

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko-Technologická

Zymografické stanovení matrixových kolagenáz
asociovaných s onemocněním srdce
Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Vrbatová**
Osobní číslo: **C22401**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Zymografické stanovení matrixových kolagenáz asociovaných s onemocněním srdce**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Seznamte se s literárními údaji o matrixových metaloproteinázách přednostně štěpících kolagen, o jejich vztahu ke kardiovaskulárním onemocněním a zaměřte se také na možnosti jejich stanovení.

Experimentální část:

Pokuste se modifikovat stávající zymografickou metodu určenou pro stanovení matrixových metaloproteináz přednostně štěpících želatinu tak, aby byla co možná nejvíce použitelná pro stanovení matrixových metaloproteináz přednostně štěpících kolageny.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Zymografické stanovení matrixových kolagenáz asociovaných s onemocněním srdce, jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích 21.4.2025

Bc. Lucie Vrbatová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Pavle Žákové PhD. za velkou trpělivost, podporu a odborné vedení při zpracování mé diplomové práce a také i za její čas, který mi v laboratoři věnovala.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu kolagenové zymografie a to tak, abychom mohli kvalitativně stanovit jaké matrixové metaloproteinázy se na gelu nacházejí. A připravit tak metodu pro další studium, kde už by bylo možné kvantitativní stanovení vzorků. Materiálem vzorku bylo krevní sérum. Ke stanovení jsme využili metodu SDS-PAGE elektroforézy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kolagenová zymografie, SDS-PAGE elektroforéza, kolagenázy, matrixová metaloproteináza-1, matrixová metaloproteináza-8, matrixová metaloproteináza-13

TITLE

Zymographic determination of matrix metalloproteinases associated with heart disease.

ANNOTATION

The aim of this diploma thesis was to optimize the collagen zymography method in order to qualitatively determine which matrix metalloproteinases are present on the gel. The goal was to prepare a method for further studies where quantitative determination of samples would be possible. The sample material was blood serum. We used the SDS-PAGE electrophoresis method for the determination

KEYWORDS

Collagen zymography, SDS-PAGE electrophoresis, collagenases, matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-8, matrix metalloproteinase-13

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	9
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 Matrixové metaloproteinázy	11
1.1.1 Historie spojená s matrixovými metaloproteinázami	11
1.1.2 Obecné informace o matrixových metaloproteinázách	11
1.1.3 Struktura Matrixových metaloproteináz	12
1.1.4 Kolagenázy	14
1.1.4.1 Struktura kolagenáz	14
1.1.4.2 Zástupci kolagenáz	15
1.1.4.2.1 Matrixová metaloproteináza 1	17
1.1.4.2.1.1 Ischemická mrtvice	19
1.1.4.2.2 Matrixová metaloproteináza 8	21
1.1.4.2.2.1 Onemocnění	22
1.1.4.2.2.2 Vliv MMP-8 na aterosklerózu	22
1.1.4.2.3 Matrixová metaloproteináza 13	23
1.1.4.2.4 Matrixová metaloproteináza 18	26
1.1.4.3 Role kolagenáz v onemocnění rakoviny	27
1.1.4.3.1 MMP-8	28
1.1.4.4 Vliv matrixových metaloproteináz na hojení ran	29
1.1.4.4.1 Interakce matrixových metaloproteináz při hojení diabetických ran	30
1.1.4.5 Analýza kolagenáz	30
1.1.4.5.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	30
1.1.4.5.2 Western blotting	31
1.1.4.5.3 SDS-PAGE elektroforéza	31
1.1.4.5.4 Kolagenová zymografie	32
2 PRAKTICKÁ ČÁST	34
2.1 Materiál a metoda	34
2.1.1 Použité přístroje a pomůcky	34
2.1.2 Použité chemikálie	36
2.1.3 Příprava potřebných roztoků	37
2.1.4 Příprava vzorků	39
2.1.5 Příprava aparatury pro výrobu gelů	40

2.1.6	Příprava dělicího gelu	40
2.1.7	Příprava zaostřovacího gelu.....	41
2.1.8	Příprava elektrodového pufru	42
2.1.9	Umístění vzorků a standardů na gel.....	42
2.1.10	Vlastní elektroforéza.....	43
2.1.11	Postup před inkubací gelu a vlastní inkubace	43
2.1.11.1	Barvení a odbarvování gelů	43
2.1.12	Skenování gelů.....	44
2.1.13	Focení gelů.....	44
3	DISKUZE, VÝSLEDKY.....	45
3.1	Dělicí gel	46
3.2	Zaostřovací gel	46
3.3	Inkubační roztok.....	47
3.4	Postup barvení a odbarvování gelu	48
3.5	Zbavení se nerozpustného kolagenu	50
3.6	Použití Tritonu X-100	52
3.7	Vzorkový pufr a vzorek	53
3.8	Zkušební postup kolagenové zymografie 1.....	54
3.9	Zkušební postup kolagenové zymografie 2.....	56
3.10	Dokumentace pomocí gelů.....	58
	ZÁVĚR	64
	POUŽITÁ LITERATURA.....	66
	PŘÍLOHY	73

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 – Schématické znázornění obecné struktury MMP	12
Obrázek 2 – Hlavní podtypy MMP a jejich struktura	13
Obrázek 3 – Struktura kolagenáz	14
Obrázek 4 – Krystalová struktura MMP-1	17
Obrázek 5 – Krystalová struktura MMP-8.....	21
Obrázek 6 – Krystalová struktura MMP-13	23
Obrázek 7 – Proces kolagenové zymografie	33
Obrázek 8 – Aparatura na přípravu gelů a elektroforézu	34
Obrázek 9 – Obrázek gelu, kde byl kolagen inkubován při teplotě 37°C po dobu 10 minut..50	
Obrázek 10 – Obrázek gelu, kde nebyl inkubován kolagen.....	51
Obrázek 11 – Obrázek gelu, kde byl kolagen inkubován při 40°C po dobu 5 minut.....	51
Obrázek 12 – 3. gel pod bodovým bílým světlem z pokusu kolagenové zymografie č.2.....	60
Obrázek 13 – Výstřižek gelu pod bodovým bílým světlem z pokusu kolagenové zymografie č.1.....	60
Obrázek 14 – Gel pod bodovým bílým světlem z pokusu kolagenové zymografie č.1	61
Obrázek 15 – Gel pod modrým světlem, z pokusu kolagenové zymografie č.1	61
Obrázek 16 – Gel pod modrým světlem, z pokusu kolagenové zymografie č.2.....	62
Obrázek 17 – Gel pod bodovým bílým světlem se clonou, z pokusu kolagenové zymografie č. 2.....	63
Obrázek 18 – kolagenový zymogram.....	62
Tabulka 1 – Hlavní kolagenázy (MMP-1, MMP-8 a MMP-13): název, substráty a hlavní onemocnění, na kterých se podílejí.....	16
Tabulka 2 – Použité chemikálie.....	36
Tabulka 3 – Reagencie pro přípravu 4 dělicích gelů	41
Tabulka 4 – Reagencie na přípravu 2 zaostřovacích gelů	42
Tabulka 5 – Postupy přípravy zaostřovacích gelů.....	47
Tabulka 6 – Postupy na přípravu inkubačních roztoků	47
Tabulka 7 – Postupy přípravy barvicího a odbarvovacího roztoku.....	48

Tabulka 8 – Optimalizovaný postup odbarvování.....	49
Tabulka 9 – optimalizovaný postup barvení.....	49
Tabulka 10 – Hodnoty MMP-8 a MMP-9 v séru a plazmě	54
Tabulka 11 – Umístění, poměry, inkubace pipetovaných vzorků kardiaka a dobrovolného dárce na gelu.....	54
Tabulka 12 – Postup odbarvování, barvení a odbarvování gelů.....	55
Tabulka 13 – Umístění, poměry, inkubace pipetovaných vzorků kardiaka a dobrovolného dárce na gelu	56
Tabulka 14 – Postup odbarvování, barvení a odbarvování gelů.....	57
Tabulka 15 – Molekulové hmotnosti jednotlivých kolagenáz.....	63

SEZNAM ZKRATEK

CVD – cévní mozková onemocnění

DM – diabetes mellitus

DD – dobrovolný dárce krve

ECM – extracelulární matrix

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HDL – lipoprotein s vysokou hustotou

IFN- β – interferon β

IL-1 – interleukin 1

MD – molekulární dynamika

MMP – matrixové metaloproteinázy

MMP-1 - Matrixová metaloproteináza 1

MMP-13 - Matrixová metaloproteináza 13

MMP-8 - Matrixová metaloproteináza 8

PCR – polymerázová řetězcová reakce

PLGA – poly(mléčná-ko-glykolová kyselina)

PVA – poly(vinylalkohol)

SMC – S-methylcystein

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

TIMP – tkáňový inhibitor metaloproteináz

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α

VCAM-1 – vaskulární adhezní buňka 1

APS – persíran amonný

SDS – dodecyl síran sodný

TEMED – N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin

Tris-Base – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

ÚVOD

Matrixové metaloproteinázy jsou enzymy, které tvoří rozsáhlou rodinu endopeptidáz závislých na zinku. Jejich klíčovou funkcí je remodelace extracelulární matrix. Remodelace je potřebná pro řadu fyziologických procesů. Těmito procesy je např. embryogeneze, angiogeneze, hojení ran nebo imunitní odpověď. Zvláštní postavení v rodině matrixových metaloproteináz mají kolagenázy (kolagenázy-1, kolagenáza-2, kolagenáza-3), které jsou jedinečné svou schopností štěpit fibriální kolageny typu I, II a III, ty jsou hlavními strukturálními komponentami extracelulární matrix.

Správná regulace aktivity kolagenáz je nezbytná pro homeostázu tkání, zatímco její porucha je spojována s vývojem mnoha onemocnění, mezi něž patří zánětlivé stavy, artritida, onemocnění srdce a v první řadě nádorová progresse. Nadměrná aktivita a exprese těchto enzymů přispívá k degradaci bazální membrány a okolní extracelulární matrix, díky čemu je usnadněná invaze nádorových buněk do okolních tkání a jejich migrace s tvorbou metastáz, jedná se o klíčové kroky v progresi rakoviny. V onkologickém výzkumu se intenzivně zkoumají kolagenázy a mechanismy jejich regulace. Kolagenázy také hrají komplexní a často protichůdné role v různých aspektech onemocnění srdce. Jejich aktivita ovlivňuje remodelaci extracelulární matrix, zánět, angiogenezi a stabilitu aterosklerotických plátů.

Praktická část diplomové práce je zaměřena na stanovení kolagenáz pomocí metody kolagenové zymografie. Jedná se o elektroforetickou metodu umožňující semikvantitativní analýzu aktivních forem kolagenáz v biologických vzorcích a to na základě jejich schopnosti degradovat nativní kolagen inkorporovaný do polyakrylamidového gelu.

Cílem praktické práce bylo vyladit a vylepšit jednotlivé kroky postupu kolagenové zymografie tak, aby byla použitelná pro lidské sérum či plazmu. A to přípravu zaostřovacího a dělicího gelu, zpracování vzorků, optimalizaci složení pufrových roztoků, nastavení podmínek inkubace pro enzymatickou reakci a následné techniky barvení a odbarvování gelů. Naším záměrem bylo, aby výsledné gely jasně a zřetelně vizualizovaly přítomnost kolagenáz prostřednictvím charakteristických projasnění v gelové matici indikujících degradaci kolagenu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Matrixové metaloproteinázy

1.1.1 Historie spojená s matrixovými metaloproteinázami

Matrixové metaloproteinázy (MMP) byly poprvé popsány již v roce 1949, v období, kdy byly objeveny depolymerizující enzymy podílející se na růstu nádoru, vytváření stromatu a pojivové tkáně, včetně malých krevních cév, které jsou tekutější (1). Výzkum rodiny MMP, tak jak je známe dnes, začal v roce 1962 Woesnnerem, dále v jeho práci pokračovali Gros a Lapier. Tito dva muži objevili a charakterizovali enzym s kolagenolytickou aktivitou v tkáních obojživelníků (konkrétně charakterizovali kolagenázu jako enzym zodpovědný za resorpci ocasu pulce) (2,3). Teprve v roce 1980 navrhl Haris a spol. použití názvu MMP pro skupinu kolagenáz/želatináz. Za posledních 60 let byl viděn pozoruhodný pokrok ve studii biologických funkcí MMP a jejich zapojení do řady biologických procesů, jakými je například remodelace a oprava tkání, buněčná diferenciace, embryogeneze, morfogeneze, buněčná proliferace, apoptóza, hojení a reprodukce. Bylo prokázáno, že MMP jsou přítomny ve virech, archeobakteriích, rostlinách, hlístech a zvířatech (4).

1.1.2 Obecné informace o matrixových metaloproteinázách

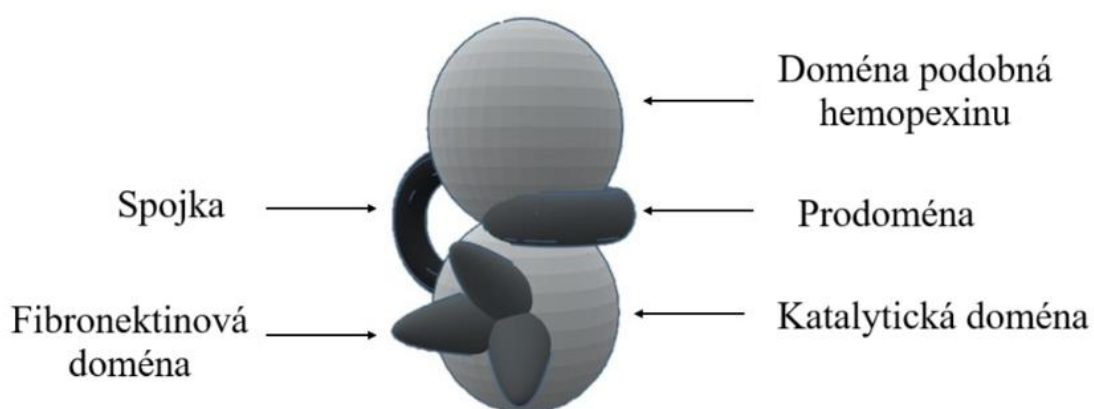
Matrixové metaloproteinázy jsou enzymy štěpící bílkoviny v extracelulární matrix (ECM). Jak již bylo uvedeno, jejich funkce je klíčová pro různé biologické procesy, jako je hojení ran, vývoj tkání a angiogeneze. Nicméně, jejich nadměrná aktivita je spojována s řadou patologických stavů, včetně rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění a zánětů. MMP jsou produkovány různými typy buněk a jejich aktivita je regulována jak na úrovni exprese, tak prostřednictvím specifických inhibitorů. Nerovnováha mezi MMP a jejich inhibitory může vést k poruchám remodelace tkání a přispívat k rozvoji různých onemocnění (5).

1.1.3 Struktura Matrixových metaloproteináz

První známou strukturu komplexu MMP-inhibitor popsal Lovejov se svými spolupracovníky. Tato struktura odhalila, že aktivním místem MMP je hluboká dutina. Navíc bylo zjištěno, že katalytické domény různých MMP vykazují značnou sekvenční podobnost, která se pohybuje od 33% (mezi MMP-21 a MMP-23) až po 86% (mezi MMP-3 a MMP-10). Následně byly popsány trojrozměrné struktury katalytických domén enzymů MMP-1 a MMP-8, a také struktury pro-MMP-3 a MMP-1 (3).

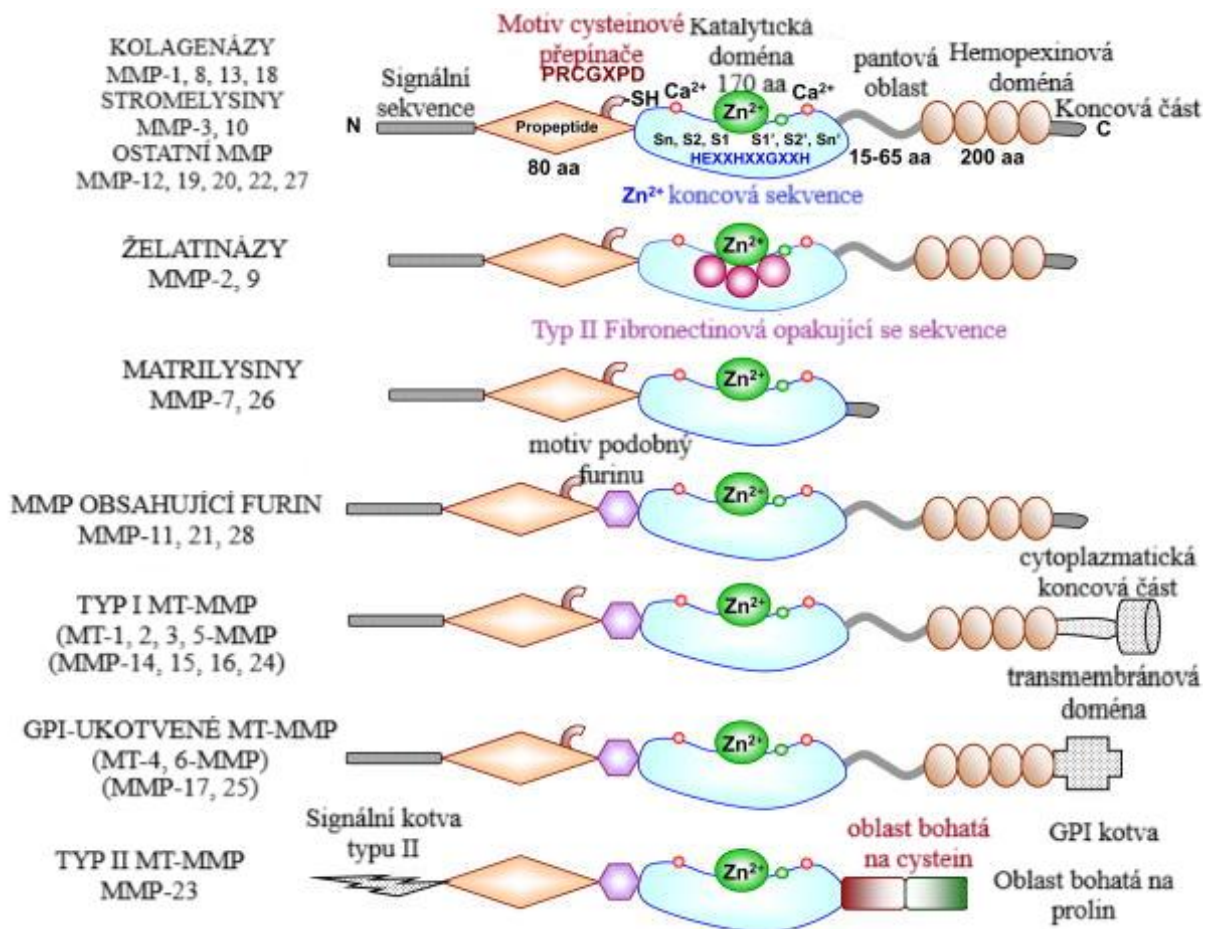
Mezi nejběžnější strukturální rysy MMP patří (3):

- Signální N-koncový peptid s proměnou délkou.
- Prodoména, které udržuje MMP v neaktivním stavu a je odstraněna v případě aktivace proteolytického enzymu.
- Katalytická doména s iontem Zn^{2+} , skládá se z pěti β -listů, tří α -helixů a tří vápenatých iontů. V katalytické doméně želatináz je obsažena fibronektinová sekvence, kterou se odlišují od ostatních MMP.
- „Linker“ proměnné délky „pantová oblast“ spojuje katalytickou doménu s hemopexinovou doménou.
- Hemopexinová doména se vyznačuje čtyřmi β -„vrtulemi“.
- Další transmembránová doména s malou cytoplazmatickou C-terminální doménou. Nachází se pouze v MMP-14, -15, -16, -24.



Obrázek 1 – Schématické znázornění obecné struktury MMP upraveno dle (3)

Matrixové metaloproteinázy patří do rodiny endopeptidáz nebo matrixinů, které patří do superrodiny proteáz metzincinů. MMP jsou vysoce homologní, multidoménové metaloproteinázy obsahující zinek (Zn^{2+}), které degradují různé proteinové složky ECM. Rodina MMP sdílí společnou základní strukturu. Struktura MMP, rozdělena podle rodin, je viditelná na obrázku č.2 (5).



Obrázek 2 – Hlavní podtypy MMP a jejich struktura, upraveno dle (5)

Propeptid obsahuje specifický motiv PRCGXPD, kde cysteinová skupina (-SH) váže iont zinku (Zn^{2+}), čímž MMP udržuje v neaktivním stavu (proMMP). Katalytická doména má vazebný motiv pro zinek (HEXXHXXGXXH), obsahuje dva ionty zinku, specifické vazebné kapsy (S1, S2, ... Sn a S1', S2', ... Sn'), které určují specificitu, a dva nebo tři ionty vápníku (Ca^{2+}), které stabilizují strukturu. Některé MMP se od tohoto obecného schématu odlišují (5).

1.1.4 Kolagenázy

Kolagenázy, jako jsou matrixová metaloproteináza 1 (MMP-1), matrixová metaloproteináza 8 (MMP-8), matrixová metaloproteináza 13 (MMP-13) a matrixová metaloproteináza 18 MMP-18, štěpí fibrilární kolagen typu I, II a III na specifické fragmenty. Tento proces zahrnuje rozvinutí trojitě helixové struktury kolagenu a následnou hydrolyzu peptidových vazeb. Domény hemopexinu jsou klíčové pro štěpení nativního kolagenu, zatímco katalytické domény štěpí nekolagenové substráty. Struktura kolagenáz je detailněji viditelná ve výstřižku z obrázku č.1 (6).

1.1.4.1 Struktura kolagenáz



Obrázek 3 – Struktura kolagenáz, upraveno dle (5)

Kolagenáza se skládá z propeptidu, katalytické metaloproteinázové domény, spojovacího peptidu (pantová oblast) a hemopexinové domény. Propeptid má cysteinový přepínač PRCGXPD, jehož cysteinová sulfhydrylová (–SH) skupina chelatuje aktivní místo Zn²⁺, čímž udržuje MMP v latentní formě zymogenu proMMP. Katalytická doména obsahuje vazebný motiv Zn²⁺ HEXXHXXGXXH, dva ionty Zn²⁺, specifické kapsy S1, S2, …Sn a S1', S2', …Sn', které udělují specifitu, a dva nebo tři Ca²⁺ ionty pro stabilizaci (5).

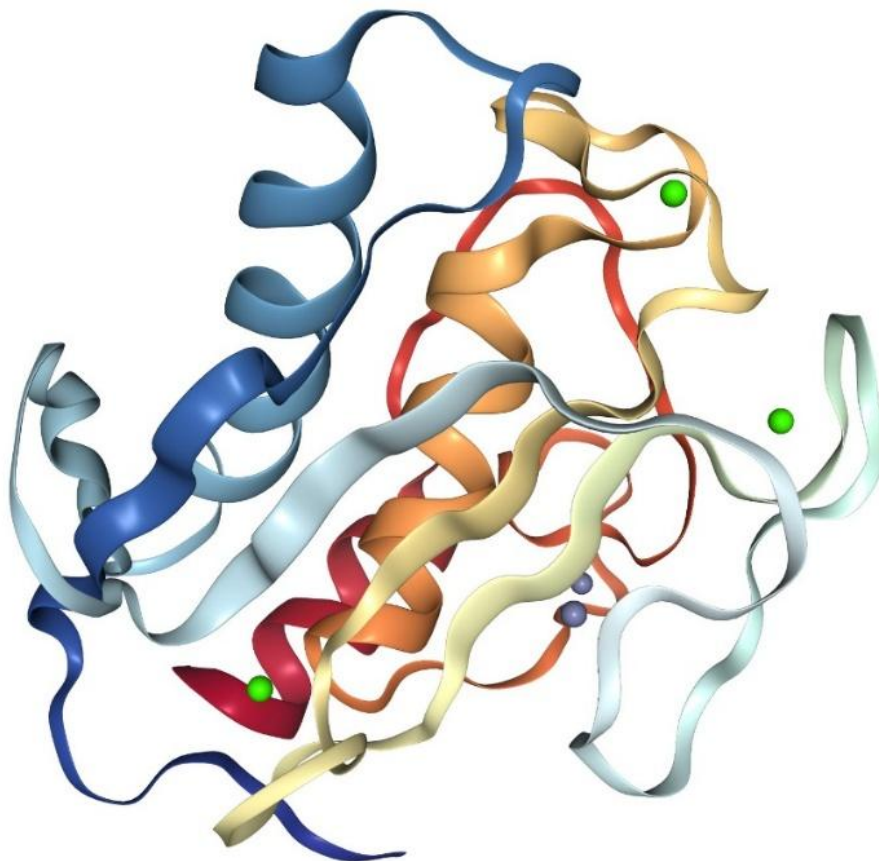
1.1.4.2 Zástupci kolagenáz

MMP představují klíčové enzymy, které se účastní přestavby a úpravy extracelulární hmoty. Kromě této funkce mohou MMP působit i uvnitř buněk a mají schopnost aktivovat růstové faktory, které se nacházejí v jejich okolí, dále pak buněčné povrchové receptory a adhezní molekuly (7). Klasifikace těchto enzymů probíhá podle toho, jaké substráty preferenčně štěpí. Přestože jejich aminokyselinová sekvence vykazuje značnou podobnost, liší se v tom, které konkrétní proteiny extracelulární matrix dokáží rozkládat (8). Klasifikace hlavních kolagenáz je vidět v tabulce č.1.

Tabulka 1 – Hlavní kolagenázy (MMP-1, MMP-8 a MMP-13): název, substráty a hlavní onemocnění, na kterých se podílejí

Typ MMP	Název	Substrát	Výroba	Fyziologická funkce	Přidružené nemoci	Zdroje
MMP-1	Kolagenáza 1 / intersticiální kolagenáza/fibroblastová kolagenáza	Kolagen I, II, III, VII, VIII, X, XI, želatina, fibronectin, aggrecan, entactin, tenascin, ovostatin, kasein	Fibroblasty, keratinocyty, endoteliální buňky, makrofágy, osteoblasty, chondrocyty, krevní destičky	Hojení ran, reepitelizace, buněčná proliferace, migrace keratinocytů	Hojení ran, reepitelizace, buněčná proliferace, migrace keratinocytů	(9)
MMP-8	Kolagenáza 2/ kolagenáza neutrofilů	Kolagen I, II, III, fibronectin, aggrecan, ovostatin	Chondrocyty, endoteliální buňka, makrofágy, buňka hladkého svalstva	Obměna parodontální tkáně, protizánětlivá aktivita, hojení ran	Parodontitida, revmatoidní artritida, astma, rakovina	(10)
MMP-13	Kolagenáza 3	Kolagen I, II, III, IV, IX, X, XIV, fibronectin, laminin, želatina, aggrecan, plazminogen, osteonektin	Epiteliální buňka, neuronová buňka, pojivová tkáň (chrupavka a kost)	Osteoklastická aktivace, protizánětlivá aktivita	Parodontitida, osteoartritida, jaterní fibróza, rakovina	(10, 11)
MMP-18	Kolagenáza 4	Kolagen a želatina	Orgány: mléčná žláza, placenta, plíce, slinivka, vaječník, střevo, slezina, brzlík, prostata, tlusté střevo a srdce	Hojení ran	MMP-18 nebyla přímo spojena se specifickým patologickým stavem.	(3)

1.1.4.2.1 Matrixová metaloproteináza 1



Obrázek 4 – Krystalová struktura MMP-1 převzato z (12)

Matrixová metaloproteináza-1 (MMP-1), známá také jako kolagenáza-1 nebo intersticiální kolagenáza, je kódována genem nacházejícím se na chromozomu 11, konkrétně v oblasti q22.3. Tento enzym rozkládá kolagen a želatinu a také aktivuje proMMP-9 jeho přeměnou na aktivní formu. Za normálních fyziologických podmínek je hladina MMP-1 v buňkách velmi nízká, avšak během zánětlivých procesů a autoimunitních onemocnění dochází k jejímu výraznému nárůstu (13). Pomalu se hojící rány a žilní vředy vykazují zvýšené aktivity a koncentrace MMP-1, -8 a -9, přičemž hladiny tkáňového inhibitoru metaloproteázy (TIMP) zůstávají relativně nízké (14).

Zánětlivé cytokiny, jako tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α) a interleukin-1 (IL-1), zesilují expresi MMP-1. V kultivovaných fibroblastech lidských hlasivek TNF- α omezuje buněčnou proliferaci, snižuje hladiny TIMP-3 a mRNA pro kolagen III a fibronectin, přičemž zvyšuje expresi MMP-1 a -2. Tento posun k vyššímu poměru MMP/TIMP-3 může přispět k urychlení procesu hojení ran po poranění hlasivek (15).

MMP-1 může být zapojena do oběhových poruch a zánětlivých procesů spojených s náhlou ztrátou sluchu. Příkladem je studie u korejské populace, kde byl jednonukleotidový polymorfismus (SNP) MMP-1 v promotorové oblasti -1607G/2G identifikován jako faktor, který zvyšuje riziko náhlé hluchoty ve srovnání s genotypy G/2G a G/G (16).

Lokální kontrolované uvolňování antifibrotických látek může předejít vzniku tkáňové fibrózy v okolí biomedicínských implantátů, jako jsou prsní implantáty nebo vaskulární stenty. Ve fibrotickém modelu králičího ucha stratifin aplikovaný přímo na tkáň zabraňuje tvorbě dermální fibrózy a podporuje přirozenou regeneraci tím, že reguluje ukládání ECM. Výzkumy zkoumaly antifibrotický efekt stratifinu s kontrolovaným uvolňováním při prevenci fibrózy způsobené dermálními implantáty s hydrogelovými mikrosférami z poly(mléčné-ko-glykolové kyseliny) (PLGA) a poly(vinylalkoholu) (PVA). Uvolňování stratifinu z těchto mikrosférických PLGA/PVA implantátů vedlo ke zvýšení exprese MMP-1 v okolní tkáni, snížilo ukládání kolagenu, zmírnilo dermální fibrózu a zánět, což se projevilo menší celularitou tkáně a sníženým počtem CD3(+) imunitních buněk. Tyto PLGA/PVA kompozity uvolňující stratifin by mohly být využity jako povlaky pro redukci fibrózy v okolí biomedicínských implantátů, včetně prsních implantátů nebo vaskulárních stentů (17).

Kyselina kynurenová, která je konečným produktem kynureninu, vykazuje antifibrotické vlastnosti a neprochází hematoencefalickou bariérou, což minimalizuje riziko centrálních vedlejších účinků. Výzkumy ukázaly, že nemá negativní vliv na životaschopnost dermálních buněk a výrazně podporuje expresi MMP-1 a -3, přičemž současně potlačuje produkci kolagenu typu I a fibronectinu fibroblasty. Tyto vlastnosti naznačují, že kyselina kynurenová by mohla být efektivním antifibrotickým prostředkem, který by zlepšil proces hojení u pacientů ohrožených hypertrofickými jizvami. Dále bylo zjištěno, že terapie kynureninem zvyšuje expresi MMP-1 a -3 aktivací signální dráhy MAPK/ERK1/2, což podporuje její terapeutický potenciál (18).

MMP-1 se ale také může podílet na rozvoji rakoviny a šíření metastáz. Výzkumy naznačují spojení mezi polymorfismem SNP MMP-1 -1607 2G/2G a nepříznivou prognózou u maligních nádorů, jako je například skvamózní karcinom jazyka (19). U pacientů s invazivním dobře diferencovaným karcinomem štítné žlázy je exprese MMP-1 spojena s agresivními rysy nádoru, včetně invaze do laryngotracheální oblasti, multifokalitou a přítomností metastáz. Rovněž je exprese MMP-1 spojována s nepříznivou prognózou u karcinomu jícnu. Může být využita jako indikátor prognózy a potřeby rozsáhlejšího chirurgického zásahu (20).

1.1.4.2.1.1 Ischemická mrtvice

Cévní mozková onemocnění (CVD) jsou charakterizována ischemickým poškozením mozku, které způsobuje akutní neurologické deficity a představuje pátou nejčastější příčinu úmrtí ve Spojených státech. Více než 80 % případů CVD tvoří ischemické mozkové příhody (IS), které jsou způsobeny uzávěrem krevních cév (21). Hlavními mechanismy IS jsou trombóza, embolizace a lakunární infarkt, které vedou ke ztrátě kyslíku a poruše ATPázy. Tyto ischemické procesy vedou k patologickým událostem, jako je narušení hematoencefalické bariéry, vznik vazogenního edému, sekundární hemoragická transformace a smrt neuronů (22).

Hlavní rizikové faktory IS jsou součástí metabolického syndromu, zahrnujícího hypertenzi, cukrovku, obezitu, vysoké hladiny triglyceridů a nízkou hladinu lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL). Mezi další významné faktory patří vliv prostředí, jako je konzumace alkoholu, kouření, stravovací návyky a tělesná aktivita (22, 23).

Cévní mozková onemocnění, zejména ischemické mozkové příhody, jsou vážnou zdravotní hrozbou. Rizikové faktory zahrnují metabolický syndrom a environmentální vlivy, přičemž významné rozdíly v incidenci a výsledcích existují mezi různými etnickými skupinami. Výzkum těchto odlišností má zásadní význam pro prevenci a zlepšení léčby (22).

Role polymorfismu MMP-1 u ischemické mrtvice

MMP-1, protein o hmotnosti 53 kDa, se podílí na rozkladu intersticiálního kolagenu typů I, II a III a klíčových strukturálních komponent fibrózního plátu, který je spojen s mechanismem aterosklerotické mrtvice. Aktivní zinek interaguje s pantovou oblastí a karboxylovou terminální doménou, čímž umožňuje rozvinutí trojšroubovice kolagenové struktury (24). MMP-1 byla také úzce spojena s pokročilými aterosklerotickými plaky a předpokládá se, že zhoršuje aterosklerózu degradací plaků, což vede k cyklu expanze a prasknutí plaku (22).

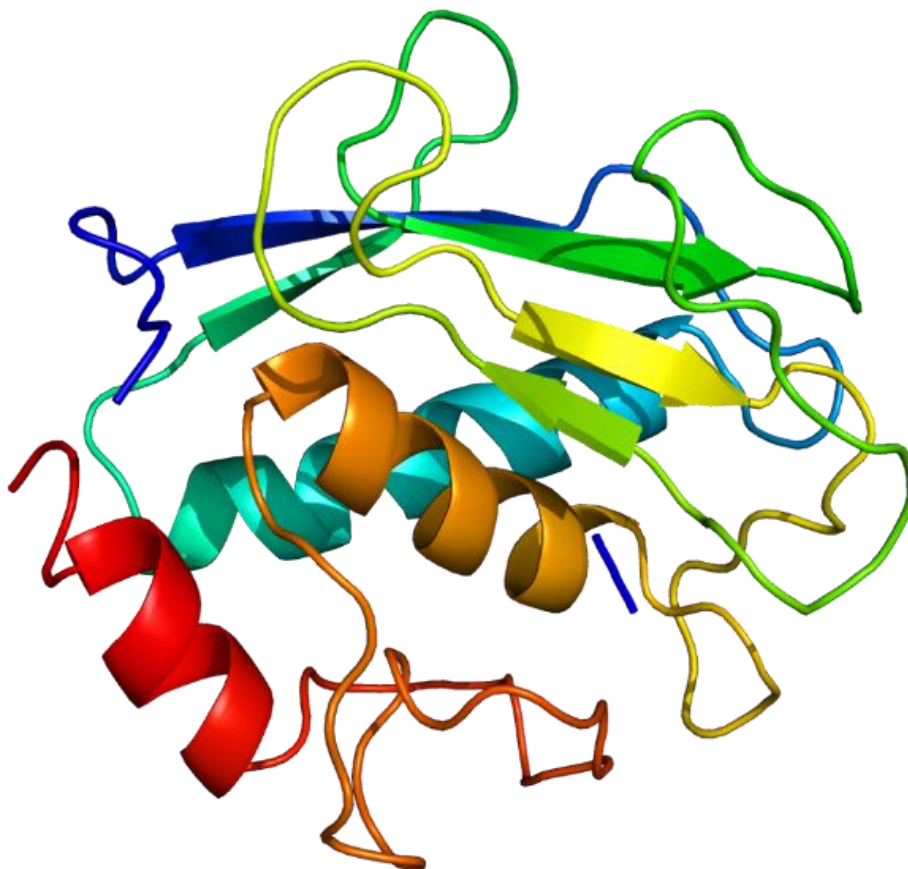
Klinická role polymorfismu MMP-1

Byl identifikován polymorfismus jednoho guaninu (1G až 2G) lokalizovaný v oblasti promotoru MMP-1 -1607 1G/2G. Bylo prokázáno, že alela 2G tohoto promotoru podporuje transkripční aktivitu vytvořením vazebného místa pro transkripční faktor E26 (22). Ale Chehaibi a spol. hodnotili roli této alely 1G vs. 2G v incidenci IS u tuniských pacientů a nenašli žádnou souvislost mezi polymorfizmem genu promotoru -1607 a incidencí IS (25). Tato negativní asociace však může být způsobena podobností ve frekvenci genotypu mezi pacienty s aterosklerózou krční tepny a kontrolami ($p = 0,085$). Ukázalo se však, že homozygotní *MMP-1* 2G/2G a polymorfismy *MMP-3* synergicky vedou ke zvýšení aterosklerózy karotid (odds ratio (OR) 3,31, $p = 0,004$) (31). Dosud žádná klinická studie nehodnotila roli *MMP-1* polymorfismů v klinickém výsledku IS a jejich role v incidenci IS zůstává nejasná (22).

MMP a aneurysma

Při aneuryzmatu dochází k rozpadu a nefunkčnosti elastinu ve střední vrstvě aorty. Matrixové metaloproteinázy významně přispívají k oslabení složek extracelulární matrix (elastinu, kolagenu, fibronektinu a proteoglykanů), a tím narušují stěnu aorty. U aneuryzmatu se prokazatelně zvyšují koncentrace MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 a MMP-9. Experimentální vyřazení genu pro TIMP-3 vede ke snížení hladin kolagenu a elastinu a zároveň ke zvýšení aktivity enzymů štěpících proteiny, což následně způsobuje vznik aneuryzmatu po podání angiotensinu II (27).

1.1.4.2.2 Matrixová metaloproteináza 8



Obrázek 5 – Krystalová struktura MMP-8 převzato z (28)

Enzym MMP-8 je známý pod několika běžnými názvy, jako jsou kolagenáza-2, neutrofilní kolagenáza, PMN-kolagenáza nebo granulocytová kolagenáza. Klíčovými faktory pro MMP, včetně MMP-8, jsou aktivace, katalytický mechanismus, specifita vůči substrátům a mechanismus inhibice pomocí inhibitorů (29).

MMP-8 plní fyziologickou úlohu při remodelaci extracelulární matrix (ECM) během hojení ran a opravy poraněných tkání (29). Enzymy MMP, včetně MMP-8, rozkládají proteiny a hydrolyzují peptidové vazby (30). MMP-8 rozkládá kolagen typů I, II, III, VII a X s degrační preferencí v pořadí (I > III > II). Tento enzym degraduje heterotrimerní kolagen (typ I) přibližně 20krát účinněji než homotrimerní kolagen (typ III) (31).

MMP-8 má kromě této role několik dalších biologických účinků, například aktivaci zánětlivých mediátorů, regulaci fyziologických funkcí a vliv na progresi rakoviny (32). Enzym také inaktivuje serpiny, jako jsou $\alpha 1$ -antitrypsin a $\alpha 1$ -antithyotrypsin, a $\alpha 2$ -makroglobulin (33). MMP-8 může mít vliv na nádorový růst i ochranu nádorů v závislosti na fyziologii, patologii a dalších faktorech (29). Její 3D struktura může být analyzována pomocí rentgenové krystalografie nebo NMR studií (34).

1.1.4.2.2.1 Onemocnění

Mezi onemocnění spojené s MMP-8 patří:

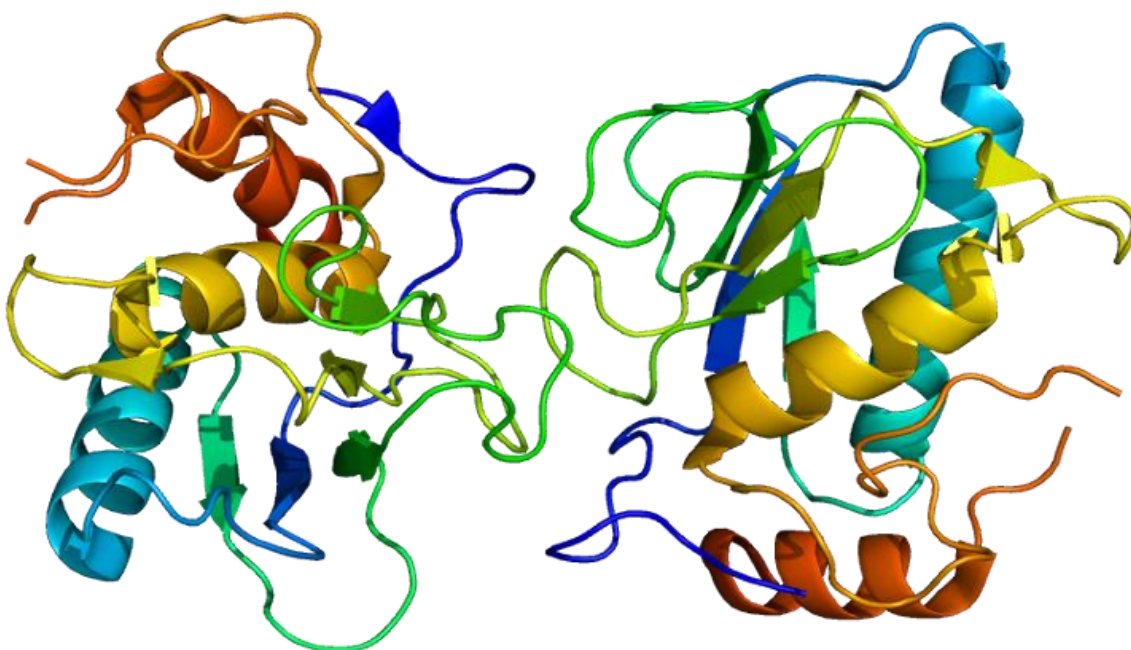
- Revmatoidní artritida
- Kardiovaskulární poruchy (35)
- Ateroskleróza
- Nadměrný růst dásní a periondontální onemocnění
- Rakovina

1.1.4.2.2.2 Vliv MMP-8 na aterosklerózu

Studie ukazuje, že matrixová metaloproteináza (MMP)-8 hraje klíčovou roli v rozvoji aterosklerózy. Inaktivace MMP-8 u myši vedla k výraznému snížení tvorby aterosklerotických lézí, nižším hladinám angiotensinu II, stabilnějším aterosklerotickým plátům a nižšímu krevnímu tlaku. MMP-8 ovlivňuje expresi adhezivní molekuly VCAM-1, což má vliv na zánětlivé procesy a adhezi leukocytů na endotel. Variace v genu MMP8 jsou spojeny s rozsáhlostí aterosklerózy a hladinami VCAM-1 v plazmě, což zdůrazňuje její klíčovou úlohu při kardiovaskulárních onemocněních. Tyto poznatky ukazují, že cílení na MMP-8 může představovat slibnou strategii pro prevenci a léčbu aterosklerózy (36).

1.1.4.2.3 Matrixová metaloproteináza 13

Gen pro MMP-13, známou také jako kolagenáza-3, se nachází na chromozomu 11q22.3. Tento enzym má vysokou schopnost štěpit kolagen typu II. Původně se mělo za to, že exprese MMP-13 se omezuje na pojivovou tkáň, zejména chrupavku a vyvíjející se kostní tkáň. Později však byla její přítomnost potvrzena také v epiteliálních a neuronálních buňkách. Nadměrná exprese MMP-13 v chrupavce pacientů s osteoartrózou naznačuje, že zvýšená aktivita tohoto enzymu v chondrocytech může přispívat k progresi osteoartritidy (38). Gen MMP-13 byl identifikován jako přímý cílový gen mikroRNA miR-411 v chondrocytech. Zvýšené hladiny miR-411 potlačují expresi MMP-13 a podporují syntézu kolagenu typu II a IV v chondrocytech. Ve srovnání se zdravou chrupavkou vykazuje chrupavka postižená osteoartrózou sníženou hladinu miR-411 a zvýšenou expresi MMP-13. Tyto poznatky naznačují, že miR-411 má schopnost regulovat expresi MMP-13 a remodelaci extracelulární matrix v chondrocytech, což by z ní mohlo učinit potenciální terapeutický cíl pro léčbu osteoartrózy (39).



Obrázek 6 – Krystalová struktura MMP-13 převzato z: (37)

Nízký poměr polynenasycených mastných kyselin kyseliny linolové (n-6) ku kyselině α -linolenové (n-3) omezuje expresi MMP-13 v zánětlivých chondrocytech jak při laboratorních testech, tak i v živých organismech, a může být účinným nástrojem ke zmírnění příznaků osteoartrózy. V lidských chondrocytech pěstovaných v kultuře poměry n-6/n-3 na úrovni 1:1 a 2:1 vedly ke snížení exprese mRNA i produkce proteinu MMP-13, aniž by to ovlivnilo množení buněk. V experimentálním modelu artritidy u krys, vyvolané aplikací Freundova kompletního adjuvans, se nízké dietní poměry n-6/n-3 (1:1 a 2:1) projeví poklesem otoku tlapek, snížením hladin MMP-13 a IL-1 v séru a zmírněním poškození chrupavky (40).

MMP-13 může být zapojena do onemocnění plic, jako jsou akutní poškození plic, virové infekce a chronická obstrukční plicní nemoc. V epiteliálních buňkách dýchacích cest byla stimulace sekrece MMP-13 vyvolána kyselinou polyinosin-polycytidylovou, přičemž její sekreci bylo možné zrušit pomocí inhibitorů, jako je p38 MAPK SB304680, fosfoinositid 3-kinázy LY294002, Janusovy kinázy nebo inhibitoru NF κ B Bay 11-7082. Interferon- β (IFN- β) rovněž indukoval sekreci MMP-13, kterou potlačily všechny výše uvedené inhibitory kromě Bay 11-7082. Navrhuje se, že sekrece MMP-13 byla zprostředkována IFN receptory nezávisle na NF κ B, zatímco kyselina polyinosin-polycytidylová stimulovala sekreci IFN mechanismem závislým na NF κ B, což vedlo ke zvýšené sekreci MMP-13 v epiteliálních buňkách dýchacích cest. Dále inhibitory MMP-13 a MMP-13 siRNA potlačily IFN-indukovanou produkci IFN γ -indukovatelného proteinu 10 (IP-10) a regulovaly sekreci RANTES, čímž poukazují na zapojení MMP-13 do produkce prozánětlivých chemokinů vyvolaných virovými infekcemi. Kromě toho byl objeven nový polymorfismus v promotorové oblasti genu MMP-13, který podporuje teorii, že MMP-13 se podílí na obranných procesech v epiteliálních buňkách dýchacích cest (41).

Jaterní fibróza představuje pokročilé stadium jaterních onemocnění, které může vyústit v jaterní selhání nebo vznik rakoviny. Studie zkoumaly, zda zvýšená exprese genu MMP-13 v játrech krys dokáže zpomalit nebo zastavit progresi jaterní fibrózy. U krys s jaterní fibrózou, vyvolanou ligací žlučovodu, bylo aplikováno hydrodynamické dodání genu MMP-13 prostřednictvím expresního vektoru obsahujícího kazetu CAG promotor-MMP13-IRES-tdTomato-polyA. Tento postup vedl ke zvýšení sérových hladin MMP-13, které dosáhly maxima po 14 dnech a přetrvávaly po dobu dalších 60 dnů. Zaznamenané hladiny kyseliny hyaluronové

byly u léčených krys nižší než u neléčených, což naznačuje pozitivní terapeutický efekt nadměrné exprese MMP-13. Kvantitativní analýza tkání, obarvených kolagenovým barvivem sirius red, prokázala významně nižší podíl fibrotické tkáně u krys léčených MMP-13 ve srovnání s neléčenými zvířaty. Tento výzkum ukazuje, že hydrodynamické dodání genu MMP-13 zaměřené na játra by mohlo být slibným přístupem k prevenci jaterní fibrózy (42).

MMP-13 bývá často nadměrně exprimován v nádorových tkáních, což může přispívat k progresi a šíření metastáz. Zvýšená exprese MMP-13 byla zaznamenána v nasofaryngeálních rakovinných buňkách, exozomech získaných z kondicionovaného média, a také v plazmě pacientů s nasofaryngeálním karcinomem (43). Transwell analýza je všestranná in vitro metoda, která se používá ke studiu migrace a invaze buněk skrze porézní membránu oddělující dvě komory (49). Základní princip spočívá v nanesení buněk do horní komory transwell insertu a sledování jejich pohybu do dolní komory, často v reakci na chemoatraktant (45). A díky této analýze bylo zjištěno, že exozomy obsahující MMP-13 podporují metastázování rakovinných buněk nosohltanu. Použití MMP-13 siRNA snižovalo vliv těchto exozomů na šíření metastáz a proces angiogeneze (43).

1.1.4.2.4 Matrixová metaloproteináza 18

Gen MMP-18, známé také jako kolagenáza-4, je lokalizován na chromozomu 12q14. V průběhu 90. let 20. století byla pomocí analýzy sekvenční podobnosti v databázích exprimovaných sekvenčních značek objevena částečná cDNA, která kódovala 3' konec potenciální nové lidské MMP. Následně byl pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) z cDNA lidské mléčné žlázy doplněn zbývající 5' konec této cDNA. Předpokládaný protein vykazoval všechny klíčové strukturální znaky charakteristické pro rodinu MMP a jeho největší podobnost byla zaznamenána s MMP-1, -3, -10 a -11, díky čemuž byl označen jako MMP-18. Tato molekula se od ostatních MMP odlišuje svou aminokyselinovou sekvencí, která zahrnuje dvě štěpné oblasti pro aktivaci. mRNA MMP-18 je přítomna v řadě normálních lidských tkání, nicméně její exprese nebyla pozorována v mozku, kosterním svalstvu, ledvinách, játrech nebo leukocytech (5).

MMP-18 je protein, který se vyskytuje v migrujících makrofázích. Růst periferních axonů *in vitro* je výrazně ovlivněn přítomností pupenů končetin a kožních explantátů. Axonální růst směrem ke kožním explantátům *Xenopus laevis* v matrigelu je propojen s expresí MMP-18 a dalších MMP, přičemž tento proces je blokován inhibitory MMP, jako jsou BB-94 a GM6001. Když je MMP-18 uměle exprimován v buněčných agregátech COS-7, podporuje axonální růst z explantátů dorzálních kořenových ganglií *Xenopus*. Nidogen, uvolňovaný kultivovanou kůží v matrigelu, je specifickým cílem MMP, zatímco ostatní komponenty zůstávají neporušené. Tato pozorování spojují MMP-18 s odbouráváním ECM a jeho rolí v řízení růstu axonů. Přestože MMP-18 má širokou distribuci a různé funkce v tkáních, nebyla přímo propojena s konkrétním patologickým stavem (46).

1.1.4.3 Role kolagenáz v onemocnění rakoviny

Rakovina je onemocnění způsobené zhoubným nádorem, pro který je charakteristický nekontrolovaný růst s ničením okolních tkání, zakládání metastáz a celkové působení na organismus (47).

Počet nových případů rakoviny bude pravděpodobně stoupat v důsledku stárnutí populace a zvyšujícího se celoživotního rizika rakoviny (48). Přežití pacientů se u mnoha druhů rakoviny zlepšilo díky pokrokům v prevenci (49), detekci (50), diagnostice a léčbě, což bylo umožněno rozsáhlým výzkumem využívajícím metody *in vitro*, genetické analýzy, buněčné kultury a *in vivo* studie (51). Identifikace rakovinných biomarkerů, jako jsou DNA, RNA, proteiny nebo chemické modifikace biomolekul, významně přispěla k lepší diagnostice a léčbě (58).

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou zvažovány jako biomarkery a terapeutické cíle, neboť hrají klíčovou roli při degradaci extracelulární matrix (ECM), což podporuje invazi rakovinných buněk a metastázy. Ačkoliv jsou MMP často spojovány s podporou nádorových procesů, jejich studium přispívá k pochopení rakoviny a k hledání nových terapeutických přístupů (54).

Maligní nádory mají schopnost pronikat do zdravé tkáně a rozšiřovat se do vzdálených částí těla, což má za následek tvorbu metastáz. Tyto procesy jsou hlavními příčinami morbidit a mortality spojené s rakovinou. Invaze a metastázy zahrnují přichycení nádorových buněk k bazální membráně, rozklad okolní pojivové tkáně, její průnik a následnou migraci skrze poškozené stromální struktury (54). Rozklad extracelulární matrix je výsledkem společné aktivity různých proteináz, například serinových, cysteinových, aspartátových a MMP. Převážnou část destrukce pojivových tkání však zajišťují MMP. Většina MMP je vylučována ve své neaktivní formě jako zymogeny, které potřebují proteolytické štěpení k aktivaci. Tento proces může být usnadněn jinými MMP nebo serinovými proteinázami, například plasminem nebo urokinázou. I když MMP hrají hlavní roli v destrukci pojivové tkáně, serinové proteinázy jsou významnými aktéry v proteolytické kaskádě, která aktivaci MMP podporuje a spouští proces nádorové invaze (55).

1.1.4.3.1 MMP-8

Systematický přehled shrnul současné znalosti o její potenciální prognostické hodnotě v krvi a nádorových vzorcích, stejně jako vliv genetických změn na prognózu. Byly analyzovány in vitro a in vivo studie, aby byly objasněny molekulární mechanismy a aplikace MMP-8 v terapii rakoviny (56).

MMP8 je zvažována jako prognostický marker pro rakovinu. Její měření, včetně genové exprese, hladin proteinů a genetických polymorfismů, může pomoci odhadnout průběh a výsledek onemocnění. Použití MMP8 by mohlo lékařům poskytnout cenné informace o pravděpodobnosti recidivy a přežití pacientů. Tento biomarker má potenciál významně přispět k personalizovanému přístupu v léčbě rakoviny (55).

Analýza proteinu a mRNA MMP8 v nádorech ukazuje variabilní výsledky ohledně jeho role jako prognostického biomarkeru. Imunohistochemické metody a RT-PCR jsou nejčastěji používané techniky. mRNA MMP8 je zřídka detekována a její stabilita v nádorové tkáni je sporná (57). Studie o nádorové expresi MMP8 u rakoviny prsu neprokázaly jasnou souvislost s klinicko-patologickými rysy, ačkoli některé korelace s jinými faktory byly nalezeny (58).

U rakoviny kůže se role MMP8 liší podle podtypu. Například vyšší hladiny MMP8 jsou spojeny s invazivitou melanomu, avšak u bazaliomu nebo spinocelulárního karcinomu nejsou klinicky významné (55). U rakoviny hlavy a krku byly hladiny MMP8 proměnlivé, přičemž její vyšší exprese v SCC jazyka naznačovala lepší prognózu (59).

V případech rakoviny vaječníků a jater byly zvýšené hladiny MMP8 spojeny se špatnou prognózou, zatímco u kolorektálního karcinomu a rakoviny žaludku se výsledky lišily (60). U některých rakovin, jako je rakovina plic, pankreatu nebo dělohy, existují omezené důkazy, které neumožňují jednoznačné závěry. Celkově je role MMP8 jako biomarkeru proměnlivá, ačkoli některé korelace s malignitou naznačují její potenciální využití v specifických případech (55).

1.1.4.4 Vliv matrixových metaloproteináz na hojení ran

K zajištění optimálního hojení ran dochází díky vysoce koordinovanému a systematicky uspořádanému procesu (61). Proces hojení ran využívá ECM, která zlepšuje buněčné funkce nezbytné pro zacelení, včetně přilnavosti buněk, jejich pohybu a remodelace tkáně. V průběhu celého procesu hojení ran jsou MMP nepostradatelné. V zánětlivé fázi se starají o odstranění poškozených proteinů a provizorní ECM. V proliferační fázi umožňují angiogenezi a migraci buněk tím, že narušují bazální membránu kapilár. V fázi remodelace pak přispívají ke kontrakci a obnově tkáně. Dále je známo, že MMP regulují aktivitu některých růstových faktorů a polymorfonukleárních buněk (63).

Klíčovou roli v hojení ran hrají zejména želatinázy (konkrétně MMP-2 a MMP-9) a kolagenázy (MMP-1 a MMP-8). Účinek těchto MMP je regulován tkáňovým inhibitem metaloproteináz (TIMP), který existuje ve čtyřech formách (TIMP-1 až TIMP-4). TIMP přerušují aktivitu MMP tím, že se na ně vážou v alternativních nebo aktivních místech, a dokážou tak inhibovat všechny typy MMP, i když s různou silou vazby (64). Ačkoli jsou MMP pro hojení ran nepostradatelné, jejich nesprávná koncentrace může proces zkomplikovat. V běžných situacích interakce MMP s růstovými faktory a receptory přispívá k udržení rovnováhy ECM, a tím i k nízkému výskytu MMP. Nicméně, prognóza hojení bude odvislá od poměru mezi množstvím MMP a TIMP (65).

V rámci ECM může nerovnováha těchto matricových proteinů a jejich inhibitorů způsobit degradaci matrice (66) a je spojena s proteolytickými enzymy distribuovanými v několika skupinách zapojených do rozvoje onemocnění (65). V důsledku této interakce klesá koncentrace růstových faktorů a TIMP. Naopak stoupá hladina proteáz a MMP, konkrétně MMP-1, MMP-2, MMP-8 a MMP-9, a prozánětlivých cytokinů, jako je interleukin-1 (IL-1) a tumor nekrotizující faktor-alfa (TNF- α), které uvolňují neutrofile a makrofágy. Tento jev je silnější u dlouhodobých ran ve srovnání s čerstvými. Tato nerovnováha má souvislost s patologickými stavy hojení ran, jako je diabetes mellitus (DM) a další cévní komplikace (67).

1.1.4.4.1 Interakce matrixových metaloproteináz při hojení diabetických ran

Diabetes mellitus je chronická metabolická porucha postihující miliony lidí na celém světě. Hyperglykémie indukuje většinu mikro- a makrovaskulárních komplikací spojených s DM. Může docházet k přímému nebo nepřímému zvýšení aktivity MMP, a to prostřednictvím oxidačního stresu nebo konečných produktů pokročilé glykace (68). Lidé s metabolickým syndromem mají prokazatelně vyšší hladiny MMP než zdraví jedinci, což naznačuje zvýšené riziko vzniku dalších zdravotních komplikací (64). Správné hojení ran závisí na regulaci rozkladu ECM; narušení rovnováhy mezi tvorbou a odbouráváním ECM může vést ke vzniku chronických vředů nebo fibrózy (69). Narušení buněčné a biochemické rovnováhy, poškození tkání nebo různá onemocnění mohou ovlivnit proces hojení ran různými způsoby. To má také negativní dopad na proteázy, cytokiny a růstové faktory, což může vést k neúplnému nebo opožděnému uzavření rány a bránit tak úspěšné obnově kůže (70).

Zdravotnická komunita s velkým znepokojením sleduje přetrvávající problémy spojené s venózními bércovými vředy (VLU) a diabetem. Tyto stavy nepřinášejí pouze bolest, zhoršenou kvalitu života a potenciálně i úmrtí, ale představují také značné ekonomické náklady (80). Diabetický vřed na noze je běžný v jakékoli věkové skupině a je pozorován převážně u osob starších 65 let s výskytem více než 3 % a výskytem více než 1 % světové populace (71).

1.1.4.5 Analýza kolagenáz

1.1.4.5.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA je technika, která slouží ke kvantitativnímu určení specifických molekul, jako jsou proteiny nebo protilátky, ve vzorku. Funguje na základě vysoce specifické interakce mezi hledanou molekulou a její vazebnou partnerkou (protilátkou nebo antigenem), přičemž tato vazba je následně detekována pomocí enzymu (73).

Známa molekula (antigen nebo protilátka) se upevní na povrch, typicky na dně malé plastové jamky. Tím se zajistí, že se specifické reakce oddělí od ostatních látek ve vzorku. Pokud je ve zkoumaném vzorku přítomna cílová molekula (antigen při hledání protilátek, nebo protilátka při hledání antigenu), specificky se naváže na tu upevněnou. K odhalení této vazby se použije další protilátka, která má na sobě navázaný enzym. Tato značená protilátka se specificky spojí s cílovou molekulou (buď přímo, nebo nepřímo přes jinou protilátku) (73).

Po odstranění nezreagovaných značených protilátek se přidá látka (substrát), kterou daný enzym přemění na barevnou, světélkující nebo fluoreskující látku. Množství vzniklé barevné změny nebo světla je úměrné množství hledané molekuly ve vzorku a měří se speciálním přístrojem (73).

1.1.4.5.2 Western blotting

Western blotting je metoda, při které se využívají speciální protilátky k nalezení a identifikaci konkrétních proteinů. Tyto proteiny jsou předtím rozděleny podle své velikosti pomocí gelové elektroforézy (74).

Při této imunoanalýze se používá membrána, která je vyrobena buď z nitrocelulózy, nebo z PVDF. Gel s rozdělenými proteiny se přiloží k této membráně a následně se aplikuje elektrické pole. Díky tomu proteiny přejdou z gelu na povrch membrány. Na membráně se pak provádějí další kroky, při kterých se používají protilátky, které cíleně rozpoznají hledaný protein. Nakonec se tyto protilátky a navázaný protein zviditelní pomocí sekundárních protilátek a dalších látek, které umožní detekci (74).

1.1.4.5.3 SDS-PAGE elektroforéza

V elektrickém poli se molekuly, které byly odděleny podle toho, jak rychle putují vlivem elektrického proudu (elektroforetická mobilita), pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem. Díky použití SDS mají všechny dělené látky stejný náboj a mohou se dělit jen podle svého náboje. (84).

Rychlost tohoto pohybu je ovlivněna tím, jak je molekula uspořádána, jaký má tvar a jaký má elektrický náboj. U proteinů hraje hlavní roli jejich struktura a náboj. Menší molekuly projdou gelem snáze a rychleji, protože jim v cestě stojí méně překážek. Naopak, větší molekuly se budou pohybovat pomaleji, protože narazí na více překážek v gelové síti. Díky tomu se molekuly v gelu rozdělí v podstatě jen podle své velikosti (75).

1.1.4.5.4 Kolagenová zymografie

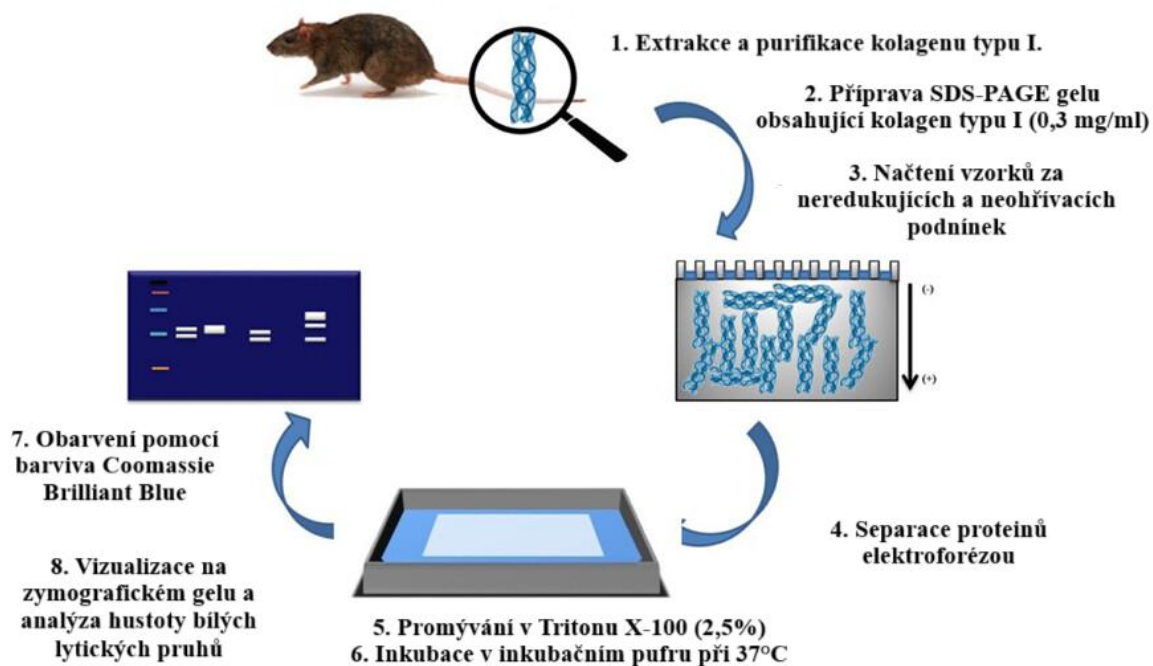
Kolagenová zymografie je metoda založená na SDS-PAGE elektroforéze, která slouží k detekci jak proenzymových, tak i aktivních forem kolagenáz.. Je dobře zdokumentované, že matrixové metaloproteinázy, se podílejí na proteolytické přeměně a štěpení několika složek extracelulární matrix i na molekulách, které nepatří do ECM (76). Detekce aktivity těchto enzymů nám může poskytnout významné diagnostické a prognostické informace, což umožní optimální výběr možností léčby.

Kolagenová zymografie je jednou z nejčastěji používaných metod pro detekci proteolytické aktivity. Při této technice se proteiny separují na SDS-PAGE gelu, který je kopolymerizován se specifickým substrátem (např. želatinou, kaseinem nebo kolagenem) za neredukčních podmínek a bez zahřívání (78). SDS způsobuje neproteolytickou aktivaci proenzymu, což umožňuje degradaci substrátu aktivním enzymem. Tento jev umožňuje analyzovat jak proenzym, tak aktivní formu. Po obarvení gelů se natrávené oblasti jeví jako číré pruhy na tmavém pozadí (79). To je viditelné na obrázku č.8.

Kolagenová zymografie je upřednostňovanou metodou pro hodnocení aktivity kolagenáz (MMP-1, MMP-8 a MMP-13) z následujících důvodů:

- je jednoduchá a levná ve srovnání s metodami, jako je western blot, ELISA a testy aktivity
- umožňuje analýzu nejen proenzymů a aktivních forem, ale také glykosylovaných izoform (89).

Nicméně existují technické problémy, které je třeba zvážit, jako je výběr vhodného typu a koncentrace kolagenu, stanovení citlivosti kolagenázy a oddělení jednotlivých kolagenáz, protože mají podobnou molekulární hmotnost. Kolagenová zymografie byla vyvinuta Goglym a kolegy. Autoři optimalizovali metodu pro analýzu aktivity MMP-1, nezaměřili se na aktivity MMP-8 a MMP-13 (80).



Obrázek 7 – Proces kolagenové zymografie převzato z: (80)

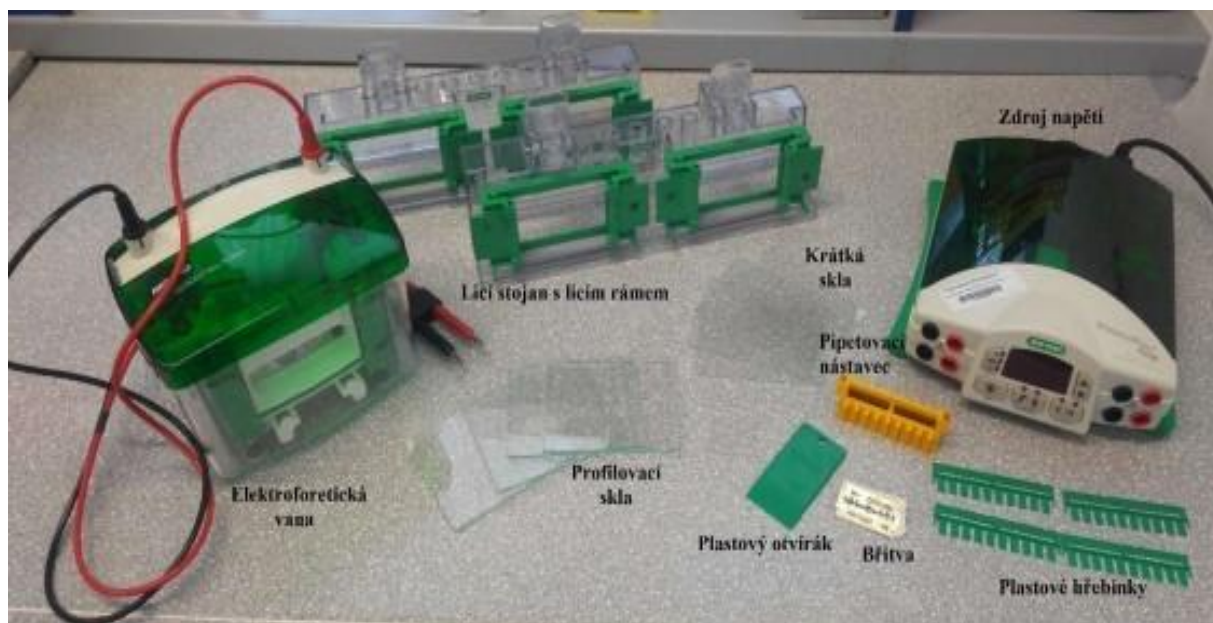
2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Materiál a metoda

2.1.1 Použité přístroje a pomůcky

a) Pomůcky pro elektroforézu

- Zdroj Power Pac Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetická vana Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Licí rám Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Licí stojan Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Těsnící pásky Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Profilovaná skla System Glass Plates (Spacer plates) (Bio-Rad, USA)
- Krátká skla System Glass Plates (Short plates) (Bio-Rad, USA)
- Plastové hřebeny na tvorbu jamek Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Plastový otvírák gelů Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)



Obrázek 8 – Aparatura na přípravu gelů a elektroforézu převzato z: (81)

b) Ostatní pomůcky

- Digitální váhy 440-21N, 440-35A (KERN, Německo)
- Chladnička (Liebherr LH KTS 1414, Německo)
- Laboratorní třepačka Kavalier LT 2 (Votice, ČR)
- Třepačka REAX TOP s nástavcem (Heidolph, Německo)
- Inkubátor (Memmert, Německo)
- Portable analog pH metr HI 8314 (Hanna Instruments, Rumunsko)
- Ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Slovensko)
- Pumpa vakuová (Merck, Německo)
- Sada reagenčních lahví 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml (Simax, ČR)
- Automatické pipety: 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l, 5 ml (BioHit, Finsko)
- Mikrozukavky Eppendorf: 2 000 μ l, 1 500 μ l, 600 μ l
- Plastové zkumavky: 10 ml, 15 ml
- Petriho misky o průměru 17 cm
- Skleněné odměrné válce, kádinky
- Celofánová fólie
- Filtrační papíry
- Stříčka 500 ml
- Vortex (Heidolph, Německo)
- Parafilm (Bemis Flexible Packaging, USA)
- Skener Perfection V600 Photo (EPSON, Japonsko)

2.1.2 Použité chemikálie

Tabulka 2 – Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce, země
Persíran amonný (APS)	MERCK, Německo
Dodecyl síran sodný (SDS)	(LACH-NER, Česká republika)
30% akrylamid/bis-akrylamid (polyakrylamid)	MERCK, Německo
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	MERCK, Německo
Chlorid sodný	MERCK, Německo
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)	PENTA, Česká republika
Hydroxid sodný	LACH-NER, Česká republika
Chlorid vápenatý (bezvodý)	PENTA, Česká republika
Chlorid sodný	MERCK, Německo
Glycin	LACH-NER, Česká republika
Kyselina octová 99%	LACH-NER, Česká republika
Methanol	LACH-NER, Česká republika
Ethanol 96%	LACH-NER, Česká republika
Glycerol (bezvodý)	LACH-NER, Česká republika
Kyselina chlorovodíková 37%	MERCK, Německo
Triton®X-100	MERCK, Německo
Brij® L23	MERCK, Německo
Coomassie Brilliant Blue R	MERCK, Německo
Bromfenolová modř	Lachema N. P. Brno, Česká republika
Corning Colagen typu I	MERCK, Německo

2.1.3 Příprava potřebných roztoků

a) 10 % Dodecylsírán sodný

V 50 ml destilované vody rozpustíme 10 g SDS. Poté doplníme destilovanou vodou na celkový objem 100 ml. Roztok uchováváme v chladničce přibližně 3 měsíce. Při nižší teplotě tento roztok krystalizuje, proto je nutné ho před použitím zahřát v teplé vodní lázni a promíchat.

b) 1,5 M Tris – HCl pufr s hodnotou pH 8,8

V 50 ml destilované vody rozpustíme 18,5 g Tris-Base. Poté pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na výslednou hodnotu 8,8. Následně doplníme 50 ml destilované vody na celkový objem 100 ml. Tento roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní přibližně 3 měsíce.

c) 0,125 M Tris – HCl pufr s hodnotou pH 6,8

50 ml destilované vody rozpustíme 1,5 g Tris-Base. Poté pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na výslednou hodnotu 6,8. Následně doplníme 50 ml destilované vody na celkový objem 100 ml. Tento roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní přibližně 3 měsíce.

d) 0,5 M Tris – HCl pufr s hodnotou pH 6,8

V 50 ml destilované vody rozpustíme 18,5 g Tris-Base. Poté pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na výslednou hodnotu 8,8. Následně doplníme 50 ml destilované vody na celkový objem 100 ml. Tento roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní přibližně 3 měsíce.

e) Elektrodotový pufr

V 500 ml destilované vody rozpustíme 2,91 g Tris-Base, 14,41 g glycinu a 1 g SDS. Následně doplníme 500 ml destilované vody. Roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní zhruba měsíc. Před elektroforézou roztok ředíme v poměru 1:5 destilovanou vodou.

f) Inkubační pufr

V 250 ml destilované vody rozpustíme 3,028 g Tris-Base, 1,46 g chloridu sodného, 0,56 g chloridu vápenatého a 0,25 g Brij 35. Poté doplníme 250 ml destilované vody na celkový objem 500 ml. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH roztoku na výslednou hodnotu 8,0. Tento roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní zhruba měsíc.

g) 2% Bromfenolová modř

V plastové zkumavce rozpustíme 0,1 g bromfenolové modři v 5 ml destilované vody. Roztok uchováváme v chladu.

h) Vzorkový pufr

Do plastové zkumavky postupně napipetujeme 1000 μ l 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8, 3200 μ l 10 % SDS, 800 μ l glycerolu, 2800 μ l destilované vody a 200 μ l 2 % roztoku bromfenolové modři. Roztok důkladně promícháme a uchováváme v chladu.

i) 10 % Persíran amonný

Pro přípravu čtyř gelů na analytických vahách navážíme 0,2 g APS. Následně k navážce napipetujeme 2 ml destilované vody. Roztok APS připravujeme vždy v den použití.

j) 2,5 % Triton X-100

Pro čtyři gely rozpustíme 12,5 ml Tritonu X-100 v 493,74 ml destilované vody. Triton X-100 je špatně rozpustný, proto použijeme k jeho rozpuštění ultrazvukovou vanu. Tento roztok připravujeme hned po spuštění elektroforézy a vždy v den použití.

k) Odbarvovací roztok

Pro odbarvení čtyř gelů smícháme v reagenční láhvi 210 ml methanolu, 60 ml kyseliny octové a 330 ml destilované vody. Odbarvovací roztok připravujeme vždy v den použití.

l) Barvicí roztok

Pro obarvení čtyř gelů smícháme v reagenční láhvi 100 ml methanolu, 4 ml kyseliny octové, 137 ml destilované vody a 1,6 g Coomassie Brilliant Blue R. Důkladně vše promícháme,

aby se Coomassie Brilliant Blue R dobře rozpustila. Tento roztok připravujeme vždy v den použití.

m) 0,1 M Hydroxid sodný

Ve 100 ml destilované vody rozpustíme 0,4 g hydroxidu sodného. Tento roztok uchováváme v chladu. Roztok se používá pro úpravy pH.

2.1.4 Příprava vzorků

Pro potřeby této diplomové práce byl vzorek krve odebrán dobrovolnému dárci, a to na Oddělení klinické biochemie a hematologie v nemocnici v Jablonci nad Nisou. Vzorek byl nabrán do vakuové zkumavky se zlatým uzávěrem, ve které se nachází separační gel. Po odebrání vzorku bylo potřebné nechat vzorek ustát a to po dobu cca. 20 minut. Následně byla zkumavka vložena do centrifugy. Vzorek byl stočen na 1700 otáček za minutu po dobu 10 minut. Následně bylo sérum odseparováno do jiné zkumavky.

Jako další vzorky pro stanovení kolagenáz byly použity vzorky séra od pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, kteří byli zahrnuti do studie. Ta sledovala zánětlivou odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů. Studie probíhala ve spolupráci s Interní klinikou – Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.). V souladu s touto studií byly také vydány souhlasy Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, které jsou uvedeny v příloze A. Všichni pacienti, kteří jsou do studie začleněni, podepsali informovaný souhlas a vyplnili dotazník. Příklad informovaného souhlasu pro účastníky studie je uveden v příloze B. Pacientům byla krev odebírána před zákrokem, 24 a 48 hodin po perkutánní koronární intervenci. Pacientům s číslem větší než 40 byl proveden ještě čtvrtý odběr D, a to v rozmezí 3, 6 až 12 měsíců po výkonu PCI (většinou 3 měsíce po zákroku). Během transportu byly vzorky uchovávány u ledu a následně zpracovány. Po transportu se zkumavky nechaly stát zhruba půl hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla provedena centrifugace pro získání séra, 10 minut při 3500 otáčkách za minutu, při teplotě 4 °C. Získané sérum bylo rozpipetováno a alikvoty byly zamrazeny při teplotě – 80 °C.

Vzorky séra a rozmrzlého alikvoty naředíme připraveným vzorkovým pufrem. Pro stanovení kolagenáz používáme 1 - 2x ředění. Takto naředěné vzorky důkladně promícháme na vortexu a necháme 2 hodiny inkubovat při 25 °C. Dodržení doby inkubace je důležité z toho

důvodu, že během ní obsadí SDS aktivní místa na MMP, a tím zabrání jejímu předčasnému štěpení kolagenu během elektroforézy.

Výsledky stability vzorků z diplomové práce (81) naznačují, že dlouhodobé skladování zmrazených vzorků při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nevykazuje statisticky významné změny v jejich hladinách sledovaných analytů. Díky tomu lze usuzovat, že využití vzorků z dané studie pro naše účely by neměl představovat problém.

2.1.5 Příprava aparatury pro výrobu gelů

Nejdříve opláchneme profilovací a krátká skla destilovanou vodou, které pomocí papírového ručníku dosucha vysušíme a následně je pomocí ethanolu a papírového ručníku vyleštíme. Je důležité, aby skla byla důkladně odmaštěna, zbavena všech nečistot a dokonale čistá. K profilovacímu sklu přiložíme krátké sklo a obě společně vložíme do licího rámu. Do licího rámu vložíme těsnící pásky. Licí rám se skly vložíme do licího stojanu (do jednoho stojanu se vejdou dva licí rámy). Mezi profilovací a krátké sklo napipetujeme destilovanou vodou cca. do půlky krátkého skla. Vodu necháme cca. 1 minutu mezi skly a sledujeme, zda voda neprotéká. Vody se zbavíme tak, že vezmeme do ruky stojan a naklopíme ho, aby se voda vylila do výlevky. Zbytky vody vysušíme pomocí filtračních papírů.

2.1.6 Příprava dělicího gelu

Reagencie potřebné k přípravě čtyř dělicích gelů jsou uvedeny v tabulce 1. Nejdříve si musíme nechat rozpustit kolagen. To provedeme tak, že připravíme vodní lázeň na 37°C do lázně ponoříme kep s $300\text{ }\mu\text{l}$ kolagenu. Kolagen necháme 20 minut ve vodní lázni. Po vyndání kolagenu z vodní lázně necháme kolagen krátce promíchat na vortexu. Dalším krokem je, že v plastové zkumavce postupně smícháme reagencie kroku 1, jak je uvedeno v tabulce 1. Roztok důkladně promícháme na vortexu a následně odvzdušníme pomocí vývěvy, a to za současného poklepání tužkou. Do zkumavky přidáme APS a TEMED. K roztoku napipetujeme nejdříve APS a následně TEMED (reagencie kroku 2). Celý roztok důkladně a krátce promícháme na vortexu a poté co nejrychleji pipetujeme mezi skla tak, aby hladina gelu sahala pod zelený okraj licího rámu. Nakonec gel rychle a velmi opatrně převrstvíme zhruba 1 ml destilované vody, aby nedošlo k zavzdušení gelu a vytvořila se rovná linie. Gel necháme tuhnout zhruba 40 -50 minut.

Pozorujeme zbylý gel ve zkumavce a dle něj se orientujeme. Pokud je gel ve zkumavce ztuhlý, pak je ztuhlý i gel mezi skly.

Tabulka 3 – Reagencie na přípravu čtyř dělicích gelů

	Pořadí	Reagencie	Množství [μ l]
Krok 1	1.	30% Polyakrylamid	2993
	2.	Destilovaná voda	2993
	3.	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1870
	4.	10% SDS	77
	5.	Kolagen	225
Krok 2	1.	10% APS	37,5
	2.	TEMED	7,5

2.1.7 Příprava zaostřovacího gelu

Reagencie potřebné k přípravě čtyř zaostřovacích gelů jsou uvedeny v tabulce č.2. Během doby tuhnutí zaostřovacího gelu si v plastové zkumavce připravíme zaostřovací gel a to tak, že postupně smícháme reagencie z kroku jedna, jak jdou za sebou je uvedeno v tabulce č.2. udává množství pouze na dva gely, z důvodu velmi rychlého tuhnutí gelů. Pokud se dělají čtyři gely, je nutné provádět postup pro každé dva gely zvlášť.

Roztok důkladně promícháme na vortexu a následně odvzdušíme pomocí vývěvy, a to za současného poklepání tužkou na zkumavku. Po uplynutí doby tuhnutí gelu odsajeme vodu pomocí filtračního papíru. Do zkumavky přidáme APS a TEMED. K roztoku napipetujeme nejdříve APS a následně TEMED (reagencie kroku 2). Celý roztok důkladně a krátce promícháme na vortexu a poté co nejrychleji napipetujeme nad dělicí gel až po okraj. Do zaostřovacího gelu vložíme ethanolem očištěný hřebínek. Gel necháme tuhnout tak dlouho dokud neuvidíme tuhnout část gelu ve zkumavce. Poté vytáhneme opatrně hřebínek.

Tabulka 4 – Reagencie na přípravu 2 zaostřovacích gelů

	Pořadí	Reagencie	Množství [μ l]
Krok 1	1.	30% Polyakrylamid	313
	2.	Destilovaná voda	1400
	3.	0,125 M Tris-HCl (pH 8,8)	625
	4.	10% SDS	25
Krok 2	1.	10% APS	25
	2.	TEMED	5

2.1.8 Příprava elektrodového pufru

Elektrodový pufr byl již připraven dopředu podle návodu. Před vlastní analýzou je potřeba naředit elektrodový pufr s destilovanou vodou v poměru 1:5. Na dva gely potřebujeme roztok, který získáme smícháním 150 ml elektrodového pufru s 950 ml destilované vody. Pro přípravu čtyř gelů je potřeba 200 ml elektrodového pufru a 1000 ml destilované vody

2.1.9 Umístění vzorků a standardů na gel

Po uplynutí doby potřebné ke ztuhnutí gelů, vyjme z licího stojanu licí rám. Skla s gely vyndáme z rámu a po dvojicích umístíme do rámu pro elektroforézu tak, aby směřovaly krátkými skly k sobě. Stojánky se skly umístíme do elektroforetické vany dle barevné příslušnosti, která je označena červenou a černou barvou (červená elektroda na červenou značku). Připraveným naředěným elektrodovým pufrem nejdříve opatrně propláchneme jamky v gelu, následovně naplníme pufrem prostor mezi gely. Následně do příslušných jamek pomocí malé pipety dávkujeme opatrně a plynule 10 μ l vzorku. Po naplnění všech jamek vyjme pipetovací nástavec. Do elektroforetické vany nalijeme naředěný elektrodový pufr po příslušnou rysku. Následně nasadíme na elektroforetickou vanu víko tak, aby souhlasila barevná příslušnost elektrod a vše bylo důkladně propojeno. Připojíme zdroj napětí.

2.1.10 Vlastní elektroforéza

Na zdroji napětí nastavíme příslušné parametry elektroforézy. Hodnotu napětí nastavíme na 110 V a čas na 135 minut. Dobu elektroforézy dle potřeby prodloužit. Jakmile bromfenolová modř opustí gely, stopujeme ještě dalších 20 minut a poté elektroforézu ukončíme. Během elektroforézy je udržováno konstantní napětí, a proto proud nestavujeme. Zdroj si ho vypočítá sám na základě Ohmova zákona. Hodnota proudu závisí na počtech umístěných gelů v elektroforetické vaně. Pro dva gely je na začátku průměrně 21 mA a na konci elektroforézy klesne na průměrnou hodnotu 8 mA. V průběhu elektroforézy si připravíme Petriho misky, které důkladně vyčistíme buničinou namočenou v ethanolu. Misky následně popíšeme pro přehlednější práci s gely.

2.1.11 Postup před inkubací gelu a vlastní inkubace

Po spuštění elektroforézy si připravíme dle návodu 2,5 % Triton X-100, který důkladně rozpustíme v ultrazvukové vaně a následně zchladíme studenou vodou na teplotu 22 °C. Po ukončení elektroforézy sejmeme z elektroforetické vany víko a slijeme elektroodový pufr do odpadu. Poté vyjmeme skla z nástavců. Pro získání gelů skla pomocí plastového otvíráku opatrně oddělíme od sebe a pomocí plastového otvíráku odřízneme jamky, které odstraníme. Opatrně sloupneme jednotlivé gely ze skla do podepsaných Petriho misek. Každý gel zalijeme zhruba 60 ml Tritonu X-100. Poté misky necháme 1 hodinu stát. Následně slijeme Triton X-100 do odpadu. Při slívání se snažíme na gely nesahat. Nakonec na každý gel nalijeme 100 ml inkubačního pufru a necháme gely v termostatu inkubovat minimálně 48 hodin a maximálně 60 hodin při teplotě 37 °C.

2.1.11.1 Barvení a odbarvování gelů

Těsně před ukončením inkubace si připravíme odbarvovací a barvicí roztok podle návodu. Z gelů slijeme inkubační pufr do odpadu a poté na každý gel nalijeme 80 ml odbarvovacího roztoku. Nastříháme celofánové fólie na obdélníky o trochu větší, než je velikost gelu a na celofánové obdélníky nalijeme 10 ml glycerolu a dobře promícháme. Takto připravené celofánové fólie necháme inkubovat 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí 30 minut slijeme odbarvovací roztok do speciálního odpadu a následně na všechny gely nalijeme 60 ml barvicího roztoku a necháme třepat 1 hodinu. Po třepání barvicí roztok slijeme do speciálního odpadu a každý gel v Petriho misce důkladně promícháme s malým množstvím odbarvovacího

roztoku. Ten následně slijeme do speciálního odpadu a na jednotlivé gely nalijeme 60 ml čistého odbarvovacího roztoku smíchaného s 10 ml glycerolu a necháme gely 5 minut. Gely opatrně přesuneme mezi připravené celofánové fólie. Gely osušíme pomocí papírových utěrek a necháme uschnout na čistých papírových utěrkách a gely popíšeme.

2.1.12 Skenování gelů

provádíme co nejdříve po jejich obarvení. Můžeme však skenovat i týden po obarvení. Nejdříve odstraníme bílou desku ze skeneru a poté ho zapneme. V příslušném programu pro skener si nastavíme několik parametrů. Jako nejvhodnější se jeví následující parametry. Zvolíme si Home mode, protože tato varianta nabízí více možností pro skenování. Dále zvolíme Positive film. Následně v nabídce zaškrtneme možnosti 400 dpi, Color Restoration, Digital ICE a Backlight Correction. Poté klikneme na tlačítko Preview, kdy provedeme náhled gelu. Nastavíme gel na správnou orientaci a odstraníme přebytečné pozadí (oříznutím). Pokud gel v náhledu vypadá v pořádku, klikneme na tlačítko Scan. Poté naskenovaný gel exportujeme do naší zvolené složky a uložíme. Může se stát, že jsou gely světlejší, a to nejčastěji, když je skenujeme déle po obarvení. V tomto případě je potřeba na tuto skutečnost reagovat úpravou předešlých parametrů a různě je zkombinovat. Nejčastěji jsme skenovali bez Backlight Correction a Color Restoration. Je také možnost měnit kontrast a jas. Vždy se snažíme, aby proužky na gelu byly co nejzářivější a nejostřejší, aby bylo možné gel vyhodnotit.

2.1.13 Focení gelů

Gely byly vloženy na skleněnou desku pod kterou se nacházel zdroj světla, bylo vyzkoušeno bílé, modré, červené a bílé bodové světlo. Jako nejvhodnější bylo vybráno modré a bílé bodové světlo. Nad deskou se nacházel statim s fotoaparát, který fotil gely. U světla s body jsme použili jako clonu bílý papír.

3 DISKUZE, VÝSLEDKY

Cílem této diplomové práce bylo připravit a optimalizovat postup pro metodu kolagenové zymografie pro pacienty. Většina článků a diplomových prací se zabývá želatinovou zymografií pro MMP-2 a MMP-9. Je velký problém najít ucelený postup kolagenové zymografie, nám se podařilo najít dva články (80, 82), které měly z části postup napsaný, ale i přesto tam některé zásadní věci chyběly např. kolik je potřeba inkubačního roztoku nebo zda je potřeba třepat gel s barvicím roztokem. Z důvodu nedostatečného množství informací jsme využili zkušeností se želatinovou zymografií z předchozí diplomové práce (81). Postupy jsme kombinovali, jak z diplomových prací tak z výše uvedených vědeckých článků.

V dostupné literatuře se nám nepodařilo najít záznam gelu na kterém by byly zobrazeny kolagenázy pocházející z lidského séra nebo plazmy. Námi nalezené referenční hodnoty kolagenáz byly naměřené v lidské sérum nebo plazmě imunochemickou metodou, ale hodnoty změřené kolagenovou zymografií se nám nepodařilo nalézt.

V roce 1998 je poprvé Goglym a et al. (82) publikovaná metoda kolagenové zymografie pro stanovení aktivity MMP-1 a v roce 2017 na tuto práci navazuje práce, která již umožňuje stanovení aktivity nejen u MMP-1, ale i u MMP-8 a MMP-13 (80). Obě tyto publikace se zabírají stanovením kolagenáz v buněčných kulturách.

Dle publikace z roku 2017 (80) byly pro vypracování metody kolagenové zymografie použity tři typy kolagenu. Prvním typem byl kolagen typu I vyextrahovaný z chrupavky z krysího ocasu, druhý byl komerčně koupený kolagen typu I od firmy Sigma-Aldrich a poslední byl také koupený kolagen od stejné firmy, ale byl vyrobený z kuřecí chrupavky. U kolagenu typu II nebyla detekována žádná kolagenázová aktivita. Z publikace vyplývá, že kolagen vyextrahovaný a ne komerčně dostupný vykazoval vyšší citlivost ke kolagenázám než komerčně dostupný kolagen. Ale i přesto je možné u komerčně vyrobeného kolagenu od firmy Sigma-Aldrich kolagenázovou aktivitu detekovat.

Navzdory nízkým hodnotám kolagenáz v lidském séru nebo plazmě jsme se rozhodli pro optimalizaci postupu kolagenové zymografie. Důvody pro uskutečnění této práce byly, že hodnoty pacientů budou mnohem vyšší než u zdravých jedinců a tím i lépe detekovatelné.

3.1 Dělicí gel

U dolního dělicího gelu byl postup uvedený v publikaci (82), jediné co jsme museli udělat, tak bylo přepočítat objemy jednotlivých chemikálií, tak aby byl celkový objem cca. 8 ml. Gel dobře tuhne, má pěknou konzistenci, je bez bublinek a má hladký povrch. U tohoto gelu je dobré při odsávání přebytečných bublinek vývěvou klepat na zkumavku dřevěnou tužkou, čas klepání je cca. 5 minut.

3.2 Zaostrňovací gel

Problém nastal u zaostrňovacího gelu, množství chemikálií v prvním kroku bylo stejné jak v diplomové práci tak i v odborných člancích. V čem se postupy lišily bylo množstvím chemikálií v druhém kroku. Na horní gel jsme vyzkoušeli dvě různé varianty. 1. varianta byla dle publikací (80,82) a druhá dle diplomové práce (81). Varianty viz. tabulka č.5.

VARIANTA č. 1

- Gel netuhl rychle, byla potřeba dlouhá doba než gel ztuhnul.
- Jamky nebyly ostré a hranaté, ale spíše oblé a deformované.

VARIANTA č. 2

- Gel tuhl rychle, z tohoto důvodu je potřeba pracovat rychle, aby nám gel neztuhnul již ve zkumavce a hlavně hned po nalití gelu je potřeba zasunout do gelu hřebínek. Hřebínek odendáváme tehdy, když vidíme, že část gelu ve zkumavce již ztuhla.
- Když vyndáme hřebínek včas jsou jamky obdélníkového tvaru a ostrých kontur. Pokud se ale stane, že nevytáhneme hřebínek včas jsou jamky deformované.

Pokud bychom srovnávali přípravu gelu pro želatinázy a kolagenázy, tak u kolagenáz je potřeba menší množství 10% APS a větší množství TEMEDU.

Tabulka 5 – Postupy přípravy zaostřovacích gelů

Horní gel	Chemikálie:	Varianta č.1 [μl]	Varianta č.2 [μl]
První krok	1. Polyakrylamid	625	625
	2. Destilovaná voda	2800	2800
	3. 0,125 M Tris-HCl	1250	1250
	4. 10% SDS	50	50
Druhý krok	1. 10% APS	250	50
	2. TEMED	3,75	10

3.3 Inkubační roztok

První věcí, kterou musíme udělat předtím než začneme dělat inkubační roztok je pořádně si vypláchnout lahev destilovanou vodou, případně lahev vymýt malým množstvím methanolu. Vyzkoušeli jsme si přípravu dvou inkubačních roztoků (viz. Tabulka č.6)

Tabulka 6 – Postupy na přípravu inkubačních roztoků

Chemikálie		Množství [g]	
Inkubační roztok č.1	Inkubační roztok č.2	Inkubační roztok č.1	Inkubační roztok č.2
TRIS 50 mM	TRIS 50 mM	3,028	3,028
CaCl ₂ 10 mM	CaCl ₂ 10 mM	0,560	0,560
NaCl 50 mM	NaCl 50 mM	1,400	1,400
0,05% BRIJ	0,005% BRIJ	0,250	0,025
Destilovaná voda	Destilovaná voda	500 ml	500 ml

Z těchto dvou variant přípravy inkubačních gelů jsme si vybrali postup č.1. Z důvodu toho, že pokud máme menší koncentraci BRIJE není roztok tak stabilní a nevydrží v lednici po dobu 1 měsíce. Roztok vydržel po dobu pouze několika dnů.

3.4 Postup barvení a odbarvování gelu

Tabulka 7 – Postupy, přípravy barvicího a odbarvovacího roztoku z publikace (80)

Odbarvovací roztok		Barvicí roztok	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Methanol	240 ml	Methanol	100 ml
Kyselina octová	60 ml	Kyselina octová	25 ml
Destilovaná voda	300 ml	Destilovaná voda	125 ml
		Comasie Brilliant Blue	0,75 g

Postup:

- 1) Ke gelu přidáme 80 ml Tritonu X-100 a necháme působit 15 minut. Stejný postup zopakujeme ještě jednou. Odlijeme Triton X-100 a opláchneme gel destilovanou vodou.
- 2) Ke gelu přidáme 80 ml odbarvovacího roztoku a necháme 30 minut působit. Odlijeme odbarvovací roztok a gel opláchneme destilovanou vodou.
- 3) Ke gelu přidáme 60 ml barvicího roztoku a necháme 1 hodinu třepat. Následně odlijeme barvicí roztok.
- 4) Ke gelu přidáme 60 ml odbarvovacího roztoku a necháme 5 minut působit.

Výsledek:

- Gel měl o něco menší velikost než na začátku. Barva gelu byla o něco tmavší, ale ne tak tmavá jako u želatináz. V gelu se nacházely fragmenty kolagenu, které jsme následně zkoušeli odstranit viz níže. U želatináz po tomto postupu byl gel o něco menší a velmi tmavé modré barvy.

Tabulka 8 – Optimalizovaný postup odbarvování

Odbarvovací roztok 1 (na dva gely)		Odbarvovací roztok 2 (na dva gely)	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Methanol	105 ml	Methanol	90 ml
Kyselina octová	30 ml	Kyselina octová	33 ml
Destilovaná voda	165 ml	Destilovaná voda	177 ml

Tabulka 9 – Optimalizovaný postup barvení

Barvicí roztok 1		Barvicí roztok 2	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Methanol	50 ml	Methanol	45 ml
Kyselina octová	2 ml	Kyselina octová	2 ml
Destilovaná voda	68 ml	Destilovaná voda	73 ml
Comasie Brilliant Blue	0,8 g	Comasie Brilliant Blue	0,625 g

S ohledem na nedostatečné výsledky po aplikaci barvicího a odbarvovacího roztoku na gel viz. tabulka č.7 jsme se rozhodli optimalizovat složení těchto roztoků. Při pokusech o optimalizaci složení odbarvovacího a barvicího gelu jsme zjistili, že byl lepší barvicí roztok s větším množstvím barviva. Publikace z roku 2017 (80) dále podporuje toto tvrzení, neboť prokazuje nízkou míru absorpce barviva u daného gelu. Odbarvovací roztok byl lepší č.1, kde nedocházelo ke smršťování gelu.

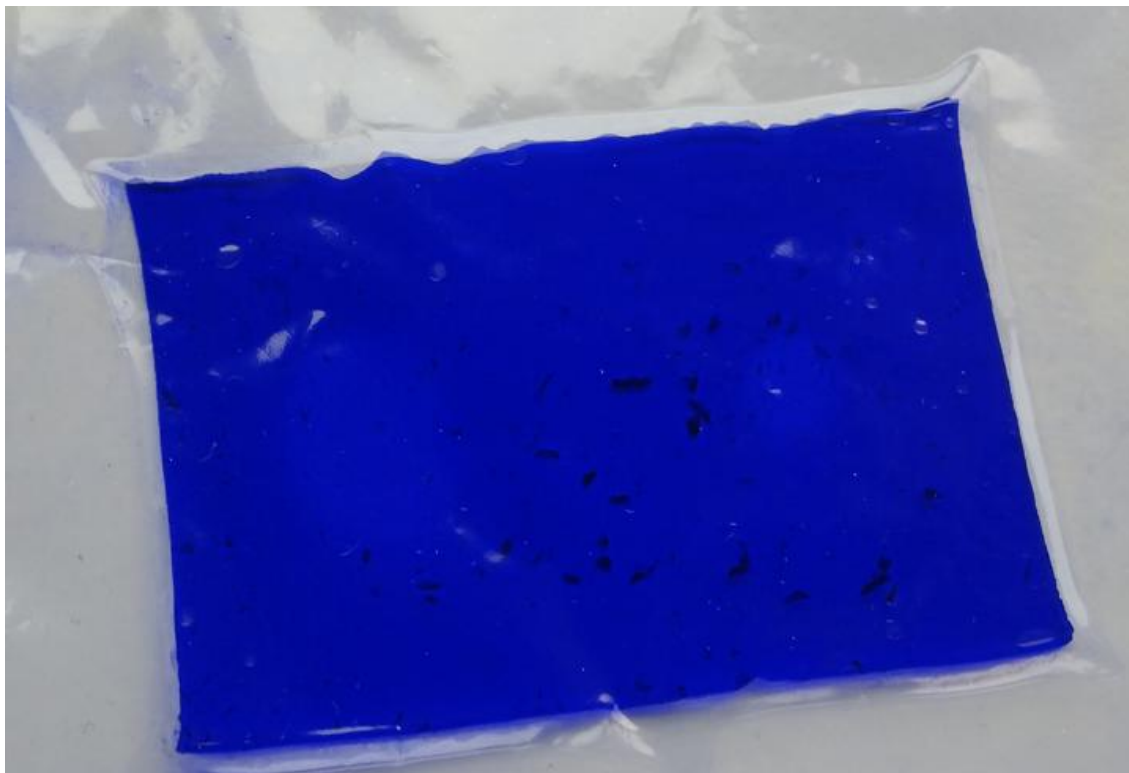
3.5 Zbavení se nerozpustného kolagenu

Zkusily jsme čtyři postupy:

- 1) Inkubace kolagenu při 37°C po dobu 10 minut.
- 2) Inkubace kolagenu při 37°C po dobu 20 minut.
- 3) Inkubace kolagenu při 40°C po dobu 5 minut.
- 4) Bez inkubace

Vzhled gelů:

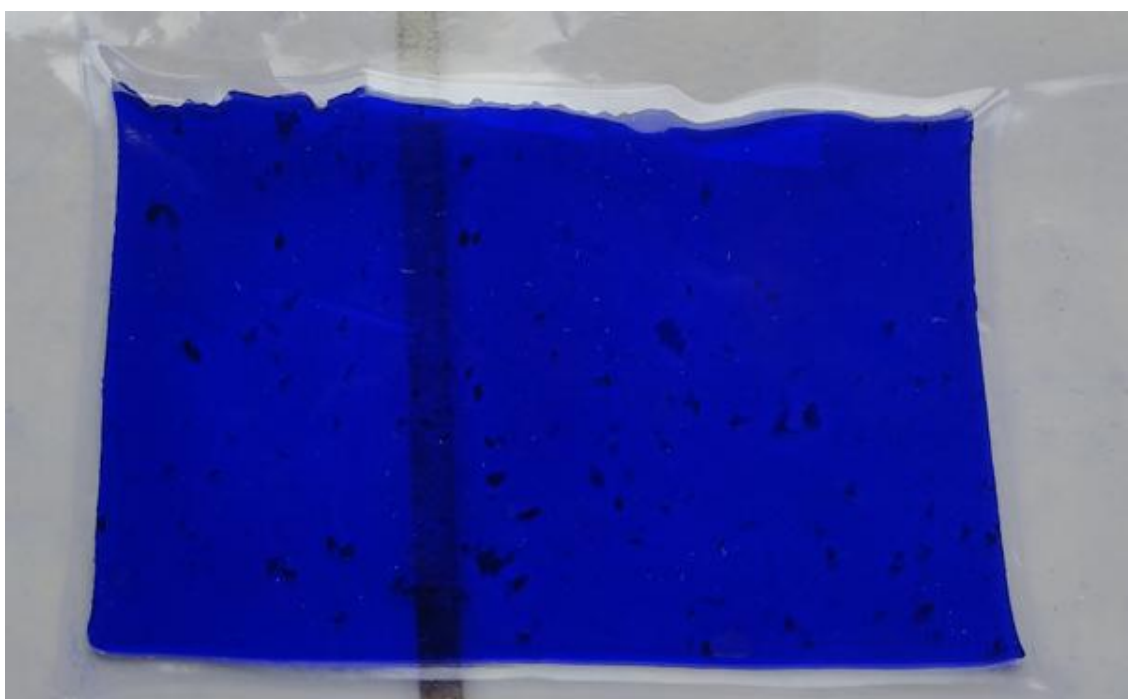
- 1) Na gelu bylo vidět, menší množství fragmentů kolagenu. Gel byl pevný, tuhý a velikost byla stejná (viz. obrázek č.9).
- 2) Na gelu byly vidět drobné fragmenty kolagenu. Gel byl zcela průhledný, pevný a velikost byla stejná.
- 3) Nebyly zde vidět žádné fragmenty kolagenu, gel byl průhledný, málo pevný a trhal se (viz. obrázek č.11).
- 4) Na gelu byly vidět fragmenty kolagenu (viz. obrázek č.10).



Obrázek 9 – Obrázek gelu, kde byl kolagen inkubován při teplotě 37°C po dobu 10 minut



Obrázek 10 – Obrázek gelu, kde nebyl inkubován kolagen



Obrázek 11 – Obrázek gelu, kde byl kolagen inkubován při 40°C po dobu 5 minut

Výsledek:

Za nejlepší postup považujeme nechat kolagen inkubovat při teplotě 37°C po dobu 20 minut. Tento postup jsme praktikovali i nadále při všech dalších pokusech, gely potom už obsahovaly jen minimum větších fragmentů kolagenu. Nadále však na gelech zůstávaly menší fragmenty či drobné shluky barviva a to i po důkladném třepání barvicího roztoku při jeho přípravě. Zdokumentováno to je na kterémkoliv z následujících gelů (obrázky 13-17).

3.6 Použití Tritonu X-100

Byly vyzkoušeny různé varianty pro práci s Tritonem X-100. V odměrném válci bylo odměřeno stanovené množství Tritonu X-100, ke kterému byla přidána destilovaná voda. Baňku s Tritonem X-100 a destilovanou vodou jsme vložili do ultrazvuku, z důvodu, že Triton X-100 není snadno rozpustný v destilované vodě. Po dokončení elektroforézy jsme gel ze sklíček přesunuli do Petriho misky. Do misky jsme nalili 60 ml Tritonu X-100. Pro následný postup s Tritonem X-100 byly využity následné varianty:

- 1) Gel jsme nechali 15 minut v Tritonu X-100, poté jsme z misky vylili Triton X-100 a gel opláchli destilovanou vodou. Tento postup byl opakován dvakrát po sobě.
 - Při tomto postupu na gelu nebyly vidět žádné kolagenázy.
- 2) Gel jsme nechali 15 minut třepat na třepáče v roztoku Tritonu X-100, poté jsme z misky vylili Triton X-100 a gel opláchli destilovanou vodou. Tento postup byl opakován dvakrát po sobě.
 - Při tomto postupu na gelu nebyly vidět žádné kolagenázy.
- 3) Gel jsme nechali jednu hodinu v Tritonu X-100 bez jakéhokoliv třepání. Po hodině byl odlit Triton X-100 z misky.
 - Lepší viditelnost kolagenáz, ale zase jsou vidět na gelu fragmenty.
- 4) Gel jsme nechali jednu hodinu v Tritonu X-100 bez jakéhokoliv třepání. Rozdíl oproti třetí variantě byl v tom, že Triton X-100 byl ochlazen na teplotu 22°C. Po hodině byl odlit Triton X-100 z misky.
 - Lepší viditelnost kolagenáz a na gelu nejsou vidět fragmenty. Tento postup hodnotíme jako optimální.

3.7 Vzorkový pufr a vzorek

Vyzkoušeli jsme tři možnosti přípravy vzorkového pufru:

- 1) Varianta z publikace z roku 1998 (82)
 - Vzorkový pufr se skládal z:
 - 1 M Tris-HCl o pH 6,8
 - 50% glycerol
 - 0,4% bromfenolová modř
- 2) Varianta z novější publikace z roku 2017 (80)
 - Vzorkový pufr se skládal z:
 - 0,625 M Tris-HCl o pH 6,8
 - 20% glycerolu
 - 4% SDS
 - 0,004% bromfelové modři
- 3) Dle DP Kateřiny Baudyšové (81)
 - Vzorkový pufr se skládal z:

○ 0,5 M Tris-HCl	1 ml
○ Glycerol	0,8 ml
○ 10% SDS	3,2 ml
○ Destilovaná voda	2,8 ml
○ 2% bromfenolová modř	0,2 ml

V prvních dvou variantách bylo velmi malé množství bromfenolové modři. Při elektroforéze nebylo vidět putování vzorku, z tohoto důvodu jsme použili variantu č.3, ve které bylo větší množství bromfenolové modři a vzorek byl tak vidět v jaké části se na gelu nachází. Bylo vyzkoušeno ředění vzorku se vzorkovým pufrem v poměru 1:16, které je dle předchozí DP optimální pro želatinázy (81). U stanovení kolagenáz na gelu nebylo nic vidět z důvodu, že želatinázy jsou zastoupeny v séru ve větší koncentraci než kolagenázy, viz. tabulka č.10. Proto jsme ředili vzorek se vzorkovým pufrem v poměru 1:1 nebo 1:2.

Tabulka 10 – Hodnoty MMP-8 a MMP-9 v séru a plazmě (83)

	Sérum (ng/l)	Plazma (ng/l)
MMP-8 (kolagenáza)	5,2 - 39	1,5 – 3,5
MMP-9 (želatináza)	275 - 1049	38 - 107

3.8 Zkušební postup kolagenové zymografie 1

Pro zdokumentování jakým způsobem se vývoj metody ubíral, uvádíme nyní dva příklady pracovních postupů a k nim i příslušné gely. Postupy byly vybrány tak, že první uvedený je zároveň jedním z prvních testovaných postupů a druhý je zároveň posledním testovaným pokusem.

U prvního postupu jsme testovali řadu základních parametrů, např. ředění vzorků, potřebnou dobu elektroforézy, různé způsoby barvení a odbarvování gelů.

Napipetovali do jamek na gely vzorky pacienta s kardiovaskulárním onemocněním a vzorky dobrovolného dárce (DD). Tyto vzorky byly nejprve smíchány se vzorkovým pufrům v poměru 1:1 a 1:2 a poté byla polovina vzorků inkubována při 25°C po dobu 2 hodin. Poté byly napipetovány na gely v pořadí viz. tabulka č.11.

Tabulka 11 – Umístění, poměry a inkubace pipetovaných vzorků kardiaka a dobrovolného dárce na gelu

Pozice	Poměr (vzorek : vzorkový pufr)	Vzorek
1.	1:1	DD - neinkubováno
2.	1:1	DD – inkubováno
3.	1:1	DD – inkubováno
4.	1:2	DD – neinkubováno
5.	1:2	DD – inkubováno
6.	1:1	Pacient – neinkubováno
7.	1:1	Pacient - inkubováno
8.	1:1	Pacient - inkubováno
9.	1:2	Pacient – neinkubováno
10.	1:2	– inkubováno

Provedli jsme elektroforézu u dvou gelů, podmínky elektroforézy:

- 110 V
- Doba trvání 135 minut
- Před i po elektroforéze měl elektroforetický pufr laboratorní teplotu (22 °C)

Dalším krokem je zalití gelu Tritonem X-100. Do Petriho misek vložíme gel, který zalijeme 60 ml Tritonu X-100, jehož teplota je mezi 25-26 °C, a necháme 1 hodinu stát bez jakéhokoliv pohybu. Po hodině vylijeme z Petriho misky všechnen Triton X-100 a promyjeme gel destilovanou vodou, které poté vylijeme do odpadu. Do Petriho misky přidáme 100 ml inkubačního pufru a misku dáme do termostatu na dobu 60 hodin. Teplota termostatu je nastavena na 38 °C. Po vyndání z termostatu následuje: odbarvení, barvení a odbarvování, viz. tabulka č. 12.

Tabulka 12 – Postup odbarvování, barvení a odbarvování gelů

	Gel 1	Gel 2
Odbarvování	Doba: 30 minut Množství: 80 ml odbarvovacího roztoku	Doba: 30 minut Množství: 80 ml odbarvovacího roztoku
Barvení	Doba: 60 minut Po celou dobu třepáno na třepačce Množství: 60 ml	Doba: 60 minut Po celou dobu bez třepání Množství: 60 ml
Odbarvování	Doba: 5 minut Necháme stát Množství: 60 ml odbarvovacího roztoku + 10 ml glycerolu	Doba: 5 minut po celou dobu pomalé krouživé pohyby Množství: 60 ml odbarvovacího roztoku + 10 ml glycerolu

3.9 Zkušební postup kolagenové zymografie 2

Do prvního a druhého dělicího gelu jsme dali o 30 % více kolagenu než do třetího gelu, který obsahoval kolagenu standardní množství používané v ostatních gelech v celé práci (viz. tabulka 3). Testovali jsme i vliv významného prodloužení doby elektroforézy, různé způsoby barvení a odbarvení gelů. Elektrodotový pufr byl před elektroforézou ochlazen na 11°C.

Před elektroforézou jsme napipetovali do jamek na gely vzorky kardiaka a vzorky DD. Tyto vzorky byly nejprve smíchány se vzorkovým puffrem v poměru 1:2 a poté byla polovina vzorků inkubována při 25°C po dobu 2 hodin. Poté byly napipetovány na gely v pořadí viz. tabulka č.13.

Tabulka 13 – Umístění, poměry a inkubace pipetovaných vzorků kardiaka a dobrovolného dárce na gelu

Pozice	Množství (μl)	Poměr (vzorek : vzorkový pufr)	Vzorek
1.	10	1:2	DD - inkubováno
2.	10	1:2	Pacient – inkubováno
3.	15	1:2	DD – inkubováno
4.	15	1:2	Pacient – inkubováno
5.	10	1:2	DD – inkubováno
6.	15	1:2	Pacient – inkubováno
7.	10	1:2	Pacient - inkubováno
8.	10	1:2	DD - inkubováno
9.	10		Albumin (70 g/l)
10.	10		Albumin (70 g/l)

Provedli jsme elektroforézu u tří gelů, podmínky elektroforézy:

- **1 a 2 gel:**
 - 110 V
 - 305 minut
 - Teplota 11°C
- **3 gel**
 - 110 V
 - 175 minut
 - Teplota nejdříve 6°C na konci kolem 11°C

Dalším krokem je zalití gelu Tritonem X-100. Do Petriho misek vložíme gel, který zalijeme 60 ml Tritonu X-100, tento roztok jsme ochlazovali na teplotu 22 °C, a necháme 1 hodinu stát bez jakéhokoliv pohybu. Po hodině vylijeme z Petriho misky všechnu Triton X-100 a promyjeme gel destilovanou vodou, které poté vylijeme do odpadu. Do Petriho misky přidáme 100 ml inkubačního pufru a misku dáme do termostatu na cca. 60 hodin. Teplota termostatu je nastavena na 38 °C. Po vyndání z termostatu následuje: odbarvení, barvení a odbarvování, viz. tabulka č. 14.

Tabulka 14 – Postup odbarvování, barvení a odbarvování gelů

	Gely 1,2	Gel 3
Odbarvování	Doba: 30 minut Množství: 80 ml odbarvovacího roztoku	Doba: 30 minut Množství: 80 ml odbarvovacího roztoku
Barvení	Doba: 60 minut bez třepání Množství: 60 ml	Doba: 60 minut 35 minut mírného třepání a 25 minut bez třepání Množství: 60 ml
Odbarvování	Doba: 5 minut S krouživým pohybem Množství: 60 ml odbarvovacího roztoku + 10 ml glycerolu	Doba: 5 minut Necháme stát Množství: 60 ml odbarvovacího roztoku + 10 ml glycerolu

3.10 Dokumentace pomocí gelů

Druhý pokus lze zároveň považovat za nejúspěšnější ze všech provedených pokusů. Na obrázku č.12 je vidět, že v tomto případě vzorek migroval větší vzdálenost ve srovnání s ostatními analyzovanými gely. Na tomto konkrétním gelu probíhala elektroforéza po dobu 305 minut za použití chlazeného elektrodového pufru. Z toho vyplývá, že zvýšením doby trvání elektroforézy zvýšíme významně vzdálenost doputování vzorku. Použití chlazeného elektrodového pufru během elektroforézy vedlo k zřetelnější vizualizaci bandů ve srovnání s gely, u kterých chlazení nebylo aplikováno. Zároveň je možné pozorovat projasnění téměř ve všech jamkách nedaleko startu nad modrým bandem, který je na tomto gelu nejdále ze všech prezentovaných gelů. Tento band odpovídá dle našeho názoru obarvení částečně naštěpeného kolagenu. Při nízké aktivitě kolagenázy a zároveň dostatečně vysoké koncentraci kolagenu v gelu, může dojít pouze k částečnému naštěpení a protože zbylý kolagen v takovém místě dál zůstává, obarví se. Podobně jako např. albumin. V tomto místě byla po inkubaci vždy jasně viditelná enzymatická aktivita, která se objevovala až 12 hodin po začátku inkubace a to v podobě bílého pruhu na gelu. Podobný pruh byl viditelný na gelech s želatinázami (81). Tam však proběhlo úplné naštěpení želatiny a výsledkem byly jasně zářící bandy.

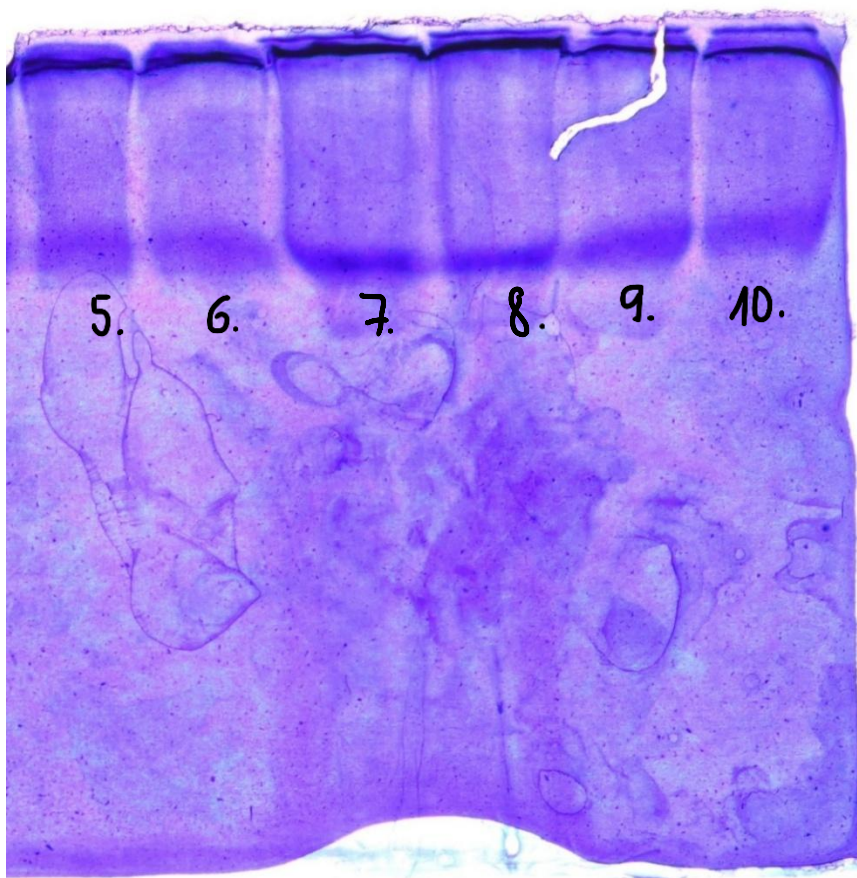
Na výstřižku gelu viz. obrázek č.13 byl u třetí jamky zprava vidět náznak „projasnění“ a to jednak při barvení a i při nafocení, je vidět náznak zbělení nad modrými bandy. Tento gel byl získán pokusem 1. Stejně jako obrázky č. 14 a 15.

Na obrázku č.14 a č.15 je vidět jeden gel vyfocený pod modrým světlem a bílým bodovým světlem. Na tomto gelu jsou zřetelně vizualizovány spodní modré bandy. V jamkách 1, 2, 3, 6, 7 a 8 byly vzorky aplikovány v poměru 1:2 (vzorek : pufr), přičemž v těchto pozicích je pozorována vyšší intenzita proteinových bandů ve srovnání s jamkami 4 a 5. V jamkách 4 a 5 jsou proteinové bandy detekovatelné s výrazně nižší intenzitou. Na základě těchto pozorování byl v následujících experimentech používán poměr vzorku k pufru 1:2.

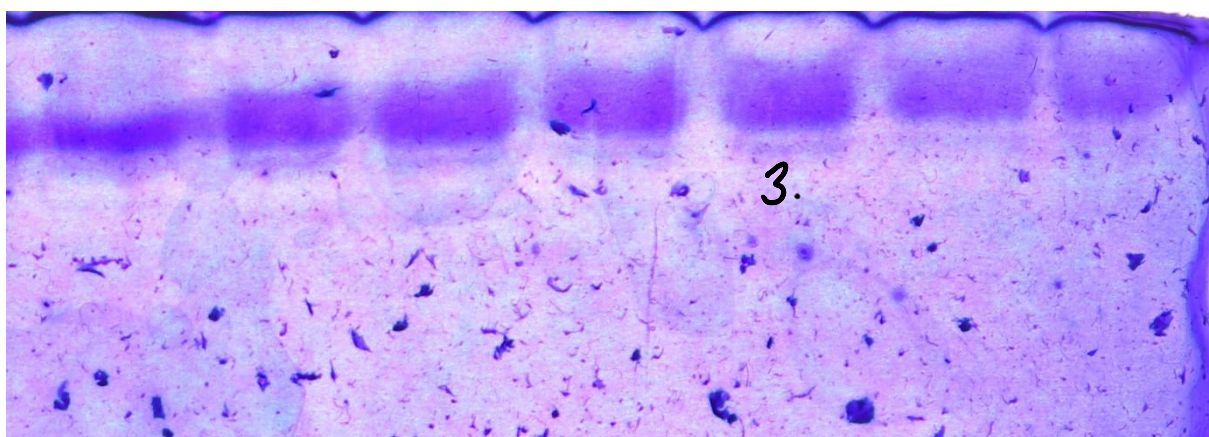
Na obrázku č.16 a č.17 je vidět stejný gel pod modrým a bodovým bílým světlem, který byl připraven v souladu s postupem kolagenové zymografie č. 2. Jen je doba elektroforézy kratší. Na tomto gelu je v jamkách 9 a 10 detekován albumin, který slouží jako referenční marker pro identifikaci metaloproteináz. Téměř neznatelné projasnění mezi proteinovými bandy na startu téměř ve stejné úrovni jako je band albuminu, je předběžně identifikováno jako MMP-8, zatímco mírně svítící bandy pod albuminem indikují přítomnost MMP-1 nebo MMP-13. K následné přesnější identifikaci se přistupuje na základě stanovení relativní molekulové hmotnosti. Tento krok je limitován vysokou podobností molekulových hmotností kolagenáz, což komplikuje jejich jednoznačnou identifikaci.

Na gelu jsou dále vizualizovány modře zbarvené bandy v dolní části, které indikují přítomnost nedostatečně štěpeného kolagenu. Na přítomnost kolagenáz v oblasti projasnění a modrého bandu usuzujeme podle pozice albuminu na gelu, který má vyšší molekulovou hmotnost. Želatinázy, které by dokázaly kolagen také do určité míry naštěpit, ikdyž to není jejich preferenční substrát, mají molekulovou hmotnost vyšší než albumin. Výjimkou je jen MMP-8, která byla téměř neznatelná.

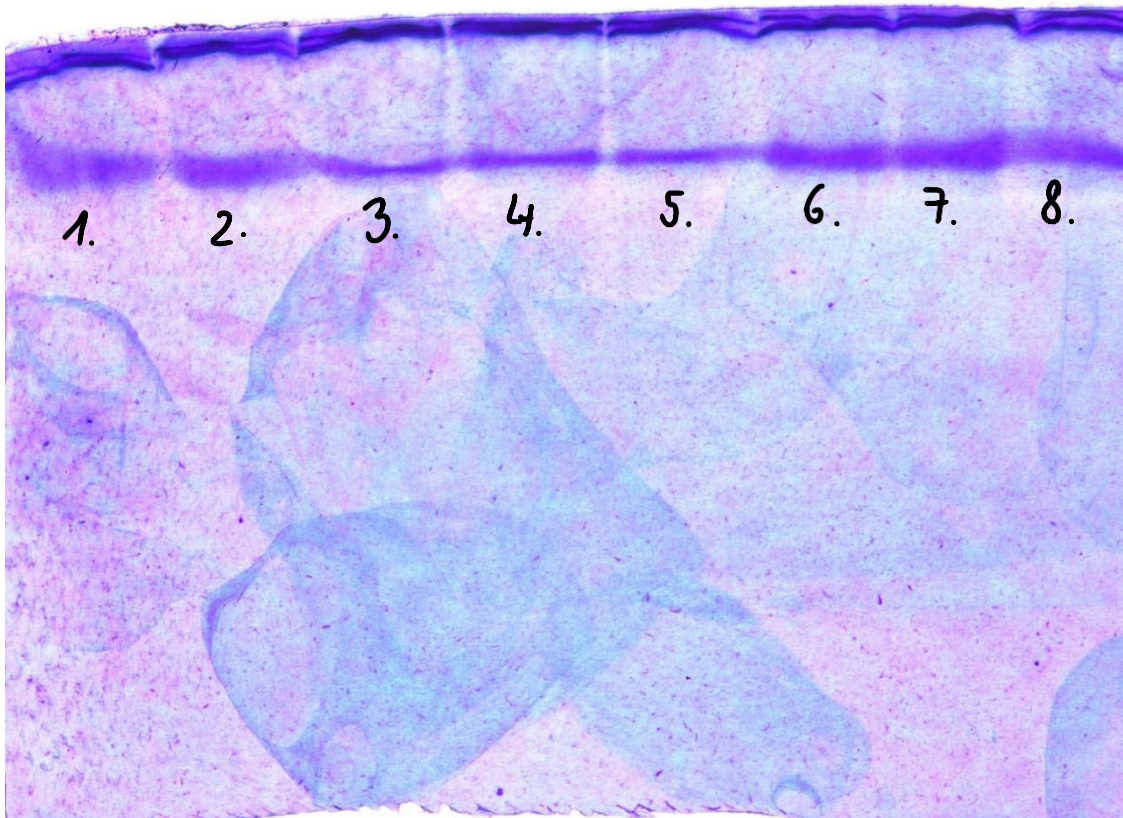
Na obrázku číslo 18. je prezentován zymogram převzatý z publikace (84). Vizualizace tohoto zymogramu demonstruje omezenou migraci vzorku na gelu, což bylo pozorováno i v našich experimentech.



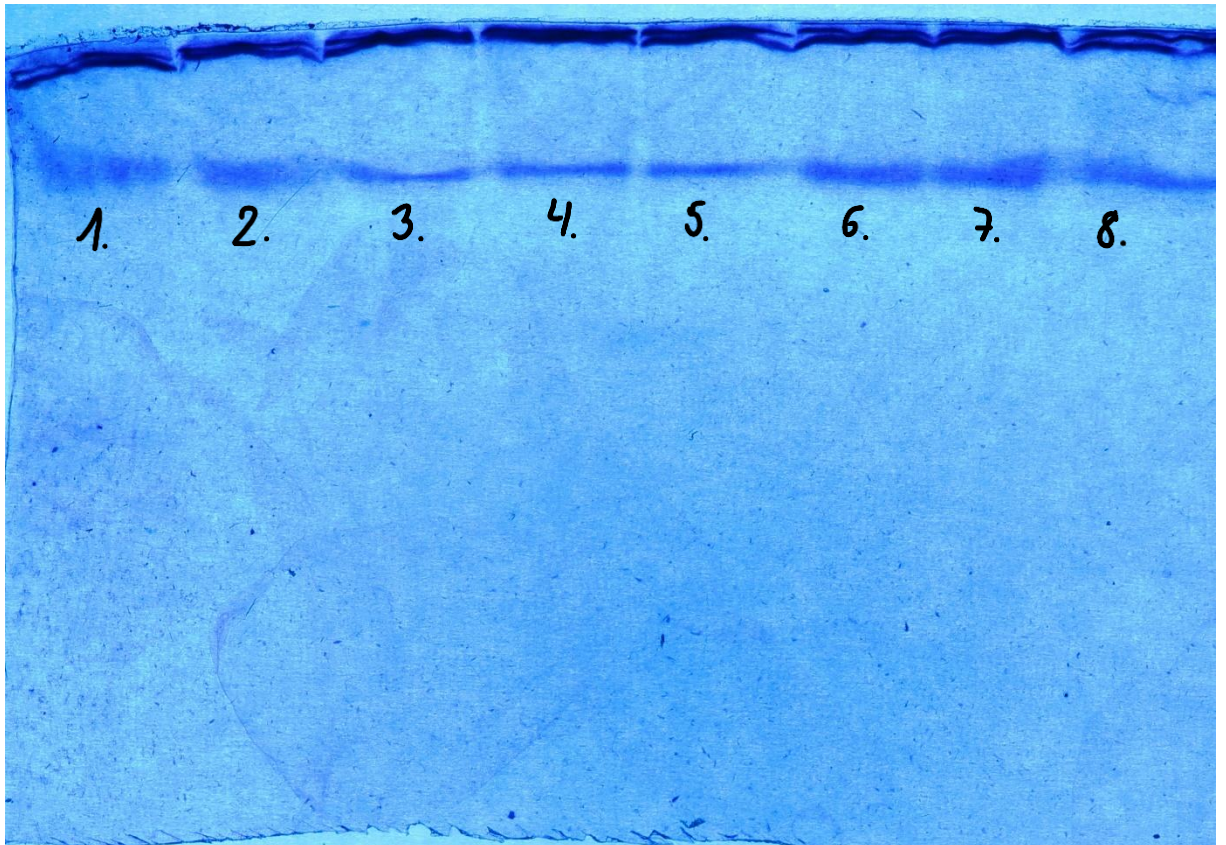
Obrázek 12 – 3. Gel pod bodovým bílým světlem z pokusu kolagenové zymografie č.2



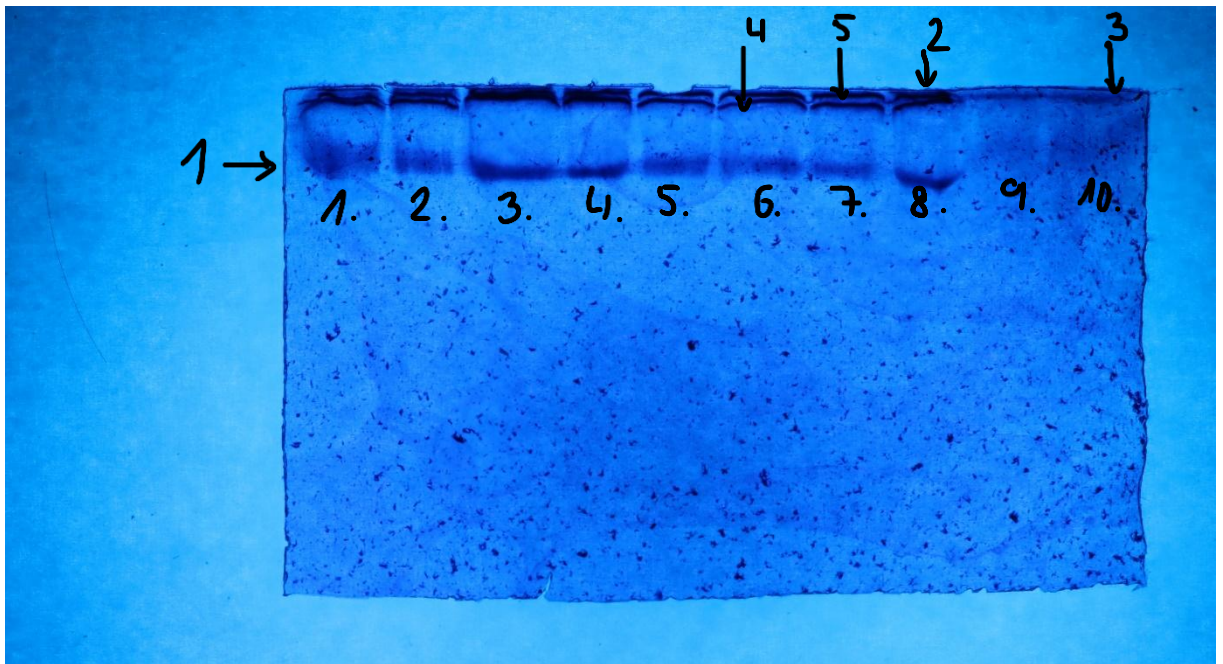
Obrázek 13 – Výstřižek gelu pod bodovým bílým světlem z pokusu kolagenové zymografie č. 1, v pozici tři bylo během barvení a i po nafocení gelu viditelné „projasnění“ nedaleko od startu, nad širokým modrým bandem.



Obrázek 14 – Gel pod bodovým bílým světlem z pokusu kolagenové zymografie č.1



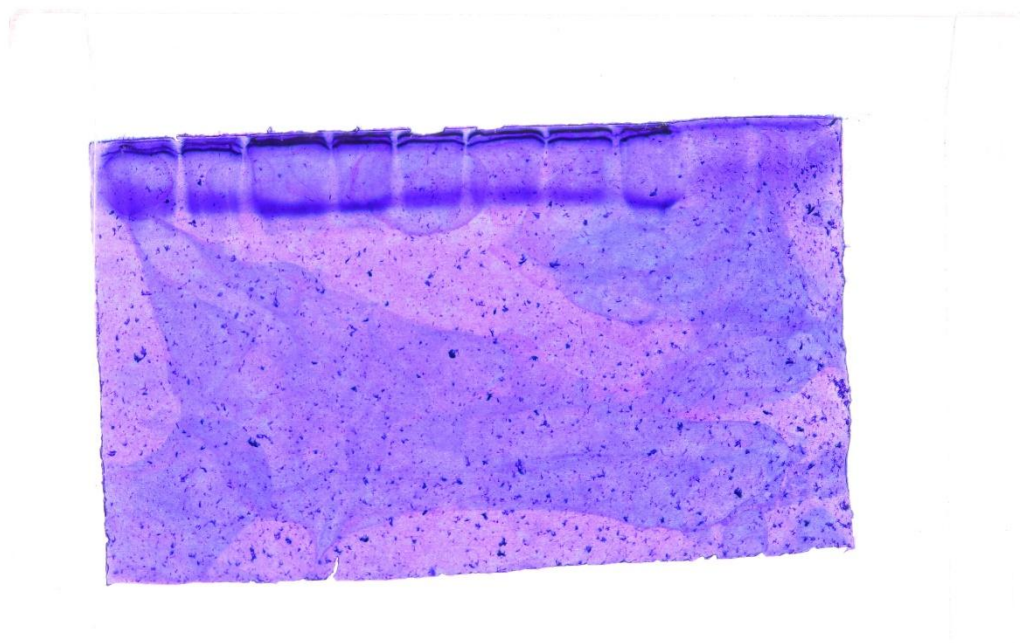
Obrázek 15 – Gel pod modrým světlem z pokusu kolagenové zymografie č.1



Obrázek 16 – Gel pod modrým světlem, z pokusu kolagenové zymografie č.2

Vysvětlivky pro obrázek č. 16.

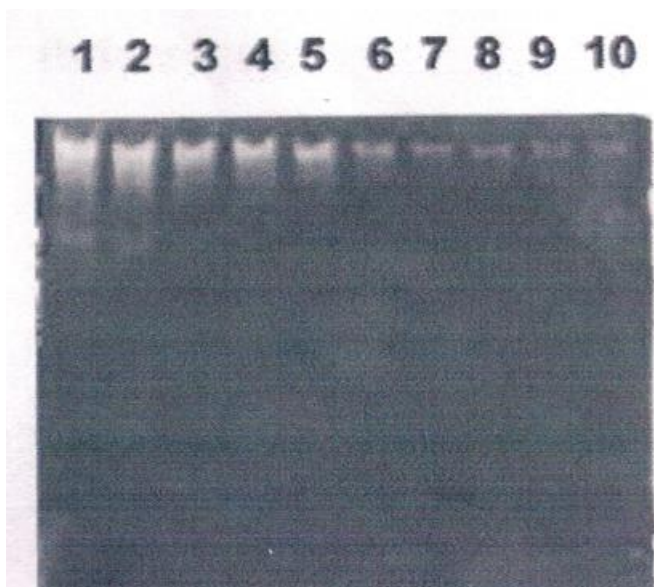
- 1 – Modrý band – nedostatečně naštípaný kolagen
- 2 – pravděpodobně MMP-8
- 3 – Albumin
- 4 – pravděpodobně MMP-1 nebo MMP-13
- 1. – 10. – pozice jamek na gelu



Obrázek 17 – Gel pod bodovým bílým světlem se clonou, z pokusu kolagenové zymografie č. 2

Tabulka 15 – Molekulové hmotnosti jednotlivých kolagenáz (80)

Molekulová hmotnost kDa	Příslušná kolagenáza
60	MMP-1
57	MMP-8
59	MMP-13



Obrázek 18 – Kolagenázový zymogram převzato z: (84)

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo aplikovat metodu kolagenové zymografie v laboratorní praxi a prokázat přítomnost matrixových metaloproteináz (MMP-1, MMP-8, MMP-13) schopných degradovat kolagen. Navzdory absenci detailního a uceleného protokolu pro kolagenovou zymografii v dostupné literatuře, jsme se pokusili sestavit funkční postup na základě informací z vědeckých článků a předešlé diplomové práce, která se zabývala želatinovou zymografií.

Klíčovým výsledkem naší práce bylo kvalitativní potvrzení přítomnosti kolagenáz v analyzovaných vzorcích, což dokazuje, že tyto enzymy jsou schopné štěpit kolagenový gel připravený v našich experimentálních podmínkách. Na obrázku č.16, je detekován albumin jako marker pro identifikaci MMP-8 (nad albuminem) a MMP-1/13 (pod albuminem), přičemž přesná identifikace je komplikována podobnou molekulovou hmotností kolagenáz a gel dále vykazuje svítící body a modré bandy indikující nenaštěpený kolagen.

Během realizace experimentů jsme narazili na několik překážek. Jednou z hlavních překážek byla omezená dostupnost vhodného typu kolagenu. Pro budoucí výzkum by bylo dobré vyzkoušet kolagen jiného typu. Nejlepší možností by byla extrakce kolagenu z myších ocásků, což by zajistilo konzistentnější a potenciálně nákladově efektivnější zdroj materiálu.

Dalším faktorem ovlivňujícím kvalitu výsledků byla absence chladicího zařízení pro elektroodvzdušňovač během elektroforézy. Naše pozorování naznačují, že udržování nízké teploty (konkrétně 11 °C) vedlo k lepší vizualizaci enzymatických bandů na gelu, což zdůrazňuje význam optimalizace podmínek elektroforézy pro dosažení spolehlivějších výsledků.

Pro další rozvoj a zpřesnění metody kolagenové zymografie doporučujeme zvážit několik směrů výzkumu. Jednou z možností je přechod k analýze pouze tkáňových vzorků namísto séra či plazmy, což by mohlo poskytnout relevantnější informace o lokální proteolytické aktivitě. Alternativně by mohlo být přínosné pokusit se o zakoncentrování analyzovaných vzorků s cílem dosáhnout vyšších koncentrací kolagenáz. K tomuto by bylo možné využít metodu mikroextrakce z vodné fáze. Jedná se o moderní a relativně jednoduchou techniku

mikroextrakce, která se stává stále populárnější v oblasti přípravy vzorků pro různé analytické metody.

Naše práce představuje první krok k zavedení kolagenové zymografie v našich laboratorních podmínkách. Do budoucna by tato metodologie mohla sloužit jako orientační nástroj pro detekci změn v koncentraci kolagenáz, neboť u pacientů se předpokládají vyšší hladiny těchto enzymů v porovnání se zdravými jedinci. Výsledky by v tomto případě byly hodnoceny kvalitativně, jako zvýšená či snížená přítomnost kolagenáz. Dále by bylo možné pokusit se provést semikvantitativní analýzu intenzity modrých bandů, což by potenciálně umožnilo další úroveň hodnocení.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Gersh I & Catchpole H R. „The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth," Amer. J. Anat. 85:457-521, 1949.
2. Gross J, Lapiere CM. COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY*. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. červen 1962 [citován 13. březem 2025];48(6):1014–22. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC220898/>.
3. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. Cells [Internet]. 26. duben 2020 [citován 14. duben 2025];9(5):1076. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1076>.
4. Historie matrixových metaloproteináz: milníky, mýty a mylné představy [Internet]. [citován 13. březem 2025]. Dostupné z: <https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/ajpheart.00577.2012>.
5. Cui N, Hu M, et al. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Prog Mol Biol Transl Sci [Internet]. 2017 [citován 13. březem 2025];147:1–73. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5430303/>.
6. Nagase H, Fushimi K. Elucidating the Function of Non catalytic Domains of Collagenases and Aggrecanases. Connect Tissue Res [Internet]. leden 2008 [citován 15. duben 2025];49(3–4):169–74. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03008200802151698>.
7. Mohd Dom TN, Ayob R, et al. National Economic Burden Associated with Management of Periodontitis in Malaysia. Int J Dent [Internet]. 2016 [citován 15. duben 2025];2016:1–6. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijd/2016/1891074/>.
8. Hannas AR, Pereira JC, et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol Scand [Internet]. leden 2007 [citován 15. duben 2025];65(1):1–13. Dostupné z: <https://medicaljournalsweden.se/actaodontologica/article/view/38397>.
9. Li W, Zhu Y, et al. P. Association of Common Variants in MMPs with Periodontitis Risk. Dis Markers [Internet]. 2016 [citován 15. duben 2025];2016:1–20. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2016/1545974/>.
10. Ye S. Putative targeting of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. Pharmacol Ther [Internet]. březem 2015 [citován 15. duben 2025];147:111–22. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725814002071>.
11. Yamamoto K, Okano H, et al. MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1. Matrix Biol [Internet]. prosinec 2016 [citován 15. duben 2025];56:57–73. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X16300312>.

12. MMP-1 Protein Overview | Sino Biological [Internet]. [citován 3. květen 2025]. Dostupné z: <https://kr.sinobiological.com/resource/mmp1/proteins>.
13. Mittal R, Patel AP, et al. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol* [Internet]. 2016 [citován 13. březem 2025];231(12):2599–621. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.25430>.
14. Ayuk SM, Abrahamse H, et al. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016 [citován 13. březem 2025];2016:2897656. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4893587/>.
15. Chen X, Thibeault SL. Role of TNF- α in Wound Repair in Human Vocal Fold Fibroblasts. *The Laryngoscope* [Internet]. září 2010 [citován 13. březem 2025];120(9):1819–25. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965638/>.
16. Nam SI, Yu GI, et al. A polymorphism at -1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased risk of sudden deafness in korean population but not at -519A/G in MMP-1. *The Laryngoscope* [Internet]. 2011 [citován 13. březem 2025];121(1):171–8. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lary.21334>.
17. Rahmani-Neishaboer E, Hartwell R, et al. Localized controlled release of stratifin reduces implantation-induced dermal fibrosis. *Acta Biomater* [Internet]. 1. říjen 2012 [citován 13. březem 2025];8(10):3660–8. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112002826>.
18. Wada Y, Shimada K, et al. Nový inhibitor proteinkinázy p38 aktivovaný mitogenem R-130823 chrání chrupavku tím, že snižuje produkci matricové metaloproteinázy-1,-13 a prostaglandinu E2 v lidských chondrocytech. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 1. únor 2006 [citován 13. březem 2025];6(2):144–55. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576905002092>.
19. Shimizu Y, Kondo S, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer. *Auris Nasus Larynx*. září 2008;35(3):381–9.
20. Mizrachi A, Koren R, et al J. Expression of MMP-1 in invasive well-differentiated thyroid carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. leden 2011;268(1):131–5.
21. Xu J, Murphy SL, et al. Úmrtí: konečné údaje za rok 2013. [citován 15. duben 2025]; Dostupné z: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/38255>.
22. Chang J, Stanfill A, et al. The Role of Matrix Metalloproteinase Polymorphisms in Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* [Internet]. 12. srpen 2016 [citován 14. březem 2025];17(8):1323. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/8/1323>.
23. Kwon Y, Norby FL, et al. Association of Smoking, Alcohol, and Obesity with Cardiovascular Death and Ischemic Stroke in Atrial Fibrillation: The Atherosclerosis Risk

in Communities (ARIC) Study and Cardiovascular Health Study (CHS). Taniyama Y, editor. PLOS ONE [Internet]. 12. leden 2016 [citován 15. duben 2025];11(1):e0147065. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0147065>.

24. Manka SW, Carafoli F, et al. Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 31. červenec 2012 [citován 14. březem 2025];109(31):12461–6. Dostupné z: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1204991109>.
25. Chehaibi K, Hrira MY, et al. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population. *J Neurol Sci* [Internet]. červenec 2014 [citován 15. duben 2025];342(1–2):107–13. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X1400272X>.
26. Nakaji K, Ihara M, et al. Matrix Metalloproteinase-2 Plays a Critical Role in the Pathogenesis of White Matter Lesions After Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rodents. *Stroke* [Internet]. listopad 2006 [citován 15. duben 2025];37(11):2816–23. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.0000244808.17972.55>.
27. Siemianowicz K. The Role of Metalloproteinases in the Development of Aneurysm. In: *Aneurysm* [Internet]. IntechOpen; 2012 [citován 2. květen 2025]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/38629>.
28. MMP8. In: *Wikipedia* [Internet]. 2024 [citován 9. duben 2025]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=MMP8&oldid=1249059262>.
29. Baidya SK, Banerjee S, et al. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and its inhibitors: A minireview. *Eur J Med Chem Rep* [Internet]. 1. duben 2024 [citován 2. květen 2025];10:100130. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772417424000025>.
30. Tallant C, Marrero A, et al. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* [Internet]. leden 2010 [citován 14. březem 2025];1803(1):20–8. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488909000998>.
31. Cheng J, Sauthoff H, et al. Human Matrix Metalloproteinase-8 Gene Delivery Increases the Oncolytic Activity of a Replicating Adenovirus. *Mol Ther* [Internet]. listopad 2007 [citován 14. březem 2025];15(11):1982–90. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001616326612>.
32. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem* [Internet]. 1. listopad 2016 [citován 14. březem 2025];31(sup1):177–83. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620>.
33. Sulkala M, Tervahartiala T, et al. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* [Internet]. únor 2007 [citován 14. březem 2025];52(2):121–7. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996906002354>.

34. Seizer P, May AE. Platelets and matrix metalloproteinases. *Thromb Haemost* [Internet]. 2013 [citován 14. březem 2025];110(11):903–9. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH13-02-0113>.
35. García-Irigoyen O, Latasa MU, et al. Matrix metalloproteinase 10 contributes to hepatocarcinogenesis in a novel crosstalk with the stromal derived factor 1/C-X-C chemokine receptor 4 axis. *Hepatology* [Internet]. 2015 [citován 14. březem 2025];62(1):166–78. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.27798>.
36. Laxton RC, Hu Y, et al. A Role of Matrix Metalloproteinase-8 in Atherosclerosis. *Circ Res* [Internet]. 23. říjen 2009 [citován 14. březem 2025];105(9):921–9. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.109.200279>.
37. Matrix metalloproteinase 13. In: Wikipedia [Internet]. 2024 [citován 9. dubem 2025]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Matrix_metalloproteinase_13&oldid=1228257636.
38. Dalvie D, Cosker T, et al. Metabolism Distribution and Excretion of a Matrix Metalloproteinase-13 Inhibitor, 4-[4-(4-Fluorophenoxy)-benzenesulfonylamino]tetrahydropyran-4-carboxylic Acid Hydroxyamide (CP-544439), in Rats and Dogs: Assessment of the Metabolic Profile of CP-544439 in Plasma and Urine of Humans. *Drug Metab Dispos* [Internet]. září 2008 [citován 14. březem 2025];36(9):1869–83. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090955624017884>.
39. Wang G, Zhang Y, et al. MicroRNA-411 inhibited matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes. *Am J Transl Res* [Internet]. 15. říjen 2015 [citován 14. březem 2025];7(10):2000–6. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656776/>.
40. Yu H, Li Y, et al. A low ratio of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids suppresses matrix metalloproteinase 13 expression and reduces adjuvant-induced arthritis in rats. *Nutr Res* [Internet]. prosinec 2015 [citován 14. březem 2025];35(12):1113–21. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531715002328>.
41. Mashimo Y, Sakurai-Yageta, et al. Induction of the Matrix Metalloproteinase 13 Gene in Bronchial Epithelial Cells by Interferon and Identification of its Novel Functional Polymorphism. *Inflammation* [Internet]. 4. prosinec 2015 [citován 14. březem 2025]; Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-015-0291-1>.
42. Abe H, Kamimura K, et al. Effective Prevention of Liver Fibrosis by Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery of Matrix Metalloproteinase-13 in a Rat Liver Fibrosis Model. *Mol Ther - Nucleic Acids* [Internet]. 2016 [citován 14. březem 2025];5:e276. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2162253117300057>.
43. You Y, Shan Y, et al. Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Cancer Sci* [Internet]. prosinec 2015 [citován 14. březem 2025];106(12):1669–77. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cas.12818>.

44. Justus CR, Marie MA, et al. Transwell In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. In: Friedrich O, Gilbert DF, editoři. Cell Viability Assays [Internet]. New York, NY: Springer US; 2023 [citován 15. duben 2025]. s. 349–59. (Methods in Molecular Biology; roč. 2644). Dostupné z: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-3052-5_22.
45. Kramer N, Walzl A, et al. In vitro cell migration and invasion assays. Mutat Res Mutat Res [Internet]. leden 2013 [citován 15. duben 2025];752(1):10–24. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574212000464>.
46. Tonge D, Zhu N, et al. Axonal growth towards *Xenopus* skin *in vitro* is mediated by matrix metalloproteinase activity. Eur J Neurosci [Internet]. únor 2013 [citován 14. březen 2025];37(4):519–31. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.12075>.
47. rakovina | Velký lékařský slovník On-Line [Internet]. [citován 14. březen 2025]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/pojem/rakovina>.
48. Ahmad AS, Ormiston-Smith N, et al. Trends in the lifetime risk of developing cancer in Great Britain: comparison of risk for those born from 1930 to 1960. Br J Cancer [Internet]. březen 2015 [citován 15. duben 2025];112(5):943–7. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/bjc2014606>.
49. Wild CP. The global cancer burden: necessity is the mother of prevention. Nat Rev Cancer [Internet]. březen 2019 [citován 15. duben 2025];19(3):123–4. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41568-019-0110-3>.
50. Chie W, Chang Y, et al. A novel method for evaluation of improved survival trend for common cancer: early detection or improvement of medical care. J Eval Clin Pract [Internet]. únor 2007 [citován 15. duben 2025];13(1):79–85. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2753.2006.00656.x>.
51. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. Nat Rev Cancer [Internet]. listopad 2005 [citován 15. duben 2025];5(11):845–56. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrc1739>.
52. Goossens N, Nakagawa S, et al. Cancer biomarker discovery and validation. Transl Cancer Res [Internet]. červen 2015 [citován 15. duben 2025];4(3):256–69. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4511498/>.
53. Roy R, Yang J, et al. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. J Clin Oncol [Internet]. 1. listopad 2009 [citován 15. duben 2025];27(31):5287–97. Dostupné z: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.23.5556>.
54. Brinckerhoff CE, Rutter JL, et al. Interstitial Collagenases as Markers of Tumor Progression. Clin Cancer Res. 2000; 6 (12) , 4823-30. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/6/12/4823/287655/Interstitial-Collagenases-as-Markers-of-Tumor>.

55. Juurikka K, Butler GS, et al. The Role of MMP8 in Cancer: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 11. září 2019 [citován 3. květen 2025];20(18):4506. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4506>.
56. Vanlint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: Cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. srpen 2006 [citován 15. duben 2025];17(4):217–23. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610106000256>.
57. Bernard PS, Wittwer CT. Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clin Chem* [Internet]. 1. srpen 2002 [citován 15. duben 2025];48(8):1178–85. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/48/8/1178/5642289>.
58. Li L, Chen L, et al. Serum cytokine profile in patients with breast cancer. *Cytokine* [Internet]. leden 2017 [citován 15. duben 2025];89:173–8. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466615301307>.
59. Korpi JT, Kervinen V, et al. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. *Br J Cancer* [Internet]. únor 2008 [citován 15. duben 2025];98(4):766–75. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/6604239>.
60. Stadlmann S, Pollheimer J, et al. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. listopad 2003 [citován 15. duben 2025];39(17):2499–505. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804903007007>.
61. Maxson S, Lopez EA, et al. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 1. únor 2012 [citován 20. duben 2025];1(2):142–9. Dostupné z: <https://academic.oup.com/stcltm/article/1/2/142-149/6386961>.
62. Vitlianova K, Georgieva J, et al. Blood pressure control predicts plasma matrix metalloproteinase-9 in diabetes mellitus type II. *Arch Med Sci* [Internet]. 2015 [citován 20. duben 2025];1:85–91. Dostupné z: <http://www.termia.pl/doi/10.5114/aoms.2015.49208>.
63. De Francis S, Gallelli L, et al. Cilostazol prevents foot ulcers in diabetic patients with peripheral vascular disease. *Int Wound J* [Internet]. červen 2015 [citován 20. duben 2025];12(3):250–3. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iwj.12085>.
64. Khattri S, Mandal R, et al. Significance of impaired serum gelatinases activities in metabolic syndrome. *Toxicol Int* [Internet]. 2014 [citován 20. duben 2025];21(1):108. Dostupné z: <http://www.toxicologyinternational.com/text.asp?2014/21/1/108/128818>.
65. Martins VL, Caley M, et al. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res* [Internet]. únor 2013 [citován 20. duben 2025];351(2):255–68. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-012-1410-z>.
66. Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* [Internet]. září 2002 [citován 20. duben 2025];2(9):657–72. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrc884>.

67. Gharagozlian S, Svennevig K, et al. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. *BMC Clin Pathol* [Internet]. prosinec 2009 [citován 20. duben 2025];9(1):7. Dostupné z: <https://bmcclinpathol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6890-9-7>.
68. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* [Internet]. březen 2010 [citován 20. duben 2025];89(3):219–29. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034509359125>.
69. Li Z, Guo S, Y. Increased ratio of serum matrix metalloproteinase-9 against TIMP-1 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *J Diabetes Complications* [Internet]. červenec 2013 [citován 20. duben 2025];27(4):380–2. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872712003637>.
70. McCarty SM, Percival SL. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care* [Internet]. říjen 2013 [citován 20. duben 2025];2(8):438–47. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2012.0370>.
71. Price P, Fogh K, et al. Managing painful chronic wounds: the Wound Pain Management Model. *Int Wound J* [Internet]. březen 2007 [citován 20. duben 2025];4(s1):4–15. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-481X.2007.00311.x>.
72. Mekkes JR, Loots MAM, et al. Causes, investigation and treatment of leg ulceration. *Br J Dermatol* [Internet]. březen 2003 [citován 20. duben 2025];148(3):388–401. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bjd/article/148/3/388/6634677>.
73. What is an ELISA? | Abcam [Internet]. [citován 22. duben 2025]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/guides/elisa-guide/what-is-an-elisa>.
74. Western blot protocol | Abcam [Internet]. [citován 22. duben 2025]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/protocols/western-blot?srsltid=AfmBOopBCWcS09QLHW6J6PY3ZYBSjQOhmdjdRq260iKuZ1FOQkpUjlxL>.
75. Waseem Q ul A. SDS-PAGE: Introduction, Principle, Working and Steps [Internet]. *Microbiology Notes*. 2022 [citován 22. duben 2025]. Dostupné z: <https://microbiologynotes.org/sds-page-introduction-principle-working-and-steps/>.
76. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol* [Internet]. květen 2015 [citován 16. březen 2025];44–46:1–6. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X15000888>.
77. Ala-aho R, Kähäri VM. Collagenases in cancer. *Biochimie* [Internet]. březen 2005 [citován 16. březen 2025];87(3–4):273–86. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908404002664>.
78. Vandooren J, Geurts N, et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods* [Internet]. březen 2013 [citován 16. březen 2025];10(3):211–20. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2371>.

79. Snoek-van Beurden PAM, Von Den Hoff JW. Zymographic Techniques for the Analysis of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors. *BioTechniques* [Internet]. leden 2005 [citován 16. březem 2025];38(1):73–83. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2144/05381RV01>.
80. Inanc S, Keles D, et al. An improved collagen zymography approach for evaluating the collagenases MMP-1, MMP-8, and MMP-13. 2017 [citován 3. květen 2025];63(4). Dostupné z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2144/000114597?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org
81. BAUDYŠOVÁ, Kateřina. *Stanovení matrixových metaloproteináz u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a diabetiků*. Diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. 2022.
82. Gogly B, Groult N, et al. Collagen Zymography as a Sensitive and Specific Technique for the Determination of Subpicogram Levels of Interstitial Collagenase. *Anal Biochem* [Internet]. leden 1998 [citován 3. květen 2025];255(2):211–6. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269797923186>.
83. ResearchGate [Internet]. [citován 27. duben 2025]. Table 3. MMP-8 and MMP-9 levels (ng/ml) in plasma, serum and... Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/MMP-8-and-MMP-9-levels-ng-ml-in-plasma-serum-and-neutrophil-supernatants_fig6_51114469.
84. Kawl T., Ipsita R., A sensitive, rapid and specific technique for the detection of collagenase using zymography. *Electrophoresis*. 2008, 29: 1585-1588. DOI: 10.1002/elps.200700655

PŘÍLOHY

Příloha / I. část – Souhlas etické komise	74
Příloha / II. část – Souhlas etické komise	75
Příloha / III. část – Souhlas etické komise	76
Příloha / IV. část – Informovaný souhlas pro pacienty	77
Příloha / V. část – Informovaný souhlas pro pacienty	78

Příloha / I. část – Souhlas etické komise

Ethics Committee (EC)
Regional Hospital Pardubice
Chairman: MUDr. Josef Hájek, CSc.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice
Czech Republic

Members:

MUDr. Petr Vojtíšek, CSc., head of the Cardiology Dept. submitted in cooperation with University of Pardubice the application for EC approval of the study focused on inflammation, oxidative stress and other biochemical parameters in patients with ischemic heart disease. Involvement of the patient into this study will not influence the patient therapy. The patients will be submitted only to 3 blood sample collections (à 19 ml) within 2 days and filling the questionnaire. Patients will be informed about the purpose of this study by attending physician. Only in the case of their agreement to participate in this study, blood sampling will be done.

EC approve protocol of the study „The dynamic of inflammatory markers after PCI in patients with ischemic heart disease“.

Etická komise
př. Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice

26. 3. 2010



Zápis ze schůze Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.
ze dne 11. 5. 2012 (15.00 h)

Přítomni: MUDr. Josef Hájek, CSc., MUDr. Marek Sychra, doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.,
MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D., MUDr. David Stuchlík, Mgr. Jaroslav Procházka,
JUDr. Josef Rokos,
Omluveni: Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D., MUDr. Petr Formánek, MUDr. Zuzana Kala Grofová,
Anna Němcová

Schůzi zahájil a řídil MUDr. Josef Hájek, CSc.

Sekretářka EK seznámila členy s korespondencí se SÚKL a multicentrickými etickými komisemi za období 16. 4. 2012 – 11. 5. 2012.

398/11.5.2012

MUDr. Petr Vojtíšek, CSc., primář kardiologického odd. Interní kliniky PKN, a.s., požádal o schválení studie zaměřené na sledování zánětlivé reakce, nových markerů oxidačního stresu a dalších biochemických parametrů u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Tato studie nemá komerční charakter a uskuteční se v rámci spolupráce Pardubické krajské nemocnice, a.s. s Univerzitou Pardubice na Kardiologickém oddělení. Zátěž pacienta vyplývající ze zařazení do studie spočívá ve třech odběrech 19 ml krve a ve vyplnění dotazníku, zařazení do studie nemá vliv na léčbu pacienta. Konkrétní výběr pacientů bude v kompetenci lékařů Kardiologického oddělení.

Na studii se budou podílet:

Kardiologické odd.. prim. MUDr. P. Vojtíšek CSc., MUDr. J. Matějka, Ph.D.

Oddělení klinické biochemie a diagnostiky: prim. PharmDr. J. Skalický, Ph.D., Mgr. J. Kovařík,

Univerzita Pardubice: MUDr. V. Mužáková, Ph.D. Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kand'ár, Ph.D.

Členové EK studii po prostudování předložených dokumentů – v souladu s ICH GCP – schválili.

V Pardubicích 11. května 2012

Zapsala: Ivana Faiklová

Předběžný termín příští schůze etické komise: **6. 6. 2012**

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kyjevská 44
532 02 Pardubice



MUDr. Josef Hájek, CSc.
předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

Příloha / III. část – Souhlas etické komise

Stanovisko Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s. ze dne 13. 12. 2013 (15.00 h)

Přítomní: MUDr. Josef Hájek, CSc., MUDr. David Stuchlík, MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D.,
Mgr. Jaroslav Procházka, JUDr. Josef Rokos, Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D.,
MUDr. Marek Sychra, MUDr. Petr Formánek, doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.,
Omluveni: MUDr. Zuzana Kala Grofová, Anna Němcová.

Schůzi zahájil a řídil MUDr. Josef Hájek, CSc.
Sekretářka EK seznámila členy s korespondencí se ŠUKL a multicentrickými etickými komisemi za období 25.11.2013 – 13.12.2013.

434/13.12.2013

• MUDr. Vojtěch Novotný, lékař kardiologického odd. PKN, a.s., požádal členy EK o souhlas s prováděním studie s názvem **„Zánětlivá odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů“**. Studie je zaměřena na sledování zánětlivé reakce, nových markerů oxidačního stresu a dalších biochemických parametrů u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a uskuteční se v rámci spolupráce Pardubické krajské nemocnice, a.s., Kardiologického centra Agel, a.s. a Univerzity Pardubice na Kardiologickém oddělení s vědomím a pod dohledem prim. MUDr. Petra Vojtiška, CSc. a MUDr. Iva Varvafovského, Ph.D. Studie nemá komerční charakter a rozšiřuje již probíhající studii, schválenou Etickou komisí při PKN, a.s. dne 11.5.2012. Získaná data využije MUDr. Vojtěch Novotný k sepsání disertační práce v rámci doktorského studijního programu (Ph.D.) na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, školitelem je doc. MUDr. Josef Šťásek, Ph.D.

Na studii se budou podílet:

Kardiologické oddělení: prim. MUDr. P. Vojtišek, CSc., MUDr. V. Novotný

Kardiologické centrum Agel, a.s.: MUDr. I. Varvafovský, Ph.D., MUDr. J. Matějka, Ph.D., MUDr. V. Rozsival, CSc., MUDr. V. Novotný.

Oddělení klinické biochemie a diagnostiky: prim. PharmDr. J. Skalický, Ph.D., Mgr. J. Kovařík

Univerzita Pardubice: MUDr. V. Mužáková, Ph.D., Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kand'ár, Ph.D.

Byly předloženy dokumenty: protokol studie, informovaný souhlas, patientský dotazník, informovaný souhlas s provedením koronarografie /PCI, informace výrobce o stentech.

Členové EK studii po prostudování předložených dokumentů – v souladu s ICH GCP – schválili.

V Pardubicích 13. 12. 2013

Zapsala: Ivana Faiklová

Předběžný termín příští schůze etické komise: 24. 1. 2014

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Příloha 44
812/03 Pardubice



MUDr. Josef Hájek, CSc.

předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

Příloha / IV. část – Informovaný souhlas pro pacienty

INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE

Vážená paní, vážený pane,

v současné době probíhá na našem pracovišti ve spolupráci s Univerzitou Pardubice výzkumná práce (studie) s názvem „Zánětlivá reakce po implantaci koronárních stentů“.

Tato výzkumná práce je zaměřena na sledování ukazatelů zánětu a oxidačního stresu v krvi pacientů po perkutánní koronární intervenci (PCI) a vyhodnocení jejich významu v závislosti na typu použitého stentu.

V současné době je standardní léčbou ischemické choroby srdeční tzv. perkutánní koronární intervence (PCI), která spočívá v roztažení zúženého místa věnčité tepny speciálním balónkem a jeho následné vyztužení stentem. Stentů je několik typů, nejčastěji jsou používány stenty kovové, jejichž struktura je potažená léčivou látkou, která se postupně uvolňuje a brání následnému opětovnému zužování věnčité tepny v reakci na cizí materiál stentu. Tyto stenty označujeme jako tzv. „lékové stenty“. Nověji jsou dostupné stenty, které jako kostru místo kovu využívají organickou látku (kyselinu polymléčnou), která se v organismu postupně rozkládá, až přibližně po dvou letech z organismu zcela zmizí. Výhodou tohoto typu stentu je možnost navrácení věnčité tepny do stavu blízkého stavu původnímu, tedy se zachovanou schopností reagovat na přirozené podněty k rozšíření či zúžení tepny. Nevýhodou je pak nemožnost zavést tyto stenty do všech typů zúžení, tj. nelze je využít ve všech situacích. Tyto stenty nazýváme „absorbovatelné stenty“ a jsou rovněž potažené výše uvedeným léčivem zabraňujícím opětovnému zúžení tepny.

V předkládané práci budeme srovnávat laboratorní parametry zánětlivé odpovědi na zavedení těchto dvou typů stentů. Předchozí práce prokázaly, že čím vyšší je zánětlivá reakce po výkonu na věnčité tepně, tím vyšší je riziko pozdějších komplikací ve smyslu opětovného zužování věnčité tepny či srdečního infarktu.

K účasti v této výzkumné práci jste byl/a osloven/a vzhledem k tomu, že Váš zdravotní stav vyžaduje ošetření zúžení věnčité tepny stentem a zároveň jde o zúžení tepny, které je vhodné k zavedení obou typů stentů.

V případě, že se rozhodnete pro účast v této výzkumné práci, bude na základě náhodného výběru (tzv. randomizace) zvolen k ošetření zúžení věnčité tepny jeden z výše uvedených typů stentů. Rizika spojená s účastí ve studii se neliší od běžných rizik v souvislosti s PCI a zavedením stentu. Tato rizika jsou podrobně popsána v Informovaném souhlase s provedením koronarografie/PCI, který jste před výkonem podepsal/a.

Zátěž vyplývající ze zařazení do studie spočívá ve třech odběrech 19 ml krve během stávající hospitalizace a ve vyplnění dotazníku, dále v klinické kontrole a odběru krve po jednom roce. Další podrobnosti a informace Vám budou na požádání sděleny.

Vaše účast na této studii je zcela dobrovolná.

Příloha/V. část – Informovaný souhlas pro pacienty

Jméno:

Pořadové číslo:

PÍSEMNÉ PROHLÁŠENÍ O SOUHLASU S ÚČASTÍ VE STUDII

Byl(a) jsem seznámen(a) s povahou studie a souhlasím se zařazením do tohoto výzkumného projektu.

Dále souhlasím s tím, že údaje o mé osobě, které byly získány během studie, budou předávány třetím osobám pouze v anonymní formě, tzn. bez uvedení mého jména a identifikačních údajů.

V Pardubicích dne

Podpis (účastníka studie):

Se získanými osobními údaji bude nakládáno jako s ochraňovanými skutečnostmi a tyto údaje budou využity pouze pro potřeby studie a nebudou sdělovány třetím osobám.

V Pardubicích dne

Jméno a podpis (řešitele- studie):