

---

# Význam mezibuněčného prostoru v biologii gliových nádorů mozku

---

Zámečník J., Vargová L.\*, Kodet R., Syková E.\*

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, Praha

\*Ústav neurověd, Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, 2. LF UK,

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

---

## Souhrn

Velikost, geometrie a složení extracelulárního prostoru (ECP) hrají důležitou roli v ovlivňování biologického chování primárních mozkových nádorů. Pomocí metod, které popisem difuze molekul v ECP umožňují stanovit velikost a geometrii ECP, bylo zjištěno, že velikost ECP je u gliomů významně zvětšená oproti nepostižené mozkové kůře. Dále bylo ukázáno, že zvětšování podílu ECP na celkovém objemu tkáně je přímo úměrné rostoucí proliferativní aktivitě astrocytomů a paradoxně i zvyšující se buněčnosti nádorů. Zvětšení objemu ECP ve tkáních mozkových nádorů je překvapivě doprovázeno výrazným nárůstem překážek v difuzi molekul takto zvětšeným mezibuněčným prostorem. Difuzní bariéry v mezibuněčném prostoru astrocytomů s nízkým stupněm malignity vytváří zejména síť z výběžků nádorových buněk. Méně větvené a zkrácené výběžky buněk u agresivnějších astrocytomů hrají menší roli a zmožení difuzních bariér v ECP působí nadměrná produkce některých komponent extracelulární matrix (ECM), zejména tenascin. Nádorem produkované glykoproteiny ECM jsou potom substrátem pro adhezi a migraci nádorových buněk zvětšeným mezibuněčným prostorem, zároveň však mohou výrazně omezovat difuzi léčiv do nádorové tkáně. Mezi přítomností tenascinu v ECP nádorů a agresivním chováním gliových nádorů mozku byla nalezena dobrá korelace, což činí imunohistochemický průkaz tohoto glykoproteinu i diagnosticky užitečným jako prognostický marker a ukazatel větší biologické agresivity gliomů.

**Klíčová slova:** gliomy – mezibuněčný prostor – extracelulární matrix – tenascin

## Summary

### The Role of the Extracellular Space in Biology of Glial Brain Tumors

The size, geometry and composition of the extracellular space (ECS) play an important role in influencing the biological behavior of primary brain tumors. Experiments employing the real-time TMA iontophoretic method to determine the size and geometry of the ECS, by monitoring the diffusion of TMA ions in the ECS, revealed a dramatic increase in ECS size in brain neoplasms when compared with that of unaffected brain cortex. Further, the increase of ECS volume in tumors was shown to correlate with increasing proliferative activity and increasing cellularity of astrocytomas. The increase in ECS size was surprisingly accompanied by a significant increase in diffusion barriers, slowing the diffusion of molecules in the ECS of tumors. In low-grade tumors, diffusion is hindered by the presence of a dense net of tumor cell processes. In high-grade gliomas, in which the cellular processes are shortened with reduced branching, the increase in diffusion barriers is caused by the overproduction of specific components of the extracellular matrix (ECM) by the tumor cells, mainly tenascin. The ECM glycoproteins produced represent a substrate for the subsequent adhesion and migration of tumor cells through the enlarged ECS. However, they might also critically reduce the diffusion of therapeutics into the tumor. The presence of tenascin in the ECS of a neoplasm correlates significantly with the increased malignancy of the tumor and a poor clinical outcome of the disease, thus making the immunohistochemical detection of tenascin diagnostically useful as a prognostic marker and a marker of aggressive biological behavior of tumors.

**Key words:** gliomas – extracellular space – extracellular matrix – tenascin

*Čes.-slov. Patol., 41, 2005, No. 1, p. 12–18*

Schopnost lokálního infiltrativního šíření je nejvýraznější vlastností gliových nádorů mozku. Invazivní růst je umožněn komplexními změnami jak ve funkční výbavě nádorových buněk (vedoucí k proliferaci a migraci buněk), tak ve schopnosti aktivně měnit vlastnosti okolního extracelulárního prostoru (ECP) a vstupovat do interakcí s jeho komponentami,

zejména s extracelulární matrix (ECM). Výzkumu vlastností vlastních gliomových buněk na molekulární úrovni je tradičně věnována velká pozornost, studium vlastností mezibuněčného prostoru tkáně mozkových nádorů však zůstávalo dlouho v pozadí. Velikost a geometrie extracelulárního prostoru a jeho složení přitom hrají důležitou roli v ovlivňování biologického

chování mozkových nádorů – vždyť snad jako u jediné skupiny nádorů lidského organismu je růst mozkových nádorů v omezeném objemu dutiny lební právě bojem o prostor.

## Mezibuněčný prostor v CNS a možnosti studia jeho struktury

Extracelulární prostor (ECP) mozku je důležité mikroprostředí, které změnami svého složení a své struktury významně ovlivňuje fyziologické funkce neuronů i gliových buněk (25) a tvoří důležitý komunikační kanál mezi nervovými buňkami (17, 27). Velikost a složení ECP se výrazně mění během celé řady patologických stavů (28, 29).

První pokusy kvantifikovat velikost mezibuněčného prostoru mozkové tkáně proběhly pomocí běžné elektronové mikroskopie a ukázaly ECP nervové tkáně jako extrémně malý, tvořený úzkými štěrbinami mezi buňkami (3). Nyní je však zřejmé, že se jednalo o artefakty. Výsledky ultrastrukturálních studií technikou mrazového lomu, které strukturu ECP více zachovávají, i výsledky experimentů pomocí níže uvedených technik se shodují v tom, že podíl objemu ECP v CNS tvoří asi 20 % (17).

Experimentálních metod využívaných pro studium struktury ECP tkání je v současnosti několik. Jednak radioizotopová metoda se značením mezibuněčných štěrbin perfuzí radioaktivních sloučenin jako je [<sup>3</sup>H] inulin, [<sup>14</sup>C] sacharóza nebo [<sup>14</sup>C] EDTA (9), která je však příliš zdlouhavá a není vhodná pro studium změn v experimentech *in vivo*. Jiné metody umožňují určit jen relativní změny některých parametrů

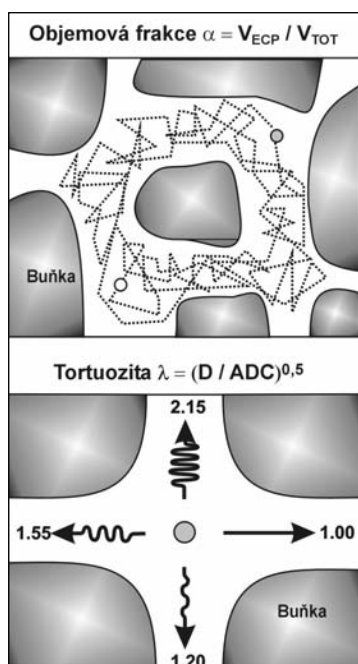
ECP. Patří sem například měření změn tkáňového odporu (32), sledování aparentního difuzního koeficientu (ADC) vody metodou difuzně-vážené magnetické rezonance (31) nebo měření vlastností ECP fluorescenčně značenými makromolekulami optickým zobrazováním (18). Nejvhodnější metodou poskytující informaci nejen o velikosti ECP, ale zároveň jeho geometrii, je studium tzv. difuzních parametrů ECP tkání.

Pohyb molekul mezibuněčným prostorem je uskutečňován difuzí. Molekuly uvolněné do ECP difundují ve formě krátkých pohybů náhodným směrem (tzv. Brownův pohyb), které přesně kopírují strukturu tohoto prostoru. Sledováním difuze těchto molekul pak můžeme popsat a kvantifikovat velikost a geometrii mezibuněčného prostoru, do kterého byly molekuly vpraveny (17). Difuzní vlastnosti ECP charakterizují dva hlavní difuzní parametry (obr. 1):

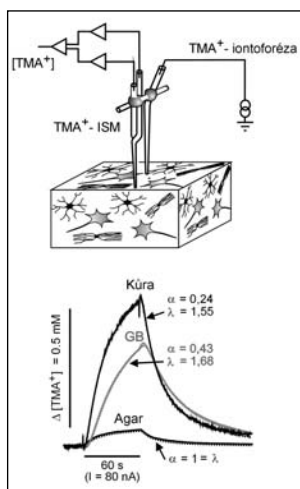
Velikost ECP charakterizuje tzv. extracelulární objemová frakce  $\alpha$ , která je vyjádřena jako poměr mezi objemem extracelulárního prostoru a celkovým objemem tkáně CNS. Určuje tedy velikost mezibuněčného prostoru, ve kterém látka difunduje. Ve zdravé mozkové kůře je velikost ECP asi 20 – 24 % celkového objemu tkáně (33).

Geometrický faktor tortuozita  $\lambda$ , česky „zakřivenost“ – odráží geometrické uspořádání ECP a jeho hodnota je tím vyšší, čím více překážek musí molekula při difuzi mezibuněčným prostorem „obcházet“, což její difuzi mezi dvěma body zpomaluje. Takové překážky představují například tenké výběžky nervových buněk nebo makromolekuly extracelulární matrix.

Přesné stanovení absolutních hodnot obou těchto difuzních parametrů ECP, velikosti ECP a jeho geometrie, umožňuje tzv. iontoforetická metoda v reálném čase (16). Je založena na iontoforetické aplikaci extracelulárního markeru, např. iontů tetramethylamonia (TMA<sup>+</sup>), do tkáně a měření jeho koncentrace pomocí iontové selektivních mikroelektrod (26) (obr. 2). Registrované difuzní křivky jsou analyzovány dosazením dat do difuzních rovnic vycházejících z II. Fickova zákona. Výsledkem jsou absolutní hodnoty výše uvedených difuzních parametrů ECP  $\alpha$  a  $\lambda$ . Difuzní měření v lidské tkáni se provádějí ihned po chirurgickém vynětí v tkáňových řezech o síle cca 400  $\mu$ m, které jsou po dobu experimentů uchovávané v prostředí velmi blízkém situaci *in situ* (komůrka s arteficiálním mozkomíšním mokem syceným kyslíkem a CO<sub>2</sub> při stabilní teplotě) (33). Opakovaně bylo prokázáno, že výsledky takto uspořádaných měření poskytují stejné hodnoty difuzních parametrů jako při měření v experimentech *in vivo* (12).



**Obr. 1. Koncepce objemové frakce ECP ( $\alpha$ ) a tortuozity ECP ( $\lambda$ ).  $V_{ECP}$ , objem ECP;  $V_{TOT}$ , celkový objem nervové tkáně;  $D$ , volný difuzní koeficient;  $ADC$ , aparentní difuzní koeficient látky v CNS. Hodnoty tortuozity odpovídají difuzi TMA<sup>+</sup>: 1,00 – volná difuze; 1,55 – mozková kůra dospělého potkana; 1,20 – těžký edém; 2,15 těžká anoxie. Upraveno dle Sykové (27)**



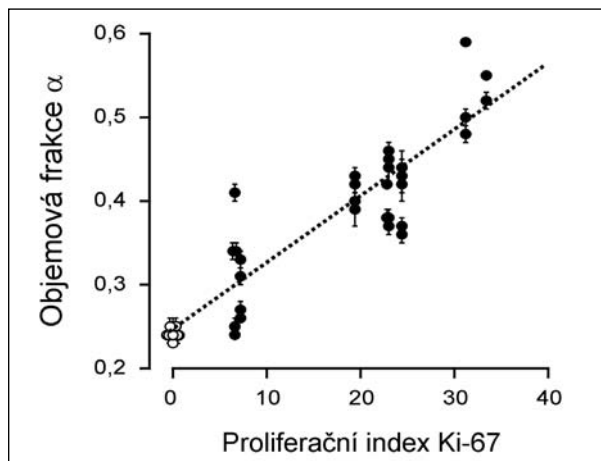
**Obr. 2.** Schéma experimentálního uspořádání pro měření difuze TMA<sup>+</sup> ve tkáňových řezech (nahore) a reprezentativní difuzní křivky TMA<sup>+</sup> s odpovídajícími hodnotami difuzních parametrů získaných v agaru, kontrolní tkáni temporální mozkové kůry a v glioblastomu (dole). Tetramethylamoniové ionty (TMA<sup>+</sup>) jsou iontoforeticky aplikovány do tkáně iontoforetickou mikropipetou a jejich koncentrace se měří iontově selektivní mikroelektrodou (ISM) pro TMA<sup>+</sup>. V mozkové tkáni je difuze TMA<sup>+</sup> omezena jen na ECP, jelikož pro TMA<sup>+</sup> jsou buněčné membrány téměř nepropustné, a je ovlivněna řadou překážek. Amplituda difuzní křivky je tím vyšší, čím menší je velikost ECP; vzestup a pokles křivky je tím pomalejší, čím vyšší je tortuozita ECP. V agarózovém gelu probíhá volná difuze a podle definice platí  $\alpha = 1 = \lambda$ . Upraveno dle Vargové a spol. (33).

$\alpha$ , objemová frakce ECP;  $\lambda$ , tortuozita; GB, glioblastom

## Velikost mezibuněčného prostoru gliových nádorů mozku

Změny velikosti mezibuněčného prostoru gliomů ve smyslu jeho zvětšení byly pozorovány už ve starších elektron-mikroskopických studiích (1) i při studiu mezibuněčných prostorů pomocí radioaktivně značené sacharózy (2). Přesnou kvantifikaci změn ve velikosti ECP gliomů však přinesly až studie využívající TMA<sup>+</sup>-iontoforetickou metodu v reálném čase (33, 37). Tabulka 1 ukazuje, že objemová frakce ECP byla oproti kontrolní mozkové kůře u všech studovaných gliomů s výjimkou oligodendrogliomů významně zvýšená, s tím, že průměrný podíl ECP v gliových nádorech mozku s nejvyšším stupněm malignity dosahoval až 48 %. Ukázalo se, že zvětšování objemu ECP je přímo úměrné rostoucí proliferativní aktivitě astrocytomů, měřené jak mitotickou aktivitou nádorové tkáně, tak stanovováním proliferativních indexů imunohistochemicky průkazem jaderných antigenů Ki-67 a topoizomerázy-IIaaa (obr. 3). Vedle nutné schopnosti nádorových buněk adherovat a migrovat do okolní tkáně je tedy vytváření dostatečně velkého prostoru pro migrující buňky další doménou agresivních mozkových nádorů. Paradoxně bylo prokázáno i zvětšování objemu ECP ve tkáni s rostoucí buněčností maligních gliových nádorů. Tento fakt je pro histopatologa při pohledu na hypercelulární nádor v mikroskopu zpočátku těžko přijatelný, je však dobře vysvětlitelný.

Hustota nádorových buněk je sice větší, tyto buňky však mají jiný objem než jejich nenádorové protějšky. K tomu přispívá ztráta mezibuněčných spojů („gap junctions“) mezi nádorovými buňkami, která vede k poruše mezibuněčné komunikace (24) vyúsťující v neschopnost regulovat buněčný objem (30). Kromě toho byla na povrchu buněk maligních gliomů prokázána přítomnost řady aberantních chloridových kanálů (23). Ty umožňují přesunem chloridů následovaných vodou vně buňky zmenšení objemu a svraštění nádorové buňky, což má význam i pro pohyb nádorových buněk geometricky komplikovaným mezibuněčným prostorem. Strukturální změny nádorové tkáně, jejichž důsledkem je zvětšení objemu ECP, mohou vznikat také v důsledku degradace některých komponent nádorové extracelulární matrix metaloproteinázami, které produkují buňky maligních gliomů (6). K dalšímu zvětšení objemu ECP zejména na periferii nádorové masy sousedící s nepostiženým parenchymem CNS může přispívat i další faktor – odumírání neuronů v okolí nádoru v důsledku excitotoxického působení glutamátu, který se uvolňuje z gliomů do jejich okolí. Tento neuropřenašeč je v gliomech produkován a dosahuje v nich mimořádně vysokých koncentrací zejména díky porušené schopnosti jeho zpětného vychytávání do nádorových buněk (35). Naopak skutečnost, že objemová frakce ECP není zvýšená v oligodendrogliomech, může být alespoň zčásti vysvětlena tím, že oligodendroglie chybí glutamin-syntetáza (enzym nutný k produkci glutamátu) (35). Oligodendrogliomové



**Obr. 3.** Vztah mezi objemovou frakcí ECP  $\alpha$  a proliferativním indexem (PI) stanoveným procentem pozitivních jader nádorových buněk při imunohistochemickém průkazu antigenu Ki-67 v difuzních infiltrujících astrocytomech (grade II - IV, ●). Kontrolní data (○) jsou vynesena oproti hodnotě Ki-67 PI 0. Každý bod odpovídá průměrné hodnotě  $\alpha \pm$  S.E.M. (střední chyba průměru) vypočítané ze 2-3 měření v různých řezech. Řezy ze stejného nádoru mají stejnou hodnotu Ki-67 PI. Regresní křivka má korelační koeficient 0,84. Upraveno dle Vargové a spol. (33)

**Tab. 1. Výsledky difúzních měření v nádorové tkáni mozkových nádorů a v nepostížené temporální kůře**

	n	$\alpha \pm \text{S.E.M}$	$\lambda \pm \text{S.E.M}$
<i>Kontrolní temporální kůra</i>	27	<b>0,24</b> ± 0,01	<b>1,55</b> ± 0,03
<i>Pilocytární astrocytomy</i>	36	<b>0,37</b> ± 0,02*	<b>1,50</b> ± 0,03
<i>Astrocytomy (grade II)</i>	71	<b>0,29</b> ± 0,01*	<b>1,57</b> ± 0,04
<i>Astrocytomy (grade III, IV)</i>	93	<b>0,48</b> ± 0,01*	<b>1,69</b> ± 0,03*
<i>Oligodendrogliomy</i>	21	<b>0,23</b> ± 0,01	<b>1,50</b> ± 0,02
<i>Ependymomy</i>	22	<b>0,39</b> ± 0,01*	<b>1,55</b> ± 0,04
<i>Meduloblastom - klasický</i>	37	<b>0,38</b> ± 0,03*	<b>1,57</b> ± 0,04
<i>Meduloblastom - desmoplastický</i>	20	<b>0,22</b> ± 0,01	<b>1,85</b> ± 0,03*

n - počet difúzních měření;  $\alpha$  - objemová frakce ECP;  $\lambda$  - tortuozita ECP;  
S.E.M. - střední chyba průměru; \* signifikantně zvýšené hodnoty oproti kontrolní kůře

buňky tak pravděpodobně nejsou na rozdíl od astrocytomů schopny uvolňovat takové množství mediátoru, aby byla dosažena toxická koncentrace, což nevede ke zvětšování objemu ECP nádorové tkáně.

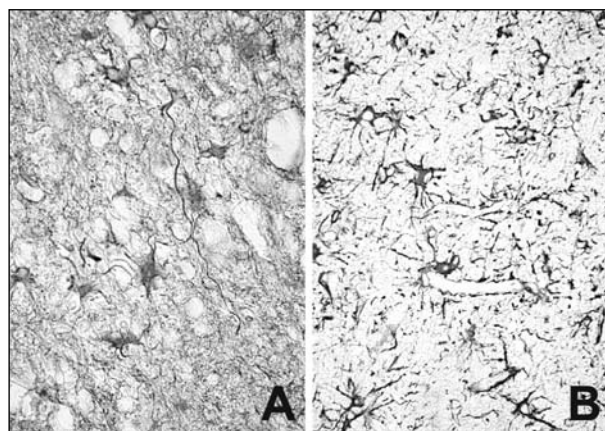
Výrazné zvětšení objemu ECP u pilocytárních astrocytomů i při jejich nízkém potenciálu malignity je spíše odrazem schopnosti těchto nádorů vytvářet početné drobné mikrocysty vyplněné pravděpodobně jen řídkým gelem či tekutinou, neboť tortuozita ECP se v těchto nádorech nezvyšuje (tab. 1). Tím je potvrzen názor, že mikrocysty jsou skutečnou strukturální součástí nádorové tkáně pilocytárních astrocytomů a že nevznikají jen jako artefakt při histologickém zpracování.

### Geometrie mezibuněčného prostoru gliových nádorů mozku

Z tabulky 1 vyplývá, že zvětšení objemu ECP v nádorové tkáni není doprovázeno poklesem tortuozity, ale naopak výrazným nárůstem překážek v difuzi látek mezibuněčným prostorem, tedy zvýšením tortuozity (33). Velká pozornost byla tedy věnována tomu, jak se na zvýšení tortuozity v nádorech podílejí různé strukturální parametry tkáně, jakými jsou hustota nádorových buněk, síť z výběžků nádorových buněk, přítomnost proliferujících hyperplastických cév a zejména kvalitativní a kvantitativní změny ve složení nádorové extracelulární matrix (37).

Překvapivě nebyla prokázána statisticky významná závislost mezi nárůstem hustoty nádorových buněk a zvýšením tortuozity nádorového ECP. Tortuozita ECP v astrocytomech se navíc zdá být jen málo ovlivněná přítomností konglomerátů hyperplastických nádorových cév. Překážky v difuzi látek mezibuněčným prostorem astrocytomů s nízkým stupněm malignity vytvářejí zejména výběžky

nádorových buněk – v difúzních astrocytomech (grade II) bývá přítomna hustá fibrilární síť z jemných dlouhých a bohatě větvených výběžků nádorových astrocytů (obr. 4A). Obdobný nárůst tortuozity byl pozorován v mozku experimentálních zvířat s posttraumatickou gliózou (22). Na druhou stranu, méně bohaté a zkrácené výběžky nádorových buněk u agresivnějších forem astrocytomů (obr. 4B) hrají menší roli a hlavním důvodem zvýšení tortuozity jejich ECP je přítomnost nadměrné produkce některých komponent extracelulární matrix. Ty mají potom zásadní význam pro adhezi a migraci gliomových buněk.



**Obr. 4. Rozdílný charakter výběžků nádorových buněk v astrocytomu, grade II (A) a glioblastomu (B). Imunohistochemický průkaz GFAP, zvětšení 600krát**

### Extracelulární matrix gliomů

Ačkoli má extracelulární matrix (ECM) zdravého mozku mnoho komponent společných s ECM ostatních tkání lidského organismu, existují výrazné rozdíly v jejím složení. ECM zdravého mozku obsahuje jen velmi malé množství fibrilárních glykoproteinů jakými jsou kolagen nebo fibronectin, naopak ve velkém množství jsou přítomny polymerizované

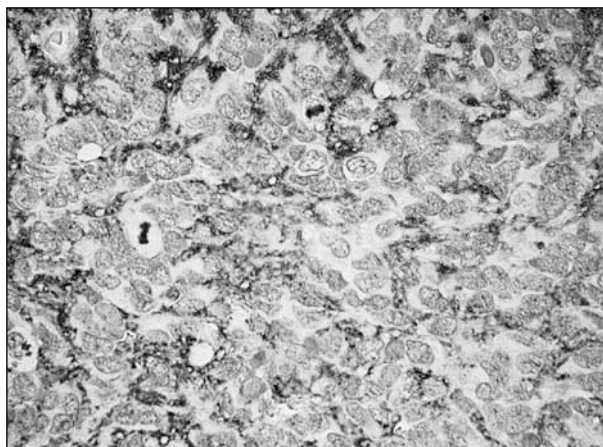
polysacharidy – glykosaminoglykany a proteoglykany (19).

Přítomnost a potenciální funkce molekul ECM v mozkových nádorech byly intenzivně studovány v experimentech na tkáňových kulturách (5). Ačkoli mají experimenty zkoumající ECM produkovanou nádorovými buňkami *in vitro* různá omezení (20), jsou výsledky prací na tkáňových kulturách zásadní zejména pro pochopení interakce mezi nádorovými buňkami a nádorovou ECM. Adheze nádorových buněk k okolní ECM je prvním krokem při jejich migraci a invazivním šíření (4). ECM navíc podporuje mitogenezu nádorových buněk (7) a prodlužuje jejich životnost inhibicí apoptózy (13).

Jak v imunohistochemické studii astrocytomů (37), tak ependymomů (36) byly nalezeny výrazné odlišnosti ve složení extracelulární matrix nádorů *in situ* od výsledků získaných ve studiích *in vitro* na tkáňových kulturách. Kultivované gliomové buňky produkují do svého mezibuněčného prostoru laminin, fibronektin a kolagen typu IV (5), v imunohistochemických studiích *in situ* (36, 37) však byly tyto komponenty ECM vždy jen součástí bazálních membrán cév v nádoru. Ve světle nedávných zjištění zůstává otázkou, zda lze vůbec těmto glykoproteinům připisovat původ v nádorových buňkách, respektive zda jsou gliomové buňky *in vivo* schopny produkce těchto glykoproteinů. Mahesparan a spol. (14) prováděli inokulaci sferoidů z lidského biotického materiálu do mozků imunodeficientních potkanů a imunohistochemicky prokazovali jednotlivé komponenty ECM protilátkami specifickými k jednotlivým biologickým druhům. Prokázali, že přítomnost lamininu, fibronektinu a kolagenu typu IV má původ v preexistujících cévách mozku potkana, nikoli v implantované lidské nádorové tkáni. Produkce kolagenů typu I, III, V a VI ve tkáňových kulturách také nebyla verifikována *in situ* u žádné ze studovaných skupin nádorů a jejich přítomnost v nádorové tkáni byla omezena na stěnu hyperplastických cév. Dobrým vysvětlením pro výše uvedené diskrepance je klonální selekce a transdiferenciace kultivovaných buněk, v důsledku které dochází ve tkáňových kulturách k rozvoji výrazných mezenchymálních rysů s extenzivní produkcí aberantních komponent ECM (20).

Na druhou stranu bylo ale prokázáno, že agresivní gliomy jsou skutečně schopny patologické produkce určitých glykoproteinů ECM do svého intersticia, které pak slouží jako substrát pro adhezi a migraci nádorových buněk (37). Jedná se o tenascin a vitronectin. Vitronectin byl imunohistochemicky prokázán pouze v intersticiu gliomů s vysokým stupněm malignity (10, 36, 37), jeho množství však bývá malé a ve studiích difuzních parametrů ECP

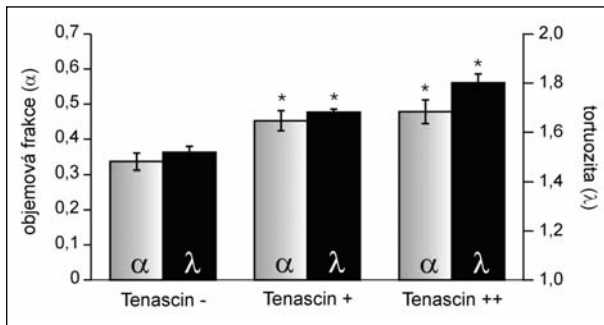
gliomů se nepodařilo prokázat významný vliv přítomnosti vitronectinu na změny v tortuozitě ECP nádorové tkáně (37). Naopak, v ECP značné části astrocytomů s vysokým stupněm malignity byla imunohistochemicky prokázána velká množství tenascin (11) (obr. 5). Objem i tortuozita ECP byly významně větší u nádorů produkujících tenascin při porovnání s hodnotami naměřenými v tenascin-negativních astrocytomech (obr. 6). Korelačními analýzami bylo prokázáno, že přítomnost tenascin v mezibuněčném prostoru nádorů je jedním z nejdůležitějších faktorů, které vedou k dramatickému vzestupu tortuozity nádorového ECP a že akumulace tenascin pravděpodobně přispívá i k udržování a dalšímu zvětšování objemu ECP nádorové tkáně (37). Podporu tomuto zjištění přinesly studie ukazující výrazný pokles objemu ECP a snížení tortuozity mozkové tkáně u tenascin-deficientních myší (34). V několika pracích byla dokumentována spojitost mezi produkcí tenascin a zvýšenou malignitou nebo angiogenezí v mozkových nádorech (11, 36, 37), což činí imunohistochemický průkaz tenascin užitečným i diagnosticky jako prognostický marker a ukazatel větší biologické agresivity gliomů.



Obr. 5. Imunohisto-chemický průkaz extracelulárních depotit tenascin v glioblastomu (zvětšení 600krát, jádra dobarvena hematoxylinem)

Mohlo by se zdát paradoxní, že nárůst difuzních překážek v ECP (ač ve zvětšeném objemu ECP maligních gliomů) může usnadňovat migraci nádorových buněk. Je třeba si uvědomit, že difuze iontů nebo neuroprénašečů a migrace buněk mají zcela odlišný mechanismus. Zvýšená objemová frakce ECP umožňuje pohyb malých molekul i buněk. Zvýšená tortuozita díky nadprodukcí glykoproteinů ECM brání difuzi molekul, ale pro nádorové buňky jsou právě glykoproteiny ECM substrátem pro adhezi a následný invazivní růst.

Zprávy podložené kvantitativními analýzami tkáňových homogenizátů tvrdí, že i ostatní



**Obr. 6. V grafu je znázorněno zvětšení objemové frakce ECP  $\alpha$  a tortuozity  $\lambda$  v astrocytomech produkujících malé (Tenascin +) i velké (Tenascin ++) množství tenascinu, v porovnání s tenascin negativními (Tenascin -) nádory. Hvězdička označuje signifikantní rozdíl v obou difuzních parametrech mezi tenascin pozitivními a tenascin negativními nádory. Upraveno dle Zámečnicka a spol. (37)**

komponenty ECM jako glykosaminoglykany a proteoglykany (zejména hyaluronát a chondroitin sulfát) jsou v gliomech přítomny ve zvýšeném množství (8). Zvýšené množství proteoglykanů v nádorové tkáni však nemusí nutně potvrzovat schopnost gliomových buněk nadměrně produkovat tyto látky. Může být jen nepřímým důsledkem zvětšení objemu ECP nádorové tkáně, který je pak vyplněn těmito mukoidními látkami, které jsou všudypřítomnou základní složkou ECM mozku (15).

## Závěr

Výše diskutovaná zjištění ukázala existenci dynamických změn velikosti a geometrie extracelulárního prostoru v gliomech během nádorové progresse. U gliomů s nižším stupněm malignity vytvářejí nádorové buňky v nepřilíživém zvětšeném mezibuněčném prostoru síť ze svých dlouhých bohatě větvených výběžků. S progresí ke zvýšené malignitě nádoru buňky pravděpodobně postupně ztrácejí schopnost regulovat svůj objem, ten se mění společně s úbytem výběžků nádorových buněk, a narůstá podíl mezibuněčného prostoru ve tkáni. Do zvětšeného ECP produkují nádorové buňky některé glykoproteiny (zejména tenascin a vitronektin), které jsou důležité pro udržení velikosti ECP a zejména pro adhezi a následnou migraci nádorových buněk dostatečně prostupným mezibuněčným prostorem.

V současnosti se do klinické praxe s velkými nadějemi zavádějí nové terapeutické postupy založené na lokálním podávání onkologických léčiv do postresekční dutiny v mozku (21). Zjištěné změny v geometrii mezibuněčného prostoru nádorové tkáně (zejména vysoká

tortuozita) však významně omezují difuzi léčiv do ECP nádorové tkáně a mohou být vysvětlením pro sníženou efektivitu těchto postupů v některých případech (21). Tuto skutečnost bude nutné v budoucnu zohlednit v terapeutickém algoritmu, kdy lokální aplikaci vlastního chemoterapeutika by mělo předcházet snížení tortuozity nádorového ECP například aplikací určitých enzymů degradujících nádorovou extracelulární matrix.

Na výsledky studií změn velikosti, geometrie a složení ECP mozkových nádorů v závislosti na jejich biologické agresivitě v současnosti navazují další experimenty. Změny difuzních parametrů a složení ECP nádorové tkáně se koreluje s výsledky vyšetřování nádorů metodami difuzně-vážené MRI a spektroskopie. Cílem je zpřesnit diagnostiku mozkových nádorů zejména ohledně stupně jejich malignity už v předoperačním období.

**Podpora projektu: GAČR 309/04/0753, VZ FNM 00000064203, VZ J13/98:111300004**

## Literatura

- Bakay, L.:** The extracellular space in brain tumours. I. Morphological considerations. *Brain*, 93, 1970, s. 693–698.
- Bakay, L.:** The extracellular space in brain tumours. II. The sucrose space. *Brain*, 93, 1970, s. 699–708.
- Bondareff, W., Pysh, J. J.:** Distribution of the extracellular space during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *Anat. Rec.*, 160, 1968, s. 773–780.
- Cereb, M. A., Nishiyama, A., Stallcup, W. B.:** A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Exp. Cell Res.*, 235, 1997, s. 254–264.
- Chintala, S. K., Rao, J. K.:** Invasion of human glioma: Role of extracellular matrix proteins. *Front. Biosci.*, 1, 1996, s. 324–339.
- Chintala, S. K., Tonn, J. C., Rao, J. S.:** Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 17, 1999, s. 495–502.
- Chung, C. Y., Murphy-Ullrich, J. E., Erickson, H. P.:** Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol. Biol. Cell*, 7, 1996, s. 883–892.
- Delpech, B., Maingonnat, C., Girard, N. et al.:** Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur. J. Cancer*, 29A, 1993, s. 1012–1017.
- Fenstermacher, J. D., Patlak, C. S., Blasberg, R. G.:** Transport of material between brain extracellular fluid, brain cells and blood. *Fed. Proc.*, 33, 1974, s. 2070–2074.
- Gladson, C. L., Cheresch, D. A.:** Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J. Clin. Invest.*, 88, 1991, s. 1924–1932.
- Herold-Mende, C., Mueller, M. M., Bonsanto, M. M., Schmitt, H. P., Kunze, S., Steiner, H. H.:** Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int. J. Cancer*, 98, 2002, s. 362–369.
- Lehmenkühler, A., Syková, E., Svoboda, J., Zilles, K., Nicholson, C.:** Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience*, 55, 1993, s. 339–351.
- Liang, Y., Haring, M., Roughley, P. J.,**

**Margolis, R. K., Margolis, R. U.:** Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle. *J. Cell. Biol.*, 139, 1997, s. 851–864. – 14. **Mahesparan, R., Read, T. A., Lund-Johansen, M., Skaftnesmo, K. O., Bjerkgvig, R., Engebraaten, O.:** Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative *in vivo* glioma model. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 105, 2003, s. 49–57. – 15. **Margolis, R. K., Margolis, R. U.:** Nervous tissue proteoglycans. *Experientia*, 49, 1993, s. 429–446. – 16. **Nicholson, C., Phillips, J. M.:** Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J. Physiol.*, 321, 1981, s. 225–257. – 17. **Nicholson, C., Syková, E.:** Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.*, 21, 1998, s. 207–215. – 18. **Nicholson, C., Tao, L.:** Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. *Biophys. J.*, 65, 1993, s. 2277–2290. – 19. **Novak, U., Kaye, A. H.:** Extracellular matrix and the brain: components and function. *J. Clin. Neurosci.*, 7, 2000, s. 280–290. – 20. **Paulus, W., Huettner, C., Tonn, J. C.:** Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int. J. Cancer*, 58, 1994, s. 841–846. – 21. **Read, T. A., Thorsen, F., Bjerkgvig, R.:** Localised delivery of therapeutic agents to CNS malignancies: old and new approaches. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 3, 2002, s. 257–273. – 22. **Roitbak, T., Syková, E.:** Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia*, 28, 1999, s. 40–48. – 23. **Sontheimer, H.:** Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. *Trends Neurosci.*, 26, 2003, s. 543–549. – 24. **Soroceanu, L., Manning, T. J., Sontheimer, H.:** Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia*, 33, 2001, s. 107–117. – 25. **Syková, E.:** Ionic and volume changes in the microenvironment of nerve and receptor cells. In: Ottoson, D., eds. *Progress in Sensory Physiology*. Heidelberg, Springer-Verlag: 1992, 1–167. – 26. **Syková, E.:** Ion-selective electrodes. In: Stamford, J., ed. *Monitoring neuronal cells: a practical approach*. New York, Oxford University Press: 1992, 261–282. – 27. **Syková, E.:** The extracellular space in

the CNS: Its regulation, volume and geometry in normal and pathological neuronal function. *Neuroscientist*, 3, 1997, s. 28–41. – 28. **Syková, E.:** Glial diffusion barriers during aging and pathological states. *Prog. Brain Res.*, 132, 2001, s. 339–363. – 29. **Syková, E., Mazel, T., Vargová, L., Voříšek, I., Prokopová-Kubinová, Š.:** Extracellular space diffusion and pathological states. *Prog. Brain Res.*, 125, 2000, s. 155–178. – 30. **Trosko, J. E., Ruch, R. J.:** Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.*, 3, 1998, s. 208–236. – 31. **Van der Toorn, A., Syková, E., Dijkhuizen, R. M. et al.:** Dynamic changes in water ADC, energy metabolism, extracellular space volume, and tortuosity in neonatal rat brain during global ischemia. *Magn. Reson. Med.*, 36, 1996, s. 52–60. – 32. **Van Harreveld, A., Dafny, N., Khattab, F. I.:** Effects of calcium on the electrical resistance and the extracellular space of cerebral cortex. *Exp. Neurol.*, 31, 1971, s. 358–367. – 33. **Vargová, L., Homola, A., Zámečník, J., Tichý, M., Beneš, V., Syková, E.:** Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas. *Glia*, 42, 2003, s. 77–88. – 34. **Voříšek, I., Antonová, T., Mazel, T., Hájek, M., Syková, E.:** Diffusion and extracellular space volume fraction in the brain of mice lacking tenascin-R or HNK1 sulfotransferase. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 11, 2003, s. 1983. – 35. **Ye, Z. C., Rothstein, J. D., Sontheimer, H.:** Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J. Neurosci.*, 19, 1999, s. 10767–10777. – 36. **Zámečník, J., Cháňová, M., Tichý, M., Kodet, R.:** Distribution of the extracellular matrix glycoproteins in ependymomas – an immunohistochemical study with follow-up analysis. *Neoplasma*, 51 (3), 2004, 214–1. – 37. **Zámečník, J., Vargová, L., Homola, A., Kodet, R., Syková, E.:** Extracellular matrix and diffusion barriers in human astrocytic tumors. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2004, 30, 2004, s. 38–350.

*MUDr. Josef Zámečník, Ph.D.  
Ústav patologie a molekulární medicíny  
2. LF UK a FN v Motole  
V Úvalu 84  
150 06 Praha 5 – Motol  
tel: 224 435 653  
fax: 224 435 620*

## **Dugganův zákon vědeckého výzkumu:**

Nejcennější citát bývá ten, u kterého nejste s to určit autora.

Z čehož vyplývá:

Autorství takového neurčeného citátu vám s radostí prozradí nejnepříznivější recenze vaší práce.

## **Einsteinův dodatek k Parkinsonovu zákonu:**

Pracovní úkol se rozrůstá tak, aby zabral veškerý vyčleněný prostor.

## **Čtyři zásady pracovní dílny:**

Mezi náradím chybí právě ten klíč nebo vrták, který potřebujete.

Téměř ke každé práci je potřeba mít tři ruce.

Zbylé matičky se nehodí ke zbylým šroubkům.

Čím pečlivěji si práci naplánujete, tím větší zmatek, když se něco nevyvede.

## **Drummondův zákon nábory pracovníků:**

Ideální uchazeč se objeví den poté, co je místo obsazeno.