پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره نوزدهم شماره ۷۱ مرداد و شهریور سال ۱۳۸۸ (۵۱-۴۴)

افزایش غلظت پلاسمائی ومیزان MMP-9 فعال در بیماران متاستازی سرطان پستان و ارتباط آن با وجود آلل T در پروموتور این ژن

مرتضی صادقی[1] سیمین همتی[2]

چکیده

سابقه و هدف : ماتریکس متالو پروتئینازها (MMPs) خانوادهای از آنزیمهای پروتئولیتیک هستند که در هضم پروتئینهای ماتریکس خارج سلولی نگهدارنده سلولها و افزایش رفتار متاستازی تومورهای بدخیم انسانی نقش مهمی دارند. گزارش شده است که MMP ها به دو صورت پروآنزیم یا آنزیم فعال در نمونههای بیولوژیکی وجود دارند و نیز مشخص شده است که از بین این خانواده MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9) در هر دو مرحله شروع و متاستاز سرطان پستان نقش دارد. ما در مطالعات قبلی خود روی این ژن، ارتباط یک پلیمورفیسم C/T در پروموتوراین ژن و مرحله متاستاز سرطان پستان را گزارش کرده بودیم. با توجه به وجود یافتههای اندک فعلی درمورد ارتباط میزان فرم فعال این آنزیم و سرطان و نیز ارتباط فرم فعال با نوع ژنوتیپ اللی افراد، در این مطالعه ما به بررسی همزمان میزان MMP-9 فعال و ارتباط ان با ژنوتیپ آللی بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداختیم.

مواد و روش ها : در این مطالعه مورد- شاهدی، میزان MMP-9 فعال پلاسمائی در ۱۰۰ بیماران مبتلا به سرطان پستان و ۱۲۰ نمونه کنترل سالم همزمان با نوع ژنوتیپ اللی این افراد بررسی شد. میزان غلظت پلاسمائی از طریق زیموگرافی ژلاتین (gelatin zymography) با ژل پلی اکریلامید و ژنوتیپ آللی در محل پلیمورفیسم با هضم آنزیم محدودکننده (PCR-RFLP) بررسی شد.

یافته ها : آنالیز دادههای آماری نشان داد که غلظت پلاسمائی MMP-9 فعال در افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل سالم اختلاف بسیار معنی داری دارد به طوریکه غلظت فرم فعال این آنزیم در گروه کنترل سالم بسیار کمتر از گروه بیماران سرطان پستان بود (به ترتیب ۰/۷ نانوگرم و ۱/۷ نانوگرم)($P<0.0001$). همچنین میزان MMP-9 فعال در افراد دارای ژنوتیپ TT و CT در مقایسه با افراد کنترل CC افزایش معنیداری نشان داد(۱/۵ برابر).

استنتاج : طبق یافتههای حاضرغلظت MMP-9 فعال در گروه بیماران سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل افزایش قابل ملاحظهای دارد و افزایش میزان پلاسمائی این آنزیم، با وجود آلل T در پروموتور این ژن و پیشرفت سرطان پستان در این افراد ارتباط دارد. بنابراین میتوان از اندازهگیری فرم فعال پلاسمائی این آنزیم یا وجود الل T در افراد، به عنوان یک عامل تشخیصی برای گروه بندی بیماران سرطان پستان و تشخیص زنان بیمار مستعد متاستاز به دیگر نواحی استفاده کرد.

واژههای کلیدی: ماتریکس متالوپروتئیناز-۹، زیموگرافی ژلاتین، سرطان پستان

مقدمه

یکی ازمهمترین شرایط موردنیاز بدخیمی سرطانها مهاجرت، جایگیری و رشد سلول نئوپلاست به داخل بافت میزبان است. این فرایند مستلزم مراحل پیچیده واکنشهای سلول سرطانی با بافت میزبان و تغییرات

مولف مسئول: مرتضی صادقی- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم-۲، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک E-mail: ms.sadeghi @yahoo.com

۱. گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

۲. گروه رادیولوژی و انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت : ۸۸/۱/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۸/۳/۱۸ تاریخ تصویب : ۸۸/۴/۳۱

www.SID.ir

ماتریکس خارج سلولی است. تاکنون آنزیم‌های مختلفی شناخته شده‌اندکه درهضم ماتریکس خارج سلولی ایفای نقش می‌کنند مانند سرین پروتئازها (۲،۱) ماتریکس متالو پروتئینازها (MMPs) (۳) و متالوپروتئینازهای تجزیه کننده(۴).

ماتریکس متالو پروتئینازها خانواده‌ای از آنزیم‌های وابسته به زینک (Zinc-dependent) هستند که در هضم بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و بافت غشاء پایه ایفای نقش می‌کنند و از این لحاظ در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارای اهمیت هستند. MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9) یک پروتئین ۹۲ کیلودالتونی با فعالیت پروتئازی است که سوبسترای اصلی آن ماتریکس خارج سلولی و اتصالات بافت غشاء پایه است. این ژن یکی از مهمترین اعضاء خانواده ماتریکس متالوپروتئینازهاست و تنها عضو این خانواده است که به خاطر دارا بودن ساختار ۳ تائی فیبرونکتین قادر به اتصال و هضم کلاژن به عنوان مهمترین ترکیب غشاء پایه است. با توجه به عملکرد حساس این ژن تغییرات بیانی‌آن می‌تواند درسرطانی شدن سلول‌ها و تغییر رفتار آنها نقش مهمی ایفا کند (۷-۵). تحقیقات حاکی ازعملکردMMP-9 در شروع وگسترش سلول‌های توموری سرطان پستان از طریق هضم کلاژن و بر هم کنش با ژنهای مهارکننده تومورها است(۹،۸).

افزایش غلظت پلاسمائی MMP-9 در کاهش بقاء و پیشرفت بیماری سرطان پستان اهمیت دارد(۱۰). ژن MMP-9 در کروموزوم ۲۰ در موقعیت 20q2.3 قرار گرفته است. که وجود یک پلی مورفیسم C/T در ناحیه ۱۵۶۲ پروموتور این ژن سبب تغییر در بیان این ژن می‌شود به طوریکه افزایش بیان این ژن در اللهای دارای نوکلئوتید T (تیمین) این پلی مورفیسم مشاهده شده است. این تغییر بیان ظاهراً ناشی از ممانعت اتصال پروتئین‌های مهارکننده رونویسی به پروموتور این ژن در افراد دارای نوکلئوتید تیمین در این جایگاه است، در این افراد رونویسی از این ژن به علت عدم اتصال پروتئین‌های مهارکننده رونویسی به آلل T افزایش می‌یابد و در نتیجه میزان بیان کلی این آنزیم در افراد دارای الل T افزایش می‌یابد ولی در افراد واجد نوکلئوتید C (سیتوزین) در این پلیمورفیسم پروتئین‌های مهارکننده رونویسی، به پروموتور ژن متصل می‌شوند و بیان کلی MMP-9 را کاهش می‌دهند(۱۱). ما در مطالعات قبلی خود گزارش‌کرده بودیم که ارتباط اصلی بین وجود آلل T در پلی مورفیسم این ژن در مقایسه بین دو گروه سرطان پستان اولیه و پیشرفته یا متاستازی با گروه سالم با مرحله متاستاز سرطان پستان است(۹). با توجه به نتایج مطالعه قبلی ما روی جمعیت ایران که اختلاف اصلی از دو گروه بیماران اولیه سرطان پستان و بیماران دارای سرطان پیشرفته (بیماران متاستازی)، بین افراد دارای متاستاز سرطان پستان و آلل T در پروموتور این ژن بود. در این مطالعه ما باتوجه به اهمیت موضوع و کمبود یافته‌ها در مورد مقدار پلاسمائی این‌آنزیم تصمیم گرفتیم به طور همزمان به بررسی میزان غلظت MMP-9 فعال پلاسمائی و ارتباط آن با نوع ژنوتیپ آللی این ژن و مرحله پیشرفت سرطان پستان در دوگروه بیماران مبتلا به سرطان پستان دارای متاستاز با تشخیص قطعی پزشک مربوط و گروه زنان سالم فاقد متاستاز بپردازیم تا بتوانیم به تفاوت قطعی بین میزان این آنزیم در افراد مبتلا به سرطان پیشرفته (افراد متاستازی) و افراد فاقد سرطان (گروه کنترل) پی ببریم.

مواد و روش ها

تهیه نمونه:

در این مطالعه مورد- شاهدی، گروه بیماران شامل ۱۰۰ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان با حالت بدخیم و متاستاز به دیگر بافت‌ها با میانگین سنی ۴۷ سال بودند و ۱۲۰ زن سالم با میانگین سنی مرتبط با گروه بیماران نیز مورد مطالعه قرار گرفتند. وجود متاستاز در تمامی افراد توسط پزشک متخصص تائید شد. از هر فرد مورد مطالعه ۶ میلی‌لیتر خون وریدی گرفته شد. ۳ میلی‌لیتر

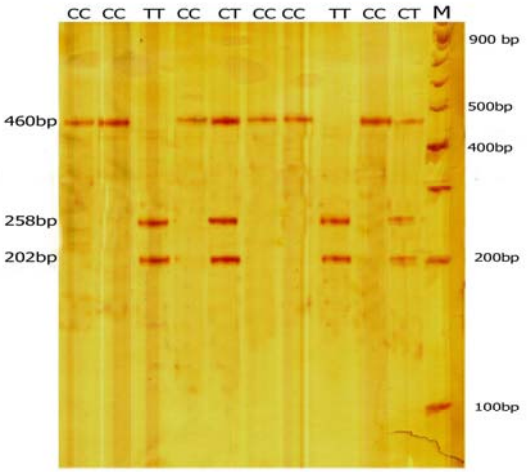
Archive of SID

www.SID.ir

برای استخراج DNA به لوله‌های حاوی EDTA منتقل شد و ۳ میلی‌لیتر برای استخراج پلاسما در لوله‌های فاقد مواد ضد انعقاد نگهداری شد. در دو مرحله جداگانه پلاسما و DNA هربیماراستخراج شد. برای استخراج DNA از روش نمکی میلر با مقداری دستکاری استفاده شد(۱۲) و برای استخراج پلاسما تیوپ حاوی نمونه خون نیم ساعت بعد از لخته شدن خون با دور g ۱۶۰۰ برای ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد و لخته خون دور ریخته شد و سرم تهیه شده از هر فرد تا زمان مطالعه در ۸۰- درجه نگهداری شد. همچنین سابقه فامیلی و خانوادگی تمامی بیماران بررسی شد و فرم‌های اطلاعات مورد نیاز تکمیل شد.

تعیین ژنوتیپ:

برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم C/T در ناحیه ۱۵۶۲ پروموتور ژن MMP-9 ، ابتدا ناحیه از پروموتور این ژن به طول ۴۶۰ جفت باز توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR در دستگاه اپندروف ساخت آمریکا با پرایمرهای رفت با توالی 5' TCT AGC CTC ATA GTA-3' و پرایمر برگشت با توالی 5' CAG TC-GAA TCT GGA CAT CCG GCA TC –3' 5 تکثیر شد. تکنیک PCR در حجم کل ۵۰ میکرولیتر با غلظت‌های زیر انجام‌گرفت : DNA ژنومی ng ۲۰- ۱۵، dNTP ۰/۴ µM ، MgCl2 ۴mM ، Tris-HCl ۲۰ mM، KCl ۱۰۰ mM، ۰/۶ µM از هر پرایمر و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز (ساخت شرکت سینا ژن). واکنش تکثیر به صورت زیرانجام گرفت : ۴ دقیقه در ۹۵ درجه به همراه ۳۰ سیکل هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه برای دناچوراسیون ، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه برای اتصال پرایمرها،۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه برای فعالیت تکثیری آنزیم ، در انتها ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه. سپس نمونه‌های حاصل ازتکثیر با استفاده ازآنزیم محدود کننده SphI (new England biolab) که در جایگاه مربوط دارای سایت برش است و فقط الل‌های تیمین را برش می دهد (قطعات ۲۰۲ و ۲۵۸ جفت بازی حاصل از برش قطعه ۴۶۰ جفت بازی) مورد برش قرار گرفت و در نهایت نمونه‌ها روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد با ولتاژ ۱۰۰ برای ۱۲ ساعت الکتروفورز شدند و بعد از رنگ‌آمیزی نیترات نقره نمونه‌ها مشاهده شدند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: نتایج حاصل از هضم آنزیمی و الکتروفورز ۱۰ بیمار که به صورت تصادفی انتخاب شده‌اند روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد. محصول اصلی PCR دارای 460bp طول است که بعد از برش توسط آنزیم Sph1 که دارای جایگاه برش در محل پلی‌مورفیسم برای آلل‌های T است، به دو قطعه 202bp و 258bp تبدیل می‌شود. در بالای شکل ژنوتیپ افراد مشخص شده است. (M مارکر 100bp).

زیموگرافی ژل اکریلامید و SDS، (SDS- polyacrylamide gelatin zymography)

میزان فعالیت پلاسمائی MMP-9 توسط زیموگرافی ژلاتین اندازه گرفته شد. در این تکنیک ژلاتیناز موجود در نمونه پلاسما موجب هضم ماتریکس ژلاتینی می‌شود و این نواحی به صورت نقاط شفاف روی ژل رویت می‌شوند(۱۳).

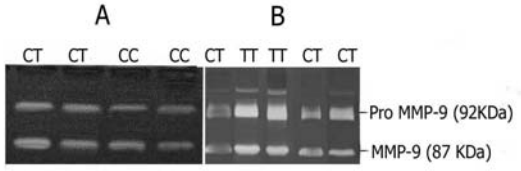
زیموگرافی ژلاتین جهت مشاهده میزان MMP-9 پلاسمائی فعال از هر دو گروه نمونه‌های کنترل و بیماران به زیر صورت گرفت:

ژل اکریلامید ۱۲ درصد به طور همزمان با ۱ درصد ژلاتین (Sigma) به عنوان سوبسترا، پلی مر شد و از

Archive of SID

www.SID.ir

پلاسمای هر نمونه ۲۵ میکرولیتر در هر چاهک ژل لود شد و الکتروفورز با ولتاژ ۱۵۰ ولت تا زمان رسیدن رنگ لودینگ بافر به ته ژل (حدوداً ۱۲ ساعت) صورت گرفت بعد از اتمام الکتروفورز، ژل به مدت یک ساعت در بافر رناچوراسیون شامل ۲/۵ Triton X-100 in 50 mM Tris–HCl(pH 7.5)) درصد) در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و سپس ژل به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه در بافر زیر با PH= ۷/۵ انکوبه گردید(۰/۱۵ M NaCl ،۱۰ mM CaCl2 0.02% NaN3 in 50 mM Tris–HCl) و در نهایت ژل با کوماسی بولو ۰/۰۵ درصد رنگ‌آمیزی و با متانول ۳۰ درصد و استیک اسید ۱۰ درصد شستشو شد. بدین صورت صفحه زمینه ژل توسط کوماسی بولو رنگ تیره می‌گیرد و نواحی که در آنها بر هم کنش ژلاتیناز (MMP-9) و سوبسترای خود یعنی ژلاتین که به ژل افزوده شده بود، به صورت نواحی بدون رنگ در مقابل زمینه سیاه اطراف باقی می‌مانند. نواحی حاصل از پرو MMP-9 (MMP-9 غیر فعال) و MMP-9 فعال به ترتیب در نواحی۹۲ و ۸۷ کیلو دالتن با استفاده از مارکر قابل شناسائی هستند، علاوه بر این روش برای تعیین کمی میزان این آنزیم از کیت کمپانی بایورد انگلیس استفاده شد (Biorad MMP-9 detection kit) (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲ : زیموگرام ژنوتیپ‌های مختلف گروه کنترل (A) و گروه بیماران سرطانی (B) روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد بعد از رنگ امیزی با کوماسی بولو.
Pro MMP-9 میزان پیش آنزیم موجود در پلاسمای هر فرد با وزن مولکولی 92 کیلو دالتن و پروتئین فعال MMP-9 باند پائینی با وزن مولکولی 87 کیلو دالتن.

با استفاده از آزمون کای دو، توزیع ژنوتیپ‌ها بر اساس تعادل هاردی واینبرگ ارزیابی شد و P<۰/۰۵ درتمامی محاسبات معنادار درنظرگرفته شد. همچنین برای بررسی توزیع ژنوتیپ‌ها در بین دو گروه بیماران و افراد کنترل از آزمون مربع کای استفاده شد و میزان فعالیت پلاسمائی استاندارد MMP-9 با اسکن باندهای حاصل توسط اسکنر دنسیتومتر(Epson GT-9500 scanner) ساخت آلمان مشخص شد و آنالیز با استفاده از نرم‌افزار (Biometra) Scan Pack 3.0 ساخت انگلیس انجام شد.

یافته ها

پس ازPCR و هضم محصولات توسط آنزیم محدود کننده و الکترفورز روی ژل اکریلامید، ژنوتیپ تک تک افراد مورد مطالعه مشخص شد (شکل شماره ۱). ژنوتیپ‌های TT,CT,CC جایگاه پلی‌مورفیسم مورد نظر در ژن MMP-9 به ترتیب در ۹۲ درصد، ۸ درصد ، و ۰ درصد از نمونه‌های کنترل و۶۵/۱۴ درصد ، ۳۰/۵۴ درصد و ۴/۳۲ درصد از نمونه‌های گروه بیماران سرطانی دارای متاستاز مشاهده شد. ژنوتیپ TT فقط در افراد دارای متاستاز مشاهده شد و هیچ کدام از افراد گروه کنترل دارای این نوع ژنوتیپ نبودند.

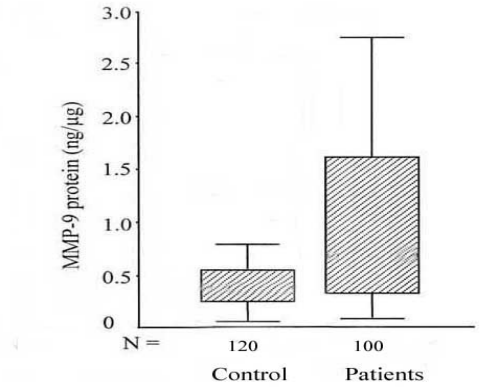
سرم تمامی افراد مورد مطالعه برای بررسی سطح MMP-9 پلاسمائی فعال با زیموگرافی آزمایش شد (شکل شماره ۲) در این شکل قسمت A نشاندهنده میزان MMP-9 فعال ۴ نمونه کنترل با ژنوتیپ‌های مختلف و قسمت B نشاندهنده میزان پلاسمائی MMP-9 فعال ۵ بیمار سرطانی است که به طور تصادفی از بین گروه بیماران انتخاب شده‌اند و ژنوتیپ افراد در بالای شکل نمایش داده شده است نواحی روشن مناطق بر هم کنش ژلاتیناز با ژلاتین موجود در ژل است و میزان شارپ بودن باند هر نونه، میزان پروتئین موجود در پلاسمای آن فرد را نشان می‌دهد.

پس از اندازه‌گیری میزان کلی MMP-9 فعال در دو گروه مشخص شد که میزان MMP-9 فعال پلاسمائی در

Archive of SID

www.SID.ir

گروه بیماران افزایش قابل توجهی نسبت به گروه کنترل A دارد (۰/۷ نانوگرم در برابر۱/۷ نانوگرم) (P<۰/۰۰۰۱) (شکل شماره ۳). همچنین دو فرد بیمار دارای ژنوتیپ TT ، میزان MMP-9 فعال بیشتری در مقایسه با افراد بیمار دارای ژنوتیپ CT دارند (۱/۵ برابر) همچنین مقایسه ژنوتیپ تمامی افراد نشان داد که ژنوتیپ TT فقط در بیماران متاستازی وجود دارد و هیچکدام از افراد کنترل دارای ژنوتیپ هموزیگوت TT نیستند.



شکل شماره ۳: میزان کلی MMP-9 فعال پلاسمائی بر حسب ng/µl در گروه کنترل (Control) و گروه بیماران سرطانی دارای متاستاز یا بدخیم (Patients).

بحث

در این مطالعه ما برای اولین بار به بررسی همزمان مقدار MMP-9 فعال پلاسمائی و ارتباط آن با ژنوتیپ آللی افراد در ناحیه ۱۵۶۲ پروموتور این ژن پرداختیم تا از این طریق مشخص کنیم که آیا وجود آلل T در پروموتور ژن MMP-9 در افراد دارای متاستاز سرطان سینه با میزان فعالیت پلاسمائی این آنزیم در ارتباط است یا خیر؟، از آنجائیکه در اکثر مطالعات در جمعیت‌های دیگر نیز مانند مطالعه قبلی ما، نقش اصلی این آنزیم در متاستاز و بدخیمی سرطانها گزارش شده است و در بیماران با سرطان پستان بعضی از بیماران غیر متاستازی در حالت پیشرفته و در واقع در مرز بین حالت متاستاز هستند و ممکن است در تشخیص‌های کلینیکی غیر متاستازی شناخته شوند که این امر خود می‌تواند در تقسیم‌بندی افراد و در نتیجه در اندازه‌گیری میزان این آنزیم در بین افراد دو گروه (بیماران سرطانی فاقد متاستاز و بیماران دارای متاستاز) ایجاد خطا کند ما در این مطالعه برای مشخص شدن تفاوت بین حالت پیشرفته سرطان و افراد سالم، میزان این آنزیم و وجود الل T در بین دو گروه بیماران سرطانی متاستازی و گروه زنان سالم فاقد سرطان را بررسی کردیم، تشخیص بیماری سرطان درمراحل اولیه وتشخیص مکانیسم‌های مولکولی درگیر در فرایند سرطان در درمان این بیماری اهمیت ویژه دارد. مشخص شده است که بیماران مبتلا به سرطان پستان یک گروه به خاطر میزان بیان متغیر ژن‌ها و ترکیبات مولکولی مختلف سلول‌ها به درمانهای شیمیائی این بیماری واکنش‌های مختلفی نشان می‌دهند(۱۴). این موضوع موجب علاقه‌مندی دانشمندان به پیدا کردن مارکرهای مولکولی جدید و ژن‌های دخیل در این بیماری شده است. از طرفی شرکت کردن MMP ها در مراحل مختلف سرطان سبب شده این خانواده به کاندید مناسبی برای مطالعات تشخیصی ژن‌های مارکر تبدیل شوند(۱۵). MMP ها در ابتدا به صورت پروآنزیم‌های غیرفعال در سیتوپلاسم ترشح می‌شوند و سپس توسط مکانیسم‌های مختلف قسمت زیموژن از آنها جدا و آنها به آنزیم فعال تبدیل می‌شوند(۱۶). تا کنون دانشمندان مختلفی به بررسی میزان پلاسمائی MMP-9 از طریق ژیموگرافی در بیماری‌های مختلفی پرداخته‌اند و به نتایج متفاوتی رسیده‌اند(۱۹-۱۷). دلائل اختلاف نظر محققین در این موضوع می‌تواند ناشی از روش‌های مختلف آنالیز داده‌ها باشد و دلیل مهم‌تر دیگر، می‌تواند ناشی از استفاده مواد ضد انعقاد خون مانند هپارین و EDTA باشد که این مواد می‌تواند روی اندازه‌گیری میزان پروتئین فعال، اثرگذار باشد و سبب اختلاف داده‌ها شود. در حقیقت EDTA از مهمترین مهارکننده MMPها است و هپارین نیز میتواند به تعدادی از اعضاء این خانواده متصل شود و نتایج را با خطا مواجه کند(۲۱،۲۰). در مطالعات قبلی ما نشان دادیم که وجود

www.SID.ir
Archive

آلل T در پروموتور MMP-9 می‌تواند با متاستاز سرطان سینه در ارتباط باشد(۹) ، ازاینرو در این مطالعه ما هدف خود را تعیین میزان MMP-9 فعال در پلاسمای افراد ازطریق زایموگرافی که یکی ازحساسترین تکنیک‌ها برای سنجش فرم پرو آنزیم و فرم فعال آنزیم است، قرار دادیم.

بر اساس یافته‌های حاصل از زیموگرافی میزان کلی MMP-9 فعال در پلاسمای افراد گروه بیماران (شکل شماره ۲ قسمت B) ۲/۴۲ برابر گروه کنترل است (P<۰/۰۰۰۱) (شکل شماره ۳). در یک مقایسه کلی گروه بیماران باندهای شارپتری از گروه کنترل نشان می‌دهند و هر گروه از افراد CT در مقایسه با افراد CC میزان بیان بیشتری را نشان می‌دهند که این یافته تائیدکننده نقش آلل T در افزایش بیان و در نتیجه میزان پلاسمائی این پروتئین است. Stella و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با مطالعه‌ای نشان دادند که می‌توان از غلظت پلاسمائی MMP-9 و عضو دیگر این خانواده یعنی MMP-2 برای تقسیم‌بندی بیمارن مبتلا به سرطان پستان استفاده کرد، طبق یافته‌های آنها میزان MMP-9 در بیماران سرطان پستان به طور قابل توجهی نسبت به افرادکنترل افزایش یافته بود(۲۲). Rocca درمطالعه‌ای دیگر روی جمعیت ایتالیا نشان دادکه افزایش قابل توجه‌ای در میزانMMP-9 گروه سرطان پستان در مقایسه با افراد کنترل وجود دارد که نتایج این دانشمندان با نتایج مطالعه حاضر در جمعیت ایران مطابقت دارد. Karolina در مطالعه دیگری در جامعه هلند و پلی مورفیسم ناحیه ۱۵۶۲ پروموتور MMP-9 نشان داد که وجود آلل T در این جایگاه می‌تواند با OR=2.61 با بدخیمی سرطان پستان و متاستاز به غدد لنفاوی در این جمعیت در ارتباط باشد(۲۳) در میان افراد مبتلا به سرطان پستان این مطالعه نیز بیشترین میزان غلظت پلاسمائی MMP-9 مربوط به افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت TT بود که این امر تائید کننده نتایج مطالعه Karolina و نشاندهنده نقش آلل T در افزایش بیان این ژن است و از تلفیق نتایج این دو مطالعه می‌توان استنباط کرد که وجود الل T در این ناحیه از پروموتورMMP-9 ، باعث افزایش بیان این ژن و افزایش فرم فعال پلاسمائی این آنزیم و در نهایت منجر به افزایش آسیب‌پذیری ماتریکس خارج سلولی و غشاء پایه نگهدارنده سلول‌ها می‌شود که این عوامل می‌توانند با همکاری عوامل دیگر سبب تسهیل مراحل سرطانی شدن سلول‌ها در افراد دارای این ژنوتیپ گردد.

این مطالعه برای اولین بار در ایران انجام شد و در یک نتیجه‌گیری کلی طبق یافته‌های ما میزان غلظت پلاسمائی MMP-9 را میتوان به عنوان فاکتوری کلیدی برای تشخیص میزان استعداد افراد مبتلا به سرطان پستان برای متاستاز به دیگر نواحی و بافت‌های مجاور معرفی کرد و یکی از راه‌های تشخیص میزان بیان این ژن در افراد نوع ژنوتیپ آللی آنها است. طبق نتایج این مطالعه زنان دارای ژنوتیپ TT برای ناحیه ۱۵۶۲ پروموتور MMP-9 در مقایسه با افراد دارای ژنوتیپ CT و CC دارایMMP-9 پلاسمائی فعال بیشتری هستند(۱/۵برابر)، که با توجه به عملکرد این ژن در تخریب ماتریکس خارج سلولی و بافت غشاء پایه، این افراد در صورت ابتلا به سرطان پستان برای متاستاز سرطان به دیگر نواحی بسیار مستعدتر از زنان دارای دو نوع ژنوتیپ دیگر (CC,CT) هستند و از طریق تعیین ژنوتیپ این ژن در ناحیه پروموتوری ۱۵۶۲ میتوان این افراد را در زیر گروه بیماران پر خطر سرطان پستان نسبت به دیگر بیماران سرطان پستان معرفی کرد.

سپاسگزاری

در پایان از کارمندان بخش انکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه اصفهان و بخش تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان به خاطر فراهم کردن تجهیزات و همچنین از اقای دکتر محمد سعید جامی از دانشکده بیوتکنولوژی دانشگاه لئون اسپانیا به خاطر همکاری صمیمانه در تجزیه و تحلیل داده‌ها و راهنمائی‌هایشان برای انجام زیموگرافی تشکر می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 932-943.
2. Diamandis E.P, Yousef G.M. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. Clin Chem 2002; 48: 1198-1205.
3. Somerville RPT, Oblander S.A, Apte S.S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. Genome Biol 2003; 4(6): 216.
4. O'Shea C, McKie N, Buggy Y, Duggan C, Hill AD, McDermott E, et al. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. Int J Cancer 2003; 105(6): 754-761.
5. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res 2003; 92: 827-839.
6. Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson S.J, Allan J.A, Knight C.G, et al. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. J Biol Chem 1994; 269: 6632-6636.
7. Stetler WG. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 1990; 9: 289-303.
8. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. Breast Cancer Res 2000; 2: 252-257.
9. Sadeghi M, Motovali M, Hojati Z. Investigation of Gelatinase- B Enzyme Role in Invasion and Metastasis of Breast Cancer. J Med Res (Shahid Beheshti University) 2008; 32(2): 89-93 (Persion).
10. Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal D.e, Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. Int J Cancer 2003; 106: 745-751.
11. Zhang B, Ye S, Herrmann S.M, Eriksson P, De Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis, Circulation 1999; 99: 1788-1794.
12. Miller SA, Dybes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.
13. Lengyel E, Gum R, Juarez J, Clayman G, Seiki M, Sato H, et al. Induction of Mr 92,000 type IV collagenase expression in a squamous cell carcinoma cell line by fibroblasts. Cancer Res 1995; 55: 963-967.
14. Van't LJ, Dai H, Van De, Vijver MJ, He YD, Hart AA.M, et al. Friend SH Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002; 415: 530-535.
15. King J, Zhao J, Clingan P, Morris D. Randomised double blind placebo control study of adjuvant treatment with the metalloproteinase inhibitor, Marimastat in patients with inoperable colorectal hepatic metastases: significant survival advantage in patients with musculoskeletal side-effects. Anticancer Res 2003; 23: 639-645.
16. Nagase H, Woessner JR, JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999; 274: 21491-21494.
17. Garbett EA, Reed MW, Brown NJ. Proteolysis in human breast and colorectal cancer. Br J Cancer 1999; 81: 287-293.
18. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. Mr. 92000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. Cancer Res 1993; 53: 140-146.
19. Oberg A, Hoyhtya M, Tavelin B, Stenling R, Lindmark G. Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases

Archive of SID

www.SID.ir

MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases TIMP-1, TIMP-2 in colorectal cancer. Gut 1999; 45: 252-258.

20. Wallon UM, Overall CM. The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A(matrix metalloproteinase-2) requires Ca2+ for fibronectin and heparin binding. J Biol Chem 1997; 272: 7473-7481.
21. Keller KM, Keller JM, Kuhn K. The C-terminus of type I collagen is a major binding site for heparin. Biochim Biophys Acta 1986; 882: 1-5.
22. Somiari B, Craig D, Shriver C. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. Cancer lett 2006; 223: 98-107.
23. Karolina P, Anita K, Marek Z. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2006; 95: 65-72.

Archive of SID

www.SID.ir