Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(108): 46-53

Association between *MMP9* Promoter Polymorphism and Breast Cancer Progression in Northwest of Iran

Fatemeh Toroghi [1], Farhad Mashayekhi[2*], Vahid Montazeri [3], Hamid Saeedi Saedi[4]

1- MSc in Cell and Molecular Biology, Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Professor in Cell and Developmental Biology, Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- Professor, Department of Surgery, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Oncology, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Received: 15 Nov 2015, Accepted: 6 Apr 2016

Abstract

Background: *MMP9*, as a member of the *MMPs* family, codes a protein that is able to provide suitable infrastructures for the migration of cancer cells and angiogenesis within tumor. The aim of this study was to investigate the relationship between -1562 C> T polymorphism in *MMP9* promoter and progression of breast cancer in northwest of Iran**.**

Materials and Methods: In this case-control study, 187 females from northwest of Iran were involved. Polymorphism of interest was determined by PCR-RFLP method using enzyme PaeI and statistical analysis was done by Med Calc software.

Results: Distribution of CC genotype in cancer and control groups was,44 and 62.5, tespectively and distribution of CT genotype in cancer and control groups was 56 and 37.5, respectively, In the statistical analysis, χ^2 and p value were respectively, 5.4 and 0.01. There is a significant association between this polymorphism and lymph nodes involvement and presence of tumor larger than $2cm^3$ (respectively p= 0.005 and p = 0.03). The results of this study showed -1562 C> T polymorphism in *MMP9* promoter is associated with stage II and higher stages of breast cancer in our population. Furthermore, CT genotype may increase the risk of lymph node metastasis and presence of tumor larger than 2 cm^3 (OR= 4).

Conclusion: According to the results of this study, MMP9 (-1562 C> T) polymorphism may be used as a biomarker for breast cancer prognosis. Although, to achieve more definitive results, it is necessary to examine a larger population.

Keywords: Cancer, MMP9, Polymorphism

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.
Email: mashayekhi@guilan.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۳ (شماره پیاپی ۱۰۸)، خرداد ۱۳۹۵، ۵۳-۴۶

ارتباط پلی‌مورفیسم راه انداز ۹ *MMP* با پیشرفت سرطان سینه در شمال غرب ایران

فاطمه طرقی[۱]، فرهاد مشایخی[۲*]، وحید منتظری[۳]، حمید سعیدی ساعدی[۴]

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه بیولوژی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- استاد بیولوژی سلولی تکوینی، گروه بیولوژی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- استاد، گروه جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۴- دانشیار، گروه انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: *MMP*۹ یکی از اعضای خانواده ماتریکس متالوپروتئینازها *(MMPs)* می‌باشد که پروتئین حاصل از آن قادر است شرایط مناسب برای مهاجرت سلول‌های سرطانی و رگ‌زایی درون تومور را فراهم نماید. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C>T در ناحیه ۱۵۶۲- راه انداز ژن MMP۹ و پیشرفت سرطان سینه در جمعیت شمال غرب ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق مورد- شاهدی، جمعاً ۱۸۷ زن مشارکت داشتند. پلی‌مورفیسم مورد نظر با روش PCR-RFLP و با استفاده از آنزیم Pae I بررسی گردید و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار مدکالک انجام گرفت.

یافته‌ها: توزیع ژنوتیپ CC در گروه‌های سرطانی و کنترل به ترتیب ۴۴ و ۶۲/۵ و توزیع ژنوتیپ CT در گروه‌های سرطانی و کنترل به ترتیب ۵۶ و ۳۷/۵ بود. در تحلیل آماری، مجذور کای و سطح معنی‌داری به ترتیب۵/۴ و ۰/۰۱ می‌باشد. علاوه بر این، بین پلی‌مورفیسم مورد نظر با درگیری غدد لنفاوی بیمار و نیز وجود تومور بزرگ‌تر از ۲ سانتی‌متر مکعب ارتباط معنی‌دار وجود دارد(به ترتیب، p=۰/۰۰۵ و p=۰/۰۳). نتایج این تحقیق نشان داد که مورد مطالعه ما، پلی‌مورفیسم C>T ۱۵۶۲- ژن *MMP*۹ با سرطان سینه در مرحله‌ی ۲ و بالاتر ارتباط دارد. هم‌چنین وجود ژنوتیپ CT می‌تواند خطر متاستاز به غدد لنفاوی و خطر وجود تومور بزرگ‌تر از ۲ سانتی‌متر مکعب را ۴ برابر کند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتیجه دست آمده ممکن است از این پلی‌مورفیسم به عنوان بیومارکر پیش آگهی استفاده کرد، هرچند نتیجه‌گیری قطعی نیازمند انجام این تحقیق با جامعه آماری بزرگ‌تر می‌باشد.

واژگان کلیدی: سرطان، *MMP*۹، پلی‌مورفیسم

***نویسنده مسئول:** ایران، رشت، دانشگاه گیلان، گروه بیولوژی

Email: mashayekhi@guilan.ac.ir

مقدمه

امروزه در کشورهای در حال توسعه، سرطان سینه به عامل اصلی مرگ ناشی از سرطان در جمعیت زنان تبدیل شده است، در حالی که در دهه قبل سرطان سرویکس عامل اصلی مرگ ناشی از سرطان شناخته می‌شد(۱). سرطان سینه در مراحل اولیه با جراحی یا پرتو درمانی قابل درمان می‌باشد، ولی در صورت وقوع متاستاز درمان مشکل‌تر و بقا به حدود ۲۵ درصد کاهش می‌یابد(۲). متاستاز طی چندین مرحله انجام می‌گیرد، این مراحل شامل جدا شدن سلول‌های بنیادی سرطانی از تومور اولیه، تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی، داخل شدن به رگ‌ها، انتقال از طریق سیستم رگی و خارج شدن از عروق و در نهایت ایجاد تومور ثانویه در بستر جدید می‌باشد. از طرفی برای این که تومور بتواند به اندازه بیش از ۲ میلی مترمکعب رشد یابد، باید توانایی رگ‌زایی داشته باشد(۳). بنابراین متاستاز و توانایی رگ‌زایی دو فرآیند ضروری برای پیشرفت سرطان می‌باشد که توسط بیان ژن‌های مختلفی از جمله ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) انجام می‌گیرد.

ماتریکس متالوپروتئینازها گروهی از آنزیم‌های وابسته به فلز روی هستند که توانایی تجزیه پروتئولیتیک اجزای مختلف ماتریکس خارج سلولی را داشته و در شرایط فیزیولوژیک طبیعی مانند ترمیم زخم، تحلیل بافت و تکوین جنین فعالیت می‌کنند(۴). ماتریکس متالوپروتئینازها به گروه‌های مختلفی شامل MMPهای کلاسیک، MMPهای متصل به غشا، ADAMs و ADAMTs تقسیم می‌شوند(۵). یکی از اعضای مهم *MMP* های کلاسیک، ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ می‌باشد که بر روی کروموزوم۲۰ قرار دارد و پروتئین ۹۲ کیلو دالتونی به نام کلاژناز یا ژلاتیناز B را رمز دهی می‌کند. این پروتئین قادر است کلاژن، پروتوگلیکان‌ها، الاستین، فیبرونکتین و نیز پروتئین‌های غیر ماتریکسی نظیر TNF-a، TGF-β،IL-8 را تجزیه نماید. بر اساس مطالعات انجام گرفته، بیان *MMP۹* در انواع بدخیمی‌ها افزایش می‌یابد که می‌تواند عواقب ناخوشایندی به دنبال داشته باشد، از جمله با آزاد سازی بیش از حد فاکتورهای رشد و فاکتورهای رگ‌زایی به تکثیر سلول‌های سرطانی و رگ‌زایی تومور کمک می‌کند و نیز با تخریب ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه، فضای کافی برای رگ‌زایی یا مهاجرت سلولی را ایجاد می‌کند(۶، ۷). برخی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن *MMP۹* در افزایش بیان آن موثر دانسته شده‌اند. یکی از این پلی‌مورفیسم‌ها به عنوان جایگزینی تیمیدین به جای سیتوزین در ناحیه۱۵۶۲ - راه انداز ذکر شده است. این جایگزینی با کاهش قدرت اتصال پروتئین‌های سرکوبگر به ناحیه تنظیمی AP-1 باعث افزایش ۱/۵برابری رونویسی از ژن *MMP۹* می‌گردد(۸).

نتایج به دست آمده از بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C>T در ناحیه ۱۵۶۲- راه انداز ژن *MMP۹* با سرطان سینه و پیشرفت آن در جمعیت‌های مختلف، متفاوت و گاه متناقض بوده و از سویی این نتایج به دلیل کوچک بودن نمونه‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی و محیطی قابل تعمیم نمی‌باشد. بنابراین برای دستیابی به نتیجه قطعی در این مورد، نیاز به تحقیق در جمعیت‌های بیشتر و انجام متاآنالیز ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی C>T در ناحیه ۱۵۶۲- راه انداز ژن *MMP۹* و پیشرفت سرطان سینه در جمعیت شمال غرب ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در این تحقیق مورد- شاهدی، جمعاً ۱۸۷ نفر مشارکت داشتند. ۷۵ زن مبتلا به سرطان سینه که در بازه زمانی شهریور۱۳۹۲ تا فروردین ۱۳۹۳ در بیمارستان نور نجات تبریز تحت عمل جراحی قرار گرفتند و نتیجه پاتولوژی آن‌ها سرطان سینه مرحله ۲ یا بالاتر گزارش شده بود، به عنوان گروه بیماران انتخاب شدند. هم‌چنین۱۱۲ زن سالم (بدون سابقه سرطان در خود یا خویشاوندان درجه اولشان) از میان افراد مراجعه کننده به کلینیک گلستان تبریز انتخاب شدند.

تهیه خون و استخراج DNA

پس از اخذ رضایت‌نامه و تکمیل فرم اطلاعات هر فرد، ۲ میلی‌لیتر خون در لوله‌های حاوی EDTA تهیه و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل گردید. DNA ژنومی به وسیله کیت (Gpp Solution شرکت ژن پژوهان، ایران) و بر اساس پروتکل مربوطه از نمونه‌های خون افراد استخراج گردید. پس از ارزیابی DNA استخراج شده به وسیله ژل آگارز ۱ درصد، تا زمان بررسی مولکولی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در میکروتیوب‌های حاوی DNA نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

در واکنش PCR مربوط به ژن مورد نظر، از دستگاه ترموسایکلر 48 چاهک (بیوراد، انگلستان) استفاده گردید. یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده جهت تکثیر محدوده قطعه پلی‌مورفیسم استفاده گردید(جدول۱). پرایمرها توسط شرکت پارس مهر زیست طراحی گردید و سنتز آن به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد. شرایط تکثیر شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه به منظور واسرشت رشته، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها به DNA پلی مریزاسیون، در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی رشته به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود(جدول ۲). قطعات تکثیر شده در شکل ۱ نمایش داده شده است.

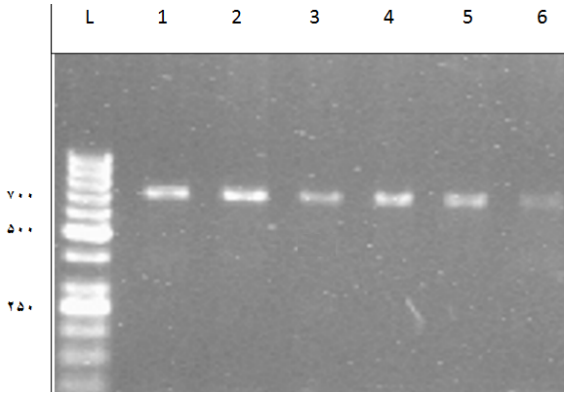
جدول ۱. مشخصات آغازگرها برای بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلوتیدی T>C۱۵۶۲- ژن MMP۹

آغازگرها	طول قطعات (bp)	دمای ذوب (C°)	درصد CG
F: 5′ ACTTATTACGGTGCTTGACACA 3′	(C)۶۹۰	۵۱/۴	۴۰/۹
R: 5′ TCACTCCTTTCTTCCTAGCCA 3′	(T)۴۳۶ + ۲۵۴	۵۳/۰	۴۷/۶

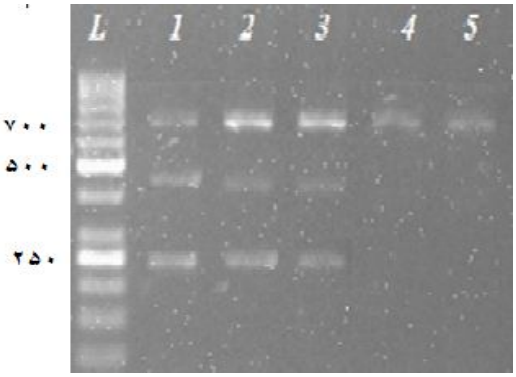
جدول ۲. دستورالعمل مورد استفاده برای انجام PCR

ردیف	مرحله	درجه سانتی گراد	زمان
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه
۲ (۳۵ X)	واسرشت سازی	۹۴	۴۵ ثانیه
	اتصال آغازگر به رشته الگو	۵۷/۵	۴۵ ثانیه
	بسط	۷۲	۴۵ ثانیه
۳	بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه
۴	نگهداری	۴	

به منظور بررسی تأثیر آنزیم محدود کننده ۴ میکرولیتراز هر محصول PCR به ۴/۸ ماکرولیتر آب استریل فاقد DNase، ۰/۲ ماکرولیتر آنزیم PaeI (فرمنتاس) و ۱ ماکرولیتر بافر B اضافه گردید و برای مدت ۴/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جایگاه برش این آنزیم 5′GCATGˇC3′ می‌باشد. در صورت وجود آلل T، قطعه ۶۹۰ جفت بازی تکثیر شده، توسط آنزیم PaeI بریده شده و دو قطعه ۲۵۴ و ۴۳۶ قطعه‌ای ایجاد می‌شود. بنابراین انتظار می‌رود در ژنوتیپ CC یک قطعه ۶۹۰ جفت بازی، در ژنوتیپ CT سه قطعه ۶۹۰، ۴۳۶، ۲۵۴ جفت بازی و در ژنوتیپ TT دو قطعه ۴۳۶ و ۲۵۴ جفت بازی ایجاد شود. محصولات برش خورده PCR روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و با استفاده از نور ماورای بنفش مشاهده شد(شکل۲).



شکل۱ .تصویر DNAی تکثیر شده باPCR قطعات تکثیر شده دارای ۶۹۰ جفت باز می‌باشد



شکل ۳. نتایج PCR- RFLP. نمونه های ۱، ۲ و ۳ ژنوتیپCT و نمونه های ۴ و ۵ ژنوتیپ CC. و مارکر DNA در سمت چپ می‌باشد.

تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار مدکالک نسخه ۱۲.۴.۲ انجام گرفت. جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌های دو گروه بیمار و کنترل از آزمون کای مربع استفاده شد و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری اختلاف دو گروه در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همان‌طور که انتظار می‌رفت کارسینوم مجرایی درجا (شایع‌ترین نوع سرطان سینه) در ۵۹ بیمار(۷۸ درصد بیماران) مشاهده شد. کارسینوم لوبولی درجا در ۸ مورد(۱۰ درصد بیماران) وجود داشت و ۱۲ درصد بیماران به سایر انواع سرطان سینه مبتلا بودند. ابتلای سینه سمت راست و چپ و ابتلای دوطرفه به ترتیب ۴۹، ۴۹ و ۲ درصد بود.

به منظور بررسی مولکولی پلی‌مورفیسم جایگاه ۱۵۶۲- راه انداز *MMP۹* به عنوان یک عامل پیش آگهی دهنده از پیشرفت سرطان سینه، پلی‌مورفیسم این منطقه با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور نمونه‌های خونی ۷۵ زن مبتلا به سرطان سینه در مرحله ۲ یا بالاتر با میانگین سنی ۴۸ سال و ۱۱۲ زن سالم بدون سابقه سرطان با میانگین سنی ۴۷/۲ سال جمع‌آوری شد و DNA آن‌ها استخراج گردید. پس از بررسی کیفیت DNA با ژل آگاروز ۱ درصد، پلی‌مورفیسم مورد نظر با تکنیک PCR-RFLP بررسی شد. ژنوتیپ CC در ۷۰ نفر از گروه کنترل و ۳۳ نفر از بیماران و ژنوتیپ CT در ۴۲ نفر از گروه کنترل و ۴۲ نفر از بیماران مشاهده گردید. توزیع ژنوتیپ CC در گروه‌های سرطانی و کنترل به ترتیب ۴۴ و ۶۲/۵ و توزیع ژنوتیپ CT در گروه‌های سرطانی و کنترل به ترتیب ۵۶ و ۳۷/۵ بود. در تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار مدکالک، مقادیر به دست آمده کای مربع و سطح معنی‌داری به ترتیب۵/۴ و ۰/۰۱ می‌باشد(جدول ۳).

جدول۳. توزیع آللی پلی‌مورفیسم C>T ۱۵۶۲- ژن MMP۹ در افراد بیمار و کنترل

آلل	گروه کنترل n(درصد)	گروه بیماران n(درصد)	OR*(95% CI)	p
C	۱۸۲ (۸۱)	۱۰۸ (۷۲)	1/00	(مرجع)
T	۴۲ (۱۹)	۴۲ (۲۸)	(۱/۰۳-۲/۷) ۱/۶	۰/۰۴

* OR: میزان افزایش خطر ابتلا و CI: بازه اطمینان

فراوانی آلل T در گروه‌های سرطانی و کنترل به ترتیب ۲۸ و ۱۹ و فراوانی آلل C در گروه‌های سرطانی و کنترل به ترتیب ۷۲ و ۸۱ بود. در تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار مدکالک، مقادیر به دست آمده کای مربع و سطح معنی‌داری به ترتیب ۳/۸ و ۰/۰۴ به دست آمد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ نشان دهنده ارتباط این پلی‌مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان سینه در مرحله ۲ و بالاتر می‌باشد(جدول ۴).

جدول۴. توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم C>T ۱۵۶۲- ژن MMP۹ در افراد بیمار و کنترل

ژنوتیپ	گروه کنترل n(درصد)	گروه بیماران n(درصد)	OR*(95% CI)	P
CC	۷۰(۶۲/۵)	۳۳ (۴۴)	1/00	(مرجع)
TC	۴۲ (۳۷/۵)	۴۲(۵۶)	۲/۱ (۱/۱-۳/۸)	۰/۰۱
TT	۰	۰		

* OR: میزان افزایش خطر ابتلا و CI: بازه اطمینان

دو پارامتر پاتولوژیک نیز در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. وجود ژنوتیپ CT در افراد مبتلا به سرطان سینه، خطر متاستاز به غدد لنفاوی و رشد تومور به ابعاد بیش از ۲ سانتی متر مکعب را ۴ برابر می‌کند(جدول۵).

جدول۵. توزیع ژنوتیپی در بیماران دارای متاستاز به غدد لنفاوی و بیماران دارای تومور با اندازه بیش از ۲ سانتی متر

پارامتر پاتولوژیک	CC تعداد(درصد)	TC تعداد(درصد)	TT تعداد(درصد)	OR*(95% CI)	p
عدم درگیری غدد لنفاوی ۳۳ =n	۲۵	۸	۰	1/00(مرجع)	۰/۰۰۵
درگیری غدد لنفاوی ۴۲ =n	۱۸	۲۴	۰	۴ (۱/۵-۱۱)	
تومور ≥ ۲سانتی متر ۲۵ =n	۲۰	۵	۰	1/00(مرجع)	۰/۰۳
تومور<۲ سانتی متر۵۰ =n	۲۴	۲۶	۰	۴ (۱/۴-۱۳)	

* OR: میزان افزایش خطر ابتلا و CI: بازه اطمینان

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که پلی‌مورفیسم C>T ۱۵۶۲- ژن *MMP۹* با سرطان سینه در مرحله ۲ و بالاتر ارتباط دارد. وجود ژنوتیپ CT می‌تواند خطر متاستاز به غدد لنفاوی و خطر افزایش ابعاد تومور به بیش از ۲ سانتی‌متر مکعب را ۴ برابر کند. *MMP۹* با هضم اتصالات سلولی ماتریکس شرایط مهاجرت سلول‌های سرطانی را فراهم می‌کند، هم‌چنین با آزادسازی فاکتورهای رشد و رگ‌زایی به تکثیر سلول‌های سرطانی و رساندن مواد غذایی و اکسیژن به توده‌های سرطانی بزرگ کمک می‌کند.

با توجه به شیوع سرطان و اهمیت تشخیص و درمان زودهنگام آن، نیاز به بیومارکرهای جدید برای تشخیص و تعیین پیش آگهی این بیماری روز به روز بیشتر احساس می‌شود. از جمله بیومارکرهای بالقوه، انواع پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشد. توانایی *MMP۹* در تسهیل مهاجرت سلولی، متاستاز و رگ‌زایی موجب شده است تا تحقیقات متعددی برای بررسی همراهی پلی‌مورفیسم‌های آن با شروع و پیشرفت بیماری‌ها انجام شود.

ژانگ و همکاران با مطالعه بر روی بیماران قلبی-عروقی مشاهده کردند که تفاوت معنی‌داری در فراوانی آللی پلی‌مورفیسم C>T۱۵۶۲- راه انداز ژن *MMP۹* در گروه‌های کنترل و بیمار وجود ندارد، ولی ۲۶ درصد حاملین آلل T در مقابل ۱۵ درصد دارندگان ژنوتیپ CC دارای تنگی شریانی در سه شریان بودند. بنابراین با توجه به اثبات فعالیت افزایش یافته راه انداز دارای نوکلئوتید T در آزمایشات بررسی میان‌کنش DNA با پروتئین و با استفاده از لوسیفراز اظهار کردند که این پلی‌مورفیسم بر فنوتیپ بیماری اثر می‌گذارد(۸). در سال ۲۰۰۹، گای ارتباط معنی‌دار بین وجود آلل T و افزایش خطر فیبریلاسیون قلبی در بیماران با فشار خون بالا را گزارش کرد(۹).

تاکنون ارتباط معنی‌داری بین وجود آلل T و خطر ابتلا به بدخیمی‌ها از جمله سرطان‌های معده، سرو گردن، دهان، سینه و ملانوما دربرخی مطالعات گزارش شده است(۱۴-۱۰). هم‌چنین برخی تحقیقات همراهی آلل T را با پیشرفت سرطان نشان داده است. طبق گزارش اسفار حضور آلل T به عنوان یک پیش آگهی دهنده، خطر پیشرفت سرطان پروستات را دو برابر می‌کند(۱۵) مطالعه ایکسینگ نشان داد که علی رغم نبود ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم مورد نظر و سرطان کولورکتال، حاملین آلل T ، دو برابر بیشتر در معرض خطر متاستاز به غدد لنفاوی بودند(۱۶).

تحقیقات متعددی نیز برای بررسی همراهی پلی‌مورفیسم C>T۱۵۶۲- راه انداز *MMP۹* با شروع و پیشرفت سرطان سینه در کشورهای مختلف انجام گرفته است. روئه و همکاران در سال ۲۰۰۷ در منطقه‌ای واقع در جنوب برزیل (که بالاترین میزان شیوع سرطان سینه در آن کشور را دارد) مطالعه‌ای برای بررسی همراهی این بیماری و پلی‌مورفیسم C>T۱۵۶۲- ژن *MMP۹* انجام دادند. این منطقه دارای جمعیتی هتروژن مرکب از سفیدپوستان، آفریقایی تبارها و سرخ پوستان می‌باشد. نتیجه این مطالعه عدم ارتباط این پلی‌مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان سینه یا پارامترهای کلینیکوپاتولوژیک را نشان داد(۱۷). پرزیبیلوس با مطالعه در جمعیت هلند نشان داد که حضور آلل T خطر بدخیمی سرطان سینه را دو برابر می‌کند(۱۸). لی و همکاران

در سال ۲۰۰۷ افزایش خفیف در خطر ابتلا به سرطان سینه در هموزیگوت‌های TT را گزارش کردند(۱۹). در سال ۲۰۱۲، شویگرت مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به سرطان سینه در لیتوانی انجام داد که تفاوت معنی‌دار در توزیع ژنوتیپی بین گروه‌های مرحله ی ۱ و مرحله ی ۳/۲ هم‌چنین گروه‌های دارای وضعیت غدد لنفاوی ۰ n و n۱ وجود داشت(۲۰). یک علت احتمالی برای تناقض مشاهده شده در نتایج بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم جایگاه ۱۵۶۲- راه انداز *MMP۹* با سرطان پستان، وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گوناگون می‌باشد که می‌تواند با تغییر توالی مورد شناسایی پروتئین‌ها و RNA های تنظیمی و بر میزان بیان ژن اثر بگذارد(۲۱). علت احتمالی دیگر برای تفاوت مشاهده شده در نتایج، عوامل محیطی و سبک زندگی افراد می‌باشد.

در ایران صادقی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی جمعیت اصفهان گزارش کردند که وجود آلل T در پلی‌مورفیسم ۱۵۶۲C>T- راه انداز ژن *MMP۹* با کاهش سن متاستاز در سرطان سینه همراه می‌باشد، ولی ارتباط معنی‌دار بین این پلی‌مورفیسم و متاستاز با غدد لنفاوی را مشاهده نکردند(۲۲). این گزارشات درخصوص افزایش خطر ابتلای سرطان سینه پیشرفته در حضور آلل T با یافته‌های ما هم‌خوانی دارد. تفاوت تحقیق ما و صادقی در مورد خطر متاستاز به غدد لنفاوی احتمالا ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه یا تفاوت در سبک زندگی آن‌ها می‌باشد.

در این مطالعه برای اولین بار همراهی پلی‌مورفیسم جایگاه ۱۵۶۲ C>T- راه انداز *MMP۹* با سرطان سینه و دو پارامتر پاتولوژیک در جمعیت آذری شمال غرب ایران بررسی گردید. برای تعمیم نتایج، لازم است این پلی‌مورفیسم درسایر جمعیت‌ها نیز بررسی شود. مزیت این تحقیق همگن بودن نسبی شرکت کنندگان بیمار و سالم از نظر سن، قومیت، محل زندگی، مذهب و تحصیلات می‌باشد که تاثیر تنوع ژن‌های دیگر یا عوامل محیطی را بر روی عملکرد پلی‌مورفیسم مورد نظر به حداقل می‌رساند، زیرا این افراد احتمالا دارای اجداد مشترک هستند، برای چندین نسل در شرایط جغرافیایی و آب و هوایی مشابهی زندگی کرده و به دلیل تشابه فرهنگی و سطح سواد، در بسیاری از زمینه‌ها سبک زندگی مشابهی دارند.

نتیجه‌گیری

در جمعیت مورد مطالعه ما پلی‌مورفیسم C>T ۱۵۶۲- ژن *MMP۹* ارتباط معنی‌دار با سرطان سینه داشت. هم‌چنین داشتن ژنوتیپ CT خطر درگیرشدن غدد لنفاوی و افزایش ابعاد تومور را چهار برابر می‌کند. بنابراین ممکن است از آن به عنوان بیومارکر پیش آگهی استفاده کرد، هرچند حصول نتایج قطعی نیازمند انجام این تحقیق با جامعه آماری بزرگ‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از کادر محترم آزمایشگاه کلینیک گلستان تبریز و سرکار خانم مسن زاده، سرپرستار محترم بیمارستان نورنجات و کلیه شرکت کنندگان در این تحقیق صمیمانه قدردانی می‌گردد. هم‌چنین از دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان برای فراهم نمودن امکان انجام این تحقیق به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61(2):69-90.
2. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. 2009; 1796(2):293-308.
3. Comen E, Norton L, Massague J. Clinical implications of cancer self-seeding. Nature reviews Clinical oncology. 2011; 8(6):369-77.
4. Gibson DJ, Schultz GS. Molecular wound assessments: matrix metalloproteinases. Advances in wound care. 2013; 2(1):18-23.
5. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library. 2005; 11:1696-701.
6. Ries C, Pitsch T, Mentele R, Zahler S, Egea V, Nagase H, et al. Identification of a novel 82 kDa proMMP-9 species associated with the

surface of leukaemic cells:(auto-) catalytic activation and resistance to inhibition by TIMP-1. Biochemical Journal. 2007; 405(3):547-58.
7. Awakura Y, Ito N, Nakamura E, Takahashi T, Kotani H, Mikami Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. Cancer letters. 2006; 241(1):59-63.
8. 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(14): 1788-94.
9. Gai X, Lan X, Luo Z, Wang F, Liang Y, Zhang H, et al. Association of MMP-9 gene polymorphisms with atrial fibrillation in hypertensive heart disease patients. Clinica Chimica Acta. 2009; 408(1):105-9.
10. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP2 and MMP9, their inhibitors, and the activator MT1MMP in primary breast carcinomas. The Journal of pathology. 1999; 189(2): 161-8.
11. Hujanen ES, Väisänen A, Zheng A, Trygdvason K, Turpeenniemi□Hujanen T. Modulation of Mr 72,000 and Mr 92,000 type□IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. International journal of cancer. 1994; 58(4):582-6.
12. Tu HF, Wu CH, Kao SY, Liu CJ, Liu TY, Lui MT. Functional− 1562 C□to□T polymorphism in matrix metalloproteinase□9 (MMP□9) promoter is associated with the risk for oral squamous cell carcinoma in younger male areca users. Journal of oral pathology & medicine. 2007; 36(7):409-14.
13. Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. Journal of cancer research and clinical oncology. 2005; 131(1):19-25.
14. Chaudhary AK, Pandya S, Mehrotra R, Singh M, Singh M. Role of functional polymorphism of matrix metalloproteinase-2 (-1306 C/T and-168 G/T) and MMP-9 (-1562 C/T) promoter in oral submucous fibrosis and head and neck squamous cell carcinoma in an Indian population. Biomarkers. 2011; 16(7): 577-86.
15. Sfar S, Saad H, Mosbah F, Gabbouj S, Chouchane L. TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer. Cancer genetics and cytogenetics. 2007; 172(1):38-44.
16. Xing L-L, Wang Z-N, Jiang L, Zhang Y, Xu Y-Y, Li J, et al. Matrix metalloproteinase-9-1562C> T polymorphism may increase the risk of lymphatic metastasis of colorectal cancer. World journal of gastroenterology: WJG. 2007; 13(34):4626-9.
17. Roehe AV, Frazzon APG, Agnes G, Damin AP, Hartman AA, Graudenz MS. Detection of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9 genes in breast cancer in South Brazil: preliminary results. Breast cancer research and treatment. 2007; 102(1): 123-4.
18. Przybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kulig A, Rykala J, et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2006; 95(1):65-72.
19. Lei H, Hemminki K, Altieri A, Johansson R, Enquist K, Hallmans G, et al. Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: few associations with breast cancer susceptibility and progression. Breast cancer research and treatment. 2007; 103(1):61-9.
20. Schveigert D, Cicenas S, Bruzas S, Samalavicius N, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival. Advances in medical sciences. 2013; 58(1):73-82.
21. Haraksingh RR, Snyder MP. Impacts of variation in the human genome on gene regulation. Journal of molecular biology. 2013; 425(21):3970-7.
22. Sadeghi, M, Motovali Bashi M, Hojati Z. [Association of a polymorphism in 1562 promoter nucleotide of collagenases IV with the age and type of metastasis in breast cancer]. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2009; 10(6):7-13.