojde ke konstrukčním ztrátám tkání a tvorbě nemocí (Sengupta a MacDonald, 2007, Kirkegaard a kol., 2004).

2.3. MMP-19

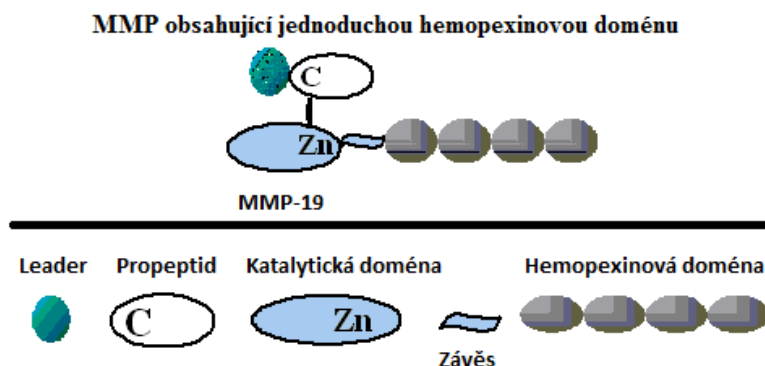
2.3.1. Charakteristika MMP-19

MMP-19 patří do podrodiny matrix metaloproteináz (velké skupiny zinkových endopeptidáz), také známých jako matrixiny, které jsou schopny hromadně degradovat všechny složky extracelulární matrix (Rawlings a kol., 1997). Činnost MMP je zapojena do řady biologických funkcí, jako je buněčná proliferace, migrace, adheze a stejně tak i při řízení mnoha základních fyziologických procesů včetně angiogeneze, zánětu a apoptóze (Fanjul-Fernandes a kol., 2010, Puente a kol., 2003, Page-McCaw a kol., 2007). MMP-19 byla poprvé izolována z lidských jater získaných z cDNA knihovny, a poté byla objevena jako autoantigen v cévách se zánětem synoviální tkáně u pacienta s revmatoidní artritidou. 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 k procesu aktivace. Sám má však sklony k vlastní aktivaci. Studie prokázaly, že MMP-19 hraje významnou roli při degradaci složek bazální membrány, jako je kolagen typu IV., lamini, fibrinogen a gelatináza I. MMP-19 má však též antiangiogenní vlastnosti, které mohou být zodpovědné za tumor supresorovou aktivitu. Gen MMP-19 se nachází na chromozomu 12q14, kde obsahuje 9 exonů na délce 7,6 kB (Rawlings a Salvensen, 1997, Chan a kol., 2010). Všechny z nich jsou vysoce konzervované mezi savčími druhy. Přítomnost tohoto genu byla také prokázána u bezobratlých, v ptačí linii se však tento gen ztratil (Pendas a kol., 1997)

2.3.2. Struktura MMP-19

MMP-19 je vylučována jako proforma, která prezentuje uspořádání typické pro domény matrixových metaloproteináz. Obsahuje prodoménu, jejímž základem je cysteinový zbytek, katalytickou doménu a asi 160 reziduí dochovávající vazbu na zinek. Linkerovou oblast tvoří COOH-terminální fragment složený z 200 aminokyselin, který se sekvenčně podobá hemopexinu. MMP-19 však nevykazuje strukturní rysy charakteristické pro hlavních členy podrodiny MMP (obr. 6). MMP-19 představují unikátní strukturální změny v rámci rodiny MMP. Tato peptidáza vykazuje archetypální strukturní doménu, která není charakteristická ostatním členům rodiny MMP. Podčeleď vykazuje nízkou sekvenční podobnost s jinými známými MMP a nemůže být tudíž zařazena do předem definovaných podskupin (Rawlings a Salvensen, 1997). 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 (Pendas a kol., 1997, Cossins a kol., 1996).

MMP-19 je schopna se prostřednictvím své hemopexinové domény připojit k povrchu buňky (Mauch a kol., 2002). Je schopna *in vitro* degradovat např. kolagen typu IV, laminin-1, fibronectin a želatina typu I (Stracke a kol., 2000a; Stracke a kol., 2000b).



Obrázek 6: Znázornění struktury MMP-19 (Palossari, 2003)

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.

2.3.3. Aktivita a specifita

Jako všichni členové rodiny MMP, je i MMP-19 syntetizován jako zymogen ze signálního peptidu, který vede protein do sekreční dráhy. Jeho latentní část se nachází v extracelulární matrix (ECM) a pro aktivaci vyžaduje proenzym proMMP-19. Má však i sklony k vlastní aktivaci. Biochemické studie prokázaly, že MMP-19 je silným hráčem při degradaci složek bazální membrány. Je schopna štěpit kolagen typu IV, hlavní složku bazální membrány na dva hlavní fragmenty 94 a 56 kDa (Stracke a kol., 2000a). Zajímavé je, že tento enzym tvoří současně s kolagenem typu IV v synoviálních cévách, revmatoidní artritidu (Kolb a kol., 1999). Laminin a nidogen, jako další dvě složky sítě bazální membrány, štěpí MMP-19 vysoce efektivním způsobem. Při předpokladu, že nidogen stabilizuje vlasečnice, může pak MMP-19 působit jako inhibiční faktor pro formátování a stabilizaci krevních kapilár. Proteolytická aktivita MMP-19 je také známá ničením jiných proteinů, jako je tenascin-C, fibronectin a komponenty chrupavky. Oligomerní protein aggrecan, podporuje významnou úlohu v této metalopeptidáze, a to úlohu v procesu přestavby tkání (Stracke a kol., 2000a; Stracke a kol., 2000b).

2.4. Metastazování

Metastazováním nádoru rozumíme jeho šíření z primárního ložiska do anatomicky vzdálených míst, kde vytváří sekundární nádory (Mudrochová, 2010). Schopnost napadnout tkáň a tvořit kolonie na vzdálených místech je neodmyslitelným rysem zhoubných novotvarů. V průběhu procesu maligní transformace se přeměňuje normální buňka v buňku nádorovou. Metastatické onemocnění je hlavní příčinou úmrtí u pacientů s rakovinou (Curran a Murray, 1999). Metastázy jsou nejčastěji diagnostikovány u pacientů v pokročilém klinickém stadiu rakoviny. Samotná metastatická ložiska mohou vznikat daleko dříve a nádorové buňky mohou dlouho dobu přežívat v tzv. spícím stavu („dormant metastasis“) bez zjevné proliferativní aktivity (Mudrochová, 2010). Metastazování je složitý proces, který sestává z mnoha kroků a závisí na řadě různých interakcí mezi nádorovými buňkami, extracelulární matricí a cílovou tkání (Becker a kol., 2005).

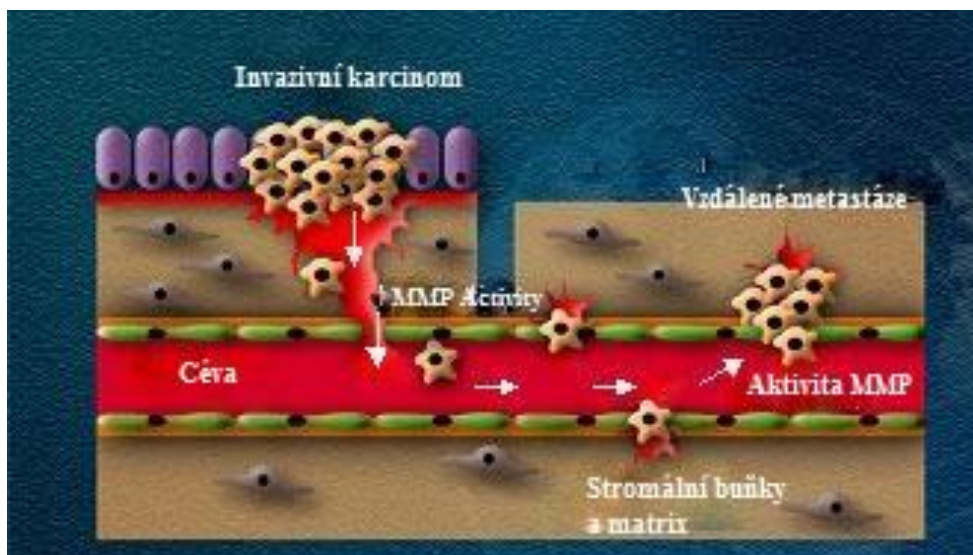
Metastatický proces, je-li úspěšně nastartován, je projevem systémového selhání organismu. Samotný vznik a růst nádoru se neděje izolovaně, ale na pozadí organismu, ve kterém vznikl. Pokud však již detekujeme vitální nádorovou tkáň, je nutno předpokládat, že obranné mechanismy hostitele byly do značné míry překonány a samotný nádor si selekcí stále životaschopnějších buněk zajistil výhodné podmínky pro další proliferaci na úkor hostitelského organismu (Klein, 2006).

2.4.1. Molekulární mechanismy v procesu metastazování

Při přeměně normálních buněk v buňky nádorové získávají nádorové buňky řadu typických vlastností, mezi něž řadíme i nádorovou invazi. Ta 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 (Curran a Murray, 1999). 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. 7).

Angiogeneze, neboli tvorba nových cév, je základem nejen pro růst nádoru, ale i pro úspěšnou invazi tumoru a metastazování (Curran a Murray, 1999). Prostá difúze kyslík a živin je schopná zásobovat nádory pouze do velikosti 1-2 mm³ (Hanahan a Folkman, 1996). Pro růst nádoru nad velikost 1–2 mm³ musí dojít k nastartování angiogeneze a k vytvoření vaskulárního zásobení nádoru, což je nezbytnou a časnou událostí v procesu karcinogeneze. Angiogeneze je komplexní proces, zahrnující degradaci bazální membrány původní cévy, proliferaci endotelu k místu působení angiogenetického stimulu, až po vznik funkčních cév obklopených novotvořenou bazální membránou a pericytem. 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 (Lukešová a kol., 2006).

Zcela zásadní úlohu v nádorovém růstu a protinádorové obraně má přirozená imunita hostitele (Klein, 2006). 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 upozorňuje imunitní systém. Normální zdravá buňka totiž na svém povrchu stále vystavuje 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 (Říhová, 2005).



Obrázek 7: Schéma šíření nádorových buněk krví (URL:< <http://www.angioworld.com/>>). Invaze nádorových buněk z tkání do cév a následně z cév do tkání, místa vzdálené metastázy, může mít uplatnění v procesu metastazování. Do procesu se zapojují i buňky stromální.

2.4.2. MMP a metastazování

Matrixové metaloproteinázy patří mezi degradační enzymy, které se uplatňují v procesech nádorové transformace a metastazování. Jsou spojeny s invazí nádorových buněk do bazální membrány a stromatu, do cév s následkem penetrace a mají vztah k metastazování. Jsou spojovány jak s primárním, tak i metastatickým nádorovým bujením. 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, šíření zhoubných nádorů a interakce mezi nádorem a jeho okolním prostředím, může vést ke vzniku významných proteinových produktů, které jsou velmi důležité pro každý krok progrese nádoru (Nelson a kol., 2000). 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 (Krizkova a kol., 2011). Proces migrace nádorových buněk podpůrnou tkání, transport bazální membránou a narušování intracelulární integrity vazeb by se neobešel bez těchto specifických enzymů.

MMP hrají klíčovou roli v procesu metastazování, jelikož mohou být produkovány nejen nádorovými buňkami, ale často ve větší míře i buňkami stromatu. MMP jsou vylučovány jako latentní, neaktivní zymogeny různými typy stromálních a epiteliálních buněk včetně mezenchymálních buněk, monocytů, makrofágů, keratinocytů i nádorovými buňkami.

K aktivaci na aktivní enzym obvykle dochází v pericelulárním nebo extracelulárním prostoru. MMP pracují společně na vytvoření kaskády aktivace. Aktivuje-li se jedna z matrix metaloproteináz, dojde ke katalýze přeměn jiných MMP neaktivních forem, zymogenů, a tím je spuštěna série aktivací až po výslednou degradaci všech tříd ECM.

2.4.2.1. Léčebné inhibice MMP

Významná role MMP v progresi tumoru a metastáz vedla k intenzivnímu vývoji 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 z pohledu „x-ray” pro stanovení krystalografických trojrozměrných struktur MMP k výrobě nonpeptidických molekul, které se selektivně váží na vazebné místo zinku 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 (Nelson a kol., 2000).

MMP se používají též jako markery pro některé zhoubné nádory tlustého střeva, štítné žlázy, močového měchýře, karcinomu prsu a jiných (Krizkova a kol., 2011). Potlačení působení MMP představuje nový terapeutický přístup k léčbě jednotlivých druhů rakoviny (Curran a Murray, 1999). 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 (Curran a Murray, 2000). 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 (Balbin a kol., 2003).

2.4.3. 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 invazi 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 hraje MMP-19 dvojí roli v progresi nádoru. Zvyšují migraci nádorových buněk během pozdějších fází melanomu a účastní se angiogeneze. Angiogenní vlastnosti MMP-19 jsou zodpovědné za tumor supresorové aktivity (Müller a kol., 2010). MMP-19 je regulována jak v bazálních i dlaždicových nádorových buňkách karcinomu tlustého střeva, tak při ztrátě funkčnosti nádorových buněk u karcinomu nosohltanu (Müller a kol., 2010, Impola a kol., 2003, Bister a kol., 2004). Nedávné studie v tomto ohledu navrhly delecí alel a podpoření hypermetylace promotoru, jako mechanismu na ztišení MMP-19 při progresi nádoru. Studie, věnující se testování myši s deficitem MMP-19 prokázaly, že jsou tyto peptidázy zapojeny do procesu remodelace tkání, adipogeneze a progresu nádorů (Jost a kol., 2006, Pendas a kol., 2004).

Role MMP-19 v procesu invaze tumoru je sporná jako u všech ostatních MMP. MMP-19 zvyšuje expresi astrocytů v melanomu (Müller a kol., 2010, Letau a ko., 2010) a to má za následek zvýšenou buněčnou proliferaci keratinocytů, migraci a adhezi kolagenu I. prostřednictvím IGF-signální dráhy (Sandowsky a kol., 2003). 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 expresi během nádorové progresy v prsu a kůži (Impola a kol., 2003, Bister a kol., 2004, Djonov, 2001).

Mezi další schopnosti MMP-19 je štěpení IGFBP-3 (insulin growth factor binding protein) růstového faktoru v *in vitro* studiích, což naznačuje, že by mohl kontrolovat aktivitu inzulinu a tím regulovat růst nádorových buněk (Rawlings, 2012).

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. V nedávné době bylo dokázáno, že MMP-19 působí jako molekulární mediátor při zánětu dýchacích cest. Zabraňuje ukládání glykoproteinu a tenascinu-C do stěn dýchacích cest, čímž podporuje zánětlivou adhezi buněk a akumulaci díky své schopnosti interakce s integriny (Fingleton a kol., 1999). V tomto ohledu se uvádí i fakt, že MMP-19 je také důležitým faktorem při kožních imunitních reakcích a ovlivňuje vývoj T-buněk (Beck a kol., 2008).

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. I u mutantních myši s deficitem MMP-19 se potvrdila dvojitá role tohoto proteinu na rakovinu. Celkově tyto údaje ukazují, že MMP-19 negativně ovlivňuje 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 progresi, ale pochopením individuální funkce každého MMP zlepšit protinádorovou strategii (Rawlings, 2012). MMP-19 ovlivňuje buněčnou proliferaci, adhezi a migraci, ale jeho fyziologická role *in vivo* je málo objasněná (Beck a kol., 2008).

Analýzou genové exprese MMP-19 v rakovinné tkáni kolorektálního karcinomu 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 primárními lézemi a samotnými metastázemi (Toshimichi a kol., 2008). Profil MMP-19 popsaly nedávné studie analýzou tkání 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 exprese MMP-19 zvyšují v průběhu tumorigeneze tlustého střeva. Zvyšující se množství MMP-19 bylo zaznamenáno i při progresi léze tlustého střeva. Semikvantitativní fluorescenční analýza prokázala expresi MMP-19 jak v normální sliznici tlustého střeva, tak v průběhu přechodu z mikroadenomu na rakovinu. Výše uvedenými metodami byla též prokázána exprese MMP-19 ve stromálních buňkách normální sliznice a zvýšená exprese MMP-19 ve vzorcích nádoru. (Müller a kol., 2010, Letau a kol., 2010). Krom zmíněných metod se pro detekci MMP používá i imunohistochemie (Lukáš a kol., 1997).

2.5. Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) se rozvíjela jako jedna z modernějších metod, které původně vycházely z tzv. histochemie. Původní histochemie vznikala přibližně v 30. letech 20. století na pomezí histologie, analytické chemie a biochemie. Jejím cílem je identifikovat a lokalizovat antigeny v místě jejich výskytu v tkáních na histologické či cytologické úrovni (Beranová a Tonar, 2002).

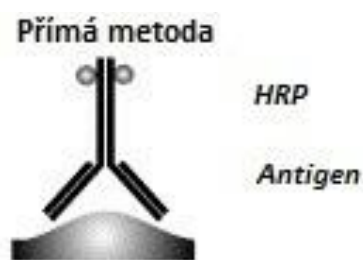
Základním cílem imunohistochemických a imunocytochemických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, tj. práce na principu vazby antigenu a protilátky. Tuto vazbu si můžeme obrazně představit jako vztah specifického klíče (protilátky, která je zpravidla volná) k zámku (tkáňovému antigenu), jenž je zpravidla pevně fixován na určitou strukturu, např. na povrch buňky. Vyšetřením, kdy na principu vazby antigen-protilátka s následnou barevnou zobrazovací akcí, prokážeme a lokalizujeme 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 diferenciací či původu buněk umožňují např. i určovat proliferující nebo imortalizované buňky v nádorové i nenádorové tkáni (Kuchyňka a kol., 2007).

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. Znázornění výsledku průkazu přítomnosti určitého antigenu je různá. V principu je možno použít dvě základní metody průkazu: přímou (jednokrokovou) či nepřímou (minimálně dvou krokovou) metodou (Bartůňková a Paulík, 2005)

2.5.1. Typy imunohistochemických metod

Přímá metoda

Jde o nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni (Králíčková a Tonar, 2002). Při přímé metodě je protilátka žádané specificity konjugována s fluoroforem. Enzym (fluorofor), konjugovaný se specifickou protilátkou, se může navázat na její doménu, kterou se váže na antigenní determinant, a tak stericky zabráni této specifické vazbě (Dvořák a kol., 2008) (obr. 8.) 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 parafinu jsou málo citlivé. I přes nenáročnost provedení jsou v současné době málo používané (Beranová, 2010).

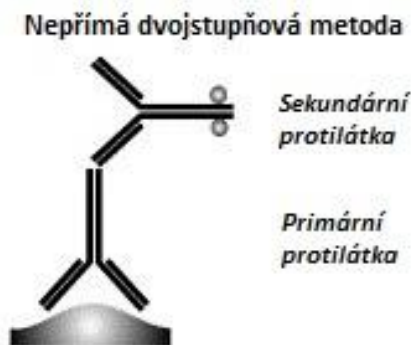


Obrázek 8: Schéma přímé metody (Schmitt a kol., 2004).

Podstatou je přímé značení protilátky např. kovem nebo fluoresceinem.

Nepřímá dvojstupňová metoda

U dvoustupňových metod je enzym nebo fluorofor navázaný na sekundární protilátku, která se naváže na specifickou primární protilátku (obr. 9). 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 (Dvořák a kol., 2008). Nepřímé IHC metody jsou ve srovnání s přímými sice komplikovanější, ale výhodou je, že mohou být mnohem citlivější (Králíčková a Tonar, 2002).

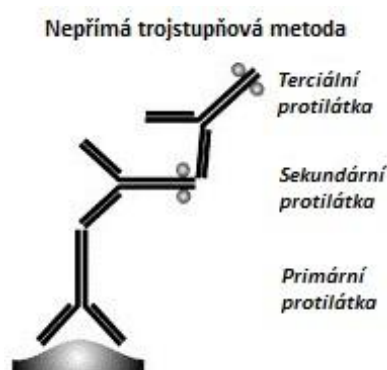


Obrázek 9: Schéma nepřímé dvojstupňové metody (Schmitt a kol., 2004).

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

Nepřímé trojstupňové 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 peroxidáza-anti-peroxidázový komplex (obr. 10). Metodika je citlivější než předešlé metody, ale časově náročnější (Králičková, Tonar, 2002).



Obrázek 10: Schéma nepřímé trojstupňové metody (Schmitt a kol., 2004).

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 1. a 3. fázi.

Peroxidáza-anti-peroxidázový komplex (PAP)

U metody PAP (peroxidáza-antiperoxidáza) se využívá rozpustný komplex skládající se ze tří molekul peroxidázy a dvou králičích protilátek proti peroxidáze. Tento komplex je vázán na primární 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) (Dvořák a kol., 2008).

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 výraznější reakcí z bakterie, (Beranová, 2010). ABC metody využívají k detekci protilátek vysoké vazebné afinity mezi avidinem-biotinem. Na primární specifickou protilátku se naváže sekundární protilátka konjugovaná s biotinem. Třetím stupněm je komplex avidin - biotin - peroxidázy, který se na sekundární biotinylovanou protilátku pevně naváže a propůjčí sestavě výrazné zesílení signálu. V dalším se pak vizualizuje vhodným systémem (Dvořák a kol., 2008).

2.5.2. Tvorba parafinových bloků

1. Odběr vzorků z resekované tkáně

Po fixaci vybere patolog vhodné, reprezentativní vzorky tkání pro histologické vyšetření. Odebíraná tkáň nesmí být nekrotická (URL:<<http://atlases.muni.cz/>>). 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 denaturaci bílkovin buněk a tkání. Fixace vzorků z tkání a orgánů se provádí pomocí fixačních prostředků (Čech a Horký, 2005). Jako fixační tekutina se zpravidla používá 10% roztok formaldehydu (někdy s různými přísadami). Fixace trvá (podle velikosti vzorku) zhruba 24 hodin (URL:<<http://atlases.muni.cz/>>).

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 xylene. 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 (Vyhlídalová, 2010).

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 sklíčka. Takto připravená a popsaná podložní sklíčka se mohou dále dehydratovat, deparafinizovat a barvit (URL:<<http://atlases.muni.cz/>>).

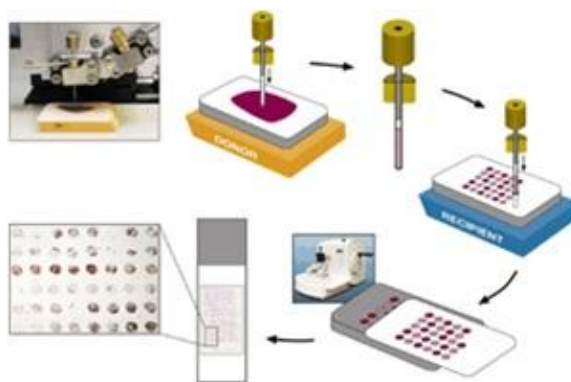
2.5.3. Tkáňové mikroarray

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 (URL:<<http://www.isenet.it/>>) tak, že z původního (donorového) tkáňového bloku s označeným místem určeným pro zkoumání se vykrojí vzorky o průměru většinou 1,8 mm - 3 mm pomocí automatického nebo poloautomatického přístroje (obr. 11). Tyto vyřezané tkáně z různých míst téhož tumoru se poté postupně vkládají do recipientních bloků (obr. 12). Tím se získá recipientní blok se stovkami různých vzorků, z něhož se udělají stovky 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 (Masopust, 2004).

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 (URL:<<http://www.bio-itworld.com/>>).



Obrázek 11. Galileo TMA CK 3500 (URL:<<http://www.isenet.it/>>).
Přístroj používaný v rámci této práce.



Obrázek 12. Schéma přípravy TMA bloku (URL:< <http://www.actasurológicas.info/>>)
Z donorového bloku vyřezeme 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.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. MATERIÁL A METODA

3.1.1. 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 tkáňové mikroarraye (TMA).

3.1.2. Chemikálie

Primární protilátka MMP19 – 5 (poskytnuta Ústavem molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.), Dako EnVisionTM + Dual Link System-HRP (DakoCytomation), Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation), pertex (Bamed), hematoxylin (Sigma), Tween 20 (Sigma), bovinní albumin frakce V (Sigma), sušené odtučněné mléko (Laktino), 10 % NaN₃ (Sigma), fetální sérum (FCS), 30% H₂O₂ (LachNer),

3.1.3. 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 (P-LAB a.s), vortex V-1 plus (Biosan), minicentrifuga (Fisher Scientific), digitální timer.

3.1.4. 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, 1,5 ml mikrozukmavky, odpadní láhev, buničina, skalpel, pinzeta, gumové rukavice, centrofix.

3.1.5. Imunohistochemická detekce protilátek: MMP19 - 5

3.1.5.1. Příprava vzorků

Tvorba tkáňových mikroarray

Parafinové bloky zpracujeme do TMA tkáňových bloků (tissue arrays) pomocí poloautomatického přístroje Galileo TMA CK 3500. Po nastavení přístroje na požadované parametry začneme vyřezávat dutou jehlou o průměru 2 mm mikro-válce a vkládáme je do nového, recipientního bloku. Vyřezeme vždy oblast, označenou jako primární nádor, další výřez mimo nádorovou tkáň a na konci série zařadíme ještě dva bloky tkání, pro orientaci.

Krájení tkáňových mikroarray

Vzorek, ve formě bločku, nařežeme na 4 µm tenké řezy a uchytíme na pozitivně nabitá podložní sklíčka. Tato sklíčka inkubujeme přes noc při teplotě 56 °C. Po inkubaci jsou připraveny pro další histologická vyšetření.

3.1.5.2. Příprava roztoků

a) 10 mM Citrátový pufr (pH 6)

Pro přípravu 10 mM citrátový pufr o pH 6,0 navážíme 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 lednici při teplotě +1 až +10°C).

b) Zásobní roztok 10x koncentrovaný PBS

Navážíme si 80 g NaCl, 2 g KCl a 32,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O. Navážky rozpustíme v destilované 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 destilované vody a 1 ml Tweenu 20. (Před každým použitím připravíme čerstvý!)

d) Roztok, pro blokaci endogenní peroxidázy

Roztok připravíme smícháním 10 ml 30% H₂O₂ 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 μ l 1x PBS, 100 μ l Fetálního séra a 10 μ l 10% NaN_3 . (Roztok připravujeme vždy čerstvý.)

g) Ředící roztok pro sekundární protilátku

Ředící roztok připravíme smícháním 900 μ l 1x PBS a 100 μ l 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 ($18^\circ\text{C} - 27^\circ\text{C}$).

5% zásobní roztok kamence hlinitodraselného ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$):

Navážku 5 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpustíme ve 100 ml deionizované H_2O

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 H_5IO_6 rozpustíme ve 25 ml deionizované H_2O

3% zásobní roztok konc. HCl (35%):

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

3.1.6. Samotná imunohistochemická detekce

3.1.6.1. 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 destilovanou vodou.

3.1.6.2. Postup imunohistochemické detekce

Zpracování řezů ve vodní lázni

Barvicí nádobku, vhodnou pro zahřívání ve vodní lázni, naplníme roztokem citrátového pufru a předehřejeme ji na 95-99°C. Po vyhřátí ponoříme preparáty do takto předehřátého 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 pufir a nahradíme ho destilovanou vodou. Opláchneme preparáty destilovanou vodou ještě 2x 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 pufr a necháme po 5-ti minutách 2x v tomto pufru inkubovat.

Aplikace sekundární protilátky En Vison+ Dual Link Systém -HRP

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

Oplach preparátu

Opatrně opláchneme pufrovým promývacím roztokem a vložíme na 5 minut do čerstvé pufrové 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 µl) chromogenu DAB+.

Odstraníme přebytečný pufr a otřeme podložní skla. Přidáme 200 µl pracovního roztoku DAB+ a pokryjeme jím vzorek. Inkubujeme 10 minut. Opatrně opláchneme v destilované 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 % etanol 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 hodnotíme pod světelným mikroskopem.

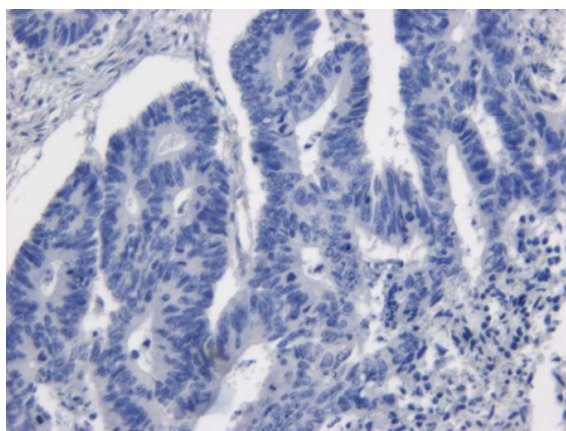
Imunohistochemická exprese byla v daných vzorcích hodnocena semikvantitativně. Byla hodnocena jak v nádorových buňkách, tak ve stromálních buňkách. Z nádorových buněk byla hodnocena pozitivita bazálních buněk. Za hranici positivity jsme považovali přítomnost MMP-19 v minimálně 10 % buněk.

4 VÝSLEDKY

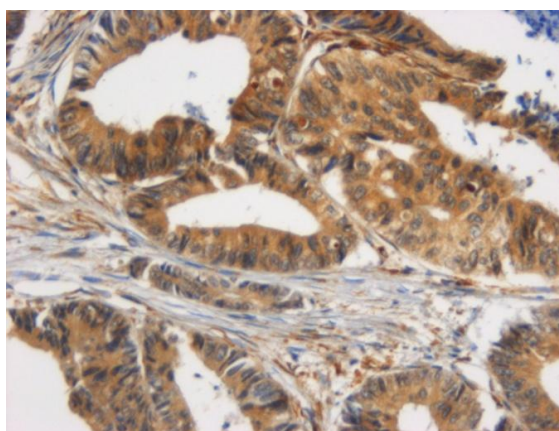
Imunohistochemická detekce MMP-19 byla provedena na souboru 30 pacientů, u kterých byl diagnostikován nádor tlustého střeva (tab. 2). Dva patientské vzorky byly nezhodnotitelné a dále nebyly zahrnuty do výsledné analýzy. U 8 pacientů bylo prokázáno, že se nejedná o karcinom, ale o nízce diferencovaný neuroendokrinní tumor. Všechny 8 pacientů bylo zařazeno do statistik, jelikož se jednalo o maligní nádory.

Pro účely této práce se sledovala exprese MMP-19 v jednotlivých typech buněk (nádorovém epitelu, bazální vrstvě nádorového epitelu, v nádorovém stromatu). Zvýšená 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 v bazálních nádorových buňkách byla zaznamenána u 18 vzorků (64,3%), 1 vzorek (3,57 %) byl středně pozitivní a u zbylých 9 vzorků (32,14 %) nebyly nalezeny žádné MMP-19 pozitivní bazální buňky. Expresе MMP-19 ve stromálních buňkách byla nalezena u 20 vzorků (71,43 %) z toho středně pozitivní byly 3 vzorky (10,71 %). U 5 (17,86 %) z celkového počtu 28 testovaných vzorků nebyla nalezena exprese MMP-19 ve stromálních buňkách.

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



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



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

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 metastázy neobjevily vůbec, klasifikováno 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 klasifikace TNM z roku 2009 byly u 9 případů (32,15 %) diagnostikovány metastázy ve 4-7 regionálních lymfatických uzlinách - N2 a u 3 (10,71 %) v 1-3 regionálních lymfatických uzlinách - N1.

V rámci našeho souboru byly dohledány také hodnoty pT nádoru, které podle patologické klasifikace hodnotí primární nádor z hlediska hloubky prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a prorůstání do jiných orgánů a struktur. Nádor postihující submucosu, tedy kategorie pT1 postihla v rámci našeho souboru 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 perirektální 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 nízké diferencovaný nádor, odpovídající stupni G3.

Tabulka 2. 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 metastázy	Počet uzlinových metastáz (N) ¹	Vzdálené metastázy	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.	NDNT/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	2	1	játra	3	4	C20	G2	0
7.	adenokarcinom	100%	100 %	100 %	1	1	1	játra	2	3	C18	G2	0
8.	NDNT/adenokarc.	100%	100 %	100 %	1	2	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.	NDNT	10%	0	50 %	0	0	0	x	X	0			0
13.	adenokarcinom	0%	0	0	0	0	0	x	X	1	C20	G1	0
14.	NDNT/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.	NDNT/adenokarc.	0	0	0	0	0	0	x	X	2	C20	G1	Duplicita
21.	adenokarcinom	100 %	100 %	100 %	1	2	1	měkké tkáně	1	4	C18	G3	0
22.	adenokarcinom	60 %	100 %	100 %	1	2	1	měkké tkáně	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.	NDNT/adenokarc.	100 %	0	0	0	0	0	x	X	3	C20	G1	Duplicita
27.	NDNT/adenokarc.	50 %	0	100 %	0	0	0	x	X	2	C 20	G1	Duplicita
28.	NDNT/leuk/adenom.	100 %	0	100 %	1	1	0	x	X	2	C18.7	G2	Triplacita

- NDNT – níže diferencovaný neuroendokrinní tumor

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 exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buňkách koreluje s expresí MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,008$) (**tab. 3**) a také s expresí ve stromálních buňkách ($p < 0,019$) (**tab. 4**). Taktéž byl prokázán statisticky významný vztah mezi expresí MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk a expresí MMP-19 ve stromálních buňkách ($p < 0,011$) (**tab. 5**).

Expresí MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk koreluje s výskytem vzdálených metastáz ($p < 0,036$) (**tab. 6**). Taktéž bylo zjištěno, že exprese MMP-19 ve stromálních buňkách koreluje s výskytem vzdálených metastáz ($p < 0,047$) (**tab. 7**) a zvýšená exprese MMP-19 ve stromálních buňkách korelovala i s výskytem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách ($p < 0,033$) (**tab. 8**).

Byly nalezeny signifikantní rozdíly v expresi proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorového epitelu mezi adenokarcinomy a nízkce diferencovanými neuroendokrinními tumory ($p < 0,002$) (**tab. 9**).

Tabulka 3. Korelace exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk s expresí MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk

	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			

Expresí proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorového epitelu koreluje s expresí MMP-19 v bazální vrstvě nádorového epitelu.

Tabulka 4. Korelace exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorového epitelu s expresí MMP-19 v nádorovém stromatu.

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

Expresí MMP-19 v apikální vrstvě nádorového epitelu koreluje s expresí MMP-19 v nádorovém stromatu.

Tabulka 5. Korelace exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk s expresí MMP-19 ve stromálních buňkách.

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

Expresí proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk koreluje s expresí MMP-19 ve stromálních buňkách.

Tabulka 6. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci s výskytem vzdálených metastáz.

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

Expresí MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk koreluje s výskytem vzdálených metastáz.

Tabulka 7. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s výskytem vzdálených metastáz.

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

Expres proteinu MMP-19 ve stromálních buňkách koreluje s výskytem vzdálených metastáz.

Tabulka 8. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s výskytem metastáz v regionálních lymfatických 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			

Expres proteinu MMP-19 ve stromálních buňkách koreluje s výskytem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

Tabulka 9. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorového epitelu mezi adenokarcinomy a nízcí diferencovanými neuroendokrinními tumory.

	Typy karcinomů		
Bazální nenádorové buňky	Adenokarcinom	nízce diferencovaný neuroendokrinní tumor	součet v řádku
0-10%	3	6	9
11-100%	17	2	19
Celk.	20	8	28
p<0,002			

Expres proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorového epitelu koreluje s adenokarcinomem a nízcí diferencovaným neuroendokrinním tumorem.

Statisticky nevýznamné výsledky:

Souhrn statisticky nepříznivých výsledků je v tabulkách uveden v příloze.

Expresí proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s výskytem vzdálených metastáz ($p < 0,14$) (**tab. 10**). Expresí MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,54$) (**tab. 11**), bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,21$) (**tab. 12**) a ani ve stromálních buňkách ($p < 0,27$) (**tab. 13**) nekoreluje s umístěním vzdálených metastáz. Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v expresi proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,11$) (**tab. 14**) ani v bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,13$) (**tab. 15**) ve vztahu k výskytu metastáz v regionálních lymfatických uzlinách. Nebyla prokázána korelace exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buňkách ($p < 0,48$) (**tab. 16**) ve stromálních buňkách ($p < 0,21$) (**tab. 17**) ani v bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,38$) (**tab. 18**) vzhledem k počtu metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

V rámci našeho souboru byla také zjišťována statistická významnost exprese proteinu MMP-19 v korelaci s hloubkou prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a s prorůstáním do jiných orgánů a struktur (pT) a se stupněm diferenciací nádoru. Expresí MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,13$) (**tab. 19**), bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,29$) (**tab. 20**) a ve stromálních buňkách ($p < 0,79$) (**tab. 21**) nekoreluje s žádnou kategorií pT. Taktéž exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,14$) (**tab. 22**), bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,24$) (**tab. 23**) a stromálních buňkách ($p < 0,35$) (**tab. 24**) nejeví vliv na stupeň diferenciací nádoru.

Dále bylo porovnáváno, zdali existuje nějaká závislost výskytu proteinu MMP-19 u pacientů s adenokarcinomem a níže diferencovaným neuroendokrinním tumorem. Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v expresi proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,12$) (**tab. 25**) ani stromálních buňkách ($p < 0,53$) (**tab. 26**) mezi adenokarcinomy a níže diferencovanými neuroendokrinními tumory. Dále bylo hodnoceno, zdali má vliv exprese proteinu MMP-19 na lokalizaci nádorového onemocnění a na výskyt dalšího nádorového onemocnění. V rámci našeho studovaného souboru bylo zhodnoceno že, exprese proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,10$) (**tab. 27**), v bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,22$) (**tab. 28**) a ve stromálních buňkách ($p < 0,76$) (**tab. 29**) nejeví žádný vliv na lokalizaci nádorového onemocnění. Taktéž nebyla nalezena korelace mezi pacienty s duplicitními nebo triplicitními nádory a expresí proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,94$) (**tab. 30**), v bazální vrstvě nádorových buněk ($p < 0,17$) (**tab. 31**) ani v buňkách stromatu ($p < 0,84$) (**tab. 32**).

5 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 i nízce diferencovaným neuroendokrinním tumorem se zaměřením na proces metastazování.

Z našich výsledků vyplývá, že exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nejspíše koreluje s expresí proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk i s expresí MMP-19 ve stromálních buňkách. Uvedené výsledky v rámci našeho souboru jsou v souladu se zjištěním autorů Sena a kol. (2012), že MMP-19 je exprimován ve stromálních buňkách normální sliznice a jeho přítomnost dosahuje maximálních hodnot v nádorovém epitelu. Dané výsledky podporují výsledky i jiných autorů.

Mauch a kol. 2002, Hietä a kol. 2003 se věnovali studii identifikace typů stromálních buněk produkujících MMP-19. Popsali, že 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. Několik studií na geneticky upravených myších modelech prokázaly při vzniku rakoviny přímou účast rezidentní fibroblastů (Kalluri a kol. 2003). Genetické a buněčné studie ukazují, že růst nádoru není určen jen maligními nádorovými buňkami, ale i nádorovým stromatem (Lynch a kol. 2002).

V souladu s našimi zjištěními zmiňuje Liotta a kol. 2001 a Lynch a kol. 2002 významné korelace mezi expresí MMP-19 ve stromálních buňkách a expresí MMP-19 v buňkách nádorového epitelu.

Z našich výsledků dále vyplývá, že exprese MMP-19 ve stromálních buňkách, koreluje s výskytem vzdálených metastáz. Obdobné zjištění popsali i Zitka a kol. (2010). 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.

Rydlová a kol (2008) tvrdí, že exprese MMP významně koreluje s přítomností regionálních uzlin a vzdálených metastáz. Pro konvenční patologické vyšetření je přítomnost metastatických uzlin jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů u kolorektálního karcinomu. Matsuyama a kol., 2002 uvádí, že exprese MMP je spojena s jatrními metastázemi kolorektálního karcinomu.

Však studie konkrétně pro MMP-19 a jejich vztah k tvorbě vzdálených metastáz a přítomnosti lymfatických uzlin není dosud popsána. V rámci naší studie však byl jistý vliv mezi expresí MMP-19 a vzdálenými metastázemi a uzlinami potvrzen.

V našem souboru pacientů byla pozorována zvýšená exprese MMP-19 u výskytu nízké diferenciace neuroendokrinního tumorů. Vliv exprese na výskyt tohoto tumoru v literatuře zatím popsán není.

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 kolorektálního karcinomu, 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 v časných a pokročilých stádiích karcinomu střev.

6 ZÁVĚR

V této práci jsme hodnotili míru exprese proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorové tkáně, v bazální vrstvě nádorové tkáni a ve stromálních buňkách vzhledem k výskytu vzdálených metastáz, k tvorbě metastáz v regionálních lymfatických uzlinách, k diferenciaci nádoru a pT nádoru (hloubku prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a prorůstání do jiných orgánů a struktur). Veškeré tyto výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí softwaru Statistica 8. Bylo zjištěno, že apikální nádorové buňky nejspíše ovlivňují expresi proteinu MMP-19, a to jak v bazální vrstvě nádorových buněk, tak ve stromálních buňkách. Bazální nádorové buňky nejspíše ovlivňují expresi proteinu MMP-19 i v buňkách stromatu. Dále byla prokázána korelace exprimovaného proteinu MMP-19 na metastázy v regionálních lymfatických uzlinách. Nalezena byla i korelace mezi bazálními nádorovými buňkami a adenokarcinomem a níže diferencovaným neuroendokrinním tumorem. Naše výsledky prokázaly význam stanovení MMP-19 ke sledování chování těchto buněk, pro celkové pochopení procesu tvorby kolorektálního karcinomu. 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.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(s)ABC	(strept)Avidin-biotin komplex – „(strept) Avidin–biotin complex“
ALB	Bovinní albuminové frakce - „Bovine albumin fraction “
CBD	Kolagen vázající doména – „Collagen binding protein“
CRC	Kolorektální karcinom - „Colorectal Carcinom“
DAB+	3, 3'-diaminobenzidin - „3, 3'-diaminobenzidine“
FITC	Fluorescein isothiokyanát - „Fluorescein isothiocyanate“
HPX	Hemopexinová doména - „Hemopexin domain“
HRP	Křenová peroxidáza - „Horseradish peroxidase“
IGFBP	Inzulinu, jako růstový faktor vázající protein - „Insulin-like growth factor-binding protein“
IGF	Inzulinu podobný růstový faktor – „Insuline-like growth factor“
MT-MMP	Membránový typ matrix metaloproteináz - „Membrane - type matrix metalloproteinase“
NDNT	Nízce diferencovaný neuroendokrinní tumor - „Poorly differentiated neuroendocrine tumor“
PAP	Peroxidáza-anti-peroxidázový komplex - „Peroxidase-antiperoxidase complex“
PBS	Fosfátový pufr - „Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerní řetězové reakce - „Polymerase chain reaction“
qRT-PCR	Kvantitativní reverzní transkripce-polymerázová řetězová reakce - „Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction“
RASI	Známka zánětu revmatoidní artritidy - „Rheumatoid arthritis sign of inflammation“
TMA	Tkáňová mikroarray - „Tissue Microarray“
TIMPs	Tkáňové inhibitory MMP - „Tissue inhibitor of metalloproteinase“
VEGF	Vaskulární endoteliový růstový faktor - „Vascular endothelial growth factor“
XM-MMP	Membránový typ matrix metaloproteinázy <i>Xenopus laevis</i> - „Xenopus membrane type MMP “

8 LITERATURA

- ALLAN, J. A., DOCHERTY, A. J., BARKER, P. J., HUSKISSON, S., REYNOLDS, J. J., MURPHY, G.: Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem. J.*, 1995, Vol. 309, s. 299 - 306 .
- ABRAHAM, R., SCHAFER, J., ROTHE, M., BANGE, J., KNYAZEY, P., ULLRICH, A.: Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells. *J Biol Chem*, 2005, vol. 280, s. 34123-34132.
- BABIČKOVÁ, L. Prognostický význam promotorového polymorfismu MMP-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.
- 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, s. 252 – 7.
- BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kolektiv: *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha, Grada, 2005, Kap. 2, ISBN 978-80-247-0691-1
- BECK, I. M., RUCKERT, R., BRANDT, K., MUELLER, M. S., SADOWSKI, T., BRAUER, R., SCHIRMACHER, P., MENTLEIN, R., SEDLACEK, R.: MMP19 is essential for T cell development and T cell-mediated cutaneous immune responses. *PLoS One*, 2008, vol. 3, e2343.
- 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, s. 1966 - 1976 .
- 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
- BERANOVÁ, M., TONAR, Z.: *Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty*. Ústav histologie a embryologie LF UK. Plzeň, 2002, s. 3-7.

- BISTER, V.-O., SALMELA, M. T., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.-L., URJA, J., LOHI J., PUOLAKKAINEN, P., LOPEZ-OTIN, C., SAARIALHO-KERE, U.: Differential Expression of Three Matrix Metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in Normal and Inflamed Intestine and Colon Cancer. *Digest Dis Sci*, 2004, vol. 49, s. 653-661.
- BODE, W.: A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure*, 1995, vol. 3, s. 527 - 530.
- BODE, W.: Structural basis of matrix metalloproteinase function. *Biochem. Soc. Symp.*, 2003, vol. 70, s. 1-14.
- BREW, K, DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000, vol. 1477, s. 267–283.
- BRINCKERHOFF, C.E., MATRISIAN, M.L.: Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that become a prince. *Nature Reviews*, 2002, vol. 3, s. 207-214.
- 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. 228, s. 494-498.
- 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.
- CURRAN, S., MURRAY, G. I.: Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, 1999, vol. 189, s. 300-308.
- CURRAN, S., MURRAY, G. I.: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *European Journal of Cancer*, 2000, vol. 36, s. 1621–1630.
- CURRY, T. E., OSTEN, K.G.: The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev.* 2003, vol. 24, s. 428-65.
- ČECH, S., HORKÝ, D.: *Přehled obecné histologie*. 1. vyd Vydala Masarykova univerzita v Brně, 2005, Kap. 1. ISBN-13: 978-80-210-5543-8
- 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, s. 927 - 930.

- 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.
- DUŠEK, L. a kol.: *Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat*. Fakultní nemocnice v Motole, Praha, 2012, s. 27-37, ISBN: 978-80-87-347-07-2
- DVOŘÁK, K., DVOŘÁKOVÁ, Z., FEIT, J., LUKÁŠ, Z., MÁDROVÁ, J.: *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. Ústav patologie v Bohunicích, 2008
- ENGLISH, W.R., PUENTE, X.S., FREIJE, J.M.P., KNAUPER, V., AMOUR A. MERRYWEATHER, A et al.: Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, s. 14046 – 55.
- FANJUL-FERNANDES, M., FOLGUERS, A.R., CABRERA, S., LOPEZ-OTIN, C.: Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulativ and functional analysis in mouse medols. *Biochem. Biophys. Acta*, 2010, vol. 1803, s. 3-19.
- FERLAY, J., AUTIER, P., BONIOL, M., HEANUE, M., COLOMBET, M., BOYLE, P.: Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006, *Annals of Oncology* 2007, vol. 18, s. 581–592.
- FERLAY, J., PARKIN, D. M., CURADO, M.P., BRAY, F., EDWARDS, B., SHIN, H.R., FORMAN, D.: Cancer Incidence in Five Continents, *International Agency for Research on Cancer* 2010, vol. 9
- FINI, M.E., COOK, J.R., MOHAN, R., BRINCKERHUFF, C.E.: Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *New York: Academic*, 1998. s. 299–356.
- FINGLETON, B.M, HEPPNER GOSS, K.J., CRAWFORD, H.C., MATRISIAN, L.M.: Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS* 1999, vol. 107, s. 102-110.
- GROSS, J., LAPIERE, C.M.: Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues - a Tissue Culture Assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962, vol. 48, s. 1014–1022.
- HANAHAN, D., FOLKMAN, J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, vol. 86, s. 353-64.
- HIETA, N., IMPOLA, U., LOPEZ-OTIN, C., SAARIALHO-KERE, U., KÄHÄRI, V.M.: Matrix metalloproteinase-19 expression in dermal wounds and by fibroblasts in culture. *J Invest Dermatol*, 2003, vol. 121, s. 997-1004.

- CHAN, 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. 129, s. 1826-1837.
- IMPOLA, U., TORISEVA, M., SUOMELA, S., JESKANEN, L., HIETA, N., JAHKOLA, T., GRENNAN, 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, s. 709-716.
- JOST, M., FOLGUERAS, A.R., FRÉLAT, F. et al.: Earlier Onset of Tumoral Angiogenesis in Matrix Metalloproteinase-19-Deficient Mice. *Cancer Res*, 2006, vol. 66, s. 5234-5241.
- 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*, 2004, vol. 53, s. 701-709.
- KLEIN, J.: *Chirurgie karcinomu plic*, Praha, Grada, 2006, Kap. 1, ISBN 9788024713847
- KOCÁKOVÁ, I.: Cetuximab – biologická léčba metastazujícího kolorektálního karcinomu. *REMEDIA*, 2005, vol. 5, s. 4-5.
- KOLB, C., MAUCH, S., KRAWINKEL, U., SEDLACEK, R.: Matrix metalloproteinase – 19 in capillary endothelial cells: expression in butely, but not in chronically, inflamed synovium. *Exp. Cell Res.* 1999, vol. 250, s. 122-130.
- KRÁLÍČKOVÁ, M., TONAR, Z.: Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty. Ústav histologie a embryologie LF UK. Plzeň, 2002, s. 5-7.
- 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.
- KUCHYŇKA, P. a kolektiv: *Oční lékařství*, Grada Publishing a.s., 1.vyd. Praha, Grada, 2007, Kap. 5, ISBN 978-80-247-1167-8
- KUKAČKA, J., KIZEK, R., PRŮŠA, R.: Budoucnost zinkových metaloproteinů v laboratorní medicíně. *Klin. Biochem. Metab.* 2008, vol. 16, s. 161-170.
- LENNARZ, W.J., LANE, M. D. *Encyclopedia of biological chemistry*. Oxford: Elsevier academic press, 2004, s. 657-665, ISBN: 978-0-12-443710-4

- LETAU, 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.
- LIOTTA, L.A., KOHN, E.C.: The microenvironment of the tumourhost interface. *Nature*, 2001, vol. 411, s. 375-379.
- LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., VOJTĚŠEK, B.: *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. Masarykova universita, Brno, 1997, ISBN 80-210-0620-X
- LUKEŠOVÁ, Š., KOPECKÝ, O., DVOŘÁK, J., HLÁVKOVÁ, D., VROBLOVÁ, V.: Nádorová angiogeneze, *Vnitř Lék*, 2006, . vol. 52, s. 797.
- LYNCH, C.C., MATRISIAN, L.M.: Matrix metalloproteinases in tumour-host cell communication. *Differentiation*, 2002, vol. 70, s. 561-573.
- MARCHENKO, N.D., MARCHENKO. G.N., WEINREB, R.N., LINDSEY, J.D., KYSHTOOBAYEVA, A., CRAWFORD, H.C., et al.: Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, vol. 36, s. 942 – 56.
- MASOPUST, J.: Nádorové markery, Ústav klinické biochemie a patobiochemie, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Labor Aktuell, 2004, s. 8.
- MATSUYAMA, Y., SOHSHIN, T., TAKASHI, A.: Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *Surg Oncology*, 2002, vol. 80, s. 105-110.
- 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. 168, s. 1244-1251.
- MUELLER, M.S., MAUCH, S., SEDLACEK, R.: Structure of the human MMP-19 gene. *Gene*, 2000, vol. 252, s. 27-37.
- MÜLLER, M., BECK, I.M., GADESMANN, J., KARSCHUK, N., PASCHEN, A., PROKSCH, E., DJONOV, V., REISS, K., SEDLACEK, R.: MP19 is upregulated during melanoma progression and increases invasion of melanoma cells. *Mod Pathol*, 2010, vol. 23, s. 511-521.

- MURDOCHOVÁ, M.: Identifikace a validace potenciálních biomarkerů metastazování u karcinomu prsu nízkého stupně malignity, Brno 2010, s., Dizertační práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovi University, Ústav biochemie. Vedoucí práce Mgr. Pavl Bouchal, Ph.D.
- MURPHY, G., SEGAIN, J.P., O'SHEA, M., COCKETT, M., IOANNOU, C., LEFEBVRE, O., et al.: The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem.*, 1993, vol. 268, s. 15435 – 41.
- NAGASE, H., WOESSNER, J.F Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999, vol. 274, s. 21491–21494.
- NAGASE, H., VISSE, R., MURPHY, G.: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 2006, vol. 69, s. 562 – 573.
- NELSON, A. R., FINGLETON, B., MACE ROTHENBERG, L., LYNN, M.M.: Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. *JCO*, 2000, vol. 18, s. 1135.
- PAGE-MCCAW, A., EWALD, A.J., WERB, Z.: Matrix metalloproteinases and the regulativ of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, vol. 8, s. 221-233.
- PALOSSARI, H.: Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue. Institute od Dentistry, University of Oulu, 2003, s. 28, ISBN 951-42-7078-9
- PATTERSON, M.L., ATKINSON, S.J., KNAUPER,V., MURPHY, G.: Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.*, 2001, vol. 503, s. 158 – 62.
- 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, s. 5304–13.
- PENDAS, A. M., KNAUPER, V., PUENTE, X. S., LLANO, E., MATTEI, M. G., APTE, S., MURPHY, G., LOPEZ-OTIN, C.: Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, s. 4281-4286.
- PETRUŽELKA, L., KONOPÁSEK, B. a kol.: *Klinická onkologie*. Praha, Karolinum, 2003, s. 274, ISBN 80-246-0395-0.
- PUENTE, X.S., SANCHEZ, L.M., OVERALL, C.M., LOPEZ-OTIN, C.: Human and mouse proteases: a imperative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, vol. 4, s. 544-588.

- RAWLINGS, N. D., SALVESEN, G. S.: *Handbook of proteolytic Enzymes*. 3.vyd. Academic Press, 2012, s. 559-561, ISBN 978-0-12-382219-2
- RYDLOVA, M., HOLUBEC, L., LUDVIKOVA, M., KALFERT, D., FRANEKOVA, J., POVYSIL, C., LUDVIKOVA, M.: Biological Activity and Clinical Implications of the Matrix Metalloproteinases. *ANTICANCER RESEARCH*, 2008, vol. 28, s. 1389-1398.
- ŘÍHOVÁ, B.: Proti nádorová imunita a nové přístupy při léčení nádorových onemocnění. Projekt Otevřená věda – sborník, Akademické a univerzitní centrum Nové hrady, 2005, s. 41-53.
- 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, s. 4569-4580.
- SENA, P., MARIANI, F., MARZONA, L., BENINCASA, M., PONZ DE LEON, M., PALUMBO, C., RONCUCCI, L.: Matrix metalloproteinases 15 and 19 are stromal regulators of colorectal cancer development from the early stages. *Int J Oncol*, 2012, vol. 41, s. 260 - 266.
- SENGUPTA, N., MACDONALD, T. T.: The Role of Matrix Metalloproteinases in Stromal/Epithelial Interactions in the Gut. *PHYSIOLOGY*, 2007, vol. 22, s. 401–409.
- SCHMITT, O., PREUßE, S., JEAN-PIERE HAAS, S.: Comparison of contrast, sensitivity and efficiency of signal amplified and nonamplified immunohistochemical reactions suitable for videomicroscopy-based quantification and neuroimaging. Brain Res Brain Res Protoc., 2004, vol. 3, s. 157-71.
- STEFFENSEN, B., WALLON, U.M., OVERALL, C.M.: 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. 207, s. 11555-66.
- STERNLICHT, M. D, WERB, Z.: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001, vol. 17, s. 463–516.
- STRACKE, J. O., FOSANG, A. J., LAST, K., MERCURI, F. A., PENDAS, A. M., LLANO, E., PERRIS, R., DI CESARE, P.E., MURPHY, G., KNAUPER, V.: Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Lett*, 2000b, vol. 478, s. 52-56.

- STRACKE, J. O., HUTTON, M., STEWART, M., PENDAS, A.M., SMITH, B., LOPEZ-OTIN, C., MURPHY, G., KNAUPER, V.: Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem*, 2000a, vol. 275, s. 14809-14816.
- TOSHIMICHI, ASANO, T. M.D., TADA MITSUHIRO, M.D., SHAOGIANG CHENG, M.D. et al.: Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. *Journal of Surgical Research*, 2008, vol. 146, s. 32-42.
- 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. Nati. ACAD. Sci. USA*, 1990, vol. 87, s. 5578 - 5582 .
- VISSE, R., NAGASE, H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.*, 2003, vol. 92, s. 827 – 39.
- 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.
- VYZULA, R.: Kolorektální karcinom 2009 - Kolorektální karcinom – vedoucí pozice v incidenci na světě, významný zdravotní problém České republiky. Farmakon Press, spol. s.r.o., Praha, 2009, vol. 5, s. 5-9.
- WOESSNER J.F.: The matrix metalloproteinase family. *Academic Press*, 1998, s. 1–13.
- WOESSNER, J.F., NAGASE, H.: Matrix Metalloproteinases and TIMPs. *New York: Oxford Univ. Press*, 2000.
- ZITKA, O., et al.: Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, vol. 17, s. 3751-3768.

Internetové zdroje:

<http://www.hpb.cz/index.php?pId=05-2-07>

http://www.labtestsonline.cz/condition/Condition_ColonCancer.html?idx=5

<http://www.rakovinastreva.cz/diagnoza/stadia-onemocneni/>

<http://www.molnar.medikus.cz/o-nemocech/kolorektalni-karcinom-922>

<http://www.svod.cz/analysez.php>

http://www.demografie.info/?cz_detail_clanku&artclID=399

<http://www.linkos.cz/po-kongresu/database-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/39/>

<http://www.ocol.cz/cs/novinky/clen-kr-oco-obdrzel-pawlikovu-cenu>

http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_23/S1462399403006628sup006.htm

http://www.angioworld.com/cast/cast_4.htm

http://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+metody+parafproc.html#formolparaf+prikrojeni

http://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+metody+parafproc.html#formolparaf+paraf

http://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+metody+parafproc.html#formolparaf+rezy

<http://www.isenet.it/product.php?id=1>

http://www.bio-itworld.com/archive/021804/strategic_proteomics.html

<http://www.actasurológicas.info/eng/jan2006/v30n1p25.htm>

9 PŘÍLOHY

Tabulka 10. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s výskytem vzdálených metastáz.

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

Expres proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s výskytem vzdálených metastáz.

Tabulka 11. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s umístěním vzdálených metastáz.

	Umístění vzdálených metastáz				
Nádorové buňky	nepřítomné (0)	jaterní metastázy	metastázy v měkkých tkáních	metastázy v játrech a kostech (kyčle)	součet v řádku
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 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s umístěním vzdálených metastáz.

Tabulka 12. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci s umístěním vzdálených metastáz.

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

Expresce proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s umístěním vzdálených metastáz.

Tabulka 13. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s umístěním vzdálených metastáz.

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

Expresce proteinu MMP 19 ve stromálních buňkách nekoreluje s umístěním vzdálených metastáz.

Tabulka 14. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s výskytem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

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

Expresce proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s výskytem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

Tabulka 15. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci s výskytem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

	Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách		
Bazální nádorové 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 v bazální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s výskytem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

Tabulka 16. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s počtem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

	Počet metastáz v regionálních lymfatických uzlinách				
Nádorové buňky	0	1	2	3	součet v řádku
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 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s počtem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

Tabulka 17. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s počtem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

	Počet metastáz v regionálních lymfatických uzlinách				
Stromální buňky	0	1	2	3	součet v řádku
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 ve stromálních buňkách nekoreluje s počtem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

Tabulka 18. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci s počtem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

	Počet uzlinových metastáz				
Bazální nádorové 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 v bazální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s počtem metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.

Tabulka 19. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s hloubkou prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a s prorůstáním do jiných orgánů a struktur.

	pT					
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						

Expres proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s hloubkou prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a s prorůstáním do jiných orgánů a struktur.

Tabulka 20. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci s hloubkou prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a s prorůstáním do jiných orgánů a struktur.

	pT					
Bazální nádorové buňky	pT 0	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4	součet v řádku
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

Expres proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s hloubkou prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a s prorůstáním do jiných orgánů a struktur.

Tabulka 21. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s hloubkou prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a s prorůstáním do jiných orgánů a struktur.

	pT					
Stromální buňky	pT 0	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4	součet v řádku
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 ve stromálních buňkách nekoreluje s hloubkou prorůstání nádoru do stěny tlustého střeva a s prorůstáním do jiných orgánů a struktur.

Tabulka 22. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci se stupněm diferenciaci nádoru.

	Stupeň diferenciaci 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

Expres proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje se stupněm diferenciaci nádoru.

Tabulka 23. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci se stupněm diferenciaci nádoru.

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

Expres proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk nekoreluje se stupněm diferenciaci nádoru.

Tabulka 24. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci se stupněm diferenciacie nádoru.

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

Expres proteinu MMP-19 ve stromálních buňkách nekoreluje se stupněm diferenciacie nádoru.

Tabulka 25. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s adenokarcinomy a nízce diferencovanými neuroendokrinními tumory.

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

Expres proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s adenokarcinomy a nízce diferencovanými neuroendokrinními tumory.

Tabulka 26. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s adenokarcinomy a nízce diferencovanými neuroendokrinními tumory.

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

Expres proteinu MMP-19 ve stromálních buňkách nekoreluje s adenokarcinomy a nízce diferencovanými neuroendokrinními tumory.

Tabulka 27. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s lokalizací nádorového onemocnění.

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

Expres proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s lokalizací nádorového onemocnění.

Tabulka 28. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci s lokalizací nádorového onemocnění.

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

Expres proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s lokalizací nádorového onemocnění.

Tabulka 29. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s lokalizací nádorového onemocnění.

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

Expres proteinu MMP-19 ve stromálních buňkách nekoreluje s lokalizací nádorového onemocnění.

Tabulka 30. Závislost exprese MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk v korelaci s duplicitní a triplicitní malignitou.

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

Expres proteinu MMP-19 v apikální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s duplicitní a triplicitní malignitou.

Tabulka 31. Závislost exprese MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk v korelaci s duplicitní a triplicitní malignitou.

	Duplicitní malignity			
Bazální nádorové 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				

Expres proteinu MMP-19 v bazální vrstvě nádorových buněk nekoreluje s duplicitní a triplicitní malignitou.

Tabulka 32. Závislost exprese MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s duplicitní a triplicitní malignitou.

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

Expres proteinu MMP-19 ve stromálních buňkách v korelaci s duplicitní a triplicitní malignitou.