

**Univerzita Karlova v Praze**

**Lékařská fakulta v Plzni**



**Mgr. Martin Pešta**

**SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY  
KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU  
METODOU REAL-TIME PCR**

**Autoreferát disertační práce**

Obor: Vnitřní lékařství

2006

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy postgraduálního studia  
v oboru vnitřní lékařství na II. Interní klinice, v Centrální radioisotopové laboratoři  
Lékařské fakulty UK v Plzni.

Uchazeč: Mgr. Martin Pešta

II. interní klinika LF UK v Plzni

Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

II. interní klinika LF UK a FN Plzeň

Oponenti: Prof. MUDr. Miloš Pešek, CSc.

Klinika TRN Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň

doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.

Ústav biologie LF UK v Plzni, Karlovarská 48, 301 66 Plzeň

doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc.

Ústav informatiky AV ČR, Pod vodárenskou věží 2, 182 07 Praha 8

Obhajoba disertace se koná před komisí pro obhajoby v oboru vnitřní lékařství na  
II. interní klinice LF a FN Plzeň, ul. Dr.E.Beneše 13, Plzeň-Bory dne .

Stanovisko k disertaci vypracovala Lékařská fakulta UK v Plzni.

S disertací je možné se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty UK v Plzni, Husova 3,  
Plzeň.

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

předseda komise pro obhajoby

v oboru vnitřní lékařství

## Obsah autoreferátu

<b>1. ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Proces onkogeneze</b>	<b>2</b>
2.1.1. Regulace buněčného cyklu	2
2.1.2. Apoptóza	3
2.1.3. Antionkogeny - nádorově supresorické geny	3
2.1.4. Protoonkogeny a onkogeny	4
<b>2.2. Proteiny rozrušující extracelulární matrix: matrixové metaloproteinázy</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Geny metabolismu fluoropyrimidinů</b>	<b>7</b>
<b>2.4. Kolorektální karcinom</b>	<b>8</b>
2.4.1. Epidemiologie	8
2.4.2. Patogeneze kolorektálního karcinomu	9
2.4.3. Nádorové markery kolorektálního karcinomu	9
<b>2.5. Měření genové exprese</b>	<b>11</b>
2.5.1. Kvantitativní analýza transkripce	11
<b>3. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE</b>	<b>12</b>
<b>4. METODIKA</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Soubor nemocných s kolorektálním karcinomem</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Vzorky pro stanovení exprese vybraných genů</b>	<b>13</b>
4.2.1. Nádorové linie	13
4.2.2. Tkáňové vzorky	13
<b>4.3. Stanovení exprese genů</b>	<b>13</b>
4.3.1. Isolace celkové RNA reverzní transkripce (RT)	14
<b>4.3.2. PCR v reálním čase (real-time PCR)</b>	<b>14</b>
4.3.2.1. House-keeping gen	14
4.3.2.2. Příprava standardů	14
4.3.2.3. Sekvence klonovaných standardů	15
4.3.2.4. Provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase	15
4.3.2.5. Stanovení exprese genů thymidylát syntázy (TS), thymidylát fosfatázy (TP)	15
<b>4.5. Hodnocení klinického stavu</b>	<b>15</b>
<b>4.6. Statistická analýza</b>	<b>16</b>
<b>5. VÝSLEDKY</b>	<b>17</b>

<b>5.1. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620</b>	<b>17</b>
5.1.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620	17
<b>5.2. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu</b>	<b>17</b>
5.2.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na chorobném postižení kolorektální tkáně	17
5.2.2. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na stádiu onemocnění	20
5.2.3. Vztah exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 k vývoji nádorového onemocnění	21
5.2.4. Závislost délky bezpříznakového období na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1	22
5.2.5. Závislost délky celkového přežití na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1	23
<b>5.3. Exprese mRNA TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu</b>	<b>23</b>
5.3.1. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na typu kolorektální tkáně	23
5.3.2. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na stádiu onemocnění	25
5.3.3. Závislost délky bezpříznakového období (DFI) na expresi genů TS, TP a DPD	26
5.3.4. Závislost délky celkového přežití (OS) na expresi genů TS, TP a DPD	26
5.3.5. Vzájemná závislost exprese TS, TP a DPD	26
<b>6. DISKUSE</b>	<b>27</b>
<b>6.1. Sledování exprese genů metodou kvantitativní RT PCR</b>	<b>27</b>
<b>6.2. Exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620</b>	<b>28</b>
6.3. Exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu	28
6.3.1. Porovnání exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 v kolorektální tkáni	28
6.3.2. Korelace exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 s klinickým stavem onemocnění	30

<b>6.4. Exprese TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu</b>	<b>31</b>
<b>7. ZÁVĚRY</b>	<b>33</b>
<b>8. CITOVANÁ LITERATURA</b>	<b>34</b>
<b>9. PUBLIKACE AUTORA</b>	<b>40</b>

## 1. ÚVOD

Kolorektální karcinom je nejčastějším nádorem zaživačího ústrojí a díky neustálému nárůstu během posledních desetiletí je druhým nejčastějším nádorem vůbec. Přestože je prognóza tohoto onemocnění při včasné diagnóze příznivá, a primární i sekundární prevenci je věnováno velké úsilí, umírá ročně na tento novotvar v České republice více než 4000 lidí. Toto ukazuje na nutnost dále rozvíjet studium tohoto nádoru a zvýšit znalosti jeho etiopatogeneze a léčby.

Podrobná znalost mechanismů kancerogeneze a biologických vlastností nádorů by mohly přispět k novým trendům v léčbě nádorů. Kumulace mutací vedoucích ke vzniku nejprve adenomu, posléze až karcinomu je velmi dobře známým genetickým modelem. V tomto ohledu je kolorektální karcinom jedním z nejprozkoumanějších nádorů. Realizace genetické informace však na takovém stupni poznání není.

Záměrem této práce bylo pokusit se o hledání genů, které by pomohly v charakteristice biologických vlastností nádoru a pomohly tak i při určení prognózy a výběru cílené terapie. Zabývali jsme se měřením genové exprese přímo ve tkáni primárního nádoru a na základě těchto výsledků se chceme pokusit o odhad chování nádoru s možným využitím při léčbě.

## 2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 2.1. Proces onkogeneze

Proces onkogeneze na buněčné úrovni je úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy (programované buněčné smrti). Výše jmenované procesy jsou u vyšších organismů regulovány mnohastupňovými mechanismy, které zahrnují intracelulární a extracelulární kontrolní dráhy. Velká většina nádorových buněk obsahuje mnohočetné genetické změny, které pravděpodobně podporují proces onkogeneze právě poškozením důležitých kontrolních drah. U nádorových onemocnění se takřka pravidelně setkáváme se dvěma základními typy genetických poškození. Prvním typem poškození jsou dominantní poruchy protoonkogenů a druhým typem jsou recesivní poruchy antionkogenů.

Genetické poruchy, které ovlivňují protoonkogeny, jsou zodpovědné za vyvolání stimulačních účinků, zatímco poruchy ovlivňující antionkogeny jsou zodpovědné za ztrátu jejich inhibiční funkce. Molekulární mechanismy kontroly buněčné proliferace zahrnují jak negativní, tak pozitivní regulátory [1].

#### 2.1.1. Regulace buněčného cyklu

Důležité procesy, jako je replikace DNA, mitóza a cytokineze, jsou řízeny řadou kontrolních systémů s cílem koordinovat jednotlivé fáze buněčného cyklu. Ve standardním buněčném cyklu je proliferační aktivita kontrolována prostřednictvím inhibitorů, které mohou zastavit cyklus ve specifických kontrolních bodech. Zpětněvazebně zde signály brání v činnosti samotného kontrolního systému, ve snaze zabránit spuštění dalšího procesu dříve, než byl dokončen předcházející. Klíčový význam inhibitorů spočívá v jejich schopnosti regulovat buněčnou proliferaci v rámci utváření integrity tkáně a organismu. Tato regulace se uskutečňuje v několika důležitých kontrolních bodech cyklu. První kontrolní bod je v  $G_1$ -fázi, těsně před vstupem do S-fáze a druhý kontrolní bod je v  $G_2$ -fázi před vstupem do mitózy. Kontrolní systém buněčného cyklu zde spouští proces, který zahajuje S-fázi. Následně v  $G_2$  kontrolním bodě se spouští proces zahajující M-fázi.

Vlastní regulace buněčného cyklu je založena na dvou skupinách proteinů. První z nich je skupina *cyklin-dependentních kináz* (*cdk*), které vykazují svoji aktivitu fosforylací určitých proteinů na serinu a treoninu. Druhou je skupina specializovaných regulačních proteinů zvaných *cykliny*, které se vážou na molekulu *cdk kinázy* a vytvářejí tak funkční komplex cyklinu s příslušnou kinázou, který se vyznačuje schopností

fosforylovat odpovídající proteiny. Cyklické spojení, aktivace a následný rozpad komplexu cyklin/cdk jsou nezbytné pro progresi buněčného cyklu [2].

### 2.1.2. Apoptóza

Apoptóza je cílený, samodestrukční mechanismus buněk, v němž buňka sama hraje aktivní úlohu. Stejně jako mechanismy proliferace a diferenciací, je apoptóza považována za kritický bod buněčné kontroly, která může být modulována fyziologicky buňkou samotnou nebo vnějším prostředím. Je také regulačního mechanismu počtu buněk v rozdílných systémech.

Defekty v procesech podílejících se na kontrole programované smrti buněk mohou prodloužit životní cyklus buněk, čímž přispívají k neoplastické buněčné expanzi, která je nezávislá na buněčném dělení. Selhání normálních apoptotických drah rovněž přispívá k procesu karcinogeneze tvorbou tolerantního prostředí pro genetickou nestabilitu a akumulaci bodových mutací, umožňuje nefunkčnost kontrolních bodů buněčného cyklu, které by normálně indukovaly apoptózu, redukuje závislost na kyslíku a živinách a podporuje rezistenci k cytotoxickým protinádorovým látkám a radiaci [2].

### 2.1.3. Antionkogeny - nádorově supresorické geny

Velká většina mutací, které vedou k vývoji nádorů, jsou mutace somatické a vyskytují se pouze v nádorových buňkách pacienta. Podíl zárodečných mutací je ve většině případů nízký (Li-Fraumeni syndrom, FAP).

Nádorově supresorické geny se od onkogenů odlišují tím, že kódují proteiny, které se podílejí na kontrole buněčného růstu a procesu diferenciací a ztráta jejich funkce je zodpovědná přímo za změněný fenotyp nádorové buňky. Existenci antionkogenů poprvé předpověděl A. Knudson v roce 1971 na základě statistické analýzy incidence retinoblastomu [3].

Antionkogeny lze tedy definovat jako geny, jejichž represe, inaktivace, dysfunkce nebo ztráta mají za následek buněčnou transformaci. Při převážně monofaktoriálním vzniku nádoru lze vysledovat autozomálně dominantní typ dědičnosti u malignit podmíněných právě antionkogeny. Jedná se o takzvanou teorii dvojího zásahu (*two hit hypothesis*) formulovanou Knutsonem, která vede ke ztrátě heterozygoty (LOH). Ztrátou heterozygoty (LOH) se rozumí vznik mutace, která funkčně vyřadí i druhou alelu genu (antionkogenu). První alela je již nefukční z důvodu přítomnosti zárodečné mutace [3].



### Gen P53 (OMIM: +191170)

Mezi nejčastěji se vyskytující mutace u lidských nádorů patří mutace antionkogenu P53. Gen P53, nacházející se na chromozomu 17p13.1, je mutovaný u více než 50 % většiny typů lidských nádorů. Tento gen kóduje jaderný fosfoprotein o molekulové hmotnosti 53 kDa, který je negativním regulátorem přechodu G<sub>1</sub>/S fáze buněčného dělení [4-9]. Hlavní funkcí nemutované přirozené formy proteinu p53 (*wild-type* p53) je kontrola normálního průběhu buněčného cyklu regulací transkripce a DNA-replikace. Inaktivace obou alel genu P53 byla nalezena u většiny typů nádorů a zejména u karcinomů plic, tlustého střeva a prsu. Ve většině případů došlo k inaktivaci obou alel P53 v somatických buňkách, ale sporadicky se můžeme setkat i se zděděnou jednou deaktivovanou alelou pro gen P53. Jedinci s rodinným nádorovým syndromem děděným autozomálně dominantně a označovaným jako „*Li-Fraumeni syndrom*“ mají 25x vyšší šanci tvorby zhoubných nádorů do svých 50 let věku než normální populace a dokonce 90% penetranci nádorového onemocnění ve věku 70 let [10-12]. Z řady získaných poznatků je zřejmé, že protein p53 působí jako „molekulární strážce“, který brání rozšíření geneticky poškozených buněk.

### APC gen (adenomatous polyposis coli, OMIM:+175100)

Zděděné mutace v APC genu, nacházejícího se na chromozomu 5q21, jsou příčinou FAP (familial adenomatous polyposis) [13], onemocnění charakterizovaného vývojem mnohačetných pre-maligních polypů ve druhé a třetí dekádě života. Téměř vždy jeden nebo více polypů projde procesem maligní transformace a vzniku karcinomu tlustého střeva. Somatické mutace tohoto genu byly rovněž nalezeny u sporadických karcinomů tlustého střeva (60 %), sporadických adenomů (63 %) a karcinomů trávicího traktu a jsou vždy asociovány s mutacemi jiných genů.

Mutace v různých oblastech genu mají rozdílný efekt na vývoj polypósy, což lze doložit počty polipů u konkrétních postižených osob [14]. K dnešnímu dni bylo popsáno 583 mutací tohoto genu [15].

#### 2.1.4. Protoonkogeny a onkogeny

Onkogenní aktivace může být způsobena kvantitativními nebo kvalitativními změnami exprese protoonkogenů, genů podporujících růst.

Kvalitativní změny jsou způsobeny změnami ve struktuře genu mající za následek syntézu abnormálního genového produktu (onkogenu), které má zvýšenou funkci.

Kvantitativní změny ovlivňují regulaci genové exprese, které vedou ke zvýšené nebo nepřiměřené produkci strukturálně nezměněné formy normálního proteinu podporujícího růst.

Většina protoonkogenů kóduje proteiny, které se podílejí na přenosu vnějších růstových a diferenciacních signálů z povrchu buňky do cytoplazmy a do jádra. Jako onkogeny mohou působit kvantitativně nebo kvalitativně změněné exprese genů:

- růstových faktorů
- receptorů pro růstové faktory
- přenašečů signálů vázaných na membránu
- cytoplazmatických přenašečů signálů
- jaderných transkripčních faktorů
- cyklinů a cyklin-dependentní kináz (cdk) [2].

Mezi nejčastěji mutované onkoproteiny přenašečů signálů patří geny rodiny RAS - Harvey (Ha), Kirstein (Ki), neuroblastoma (A) – vázající guanosin 5' trifosfát (GTP). 15 – 20% všech lidských nádorů obsahuje mutace v genech RAS. K-ras mutace jsou nalézány u 30% plicních karcinomů, u 50% kolorektálních karcinomů a u 90% karcinomů pankreatu [16-18]. Normální ras proteiny jsou přítomny v buňce jak v aktivní (signály přenášející), tak inaktivní formě. V neaktivní formě se ras váže s GDP a v případě, že buňky jsou stimulovány růstovým faktorem dochází k aktivaci ras výměnou GDP za GTP. Takto aktivovaný ras interaguje s cytosolovým proteinem raf-1, čímž dochází ke stimulaci MAP kinázy. Tato kináza aktivuje cílové transkripční faktory v jádře a tím podporuje průběh mitózy. V normálních buňkách je ras v aktivní formě pouze přechodně, protože jeho vlastní GTPázová aktivita hydrolyzuje GTP za vzniku GDP a tím se přeměňuje do inaktivní formy [2].

## 2.2. Proteiny rozrušující extracelulární matrix: matrixové metaloproteinázy

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou rodina vysoce konzervovaných endopeptidáz, které mají schopnost degradovat většinu komponent bazální membrány. Matrixové metaloproteinázy se prostřednictvím remodelace extracelulární matrix (ECM) uplatňují při procesech migrace buněk extracelulární matrix, prostřednictvím změny extracelulární matrix metaloproteinázami mohou buňky přejít do proliferace, apoptózy nebo morfogeneze. MMPs mohou také měnit aktivitu biologických faktorů jako jsou růstové faktory a receptory růstových faktorů [19]. Jejich fyziologická a

patologická funkce se projevuje také v modulaci extracelulární matrix během embryogeneze, ovariálního cyklu nebo při zánětu a nemocech jako revmatická artritida, fibróza jater, ledvin [20]. Účastní se také procesu degradace ECM a bazální membrány (BM) ve vztahu k nádorové invazivitě [21, 22, 23]. Regulace matrixových metaloproteináz probíhá na několika úrovních, na úrovni jejich transkripce, jejich aktivace a prostřednictvím specifických tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs) [19].

V současnosti je známo více než 28 lidských matrixových metaloproteináz a nové jsou stále objevovány.

Některé studie prokázaly statisticky významnou spojitost jejich exprese či aktivity u kolorektálního karcinomu s prognózou a dalšími klinickými údaji ale jiné ji popřely a tak vztah ke stádiu onemocnění, prognóze a dalším klinickým zůstává nejasný [19, 24]. Nyní jsou objasňovány různé role specifických MMPs ve stádiích onkogeneze kolorektálního karcinomu. Je zajímavé zmínit, že několik MMPs se nachází na stejném chromozómovém úseku, 11q23. Tento region se ukazuje být amplifikován u několika solivních nádorů [25]. Transkripce některých MMPs, zejména MMP-7 a MT1-MMP, je aktivována klíčovými onkogeny a tumor-supresorovými geny podílejícími se na onkogenezi kolorektálního karcinomu.

V současnosti je středem zájmu u časných stádií kolorektálního karcinomu úloha metaloproteinázy MMP-7 (matrilysin), která specificky štěpí kolagen IV elastin, intaktin, fibronectin, želatinu, laminin a tenascin. Matrilysin je jeden z cílových genů, transkripčně aktivovaných, komplexem  $\beta$ -catenin-tcf-4, který patří mezi klíčové transkripční faktory, uplatňujících se v časných stádiích kolorektální karcinogeneze [26, 27].

MMP-2 degraduje molekuly kolagenu IV, který je hlavní komponentou BM dále kolagen V, VII, X a želatinu [28]. Latentní proenzymová forma MMP-2 je udržována cysteinovým zbytkem na N-terminální peptidové doméně, který zasahuje na zinkový atom v katalytickém centru. Proteolytické odštěpení tohoto zbytku N-terminální domény aktivuje enzym [29]. Zvýšená exprese mRNA MMP-2 byla některými autory zaznamenána v nádorová kolorektální tkáni oproti normální tkáni [30, 31], jinými autory pozorována nebyla [32].

Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs) jsou hlavními endogenními regulátory aktivity MMPs ve tkáních. Do současnosti byly nalezeny 4 tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4 [33]. TIMP-2 se váže specificky nekovalentní vazbou na pro-form MMP-2 [34] a

inhibuje jeho enzymatickou aktivitu. TIMP-1 reguluje aktivitu MMP-7. Bylo zjištěno, že zvýšené exprese TIMP-1 a TIMP-2 *in vivo* potlačuje růst metastáz [35], také však byla zjištěna zvýšená exprese TIMP-1 v nádorové tkáni [31].

U následujících dvou matrixových metaloproteináz a dvou tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz jsme stanovili expresi. Výběr jsme provedli na základě výše uvedených publikací.

- MMP-2 (72kDa, typ IV kolagenáza, želatináza A, OMIM:\*120360 genový lokus:16q13)
- MMP-7 (92kDa, matrilysin, PUMP, OMIM: \*178990, genový lokus:11q21-q22)
- TIMP-2 (21kDa, OMIM: \*188825, genový lokus: 17q25)
- TIMP-1 (21kDa, OMIM: \*305370, genový lokus: Xp11.3-p11.23)

### 2.3. Geny metabolismu fluoropyrimidinů - Thymidilát syntázy (TS), thymidin fosforylázy (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD) a predikce účinnosti fluoropyrimidinů

Mezi nejčastěji podávaná cytostatika u mnoha nádorových diagnóz patří 5-fluorouracil. Tento fluoropyrimidin se používá standardně při léčbě kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, slinivky břišní, karcinomu ánu, karcinomu prsu nebo nádorů hlavy, krku a jícnu. 5-fluorouracil je základním cytostatikem pro léčbu kolorektálního karcinomu. Výhodou je relativně omezená toxicita. Mechanismus protinádorového působení 5-fluorouracilu je komplexní. Nejdůležitějším je zpomalení syntézy DNA v důsledku inhibice enzymu thymidylát syntázy (TS). Také syntéza RNA je 5-fluorouracilem negativně ovlivněna, neboť v důsledku metabolizace léku dochází k zařazování 5-fluorouridin trifosfátu do nově syntetizované mRNA, což následně vede ke vzniku chyb při translaci.

Další fluoropyrimidin, Kapecitabin, je podáván jako neaktivní, a je aktivován až přeměnou enzymem thymidin fosforylázou (TP) na 5-fluorouracilu.

Efekt 5-fluorouracilu nastává teprve po intracelulární konverzi na nukleotid fluorouridinmonofosfát (5-FUMP), kdy vzniká vlastní aktivní látka, kterou je buď 5-fluorouridinmonofosfát (FdUMP) nebo 5-fluorouridintrifosfát (FUTP). První je mohutným inhibitorem thymidylát syntázy. Blokuje tedy tvorbu deoxythymidintrifosfátu (kyseliny thymidilové) a tím i syntézu DNA. Druhý z obou antimetabolitů se inkorporuje do RNA a poškozuje její funkci (36, 37, 38, 39).

Odbourávání 5-fluorouracilu na inaktivní metabolity je zajišťováno enzymem dihydropyrimidin dehydrogenázou (DPD). Tento enzym je přítomen ve zdravých i v nádorových buňkách. Nedostatečná aktivita DPD ve zdravých buňkách způsobuje vysokou toxicitu léčby, naopak nadměrná aktivita enzymu pozorovaná u některých nádorů vysvětluje jejich rezistenci k 5-fluorouracilu. Snížená katalytická aktivita enzymu je způsobena bodovými nebo sestřihovými mutacemi v jeho genu. Bodové nebo sestřihové mutace v genu pro DPD způsobují záměnu některých aminokyselin v proteinu DPD, čímž dochází ke snížení jeho katalytické aktivity [40]. Četnost mutací v genu pro DPD je v běžné populaci popisována mezi 1 - 5,8% [41, 42]. Se sníženou expresí fyziologické varianty DPD se setkáváme buď jako s náhodným nálezem u asymptomatických jedinců nebo jako součásti vzácného, autosomálně recesivního onemocnění, projevujícího se neurologickými defekty<sup>9)</sup> a též u nemocných, u kterých se v důsledku léčby fluoropyrimidiny vyskytne významná, život ohrožující toxicita. Aktivita DPD je u žen asi o 15% nižší než u mužů. Na konečné přeměně 5-fluorouracilu se podílí thymidin fosforyláza (TP), která se nachází jak v nádorové tak nenádorové tkáni [43, 44].

Poslední studie dále prokazují, že vysoké nádorové koncentrace enzymu thymidylát fosforylázy (TP) a thymidylát syntázy (TS) jsou negativním prediktivním faktorem léčebné odpovědi na 5-fluorouracil a jeho deriváty. Stanovení exprese DPD by mohlo předejít toxickým, život ohrožujícím, komplikacím, což je problematické zejména u pacientů s adjuvantní léčbou.

- thymidylát fosforyláza (TP, OMIM: \*131222, genový lokus: 22q13.32-qter)
- thymidylát syntáza (TS, OMIM: \*188350, genový lokus: 18p11.32)
- dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD, OMIM: +274270, genový lokus: 1p22)

## 2.4. Kolorektální karcinom

### 2.4.1. Epidemiologie

Kolorektální karcinom patří mezi tři nejčastější nádory v celosvětovém měřítku. V civilizovaných zemích je incidence kolorektálního karcinomu vysoká, řadí se na druhé místo (hned za karcinom plic u mužů a karcinom prsu u žen). V zemích střední a jihovýchodní Evropy výskyt kolorektálního karcinomu dramaticky narůstá, v USA se naproti tomu příliš nemění a v Asii či v Africe vykazuje incidence tohoto onemocnění pokles [1].

Česká republika patří v tomto onemocnění jak v incidenci, tak v úmrtnosti k zemím s nejhoršími výsledky. Od roku 1960 došlo v České republice k enormnímu nárůstu incidence a kolorektální karcinom tvoří 12,1% všech nádorů u mužů a 13,7% všech nádorů u žen. Nárůst hrubé incidence za toto období byl o 341% u nádorů kolon a o 164% u nádorů rekta.

#### **2.4.2. Patogeneze kolorektálního karcinomu**

Kolorektální karcinom je nádor, jehož patogenese je asi nejlépe pochopena, vzhledem ke známému genetickému modelu, který byl navržen již v r. 1990 Vogelstain a v upravené podobě publikován v r. 1996 [45]. V současnosti jsou známy dvě cesty maligní transformace buněk střevní sliznice.

První zahrnuje poruchy genů reparace DNA (mismatch-repair genes), mezi nejčastěji mutované patří geny označované hMLH1 a hMSH2. Defektní reparační systém vede k rychlé kumulaci mutací. Ty lze monitorovat jako kumulující se chyby v citlivých oblastech, kterými jsou mikrosatelity (opakující se identické sekvence DNA různé délky). Mikrosatelitová instabilita (MSI) je markerem poruchy genů zodpovědných za výskyt replikačních chyb a mutací. Mikrosatelitovou instabilitu nalézáme především u hereditárně podmíněných forem nepolypózních kolorektálních adenokarcinomů a asi u 10-15 % případů sporadických karcinomů [45].

Druhá cesta či molekulární mechanismus kolorektální kancerogeneze je charakterizován celkovou instabilitou genomu. Ta zahrnuje postupné mutace více funkčně odlišných genů, která vedou především k nerovnováze mezi proliferací, diferenciací a zánikem buněk. Známa je sekvence poruch v protoonkogenu K-ras a supresorových genech APC (adenomatous polyposis coli), DCC (deleted in colorectal carcinoma) a p53. Důsledkem deregulace nebo mutace klíčových genů kontrolujících buněčný cyklus a zánik buněk apoptózou je nakonec růstová dysbalance, která vede k nádorovému růstu [46].

#### **2.4.3. Nádorové markery kolorektálního karcinomu**

Nádorové markery jsou molekuly přítomné v nádoru nebo produkované nádorem nebo hostitelem jako odpověď na přítomnost nádoru. Tyto molekuly se u zdravého jedince buď vůbec nevyskytují anebo se vyskytují v podstatně nižší koncentraci, než je tomu v případě přítomnosti nádoru [47]. Většinou se předpokládá korelace mezi koncentrací markeru a aktivní hmotou nádoru, a proto jsou nádorové markery

užitečným nástrojem v péči o nemocné s nádorovým onemocněním. Markery, dostupné pro většinu případů nádorů, jsou pomocné a hodnotné nástroje pro hodnocení prognózy pacientů, depistáž a monitorování léčby, zatímco pro screening jen výjimečně [48].

Pro svoji vysokou senzitivitu u kolorektálního karcinomu (71%) je jedním z nejčastěji používaných markerů Karcinoembryonální antigen.

Karcinoembryonální antigen (CEA), neboli CEACAM 5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5)

CEA, popsáný r. 1965 [49], patří k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům. Je to onkofetální protein s pravděpodobnou rolí v procesu buněčné adheze. Za fyziologických podmínek je CEA produkce pozorována ve vyvíjejícím se embryu, kde je syntetizovaný v epiteliálních buňkách, a to především na jejich membránách. V dospělém věku je syntetizován v minimálním množství epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. CEA se nachází především ve tkáni nádorů karcinomů tlustého střeva a konečníku. Z dalších nádorů GIT je CEA produkován nádory žaludku, pankreatu, jícnu a žlučových cest [50].

Antigen CA 19-9

CA 19-9 patří k tumor-asociovaným antigenům definovaným na podkladě monoklonálních protilátek, patří také k onkofetálním antigenům.

Jeho výskyt je charakteristický pro adenokarcinomy pankreatu, žaludku, tlustého střeva, jater a vybraných gynekologických nádorů. Stanovuje se často v kombinaci s CEA [50].

Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) a tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS)

Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) byl prokázán Bjorklundem jako antigen epiteliálních buněk karcinomů. Je to polypeptid, jehož struktura odpovídá směsi fragmentů cytokeratinů 8, 18 a 19 [53]. Byl prokázán ve většině karcinomů, klidová zdravá tkáň jej neobsahuje. Přítomnost TPA v séru u nemocných s výraznou proliferací maligního nádoru vedla zpočátku k představě jeho přímé vazby s procesem proliferace.

### Thymidinkinasa (TK)

Thymidinkinasa (TK), neboli ATP:thymidin-5'-fosfotransferasa (EC 2.7.1.21), je enzym syntézy DNA, které jsou charakteristické pro proliferující tkáň.

Patologicky se nachází v rychle proliferujících tkáních a z těchto tkání se dostává do cirkulace. Intenzivní produkce je pozorována především u onemocnění s generalizovanou zvýšenou proliferací a u hematologických malignit [54, 55].

## 2.5. Měření genové exprese

Biologické pochody včetně základní buněčných dějů jsou realizovány zejména faktory proteinové povahy. V buňce můžeme tyto faktory studovat na třech úrovních: Na úrovni genu (tedy genomové DNA), na úrovni genového transkriptu (RNA) a na úrovni proteinu.

Znalost exprese na úrovni mRNA umožňuje poměrně snadnou orientaci v tom, které geny jsou momentálně exprimovány. Vedle toho je důležitá i kvantitativní stránka genové exprese RNA, která představuje informaci o intenzitě genové exprese, tedy částečně informaci o množství produkovaného proteinu (na jeho množství mají dále zásadní vliv posttranslační úpravy).

Základními přístupy při studiu transkriptomu, tedy různých mRNA jsou izolace celkové RNA, izolace mRNA a reversní transkripce, tj. enzymový přepis RNA do podoby cDNA (kopírované DNA), což znamená stabilizaci této struktury, protože RNA je velmi citlivá k všudypřítomným ribonukleasám a nelze ji dlouhodobě uchovávat. cDNA lze navíc ligovat do nejrůznějších vektorů a klonovat. Rovněž tak lze cDNA amplifikovat metodou polymerasové řetězové reakce (PCR - polymerase chain reaction), pomocí specifických primerů k hledaným genům, což je nejpoužívanější technika pro detekci specifických sekvencí.

### 2.5.1. Kvantitativní analýza transkripce

Zřejmě nejlepší metodou kvantitativní PCR, metoda měřící expresi na úrovni mRNA, je polymerasová řetězová reakce v reálném čase (real-time PCR, Q-PCR). Přístroje pro real-time PCR umožňují měření množství nasyntetizované DNA po každém PCR cyklu. Díky tomu monitorování reakce lze zjistit, v kterém momentu se rozbíhá exponenciální nárůst tvořené DNA, a protože bylo prokázáno, že počet cyklů nutných k náběhu exponenciální fáze je funkcí počtu DNA templátů na počátku celého děje, lze počáteční koncentraci snadno vypočítat. Vývoj těchto nových metod byl spíše



firemní nežli akademický, takže je obtížné citovat původní autory, tato problematika je však shrnuta v přehledných publikacích [56, 57].

### 3. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Vypracovat metody stanovení genové exprese genů matrixových metaloproteináz MMP-2, MMP-7 a tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz TIMP-1 a TIMP-2 pomocí kvantitativní RT-PCR (RT real-time PCR).
2. Stanovit expresi genů MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 metodou kvantitativní RT-PCR:
  - u nádorových linií kolorektálního karcinomu (HT29, SW480 a SW620)
  - ve tkáňových vzorcích sliznice kolon a recta zdravé tkáně
  - ve vzorcích sliznice kolon a recta s benigním nádorovým postižením
  - ve vzorcích sliznice s maligním nádorovým postižením.
3. Stanovit expresi genů TS TP a DPD metodou kvantitativní RT-PCR:
  - ve tkáňových vzorcích sliznice kolon a recta zdravé tkáně
  - ve vzorcích sliznice kolon a recta s benigním nádorovým postižením
  - ve vzorcích sliznice s maligním nádorovým postižením.
4. Zjištěné hodnoty exprese genů korelovat s klinickým stavem a vývojem onemocnění a biologickými vlastnostmi nádorových linií.

## 4. METODIKA

### 4.1. Soubor nemocných s kolorektálním karcinomem

Studie zahrnuje 38 pacientů s primárně detekovaným kolorektálním karcinomem (věk 33-89 let, průměr 70.1 let) v různých stádiích onemocnění. Dále jsme do studie zařadili 11 pacientů s benigním onemocněním tlustého střeva (věk 19-70 let, průměr 45). Histologicky se jednalo o akutní formu Chronova onemocnění a Ulcerózní kolitidu.

### 4.2. Vzorky pro stanovení exprese vybraných genů

#### 4.2.1. Nádorové linie

Jako *in vitro* model jsme zvolili dvě nádorové linie primárního kolorektálního karcinomu HT29, SW480 a jednu linii, získanou ze sekundárního nádoru, metastáz kolorektálního karcinomu, SW620. Nádorové linie jsme získali od MUDr. Anny Fišerové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AVČR v Praze.

#### 4.2.2. Tkáňové vzorky

Nádorová tkáň byla získána od 38 pacientů ze souboru nemocných s kolorektálním karcinomem (Skupina TUM). Od 19 z těchto pacientů s kolorektálním karcinomem jsme získali normální tkáň sliznice tlustého střeva z okrajů střevních resektátů (skupina NORM). Tkáňové vzorky od pacientů s benigním onemocněním tlustého střeva tvoří skupinu BENIGN (n = 11).

Mezi skupinami NORM a BENIGN nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v žádném ze sledovaných parametrů, tj. v míře exprese zvolených genů, proto obě podskupiny byly sloučeny a v dalších statistických šetřeních byly použity jako jediná kontrolní skupina KONTROL.

Všechny vzorky byly histologicky ověřeny. Vzorky tkáně v množství 100 - 300 mg odebrané v průběhu operace byly okamžitě zmrazeny a uchovány při - 70°C až do zpracování. Tkáň byla získána od pacientů operovaných na Chirurgické klinice FN v Plzni v letech 1998 - 2000.

### 4.3. Stanovení exprese genů

Exprese genu byla zjištěna stanovením množství mRNA daného genu ve tkáni. Prvním krokem byla izolace celkové RNA, následovala reverzní transkripce (RT), která převedla veškerou mRNA do stabilnější podoby cDNA. Závěrečným krokem byla PCR v reálním čase (real-time PCR), která umožní zjistit kvantifikovat množství cDNA.

#### 4.3.1. Isolace celkové RNA reverzní transkripce (RT)

Z  $5 \times 10^6$  buněk nádorových linií resp. 100 mg tkáně jsme izolovali celkovou RNA pomocí soupravy „RNAgent Total RNA Isolation System“ (Promega, USA)

3  $\mu\text{g}$  izolované RNA jsme použili pro reverzní transkripci o celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$ . Použili jsme 1  $\mu\text{l}$  oligo dT<sub>20</sub> (0,5 mg/ml) a 1  $\mu\text{l}$  (200U) reverzní transkriptasy (Superscript II, Life Technologies, Invitrogen). Správné provedení reverzní transkripce bylo ověřeno stanovením glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenasy (GAPDH), která musela být přítomna.

#### 4.3.2. PCR v reálním čase (real-time PCR)

Kvantifikaci exprese genů lze provádět absolutně (stanovení počtu kopií), to znamená s použitím standard o známé koncentraci pro každý gen. Dále je možné kvantifikaci provádět relativně, poměr vůči jinému genu, kdy se porovnávají hodnoty Ct nebo je možno tyto přístupy kombinovat. Zvolili jsme kombinaci obou těchto přístupů. Jako referenční gen jsme použili gen ze skupiny „house-keeping“ genů, tj. genů, které jsou exprimovány konstitutivně.

##### 4.3.2.1. House-keeping gen

Zvolili jsme glykolytický enzym glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenasy (GAPDH) jeden z nejčastěji používaných genů [58]. Použili jsme primery navržené firmou Corbett Research (Austrálie) splňující naše požadavky [59].

Primery matrixových metaloproteináz a jejich inhibitorů (MMP-2, MMP-7, TIMP-1, TIMP-2) jsme navrhli na základě nukleotidových sekvencí volně dostupných v genomové databance National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

##### 4.3.2.2. Příprava standardů

Kvantifikaci exprese genů lze provádět absolutně, to znamená s použitím standard, pro každý gen o známé koncentraci nebo relativně, vůči jinému genu, kdy se porovnávají hodnoty Ct nebo je možno tyto přístupy kombinovat. Zvolili jsme kombinaci obou těchto přístupů.

Příprava standard spočívá v inzerci fragmentu genu ohraničeného našimi primery (amplionu) do vektoru (plazmidu), který nám umožní, po jeho namnožení (klonování) v bakteriích, získat jakékoli množství amplikonu o námi určením počtu kopií. Takto připravené standardy jsme použili pro kvantitativní PCR (real-time PCR).

#### 4.3.2.3. Sekvence klonovaných standardů

Sekvenaci klonovaných standardů jsme provedli dideoxinukleotidovou metodou pomocí PCR sekvenační soupravy „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech). Použili jsme primerů T7 a SP6 značených Cy5 a sekvenátor ALFexpress (Amersham Pharmacia Biotech). Takto určenou sekvenci inzertů jsme porovnali s sekvencí v databázi NCBI.

#### 4.3.2.4. Provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase

PCR v reálném čase jsme prováděli na přístroji Rotor-Gene 2000 (Corbett Research). Na tomto přístroji jsme prováděli jednak vlastní kvantifikace ale i všechny PCR reakce, nutné pro přípravu standard. Pro detekci PCR produktů jsme zvolili Syber green, interkalační flouorchrom. Stanovení kvantitativní PCR jsme prováděli v duplikátech pokud výsledky nebylo možno nejednoznačně interpretovat, stanovení jsme opakovali. Konečný výsledek je průměrem naměřených hodnot. Specificitu všech stanovení jsme testovali denaturační analýzou, která byla stálou součástí PCR programu (melt). Případně navíc na elektroforetickém gelu.

Kvantifikace byla provedena pouze u vzorků, u kterých byla potvrzena specificita reakce, přítomnost námi sledovaného genu. Tyto vzorky vykázaly správnou teplotu  $T_m$  identickou s  $T_m$  standardů.

#### 4.3.2.5. Stanovení exprese genů thymidylát syntázy (TS), thymidylát fosfatázy (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD)

Stanovení exprese genů TS, TP a DPD bylo provedeno pomocí kitů LightCycler TS mRNA Quantification Kit<sup>plus</sup> LightCycler TP mRNA Quantification Kit<sup>plus</sup> a LightCycler DPD mRNA Quantification Kit<sup>plus</sup> (Roche) na přístroji LightCycler (Roche). Kvantifikace byla provedena relativně, „house keeping“ gen byl v kitech použit gen glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy (GAPDH).

### 4.5. Hodnocení klinického stavu

Klinické stavy byly vyhodnoceny na základě ambulantního záznamu o zdravotním stavu pacienta uvedeného onkologem nebo chirurgem a na základě výsledků pravidelného stagingu pacientů s kolorektálním karcinomem. Pro hodnocení byly využity údaje TNM klasifikace, lokalizace nádoru, remise, progresse onemocnění, bezpříznakového přežití (DGI) a celkového přežití (OS).

#### 4.6. Statistická analýza

Statistická analýza vstupního souboru byla provedena s užitím software S.A.S. (Statistical Analysis Software) verze 8.02 a programu STATISTICA verze 5.1. (grafické výstupy). Byla provedena deskriptivní statistika vstupního souboru. Dále testy relativní četnosti. Pro porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách byly použity neparametrické testy, Kruskal-Wallisův test a Wilcoxonův test, používané pro skupiny s negaussovské rozložením zkoumaných znaků. Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků v jednotlivých skupinách, vzhledem k distribuci těchto proměnných, byl použit Pearmanův koeficient korelace.

Pro zjištění vlivu jednotlivých proměnných na délku celkového přežití (OS), respektive délku bezpříznakového období (DFI) byla použita Kaplan-Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití a dále pak byly počítány tzv. log-rank test a Wilcoxon test. U spojitých proměnných byl vztah mezi celkovým přežitím (respektive DFI) a danou proměnnou zkoumán pomocí testů asociace (Wilcoxon test, log-rank test). Stáří vzorků a dostupností dat byl zkoumaný časový interval omezen na 5 resp. 7 let.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620

#### 5.1.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620

V tabulce 1 jsou hodnoty hladin relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 u jednotlivých linií. V tabulce 2 jsou hodnoty exprese stejných genů, hodnoty jsou uvedeny absolutně, tzn. počet kopií na 1 buňku. Zatímco mRNA MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 jsme detekovali u všech nádorových linií, mRNA MMP-2 jsme detekovali pouze u linií SW620 a SW480.

Tabulka 1: Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2 a TIMP-1 a MMP-7 u nádorových linií

nádorová linie	MMP-7/GAPDH	TIMP-1/GAPDH	MMP-2/GAPDH	TIMP-2/GAPDH	MMP-2/TIMP2
HT29	46,43532169	0,925589914	0	0,001361401	0
SW620	0,150213583	9,195138872	3,251E-07	0,002428174	0,000133887
SW480	0,043743799	8,671500834	4,20545E-06	0,008135097	0,000516952

Tabulka 2: Hladiny absolutní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2 a TIMP-1 a MMP-7 u nádorových linií (počet kopií cDNA vztažený na 1 buňku)

nádorová linie	MMP-7	TIMP-1	MMP-2	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2
HT29	125,1405823	2,4944128	0	0,0036689	0
SW620	0,0924106	5,6568007	0,0000002	0,0014938	0,000133887
SW480	0,105348291	20,88359545	0,0000016	0,003095067	0,000516952

### 5.2. Exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu [91]

#### 5.2.1. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na chorobném postižení kolorektální tkáně

V tabulce 3 jsou hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi normální tkání (skupina NORM) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM). Hladina exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně (skupina TUM) ve srovnání s normální tkání (skupina NORM) ( $p < 0.0020$ ,  $p < 0.0467$ ,  $p < 0.0007$ ,  $p < 0.0003$ ).

Tabulka 3: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a normální tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkání (n=19)	nádorová tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0.0020
TIMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,0028	0.0467
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 3,2560	0.0007
TIMP-1/GAPDH	0-0.2394	0.0839-26.0146	0.0003

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi tkání benigního onemocnění (skupina BENIGN) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) jsou v tabulce 4. Zjistili jsme, že hladina exprese je signifikantně zvýšená pouze u mRNA MMP-2 nádorové maligní tkáně (skupina TUM) ve srovnání s benigní tkání ( $p < 0.0464$ ). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi nádorovou a benigní tkání nebyl zjištěn ( $p < 0.4042$ ,  $p < 0.1139$ ,  $p < 0.0780$ ).

Tabulka 4: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	benigní onemocnění (n=11)	nádorová tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0.0464
TIMP-2/GAPDH	0 - 0.0015	0 - 0,0028	0.4042
MMP-7/GAPDH	0 - 1.10987	0 - 3,2560	0.1139
TIMP-1/GAPDH	0 - 20.3014	0.0839 - 26.0146	0.0780

V tabulce 5 jsou hodnoty exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a jejich porovnání mezi normální tkání (skupina NORM) a benigní tkání (skupina BENIGN). Protože jsme nenašli rozdíly v úrovni exprese genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi skupinami NORM a BENIGN ( $p < 0.2231$ ,  $p < 0.4615$ ,  $p < 0.2691$ ,  $p < 0.2932$ ) spojili jsme vzorky těchto tkání do jedné skupiny, která umožňuje sledovat rozdíly mezi maligní tkání a tkání bez maligního postižení, tabulka 6.

Tabulka 5: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi normální tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkání (n=19)	benigní onemocnění (n=11)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0	0.2231
TIMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0.0015	0.4615
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 1.10987	0.2691
TIMP-1/GAPDH	0-0.2394	0 - 20.3014	0.2932

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi normální tkání s benigní tkání (skupina NORM + skupina BENIGN) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) jsou v tabulce 6. Zjistili jsme, že hladina exprese mRNA MMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně (skupina TUM) ve srovnání s normální a benigní tkání ( $p < 0.0005$ ,  $p < 0.0004$ ,  $p < 0.0007$ ). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2 mezi nádorovou maligní a nemaligní tkání byl hraniční ( $p < 0.0549$ ).

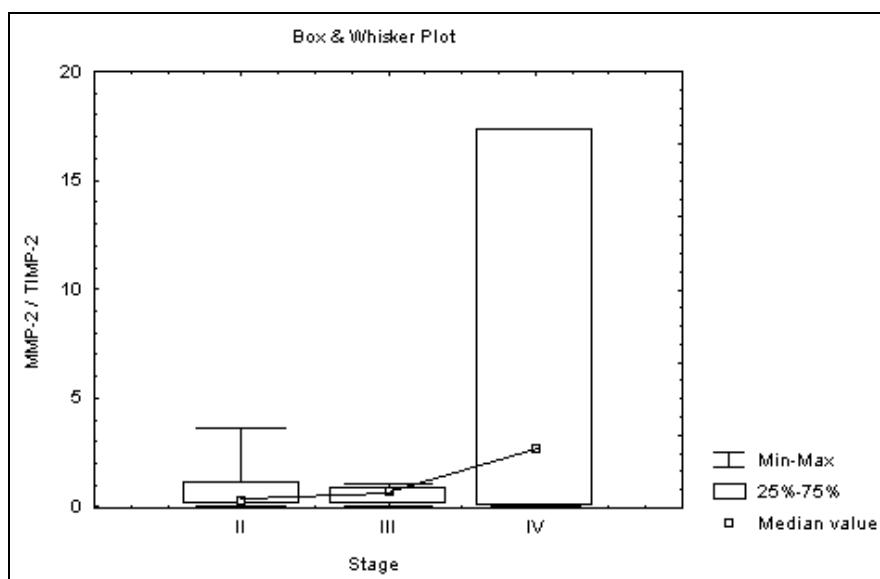
Tabulka 6: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi jednotlivými nádory a kontrolní skupinou (Wilcoxonův test).

mRNA	zdravá tkáň + benigní onemocnění (n=30)	nádorová maligní tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0,0005
TIMP-2/GAPDH	0 - 0,0001	0 - 0,0028	0,0549
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 3,2560	0,0007
TIMP-1/GAPDH	0 - 0,6665	0.0839 - 26.0146	0,0004

Vzhledem k funkční závislosti MMP-2 a TIMP-2, stanovili jsme poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 a korelovali jej se stadiem nádorového onemocnění. Jak je vidět na obrázku 1, vyšší stadium nádorového onemocnění odpovídá vyššímu mediánu hodnot poměru MMP-2/TIMP-2 (stage II: 0.29 (median), stage III: 0.69, stage IV: 2.71) ale nezaznamenali jsme statistickou signifikanci ( $p < 0.58$ ).



Obrázek 1: Poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 u stádií nádorového onemocnění



### 5.2.2. Změřené hodnoty exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na stádiu onemocnění

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi stádii onemocnění I a II oproti stádiím III a IV jsou v tabulce 7. Ne zjistili jsme žádné signifikantní rozdíly v hladinách exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV ( $p < 0.8044$ ,  $p < 0.8278$ ,  $p < 0.7167$ ,  $p < 0.4083$ ).

Tabulka 7: Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi stádii I, II a stádii III, IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II		stádium III + IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0003	23	0 - 0.0004	0.8044
TIMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0033	23	0 - 0.0028	0.8278
MMP-7/GAPDH	15	0 - 2,8318	23	0 - 1,6036	0.7167
TIMP-1/GAPDH	15	1,4426 - 17,5642	23	0,0522 - 5,3530	0.4083

V tabulce 8 jsou hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a statistické významnosti vzorků kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu (dg. C18) v.s. pacienti s diagnózou karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C19 a C20). V hladinách exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7

a TIMP-1 jsme rozdíl mezi vzorky pacientů diagnózy C18 v.s. C19 a C20 nezaznamenali ( $p < 0.2949$ ,  $p < 0.2473$ ,  $p < 0.7689$ ,  $p < 0.3745$ ).

Tabulka 8: Hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu, karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C18, C19, C20) (Wilcoxonův test).

mRNA	diagnóza C18		diagnóza C19 + C20		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2	17	0 - 0.0015	20	0 - 0.0002	0.2949
TIMP-2	17	0 - 0.0005	20	0 - 0.0101	0.2473
MMP-7	17	0 - 6.1422	20	0 - 2.9156	0.7689
TIMP-1	17	0.1712 - 0.2644	20	0.0681 - 10.3096	0.3745

### 5.2.3. Vztah exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 k vývoji nádorového onemocnění

Hladina exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5 letého sledování pacientů s kolorektálním karcinodem, v průběhu dispenzární péče, je uvedena v tabulce 9.

Tabulka 9: Hladina exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5 letého sledování pacientů s kolorektálním karcinodem (Wilcoxonův test).

mRNA	meta přítomny		meta nepřítomny		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2	16	0 - 0.0008	22	0 - 0.0003	0.8317
TIMP-2	16	0 - 0.0066	22	0 - 0.0028	0.8415
MMP-7	16	0 - 4.6990	22	0 - 2.8319	0.9165
TIMP-1	16	0.0681 - 6.0113	22	1.2527 - 26.2166	0.5099

Přítomnosti mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5 letého sledování pacientů s kolorektálním karcinodem, v průběhu dispenzární péče, je uvedena v tabulce 10. Jako přítomnost daného genu byla hodnocena exprese  $> 0$ . Hladina exprese genu rovna 0 byla hodnocena jako nepřítomnost daného genu.

Tabulka 10: Přítomnosti mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 ve vztahu k výskytu vzdálených metastáz (bez ohledu na lokalizaci) během 5 letého sledování pacientů s kolorektálním karcinomem (test relativní četnosti).

		MMP-2	TIMP-2	MMP-7	TIMP-1
meta ano	mRNA přítomna	5	8	9	14
	mRNA nepřítomna	10	7	6	1
meta ne	mRNA přítomna	11	13	16	21
	mRNA nepřítomna	12	10	7	2
p - value		0,366	0,8098	0,5286	0,8275

#### 5.2.4. Závislost délky bezpříznakového období na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1

Hodnotili jsme závislost délky bezpříznakového období (DFI interval) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu. Jako přítomnost exprese daného genu jsme hodnotili exprese jejichž hodnota počtu kopií byla  $>$  než 0. Nepřítomnou expresi daného genu jsme hodnotili jako expresi, jejichž hodnota počtu kopií byla  $=$  0. Sledovali jsme 2, 3 a 5 leté bezpříznakové období. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 24. Při statistickém hodnocení vlivu přítomnosti exprese genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 nebyl prokázán vliv přítomnosti žádného genu na délku bezpříznakového období, tabulka 11.

Tabulka 11: Závislost délky bezpříznakového období (DFI interval) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu.

mRNA	DFI interval (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
MMP-2	2	0.5019	0.6953
	3	0.5019	0.6953
	5	0.5196	0.6268
MMP-7	2	0.9455	0.9632
	3	0.9455	0.9632
	5	0.9197	0.9676
TIMP-1	2	0.6051	0.5168
	3	0.6051	0.5168
	5	0.6525	0.6232
TIMP-2	2	0.5025	0.8763
	3	0.5025	0.8763
	5	0.6580	0.6997

### 5.2.5. Závislost délky celkového přežití na expresi genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1

Hodnotili jsme závislost délky celkového přežití (OS) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu. Jako přítomnost exprese daného genu jsme hodnotili exprese jejichž hodnota počtu kopií byla > než 0. Nepřítomnou expresi daného genu jsme hodnotili jako expresi, jejichž hodnota počtu kopií byla = 0. Sledovali jsme 2, 3 a 5 leté bezpříznakové období. Při statistickém hodnocení vlivu přítomnosti exprese genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 nebyl prokázán vliv přítomnosti žádného genu na délku celkového přežití, tabulka 12.

Tabulka 12: Závislost délky celkového přežití (OS) na přítomnosti, či nepřítomnosti exprese daného genu.

mRNA	OS interval (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
MMP-2	2	0.6603	0.8443
	3	0.6475	0.8089
	5	0.6706	0.9804
MMP-7	2	0.7410	0.6642
	3	0.9553	0.9564
	5	0.8703	0.8814
TIMP-1	2	0.7278	0.8552
	3	0.6482	0.7412
	5	0.9527	0.6813
TIMP-2	2	0.6930	0.6548
	3	0.9568	0.9859
	5	0.9303	0.9815

## 5.3. Exprese mRNA TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu

### 5.3.1. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na typu kolorektální tkáně

V tabulka 13 jsou hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD a jejich rozdíly mezi normální tkání (skupina NORM) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM). Nezaznamenali jsme rozdíl v hladinách exprese mRNA TS, TP a DPD mezi nádorovou maligní tkání (skupina TUM) a normální tkání (skupina NORM), ( $p < 0.0978$ ,  $p < 0.4046$ ,  $p < 0.5403$ ,  $p < 0.8696$ ).

Tabulka 13: Hladiny specifických mRNA kopií TS, TP a DPD. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a normální tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkáň		nádorová tkáň		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	12	2.2600 - 41.1150	33	9.0000 - 62.6000	0.0978
TP	9	0.2700 - 24.2900	30	1.2900 - 19.5900	0.4046
DPD	1	4.1800 - 4.1800	16	3.0450 - 39.4350	0.5403

Hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD a jejich rozdíly mezi tkání benigního onemocnění (skupina BENIGN) a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) jsou v tabulce 14. Nezaznamenali jsme rozdíl v hladinách exprese mRNA TS, TP a DPD mezi tkání benigního onemocnění (skupina BENIGN a nádorovou maligní tkání (skupina TUM) ( $p < 0.7174$ ,  $p < 0.2028$ ,  $p < 0.0935$ ).

Tabulka 14: Relativní hladiny specifických mRNA kopií TS, TP a DPD. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi benigní tkání a maligní nádorovou tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	tkáň benigního onemocnění		nádorová tkáň		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	8	9.8200 - 151.8750	33	9.0000 - 62.6000	0.7174
TP	6	3.3200 - 65.4300	30	1.2900 - 19.5900	0.2028
DPD	3	12.7600 - 6390.00	16	3.0450 - 39.4350	0.0935

V tabulce 15 jsou hodnoty exprese mRNA TS, TP a DPD a jejich porovnání mezi normální tkání (skupina NORM) a benigní tkání (skupina BENIGN). Protože jsme nenašli rozdíly v úrovni exprese genů TS, TP a DPD mezi skupinami NORM a BENIGN ( $p < 0.2170$ ,  $p < 0.0990$ ,  $p < 0.1797$ ) spojili jsme tyto tkáně do jedné skupiny, která umožňuje sledovat rozdíly mezi maligní tkání a tkání bez maligního postižení.

Tabulka 15: Relativní hladiny specifických mRNA kopií TS, TP, DPD a CEA. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi normální tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkáň		tkáň benigního onemocnění		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	12	2.2600 - 41.1150	8	9.8200 - 151.8750	0.2170
TP	9	0.2700 - 24.2900	6	3.3200 - 65.4300	0.0990
DPD	1	4.1800 - 4.1800	3	12.7600 - 6390.00	0.1797

### 5.3.2. Hodnoty exprese genů TS, TP a DPD v závislosti na stádiu onemocnění

V tabulce 16 jsou hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP, DPD a CEA u vzorků kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II v.s. III, IV a statistické významnosti. Nezaznamenali jsme rozdíl v hladině exprese mRNA TS, TP, DPD a CEA mezi vzorky pacientů stádií I, II a III, IV, ( $p < 0.7066$ ,  $p < 0.9307$ ,  $p < 0.3335$ ).

Tabulka 16: Hladiny exprese mRNA TS, TP, DPD a CEA u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II a III, IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II		stádium III + IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	14	11,31 - 133,000	18	7.1600 - 62.6000	0.7066
TP	13	1,74 - 19,59	16	0.9150 - 20.3250	0.9307
DPD	9	4,7 - 59,40000	6	1.63 - 18.9000	0.3335

Hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP a DPD u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II, III v.s. IV jsou v tabulce 17. Také jsme nezaznamenali rozdíl v hladině exprese mRNA TS, TP a DPD mezi vzorky pacientů stádií I, II a III, IV, ( $p < 0.7396$ ,  $p < 0.8656$ ,  $p < 0.4405$ ).

Tabulka 17: Hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD u vzorků kolorektálního karcinomu pacientů stádií I, II, III v.s. IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II + III		stádium IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	23	6.3600 - 133.0000	9	9.9800 - 48.8100	0.7396
TP	21	1.3100 - 19.5900	8	0.9150 - 19.2450	0.8656
DPD	12	3.3750 - 39.1500	3	0.0400 - 19.4700	0.4405

V tabulce 18 jsou hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP a DPD a statistické významnosti vzorků kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu (dg. C18) v.s. pacienti s diagnózou karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C19 a C20). Zaznamenali jsme hraničně signifikantní rozdíl ( $p < 0.0525$ ) v expresi mRNA TS. V hladinách exprese mRNA TP a DPD jsme rozdíl mezi vzorky pacientů C18 v.s. C19 a C20 nezaznamenali ( $p < 1.0000$ ,  $p < 0.6916$ ), tabulka 32.

Tabulka 18: Hodnoty hladin exprese mRNA TS, TP a DPD u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu, karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C18, C19, C20) (Wilcoxonův test).

mRNA	diagnóza C18		diagnóza C19 + C20		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
TS	16	22.8250 - 131.8000	16	5.4600 - 42.2700	0.0525
TP	15	1.3100 - 16.7000	14	0.5400 - 23.9500	1.0000
DPD	8	4.3700 - 36.1000	7	1.6600 - 19.4700	0.6916

### 5.3.3. Závislost délky bezpříznakového období (DFI) na expresi genů TS, TP a DPD

Hodnotili jsme závislost hladiny exprese genů TS, TP a DPD na bezpříznakového období (DFI). Sledovali jsme 7 leté období. Při statistickém hodnocení vlivu exprese genů TS, TP a DPD nebyla prokázána statisticky signifikantní korelece mezi expresí těchto genu a bezpříznakovým obdobím, tabulka 19.

Tabulka 19: Závislost délky bezpříznakového období na hladině exprese daného genu.

mRNA	DFI (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
TS	7	0,5284	0,5610
TP	7	0,2192	0,1308
DPD	7	0,8510	0,9599

### 5.3.4. Závislost délky celkového přežití (OS) na expresi genů TS, TP a DPD

Hodnotili jsme závislost hladiny exprese genů TS, TP a DPD na celkovém přežití (OS). Sledovali jsme 7 leté období. Při statistickém hodnocení vlivu exprese genů TS, TP a DPD nebyla prokázána statisticky signifikantní korelece mezi expresí těchto genu celkovým přežitím, tabulka 20.

Tabulka 20: Závislost délky celkového přežití (OS) na hladině exprese daného genu.

mRNA	OS interval (roky)	p-Wilcoxon test	p-Log-rank test
TS	7	0,9065	0,5785
TP	7	0,1010	0,0803
DPD	7	0,4087	0,3251

### 5.3.5. Vzájemná závislost exprese TS, TP a DPD

V tabulce 21 jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese TS v.s. DPD, TP v.s. DPD a TP v.s. TS.

Tyto korelace jsme hodnotili u maligní nádorové tkáně. Vzájemná hraničně signifikantní, u maligní tkáně, byla korelace mezi expresí mRNA TS a mRNA DPD ( $p < 0.057$ ). Další vzájemné korelace byly statisticky nevýznamné.

Tabulka 21: Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese TS, TP a DPD u maligní tkáně kolonu a rekta.

nádorová tkáň	Spearmanův korelační koeficient	p - value
TS X DPD	0.5000	0.0577
TP X DPD	-0.1447	0.6709
TP X TS	0.0561	0.7723

## 6. Diskuse

### 6.1. Sledování exprese genů metodou kvantitativní RT PCR

Incidence a mortalita na kolorektální karcinom je v České republice jedna z nejvyšších na světě. Jeden z důvodů, proč více než 50% kolorektálních karcinomů je diagnostikováno v pokročilém stádiu (stage III a IV) je jejich pozdní diagnostika [60]. Tato situace odpovídá zastoupení pacientů v našich skupinách. III. a IV. stádium je zastoupeno 58% tkáňových vzorků od pacientů s kolorektálním karcinomem (22 z 38 pacientů).

Kromě prevence, snaha o snížení incidence a mortality na kolorektální karcinom, předpokládá hlubší pochopením etiopatogenoze tohoto onemocnění. Na jeho podkladě vývoj diagnostických vyšetření, která by včasnou diagnózou a zpřesněním prognózy, tento stav pomohla zvrátit. Jedním z takových vyšetření by mohlo být určení exprese genů, jejichž produkty se podílejí na nádorovém růstu a genů účastnících se metabolismu pyrimidinů. Takovými geny jsou také matrixové metaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory (TIMPs) [61] a dále se jedná o geny účastnící se katabolismu fluorovaných pyrimidinů TS, TP a DPD [37].

Stanovení MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 jako proteinů v séru a tkáni nebo jako mRNA ve tkáni a lymfatických uzlinách a jejich korelace se stádiem choroby, byla publikována v řadě prací, výsledky však nejsou jednoznačné [62, 63, 64, 65, 66, 67]. My jsme použili pro stanovení exprese genů a její porovnání u nádorové a normální tkáně kolonu a rekta a korelaci s klinickým stavem onemocnění, detekci specifické mRNA. Tu jsme stanovovali nejcitlivější metodou - kvantitativní RT PCR.



## 6.2. Expresse MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT29, SW480 a SW620

Pro stanovení exprese u nádorových linií HT29, SW480 a SW620 jsme se rozhodli ze dvou důvodů. Na základě literárních údajů jsme expresi matrixových metaloproteináz a jejich inhibitorů buňkami nádorových liniích kolorektálního karcinomu předpokládali [68]. RNA izolovanou z těchto linií jsme proto použili jako zdroj mRNA genů MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2. Tím jsme získali amplikony těchto genů, které jsme použili pro vytvoření standard genů MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2. Standardy jsou nutné pro kvantitativní stanovení exprese (kvantitativní PCR).

Dále jsme chtěli zjistit, které z těchto genů a v jakém množství jsou u jednotlivých linií exprimovány. Stejně jako Hewitt et al. jsme detekovali expresi TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií SW480 a SW620 [69]. Hewitt et al. detekoval zvýšenou hladinu TIMP-1 a sníženou hladinu TIMP-2 u linie SW620 oproti linii SW480, stanovení však provedl z kultivačního média. Takovéto rozdíly exprese jsme nezaznamenali (úroveň několika řádů). Autoři také uvádějí, že tyto výsledky nekorelují se stanovením, které provedli z buněčných lysátů. To ukazuje, že nelze zaměňovat a zcela srovnávat exprese metaloproteináz a jejich inhibitorů na úrovni nitrobuněčných hladin a hladin produkovaných extracelulárně. Dále jsme detekovali vysokou hladinu exprese MMP-7 u linie HT-29. Expresse je o 2-3 řády vyšší než u linií SW480 a SW620.

Vzhledem k tomu, že linie HT-29 je nádorovou linií grade 2, SW480 a SW620 grade 4, lze usuzovat, že exprese MMP-7 se uplatňuje v časnějších stádiích kancerogeneze. Tento závěr uvádí ve své práci také Kawabata et al. [70], který také detekoval vysoké hladiny MMP-7 u linie HT-29 oproti jiným liniím.

Kawabata et al detekovali u linie HT-29 nízkou hladinu exprese MMP-2, my jsme ji však nezaznamenali. Expresi mRNA MMP-2 jsme však detekovali u linií SW480 a SW620. Byla však na té nejnižší možné úrovni (0,0000016; 0,0000002). Mc Donnell et al. ji u linií SW480 a SW620 nezaznamenali [68]. Pro detekci použili metody Western blot a zymografyi, detekovali tudíž protein.

Stanovení exprese mRNA u linií HT-29, SW480 a SW620 jsme vyhodnotili jak relativně (stanovovaný gen/GAPDH), tak absolutně (počet kopií cDNA/ 1 buňka). Máme tak možnost porovnat, jestli se tato hodnocení liší. Poměry mezi expresí mRNA jednotlivých genů a mezi jednotlivými nádorovými liniemi zůstávají přibližně

zachovány. Můžeme říci, že stanovení exprese absolutně a relativně je u nádorových linií ekvivalentní.

### **6.3. Exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu**

#### **6.3.1. Porovnání exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 v kolorektální tkáni**

Zjistili jsme, že hladiny exprese specifické mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 jsou signifikantně vyšší v kolorektální nádorové maligní tkáni, než v normální kolorektální tkáni. Pozorování zvýšené exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-1 je v souladu s výsledky Murashige et al. a Collins et al., kteří popsali zvýšenou expresi mRNA MMP-2 u kolorektální nádorové tkáně a korelaci s Dukes' Stages [31,71]. Baker et al. a Murashige et al. popsali, že hladina mRNA TIMP-1, MMP-2 a MMP-9 byla statisticky signifikantně vyšší u primární nádorové kolorektální tkáně než u její přilehlé normální tkáně [30, 31]. Naproti tomu Tutton et al. nezjistili statisticky signifikantní změny v expresi mRNA MMP-2 mezi normální tkání a nádorovou v jakémkoliv stádiu onemocnění, tento výsledek je však ojedinělý [32]. Zaznamenali jsme statisticky signifikantní zvýšení hladiny exprese mRNA MMP-7 u kolorektální maligní tkáně oproti normální tkáni, podobně Brabletz et al. zaznamenali, že MMP-7 je overexprimována u 80% lidských kolorektálních nádorů [72]. Roeb et al. také detekovali zvýšenou expresi mRNA MMP-7 v kolorektální nádorové tkáni [66].

Baker et al. pozorovali zvýšení hladiny exprese mRNA TIMP-2 u normální kolorektální tkáně oproti nádorové [30]. My jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2 mezi kolorektální nádorovou maligní a nemaligní tkání. Ale při porovnání kolorektální nádorové maligní tkáně a normální kolorektální tkáně, jsme naopak zjistili zvýšenou expresi TIMP-2 u nádorové tkáně. Také Moran et al. zaznamenal signifikantně nižší hladinu mRNA TIMP-2 u nádorových vzorků [63].

Pomocí vhodných protilátek by mohlo být možné aktivitu matrixových metaloproteináz inhibovat, což by mohlo mít na nádorovou tkáň a její okolí léčebný efekt. Klinicky se již některé preparáty testují (Bay 12-9566 /fa Bayer/, BB94 /fa British Biotechnologi/).

### 6.3.2. Korelace exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-1 a TIMP-2 s klinickým stavem onemocnění

Dále jsme porovnávali hladinu exprese mRNA nebo přítomnost mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 s klinickým stavem nádorového onemocnění.

Zjistili jsme, že vyššímu stádiu onemocnění odpovídá vyšší hodnota mediánu poměru MMP-2/TIMP-2 (median stádium II: 0.29, stádium III: 0.69, stádium IV: 2.71). Collins et al. popsali, že poměr MMP-2/TIMP-2 byl vyšší u nádorové kolorektální tkáně, než u normální tkáně [71]. Ornstein pozoroval, že poměr TIMP-2/MMP-2 byl dvakrát menší a poměr TIMP-2/MMP-1 byl 1.5-krát menší u nádorové tkáně ve srovnání s normální mukózou. Na základě těchto výsledků se lze domnívat, že rovnováha mezi aktivací a inhibicí MMP-2 je u nádorů tlustého střeva zvýšená směrem k aktivaci MMP-2 [73, 74].

Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV. Také jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi pacienty s lokalizací nádoru v tlustém střevě a mezi lokalizací nádoru v rektosigmoidálním spojení a rektu. Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a jejím vztahu k výskytu distálních metastáz (nehledě na lokalizaci) během 5-ti letého follow-up pacientů s chirurgicky resekevaným kolorektálním karcinomem.

Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní vliv v přítomnosti exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 na délku bezpříznakového období (DFI). Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní vliv v přítomnosti exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 na délku celkového přežití (OS). Podobné statistické hodnocení exprese publikoval Heslin et al., kteří nezaznamenali korelaci mezi velikostí nádorového postižení nebo AJCC stádiem u karcinomů a expresí mRNA MMP-2, MMP-7 a MMP-9, kterou stanovili qRT-PCR [75]. Také jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl mezi expresí mRNA MMP-7 v rectu a tlustém střevě. Tyto výsledky se shodují s výsledky Tutton et al., kteří nezaznamenali signifikantní změny v expresi mRNA MMP-2 mezi normální tkání a kolorektální v jakémkoli stádiu onemocnění [32]. Tyto výsledky jsou však v protikladu s výsledky jiných laboratoří. Sis et al. publikoval, že exprese MMP-2 koreluje s postižením lymfatických uzlin a stádiem onemocnění, ale nenašel statisticky signifikantní vztah mezi expresí MMP-2 a celkovým přežitím [76]. Jung et al. publikoval, že upregulace TIMP-2 pozitivně koreluje s invazivitou do přilehlých lymfatických uzlin a zvýšená exprese TIMP-2

koreluje s postižením lymfatických uzlin v submukoze [77]. Použil však imunohistochemickou metodu detekce. Použitím imunohistochemického stanovení, Joo et al. zjistil, že silná reaktivita TIMP-1 ve stromálních buňkách koreluje s vyšším stádiem a přítomností metastáz v lymfatických uzlinách [78]. Moran et al. našli statisticky významnou asociaci mezi nízkou hladinou TIMP-1 a špatnou prognózou pacientů [79].

Domníváme se, že skutečnost, že jsme nezaznamenali statisticky významné korelace exprese mRNA MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 mRNA se stadii onemocnění CRC může souviset se s celkovým přístupem ke kvantifikaci exprese genů. Z té vyplývá, že exprese proteáz se stanovuje z jednotkového množství tkáně (100mg) a pro růst a invazivitu celého tumoru může být důležité celkové množství exprimovaných proteáz, které je dáno celkovou velikostí nádoru.

Dále je třeba vzít také v úvahu, že hlavní funkcí MMPs je sice přeměna ECM, ale jednotlivé MMPs mají různé, často protichůdné, funkce během angiogeneze. V současnosti se ukazuje, že MMP-2 a MMP-7 jsou schopny štěpit plazminogen, který ovlivňuje angiostatin. Ten specificky inhibuje proliferaci endotelových buněk. TIMPs jsou ve tkáních hlavními endogenními regulátory aktivity MMPs, ale TIMPs zastávají i další biologické funkce. TIMP-1 a TIMP-2 mají mitogenní aktivitu na řadu buněčných typů, zároveň overexprese těchto inhibitorů tlumí růst nádorových buněk. Tyto biologické aktivity jsou nezávislé na inhibiční aktivitě metaloproteináz. Z uvedeného vyplývá, že exprese těchto genů a jejich vztah ke klinicko-patologickým projevům je komplikovanější než jsme mysleli a je nutno provést další výzkum.

Výsledky ukazují, že stanovení mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7, TIMP-1 pro určení prognózy kolorektálního karcinomu je sporné. Abnormální exprese těchto genů však může poskytnout užitečný cíl pro novou chemoprevenci a adjuvantní protinádorovou terapii.

#### **6.4. Exprese TS, TP a DPD u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu**

Zaznamenali jsme hraničně významnou korelaci mezi expresí TS a DPD v nádorové tkáni. Pro terapeutický účinek fluoropyrimidinů se zdá být klíčová vzájemná korelace obou markerů. Při vysoké expresi TS a zároveň vysoké expresi DPD v nádorové tkáni je pravděpodobná neúčinnost léčby fluoropyrimidiny, protože je tento metabolit nejenom rychle syntetizován, ale také rychle odbouráván. Naopak nízká

exprese obou markerů predikuje senzitivitu k léčbě fluoropyrimidiny [80]. V námi sledovaném souboru jsme nezaznamenali rozdíl mezi expresí těchto markerů v kontrolní a nádorové tkáni, proto lze předpokládat citlivost k fluoropyrimidinům u většiny námi sledovaných pacientů. Tuto skutečnost ověříme v dalším experimentu.

V našem souboru oba výše uvedené markery nekorelovaly s expresí TP. Rozdíl v expresi TP mezi kontrolní a nádorovou tkání nebyl zaznamenán, stejně jako Zimovjanova at al., kteří nenašli signifikantní rozdíl v expresi TS, TP a DPD mezi nádorovou kolorektální tkání a přilehlou mukózou [37]. Dle jiných autorů však zvýšená exprese TP v nádorových buňkách je z terapeutického hlediska velmi důležitá. Predikuje totiž specifický účinek kapecitabinu, jehož meziprodukty se selektivně metabolizují přímo v nádorových buňkách. Proto expresi TP v nádorové tkáni považují za prediktivní faktor specifického účinku kapecitabinu v nádorové tkáni [81, 82].

Prokázání hraničně signifikantně zvýšené exprese TS u nádorů kolon ve srovnání s tumory rektosigmoidea a rekta může predikovat lepší účinek fluoropyrimidiny a raltitrexedu v této nádorové lokalizaci. Je známo, že vysoké hodnoty TS jsou negativním prediktivním faktorem rezistence nejen pro tyto léky. Toto zjištění je v souladu s klinickou praxí, kde je raltitrexed v monoterapii používán především u pokročilého karcinomu rekta [83].

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že stanovení TS a DPD by mohlo mít prediktivní význam pro odhad možné odpovědi na cílenou protinádorovou léčbu u kolorektálního karcinomu.

Dále jsme se v námi zkoumaném souboru zabývali možným prognostickým významem stanovení TS, TP a DPD ve vztahu k celkovému přežití pacientů (OS; 5 let) a bezpříznakovým obdobím (DFI; 5 let). V námi sledovaném souboru jsme vztah mezi expresí TS, TP, DPD a celkovým přežitím pacientů a bezpříznakovým obdobím nepotvrdili. V literatuře je popisována zvýšená exprese TS a DPD také jako nezávislý negativní prognostický faktor celkového přežití, bez závislosti na terapii [84]. Dále bylo publikováno několik prací, které potvrzují nejen expresi TP jako nezávislého prognostického faktoru u kolorektálního karcinomu, ale také pozitivní korelaci tohoto markeru se stadiem choroby, gradingem a mírou lymfatické a venózní invaze nádoru [85,86]. Význam zvýšené exprese TP pro prognózu hepatocelulárního karcinomu, karcinomu prsu a dalších nádorů je v odborné literatuře také uváděn [87,88,89].

## 7. ZÁVĚRY

Autor disertační práce:

1, Navrhl primery a optimalizoval podmínky provedení kvantitativní PCR pro stanovení exprese genů MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2.

2, Prokázal přítomnost exprese genů GAPDH, TIMP-1 a TIMP-2 u nádorových linií HT-29, SW480 a SW620. Zaznamenal vysokou hladinu exprese MMP-7 u linie HT-29. Exprese je o 2-3 řády vyšší než u linií SW480 a SW620. Expresi mRNA MMP-2 u linie HT-29 nezaznamenal. Expresi mRNA MMP-2 detekoval u linií SW480 a SW620.

3, Zjistil, že stanovení exprese absolutně a relativně je u nádorových linií ekvivalentní.

4, Prokázal signifikantně vyšší expresi mRNA MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2 v nádorové tkáni oproti normální tkáni. Lze využít při terapii.

10, Nezaznamenal korelaci přítomnosti exprese genů MMP-7, TIMP-1, MMP-2 a TIMP-2 s celkovým přežitím a DFI.

6, Prokázal, že vyšší stadium nádorového onemocnění odpovídá vyššímu mediánu hodnot poměru MMP-2/TIMP-2.

7, Nezaznamenal rozdíl mezi expresí genů TS, TP a DPD v kontrolní a nádorové tkáni.

8, Zaznamenal hraničně signifikantní zvýšení exprese TS u nádorů kolon ve srovnání s tumory rektosigmoidea a rekta. Toto zjištění lze využít při volbě terapie.

9, Zaznamenal hraničně signifikantní korelaci mezi expresí TS a DPD. Toto zjištění lze využít při volbě terapie.

10, Nezaznamenal korelaci hladiny exprese mRNA TS, TP a DPD s celkovým přežitím a DFI.

## 8. CITOVANÁ LITERATURA

1. Jablonska M, a kol.: Kolorektální karcinom, časná diagnóza a prevence. Praha, Grada, 2000.
2. Rejthar A, Vojtěšek B.: Obecná patologie nádorového růstu. Praha, Grada 2002.
3. Knudson AG Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Apr;68(4):820-3
4. Kaelin WG: Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 1999;21:950-958.
5. Fearon ER, Hamilton S, Vogelstein B: Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;238:193-197.
6. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton S, et al.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532.
7. Baker S, Fearon ER, Nigro J, et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221.
8. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342:705-608.
9. Takahashi T, Nau MM, Chibu I, et al.: p53, a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-494.
10. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-1238.
11. Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, et al.: Germ-line transmission of a mutated p53 gene in cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990;348:747-749.
12. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al.: Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994;54:1298-1304.
13. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Edis A, German P, et al.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987;328:614-616.
14. Jarvinen HJ, Peltomaki P: The complex genotype-phenotype relationship in familial adenomatous polyposis. *Eur J Gastroenterology & Hepatology* 2004; 16:5-8.
15. Human Genome Mutation Database: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>
16. Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al.: K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990;323:561-565.
17. Forrester K, C. Almoguera C, and K. Han K, et al.: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987;327:298-303.
18. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant K-ras genes. *Cell* 1988;53: 549-554.
19. Baker EA, Leaper DJ. Profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in intraperitoneal drainage fluid: relationship to wound healing. *Wound Repair Regen.* 2003 Jul-Aug;11(4):268-74.
20. Kugler A.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.* 1999 Mar-Apr;19(2C):1589-92.
21. Fingleton BM, Heppner Goss KJ, Crawford HC, Matrisian LM.: Matrilysin in early stage

- intestinal tumorigenesis. *APMIS* 1999; 107: 102-110
22. Stamenkovic I.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415-433.
  23. Curran S, Murray GI.: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*. 2000 Aug;36(13 Spec No):1621-30.
  24. Leeman MF, McKay JA, Murray GI.: Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Oct;55(10):758-62.
  25. Rooney PH, Murray GI, Stevenson DA, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL.: Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumours. *Br J Cancer*. 1999 May;80(5-6):862-73.
  26. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T.: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1033-8.
  27. Leeman MF, Curran S, Murray GI.: New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol*. 2003 Dec;201(4):528-34.
  28. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafdie S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284: 67-8.
  29. Sawicki G, Matsuzaki A, Janowska-Wieczorek A.: Expression of the active form of MMP-2 on the surface of leukemic cells accounts for their in vitro invasion. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998;124(5):245-52.
  30. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ.: Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg*. 2000 Sep;87(9): 1215-21.
  31. Murashige M, Miyahara M, Shiraishi N, Saito T, Kohno K, Kobayashi M.: Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 1996 Oct;26(5):303-9.
  32. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, et al.: Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2003 Nov 20;107(4):541-50.
  33. Nagase H, Woessner JF Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999. Jul 30;274(31):21491-4.
  34. Goldberg, G.I., Marmer, G. A. Grant, A. Z. Eisen, S. Wilhelm, and C. S. He.: Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989 86: 8207-8211.
  35. Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R.: Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int J Cancer*. 1995 Nov 27;63(5):680-7.
  36. Sobrero A, Guglielmi A, Grossi F, Puglisi F, Aschele C.: Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 2000, 27 (5 suppl. 10), 72 – 77.
  37. Zimovjanova M, Sykora V, Novotny J, Gatek J, Petruzalka L, Holubec L, Pecan L.: Comparative analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in colorectal cancer and surrounding normal



- tissue. *Neoplasma*. 2005;52(3):208-10.
38. De Vita VT., Vincent T., Hellman S., Rosenberg A: *Cancer of the Colon*. In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Lippincott - Raven Publishers 1997, pp. 1144-1182.
39. Klener P. *Chemoterapie*. In: *Klinická onkologie*. Galén, Praha 2002, pp.145-207.
40. van Kuilenburg A.B.P., Haasjes J., Richel D.J. et al.: Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: Identification of new mutations in DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 4705-4712.
41. Fernandez-Salguero P., Gonzales F.J., Kimura S. et al.: Correlation between catalytic activity and protein content for the polymorphically expressed dihydropyrimidine dehydrogenase in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1995, 50, 1015-1020.
42. Lu Z., Zhang R., Carpenter J.T. et al.: Decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in a population of patients with breast cancer: implication for 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1998, 4, 325-329.
43. Milano G., Etienne M.C., Barberi-Heyob M. et al.: dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency and fluorouracil (5FU)-related toxicity, *Proc. ASCO* 1998, Abst. 858.
44. Milano GT., McLeod H.L.: Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil based treatment? *Eur J Cancer* 2000, 36, 37-42.
45. Kinzler KW, Vogelstein B.: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70.
46. Vogelstein C, Laurue L, Thiery J.P.: Current data on the role of APC protein in the origin of colorectal cancer. *Bull. Cancer*, 84, 1997, s. 1053-60
47. Adam Z, a kol.: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, Praha, 2003.
48. 5th International Conference on Human Tumor Markers, Stockholm, Sweden, 1988.
49. Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *JExp Med* 1965;122:467-481.
50. Černá M.: *Expres vybraných genů u kolorektálního karcinomu a jaterních metastáz*. Disertační práce 2004. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta Plzeň, 2.interní klinika.
51. Katari RS, Femsten PD, Schlom J: Characterization of the shed form of the human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) from serous effusions of patients with different types of carcinomas. *Cancer Res* 1990;50:4885-4890.
52. Guadani F, Roselli M, Ferroni P, Spila A, Cavaliere F, Casaldi V, Wapner G, Abbolito MR, Greiner JW, et al.: CA 72-4 serum marker - a new tool in the management of carcinoma patients. *Cancer Invest* 1995; 13:227-238.
53. Bjorklund B: Tissue polypeptide antigen (TPA): Biology, biochemistry, improved assay methodology, clinical significance in cancer and other conditions, and future outlook. *Antibiot Chemother* WS;22:16-31.
54. Spyrtos F, Romain S, Rostaing-Puissant B, Daver A, Collona M, DeMartin PM, Bougnox P, Bolla M: Standardization and quality control in the evaluation of proliferation parameters in T1T2, NON1, MO breast cancer: multicentric retrospective study. DNA synthesis enzyme activities. *Bull Cancer (Paris)* 1999;86:678-684.
55. Broet P, Romain S, Daver A, Ricolleau G, Quillien V, Rallet A, Asselain B, Martin PM,

- Spyratos F.: Thymidine kinase as a proliferative marker: clinical relevance in 1,692 primary breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001;19:2778-87.
56. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M: Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:255-269.
57. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-193.
58. Bustin SA.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
59. Corbett research: Protocol for DNA Amplification Detection in Real-Time PCR Using Sybr-green I Intercalating Dye; 2001.
60. Holubec L. sen., Pecen L., Holubec L. jr.: Epidemiology of Colorectal Carcinoma. In *Colorectal Carcinoma: Current Possibilities of Diagnosis and Treatment.* Praha: Grada Publishing, 2004, 15-18.
61. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415-433.
62. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Dec 17;1705(2):69-89.
63. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M.: Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005 Jan;13(1):115-20.
64. Roeb E, Matern S.: Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med Klin (Munich).* 2003 Dec 15;98(12):763-70.
65. Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, Wobbles T, Hendriks T.: Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2002 Jun 17;86(12):1876-83.
66. Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern S.: Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis.* 2004 Nov;19(6):518-24. Epub 2004 Apr 22.
67. Zucker S, Vacirca J.: Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Jan-Jun;23(1-2):101-17.
68. Mc Donnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG.: Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 1999 Jun;17(4):341-9.
69. Hewitt RE, Brown KE, Corcoran M, Stetler-Stevenson WG.: Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) in a more tumorigenic colon cancer cell line. *J Pathol.* 2000 Dec;192(4):455-9.
70. Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H.: Nobiletin, a citrus flavonoid, down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005 Feb;69(2):307-14.
71. Collins HM, Morris TM, Watson SA.: Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer.* 2001 Jun 15;84(12):1664-70.

72. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T.: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 1999 Oct;155(4):1033-8.
73. Ornstein DL, Cohn KH.: Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is altered in colorectal tumors compared to normal colonic epithelium. *Dig Dis Sci.* 2002 Aug;47(8):1821-30.
74. Chan CC, Menges M, Orchowski HD, Orendain N, Pistorius G, et al.: A. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16:133-140.
75. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM.: Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg.* 2001 Jun;233(6):786-92.
76. Sis B, Sagol O, Kupelioglu A, Sokmen S, Terzi C, Fuzun M, Ozer E, Bishop P.: Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, cathepsin D, and tenascin-C expression in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2004;200(5):379-87.
77. Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, Im SA, Myung SJ, Jung HY, Yu CS, Kim JC, Hong WS, Kim JH, Min YI.: The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma *Korean J Gastroenterol.* 2005 Jun;45(6):401-8.
78. *Dig Dis Sci.* 2000 Jan;45(1):114-21. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. Joo YE, Seo KS, Kim HS, Rew JS, Park CS, Kim SJ.
79. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M.: Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005 Jan;13(1):115-20.
80. Grem L., Danenberg KB., Behan K.: Thymidine Kinase, Thymidylate Synthase, and Didydropyrimidine Dehydrogenase Profile of Cell Lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen. *Clinical Cancer Research.* 2001; 7: 999-1009.
81. Eliason JF, Megyeri A.: Potential for predicting toxicity and response of fluoropyrimidines in patients. *Curr Drug Targets.* 2004 May;5(4):383-8.
82. Nishida M. Pharmacological and clinical properties of Xeloda (Capecitabine), a new oral active derivative of fluoropyrimidine. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003 Dec;122(6):549-53.
83. Farrugia DC, Ford HE, Cunningham D, Danenberg KD, Danenberg PV, Brabender J, McVicar AD, Aherne GW, Hardcastle A, McCarthy K, Jackman AL.: Thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer predicts for response to raltitrexed. *Clin Cancer Res.* 2003 Feb;9(2):792-801.
84. Tebbutt NC, Cattell E, Midgley R, Cunningham D, Kerr D.: Systemic treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002 May;38(7):1000-15.
85. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Aug 21;88(16):1110-7.
86. Tokunaga Y, Hosogi H, Hoppou T, Nakagami M, Tokuka A, Ohsumi K.: Prognostic value of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in advanced colorectal cancer after surgery: evaluation with a new monoclonal antibody. *Surgery.* 2002 May;131(5):541-7.

87. Ezaki T, Ikegami T, Maeda T, Yamada T, Ishida T, Hashizume M, Maehara Y.: Prognostic value of thymidine phosphorylase activity in liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2005 Jun;10(3):171-6.
88. Tominaga T, Toi M, Ohashi Y, Abe O; on behalf of the 5'-BC Study Group. Prognostic and predictive value of thymidine phosphorylase activity in early-stage breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*. 2002 Apr;3(1):55-64.
89. Shimada H, Takeda A, Shiratori T, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Kobayashi S, Suzuki T, Ochiai T.: Prognostic significance of serum thymidine phosphorylase concentration in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2002 Apr 1;94(7):1947-54.
90. Ohnishi T, Tomita N, Monden T, Ohue M, Yana I, Takami K, Yamamoto H, Yagyu T, Kikkawa N, Shimano T, Monden M. A detailed analysis of the role of K-ras gene mutation in the progression of colorectal adenoma. *Br J Cancer*. 1997;75(3):341-7.
91. Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec LS, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R.: Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res*. 2005 Sep-Oct;25(5):3387-91.

## 9. PUBLIKACE AUTORA

### Publikace:

Pešta M., Holubec L., Černá M., Topolčan O., Fínek J., Holubec L. sen., Treska V., Svobodová Š., Svačina S., Matoušek M., Černý R. Expresse matrixových metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2, MMP-7) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 1 a 2 (TIMP-1, TIMP-2) u kolorektálního karcinomu měřená kvantitativní RT-PCR XXVIII. Edukační sborník článků, Brněnské onkologické dny, str. 76-78, 2004 ISBN 80-86793-01-X

Černá M., Holubec L., Pešta M., Topolčan O., Černý R. Expresse GAPDH, CEA, CK20 a VEGF v kolorektálního karcinomu, jaterních metastázách a plicním karcinomu měřená kvantitativní RT-PCR XXVIII. Edukační sborník článků, Brněnské onkologické dny, str. 73-76, 2004 ISBN 80-86793-01-X

Chottová Dvořáková M., Pešta M., Švíglerová J., Slavíková J., Kummer W. Experimentální diabetes mellitus a změny signálních systémů neuropeptidů v srdci laboratorního potkana. Plzeňský lék. Sborník 2005 ISBN

Pesta M., Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec LS, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R. Quantitative estimation of matrix metaloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metaloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. Anticancer Res. 2005 Sep-Oct;25(5):3387-91. IF

Holubec L Jr, Topolcan O, Finek J, Holdenrieder S, Stieber P, Pesta M., Pikner R, Holubec Sen L, Sutnar A, Liska V, Svobodova S, Visokai V, Kormunda S. Markers of cellular adhesion in diagnosis and therapy control of colorectal carcinoma. Anticancer Res. 2005 May-Jun;25(3A):1597-601. IF

Monika Cerna, Lubos Holubec JR, Martin Pesta, Stanislav Kormunda, Ondrej Topolčan and Radim Cerny. Quantitative Estimation of CEA and CK20 Expression in Tumour Tissue of Colorectal Cancor and its Liver Metastases with Reverse Transcription and Real-time PCR Anticancer Res. 2006 Vol. 26 (1). IF

Pesta M.<sup>a</sup>, Topolcan O.<sup>a,b</sup>, Holubec L.jr.<sup>b</sup>, Rupert K.<sup>c</sup>, Cerna M.<sup>a</sup>, Holubec L.sen., Treska V.<sup>c</sup>, Finek J.<sup>d</sup>, and Cerny R.<sup>c</sup>. Clinicopathological assessment quantitative estimation of MMP-2, MMP-7, TIMP-1 and TIMP-2 in Colorectal Carcinoma Tissue Samples Anticancer Research IF, přijato 2006

### Spoluautor kapitoly v knize:

Luboš Holubec, sen., a kolektiv: Kolorektální karcinom  
Laboratorní diagnostika kolorektálního karcinomu (L. Holubec, O. Topolčan, M. Pešta) Grada 2004 Praha, str. 65- 75, ISBN 80-247-0636-9

### Publikovaná abstrakta konferencí a sjezdů:

Martin Pešta<sup>1</sup>, Luboš Holubec Jr.<sup>2</sup>, Ondřej Topolčan<sup>2</sup>, and Radim Černý<sup>3</sup> EXPRESSION OF MATRIX METALOPROTEINASES (MMPs) AND THEIR TISSUE INHIBITORS (TIMP) IN COLORECTAL CARCINOMA Central Radioisotopic Laboratory<sup>1</sup>, 2<sup>nd</sup> Clinic of Medicine<sup>2</sup> and Department of Biochemistry<sup>3</sup> Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen , Czech Republic  
Biomarkers and environment, Vol. 5, No. 3,4 2002, Abstracts CECHTUMA 2003, 103

Pešta M., Holubec L. Jr., Topolčan O., Fišerová A., Černý R. Stanovení matrixových metaloproteináz 2 a 9 (MMP 2, MMP 9) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 2 (TIMP 2) ve tkáňových vzorcích kolorektálního karcinomu a v buňkách buněčné linie TH 29 metodou Real –Time RT PCR Poster: Sjezd Společnosti lékařské genetiky 2003

M. Pešta, L. Holubec Jr., O. Topolčan, M. Cerna and R. Cerny

MATRIX METALOPROTEINASES 2 (MMP 2) ASSESSMENT WITH COLORECTAL CARCINOMA PATIENTS Medical Faculty of Charles University, Plzen, and Faculty Hospital in Plzen, Czech Republic  
TumorBiology, Vol. 24, 1, 57, 2003  
Abstracts The XXXIst Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2003

M. Pešta, L. Holubec jr., O. Topolčan J. Fínek, K. Rupert, M. Černá and R. Černý  
CODON 12 K-RAS MUTATIONS IN TISSUE SAMPLES FROM PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER Charles University and Faculty Hospital, Pilsen, Czech Republic, CECHTUMA 2004, Praha

Pešta M., Holubec L. jr., Topolčan O., Fínek J., Rupert K., Černá M., Černý R.  
EXPRESSION OF mRNA OF MMP-2 AND MMP-7 AND THEIR TISSUE INHIBITORS TIMP-1 AND TIMP-2 IN COLORECTAL CARCINOMA PATIENTS  
Charles University and Faculty Hospital, Pilsen, Czech Republic, CECHTUMA 2004, Praha

PEŠTA, M.; HOLUBEC, L. jr.; TOPOLČAN, O.; RUPERT, K.; ČERNÁ, M.; LUBOŠ HOLUBEC, L. SEN.; TREŠKA, V.; FÍNEK, J.; ČERNÝ, R. Kvantitativní stanovení matrix metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2 a MMP-7) a jejich inhibitorů (TIMP-1 a TIMP-2) u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc 2005

Martin Pešta, Ondrej Topolčan, Lubos Holubec jr., Karel Rupert, Monika Cerna, Lubos Holubec sen., Vladislav Treska, Jindrich Finek and Radim Cerny  
Quantitative Estimation of Matrix Metaloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and Tissue Inhibitors of Matrix Metaloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in Colorectal Carcinoma Tissue Samples Hamburg Symposium on Tumor Markers, 2005

#### **Přednášky:**

Martin Pešta, Luboš Holubec Jr., Ondřej Topolčan, Monika Černá, Radim Černý  
Nádorové metaloproteinázy: exprese tkáňových MMPs u kolorektálního karcinomu  
Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen, Czech Republic  
Workshop: Proteázy a antiproteázy II., Plzeň 19.-26. September 2003

Pešta M., Holubec L., Topolčan O., Svobodova S., Finek J., Ludviková M., Holubec l.sen., Treska V., Svacina S., Cerna M. and Cerny R. Matrix Metaloproteinase 2 (MMP-2) and Tissue Inhibitor of Matrix Metaloproteinase 2 (TIMP-2) Assessment in Colorectal Carcinoma Patients using Real Time PCR  
Charles University - Medical Faculty and Faculty Hospital Pilsen, Czech Republic  
1<sup>st</sup> Medical Faculty, Charles University Prague  
Cancer Biology for the Clinician, Luxembourg, 14-15 November 2003

M. Pešta Expresse matrixových metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2, MMP-7) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 1 a 2 (TIMP-1, TIMP-2) u kolorektálního karcinomu měřená kvantitativní RT-PCR

(2. ročník kombinované formy DSP)

Školitelé: Prof. MUDr. O. Topolčan, CSc., Doc. MUDr. R. Černý, CSc.

II.interní klinika a CRL LF UK v Plzni 2004 SVK

Pešta, M. - Topolčan, O.- Holubec, L. Jr.,- Rupert, K.- Třeská, V.: Význam stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi, XXVI. Imunoanalytické dny, Poděbrady, 3.-5. 4. 2005

#### **Spoluautor přednášek:**

O. Mayer Jr, J. Filipovský, M. Pešta, M. Tichá, J. Kučerová: The association between arterial stiffness and of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in population sample 2nd Department of Internal Medicine, Charles University Pilsen, Czech Republic 2004

Chottová Dvořáková, M., Pešta M., Švíglerová, J., Slavíková, J., Kummer, W. Experimentální diabetes mellitus a změny signálních systémů neuropeptidů v srdci laboratorního potkana. Sborník abstrakt „Slavnostní vědecké konference Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni“, 16. (2005)

NOVOTNÝ, J.; TESAŘOVÁ, P.; PEŠTA, M.; HOLUBEC, L. Četnost Leydenské mutace, protrombinové mutace a mutace v MTHFR genu v populaci 470 pacientek s karcinomem prsu. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc 2005

NOVOTNÝ, J.; SÝKORA, V.; STRNAD, R.; PEŠTA, M.; TOMANCOVA, V.; ZIMOVJANOVA, M. Vliv 48 hodinové kontinuální infuze 5-fluorouracilu na expresi dihydropyrimid-indehydrogenázy and thymidinfosforylázy. (10', 3' diskuze) Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc 2005