TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شهریور ۱۳۹۸، دوره ۷۷، شماره ٦، صفحه‌های ۳٤٥ تا ۳٥۱ مقاله اصیل

ارزیابی فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان و ارتباط آن با ویژگی‌های بالینی بیماری

سولماز خلیق‌فرد[۱]، شیوا ایرانی[۱]، رامش عمرانی‌پور[۲]، علی‌محمد علیزاده[۲و۳*]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های پستان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۰۱ ویرایش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۸/۰٦/۲۳ آنلاین: ۱۳۹۸/۰٦/۳۱

زمینه و هدف: آنزیم‌های متالوپروتییناز می‌توانند منجر به هضم ماتریکس خارج سلولی و تسهیل متاستاز سلول‌های سرطانی به سایر بافت‌ها گردند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی فعالیت ماتریکس متالوپروتییناز‌های ۱ و ۱۳ در بافت و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان و ارتباط آن با ویژگی‌های بالینی بیماری بود.

روش بررسی: مطالعه حاضر به‌صورت تجربی- پژوهشی در مرکز تحقیقات سرطان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران از فروردین تا اسفند ۱۳۹٦ انجام گرفت. تعداد ۲۵ بیمار با سرطان پستان غیرمتاستاتیک لومینال A در مراحل ۲ یا ۳ بیماری و ۸ فرد سالم وارد مطالعه شدند. ابتدا چند نمونه بیوپسی از بافت پستان و ۱۰ ml خون کامل از همه شرکت‌کنندگان گرفته شد. سپس از روش زیموگرافی کلاژن جهت بررسی فعالیت ماتریکس متالوپروتییناز‌های ۱ و ۱۳ استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان فعالیت ماتریکس متالوپروتییناز‌های ۱ و ۱۳ در پلاسمای بیماران در مقایسه با افراد سالم افزایش معناداری داشت (به‌ترتیب P=۰/۰۰۵۵ و P=۰/۰۲٦۳). برخلاف ماتریکس متالوپروتییناز ۱۳، سطح میزان فعالیت ماتریکس متالوپروتییناز ۱ در بافت تومور و پلاسمای بیماران تفاوت معناداری داشت (P=۰/۰۲۲۷). همچنین سطح فعالیت پلاسمایی متالوپروتییناز ۱ (P=۰/۰۰۳۷) و متالوپروتییناز ۱۳ (P=۰/۰۳۱۱) تفاوت معناداری در مراحل ۲ و ۳ بیماری نشان داده‌اند. برخلاف ماتریکس متالوپروتییناز ۱۳، الگوی سطح فعالیت متالوپروتییناز ۱ در وضعیت گره‌های لنفاوی بین نمونه‌های بافت (P=۰/۰۳) و پلاسما (P=۰/۰۱۵) تفاوت معناداری نشان داده است.

نتیجه‌گیری: مطالعه غلظت پلاسمایی متالوپروتییناز‌های ۱ و ۱۳ در مقایسه‌ی با غلظت بافتی آن‌ها، فاکتور مناسبی جهت تشخیص زودهنگام در مبتلایان به سرطان پستان بود.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، ماتریکس متالوپروتییناز، خصوصیات بالینی.

*نویسنده مسئول: تهران، انتهای بلوار کشاورز، انستیتو سرطان ایران، مرکز تحقیقات سرطان.
تلفن: ٦۱۱۹۲۵۰۱ -۰۲۱
E-mail: aalizadeh@sina.tums.ac.ir

مقدمه

سرطان بیماری بسیار پیچیده‌ای است که اغلب با به هم خوردن تنظیمات هموستاتیک داخل سلولی و بین سلولی شروع می‌شود. در مراحل پیشرفته سرطان جهت متاستاز، هضم ترکیبات ماتریکس سلولی و برهمکنش سلول مهاجم با بافت هدف لازم است.[۱] برای تهاجم، سلول‌های سرطانی اپیتلیال باید به داخل غشاء پایه نفوذ کنند و سد ماتریکس خارج سلولی را از بین ببرند. در این مرحله آنزیم‌های پروتییناز دارای نقش بسیار مهمی هستند که با هضم ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات آن، باعث تسهیل متاستاز سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر می‌شوند.[۱] نقش کلی پروتییناز‌ها، به‌ویژه ماتریکس متالوپروتییناز‌ها (Matrix

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-03]

metaloproteases, MMPs) در متاستاز و تهاجم سلول‌های توموری به‌طورکامل اثبات شده است.[۱] پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این خانواده‌ی آنزیمی، نه تنها در تغییرات فیزیکی ساختمان غشاء پایه و اتصالات خارج سلولی ایفای نقش می‌کند، بلکه در ایجاد شرایط پاتولوژیک شامل پیشرفت و رشد تومورها، متاستاز و سایر بدخیمی‌ها نیز نقش دارد.[۲] از آنجایی‌که تغییرات بافت‌ها بیشتر بازتاب تغییرات آنزیمی مایعات بدن هستند، اندازه‌گیری غلظت ماتریکس متالوپروتیینازها در خون به عنوان ابزاری مناسب برای بررسی تغییرات پاتولوژیکی در بافت‌ها مطرح می‌باشند.[۳] در این راستا، بیشتر ماتریکس متالوپروتیینازها به‌صورت زیموژن‌های محلول ترشح می‌شوند و در فضای خارج سلولی نیاز به فعال‌سازی دارند. اعتقاد بر این است که فعال‌سازی زیموژن‌ها به‌وسیله سرین‌پروتیینازهایی مانند پلاسمین آغاز می‌گردد.[٤] یکی از این موارد، ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ (MMP-1) یا کلاژناز I می‌باشد که در بسیاری خصوصیات مانند زمان، نحوه بیان و ساختار از سایر ماتریکس متالوپروتیینازها متمایز هستند و به‌نظر می‌رسد هدف متفاوتی را دنبال می‌کنند. بیان MMP-1 در ۸۰ تا ۹۰٪ کارسینوماهای تهاجمی پستان، کولون، سروگردن، تخمدان، پروستات، پوست و پانکراس مشاهده شده است.[٥] یکی دیگر از متالوپروتیینازهای مهم خانواده کلاژنازها، MMP-13 یا کلاژناز IIIمی‌باشد.[٦] MMP-13 در مقایسه با سایر ماتریکس متالوپروتیینازها، الگوی بیانی محدودی دارد و در تغییر سریع و مؤثر ماتریکس خارج سلولی کلاژن و چند نوع بدخیمی مانند کارسینومای پستان، سرطان کولون و سرطان‌های سر و گردن نیز مشاهده شده است.[٦] بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی همزمان میزان توموری و پلاسمایی فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم و ارتباط سطوح فعالیت بافتی و پلاسمایی این آنزیم‌ها با وضعیت بالینی بیماری مانند منوپوز، مرحله بیماری و درگیری‌های گره‌های لنفاوی بود.

روش بررسی

مطالعه حاضر به‌صورت تجربی-پژوهشی در مرکز تحقیقات سرطان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران از فروردین تا اسفند ۱۳۹٦ انجام گرفت. تعداد ۲۵ بیمار با تشخیص سرطان پستان غیرمتاستاتیک لومینال A در مرحله ۲ و یا ۳ از بین مراجعه‌کنندگان به انستیتو سرطان ایران و نیز ۸ فرد سالم با دریافت رضایت‌نامه کتبی وارد مطالعه شدند. این دسته از بیماران به‌عنوان موارد جدید تشخیصی انتخاب شدند که تاکنون هیچ پروسه درمانی شامل جراحی و شیمی‌درمانی، رادیوتراپی را دریافت نکرده بودند. معیارهای ورود به مطالعه شامل بیماران با سرطان پستان نوع لومینال A، سرطان پستان در مرحله ۲ یا ۳ بیماری، بیماران با رضایت کتبی، سن بین ۳۰ تا ۷۰ سال و نیز بیماران با پاسخ پاتولوژیک سرطانی وابسته به گیرنده‌های استرورییدی بودند.

همچنین معیارهای خروج از مطالعه شامل بیماران با تومورهای غیروابسته به گیرنده استرورییدی، اعتیاد به مواد مخدر، سابقه بیماری آرتریت روماتویید و جراحی‌های اخیر، سابقه سرطان‌های پیشین و بیماران با سرطان پستان متاستاتیک بودند. پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی و ثبت مشخصات دموگرافیک بیماران، چند نمونه بیوپسی لوکال از نواحی درگیر بیماری از بافت پستان گرفته شد. همچنین ml ۱۰ خون کامل تهیه و برای استخراج پلاسما در لوله‌های فاقد مواد ضدانعقاد نگهداری شدند. برای استخراج پلاسما، تیوپ حاوی نمونه خون نیم ساعت پس از لخته شدن با دور g ۱٦۰۰۰ برای ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ و نمونه‌های پلاسمایی به همراه نمونه‌های بافتی تا زمان آزمایش در $^{\circ}C$ ۸۰- نگهداری گردیدند.[۷] نمونه‌های بافت توموری پستان ابتدا به قطعات کوچک برش داده شدند و توسط ml ۵۰۰ از بافر لیزکننده (Santa Cruz Biotechnology, USA, California Radioimmunoprecipitation assay buffer) همگن و سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ تیمار و در نهایت در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه سوپرناتانت حاصل، جهت اندازه‌گیری میزان پروتیین و نیز سنجش فعالیت آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از روش برادفورد غلظت پروتیین موجود در نمونه‌ها سنجش و در ادامه µg ۵۰ پروتیین مربوط به هر نمونه بافتی، جهت انجام مراحل الکتروفورز زیموگرام استخراج گردید.[۸و۹]

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت MMP-1 و MMP-13 در نمونه‌های پلاسمایی و توموری افراد مورد مطالعه، از زایموگرافی کلاژن به‌صورت زیر استفاده شد: نمونه پلاسمایی و بافتی هر فرد در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-03]

بافر لودینگ (۵٪ Sodium dodecyl sulfate (SDS)، ۲۰٪ گلیسرول، در ۰/۴٪ Tris دارای PH برابر ۶/۸ و حاوی ۰/۰۲٪ بروموفنول بلو) حل گردید و ۲۵ µl از هر نمونه در ژل اکریلامید ۱۰٪، حاوی ۰/۱۵–۰/۶ µg/ml تیپ کلاژن I/ III, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) در هـر چاهک لود شد. سپس الکتروفورز در یک ولتاژ ثابت ۱۱۰ ولت در ۲ ساعت در دمای ۴ °C انجام شد و پس از اتمـام الکتروفـورز ژل دو بار در ۲/۵٪ تریتون x-100 (v/v) به مدت ۱۵ دقیقه برای حذف SDS شسته شدند و سپس درون بافر Developing (50 mM Tris, 10 mM CaCl2, 50 mM NaCl, 0.05% Brij-35 (Sigma-Aldrich), pH 7.6) در دمای ۳۷ °C برای ۴۸ ساعت انکوبه شد.[۱۰]

پس از انکوباسیون، ژل‌ها با ۰/۵٪ (w/v)۲۵۰ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) رنگ‌آمیزی شدند. سپس در محلول رنگ بر ۴۰٪ متانول و ۱۰٪ اسیداستیک قرار گرفتند.

فعالیت‌های کلاژنولیتیک به‌عنوان نوارهای روشن در برابر یک پس زمینه ژل رنگ‌آمیزی با کوماسی آبی شناسایی شد.[۱۱] ناحیه حاصل MMP-1 فعال در منطقه ۴۸ کیلودالتون و ناحیه حاصل MMP-13 فعال در منطقه ۴۷ کیلودالتون با استفاده از مارکر قابل شناسایی گردید.

میزان فعالیت پلاسمایی کلاژنازهای تیپ ۱ (MMP-1) و تیپ ۲ (MMP-13) استاندارد و با اسکن باندهای حاصل توسط اسکنر (Epson GT-9500, Seiko Epson, Tokyo, Japan) و Image J software, version 1.45 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) آنالیز گردید. برای توصیف داده‌ها از میانگین و انحراف‌استاندارد استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) انجام شد. برای ارزیابی توزیع طبیعی داده‌ها از Kolmogorov-Smirnov test استفاده گردید.

همچنین برای تحلیل استنباطی داده‌ها در دو گروه با داده‌های پارامتریک از Student's t-test و برای تحلیل داده‌های غیرپارامتریک از Mann-Whitney U test استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها بیش از دو گروه، از Two-way analysis of variance (ANOVA) و Tukey's test مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر P<۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

به‌طورکلی ۸ زن بدون سرطان پستان و ۲۵ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان غیرمتاستاتیک لومینال A وارد مطالعه شدند که از این تعداد ۱۱ بیمار در مرحله ۲ و ۱۴ بیمار در مرحله ۳ بیماری قرار داشتند. همچنین ۱۰ بیمار غیرمنوپوز و ۱۵ بیمار منوپوز بودند. افزون‌براین، ۱۱ بیمار با درگیری مثبت غدد لنفاوی و ۱۴ بیمار با عدم درگیری غدد لنفاوی مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن بیماران و افراد سالم به‌ترتیب ۴۵/۵۲±۰/۰۳ و ۴۸/۵±۰/۱ محاسبه گردید. برای سنجش میزان فعالیت پروتیین‌های نمونه‌های بافت و پلاسما از روش Bradford استفاده گردید. در ابتدا، غلظت پروتیین با استفاده از منحنی استاندارد پس از خوانش دانسیته‌های مربوطه با دستگاه الایزا ریدر (Stat-Fax®-2100 microplate reader, Awareness Technology, Inc. P.O. Drawer 1679 Palm City, FL 34991 USA) با طول موج ۵۹۰ محاسبه و در ادامه منحنی غلظت و Optical density (OD) استاندارد ترسیم گردید و با قرار دادن OD نمونه‌ها، غلظت نهایی پروتیین‌های مربوطه به‌دست آمد. سنجش متالوپرتیینازها به روش Bradford نشان داد که غلظت ماتریکس متالوپروتیینازهای استخراجی از بافت و پلاسما با افزایش مراحل بیماری افزایش یافتند.

مقایسه سطح فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ در پلاسمای بیماران سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم: نشان داد که میزان فعالیت ماتریکس متالوپروتیناز ۱ (P=۰/۰۰۵۵، ۰/۱±۰/۳۹) و ماتریکس متالوپروتیناز ۱۳ (P=۰/۰۲۶۳، ۰/۲±۰/۴۴) در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم افزایش معناداری داشته است.

نتایج سطح فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ در بافت تومور و پلاسمای خون بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان داد که سطح فعالیت MMP-1 در بافت تومور (۰/۱±۰/۰۱) و پلاسمای بیماران (۰/۰۵±۰/۴۲) در مقایسه با یکدیگر تفاوت معناداری داشته است (P=۰/۰۲۲۷). اما سطح فعالیت MMP-13 در نمونه‌های بافت تومور (۰/۱±۰/۷۱) و پلاسمای بیماران (۰/۱±۰/۴۴) تفاوت معناداری را نسبت به همدیگر نشان نداده است (P=۰/۲۲۷).

جهت بررسی ارتباط بین سطح فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ و مراحل ۲ و ۳ بیماری، بیماران باتوجه به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-03]

روش TNM Classification of malignant tumors (TNM) طبقه‌بندی گردیدند. این سیستم با استفاده از سه معیار (اندازه تومور، حضور سلول‌های توموری در غدد لنفاوی اطراف تومور، گسترش تومور به سایر نقاط بدن) و مرحله بیماری را مشخص می‌کند. در بررسی سطح فعالیت پلاسمایی MMP-1، تفاوت معناداری بین مراحل ۲ (۰/۰۱±۰/۱٤) و ۳ بیماری (۰/۰٦±۰/٦۸) مشاهده گردیده است (P=۰/۰۰۳۷). همچنین تفاوت معناداری بین مراحل ۲ (۰/۰۲±۰/۱۳) و ۳ بیماری (۰/۱±۰/٤٤) در سطح فعالیت پلاسمایی MMP-13 مشاهده گردید (P=۰/۰۳۱۱).

نتایج میزان سطح فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ با وضعیت گره‌های لنفاوی درگیر در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مطالعه کنونی نشان داد که الگوی سطح فعالیت MMP-1 در وضعیت گره‌های لنفاوی (-)/(+) بین نمونه‌های بافت (P=۰/۰۳) و پلاسما (P=۰/۰۱۵) تفاوت معناداری وجود داشته است. اما نتایج مطالعه حاضر در الگوی سطح فعالیت MMP-13 در وضعیت گره‌های لنفاوی (-)/(+) نشان داد که برخلاف نمونه‌های پلاسما (P=۰/۰۱۸)، تفاوت معناداری در نمونه‌های بافتی (P=۰/۹۵۱۲) دیده نشده است.

نتایج میزان سطح فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ با وضعیت یائسگی در بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان داد که الگوی سطح فعالیت MMP-1 [نمونه‌های بافت (P=۰/۳٦٤٤) و پلاسما (P=۰/۸۸۰٤)] و MMP-13 [نمونه‌های بافت (P=۰/۳٦۸۹) و پلاسما (P=۰/۵۹٦۹)]، تفاوت معناداری در وضعیت منوپوز و غیرمنوپوز بیماران وجود نداشته است.

بحث

بسیاری از مطالعات بر سطح فعالیت متالوپروتیینازها در فرآیندهای تومورزایی متمرکز شده است. مشابه نتایج مطالعه حاضر، Vajaria و همکاران نشان دادند که میزان فرم فعال این آنزیم می‌تواند با بروز سرطان پستان و ریه در ارتباط باشد.[۱] Wieczorek و همکاران نشان دادند که میزان MMP-1 فعال در پلاسمای بیماران سرطان پستان نسبت به افراد سالم به‌طور چشمگیری افزایش یافته است.[۱۲] همچنین Kotepui و همکاران نشان دادند که MMP-13 پروتیین ترشحی بیش از حد معمول در بافت سرطان پستان در مقایسه با بافت نرمال می‌باشد و به‌عنوان یک نشانگر توموری برای تشخیص سرطان پستان می‌تواند نقش ایفا کند.[۳] Jonsson و همکاران در مطالعه‌ای اختلاف معناداری در میزان غلظت بعضی از MMPها با استفاده از پلاسما و سرم پیدا کردند.[۱۳] این پژوهشگران همچنین نشان دادند که در مطالعات آینده MMP ها به‌عنوان نشانگرهای بیولوژیک در سرطان باید از نمونه‌های پلاسمای به جای سرم استفاده شود. در مطالعه Sunami و همکاران با استفاده از ایمنوهیستوشیمی نشان دادند که بسیاری از سرطان‌های کولورکتال به شدت MMP-1 را در سیتوپلاسم سلول‌های سرطانی انتشار می‌دهند.[۱٤]

نتایج این پژوهشگران نشان داد که بیان MMP-۱ در سیتوپلاسم سلول‌های سرطانی و برخی از سلول‌های استروما و نیز چند سلول اپیتلیال طبیعی مخاط مشاهده شد. هنوز مشخص نیست که کدام سلول یا سلول‌ها، MMP-1 را تولید و بیان می‌کند. در این راستا، رنگ‌آمیزی MMP-1 به‌طور عمده در سلول‌های استرومایی بافت‌های نئوپلاستیک یا در هر دو سلول سرطانی و استرومایی گزارش شده است. بنابراین دلیلی وجود ندارد که تنها سلول‌های سرطانی به‌طور اختصاصی آن را بیان کنند. در مطالعات با استفاده از هیبریداسیون در محل، بیان بیش از حد MMP-1 در سلول‌های استرومایی یافت گردید. اختلاف بین مطالعات ایمونوهیستوشیمی و مطالعاتی که از هیبریداسیون در محل استفاده کردند، ممکن است وابسته به تفاوت سطح mRNA از بیان MMP-1 و ظرفیت‌های مختلف سلول‌های استرومایی و سرطانی برای ذخیره‌سازی MMP-1 باشد. همچنین این اختلاف می‌تواند به آستانه سنجش هر دو روش مرتبط باشد. احتمال دیگر این است که سایر MMPها مانند MMP-2 سلول‌های سرطانی، از آنزیم تولید شده توسط سلول‌های استرومایی استفاده کنند. افزون‌بر اینکه در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که MMP-1 درون سلول فعال و سپس ترشح می‌شود و برهمین اساس، احتمال دارد که افزایش MMP-1 پلاسمایی در مطالعه ما نسبت به سطح سرمی آن به‌دلیل ترشح سلول‌های میزبان به همراه سلول‌های سرطانی تومور باشد که میزان آن در پلاسما نسبت به سطح بافت اختصاصی تومور بالاتر باشد.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که برخلاف سطح فعالیت متالوپروتیناز ۱۳، الگوی سطح فعالیت متالوپروتیناز ۱ در وضعیت گره‌های لنفاوی (-)/(+) بین نمونه‌های بافت و پلاسما تفاوت

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-03]

معناداری داشته است که مشابه نتایج مطالعه Hsiao و همکاران می‌باشد.[۱۵] نتایج آن‌ها نشان داد که بیان افتراقی MMP-1 نشان‌دهنده میزان تمایز در سلول‌های سرطانی پستان است و به شدت با انواع سرطان‌های پستان تهاجمی ارتباط دارد. از این‌رو، MMP-1 را یک نشانگر پیش‌آگهی امیدبخش سرطان پستان معرفی کردند. این پژوهشگران بر این باور بودند که بیان MMP-1 می‌تواند به جداسازی زیرمجموعه‌های سرطان پستان تهاجمی در نمونه‌های بالینی به‌طور معناداری کمک کند. Kemik و همکاران نشان دادند که سطح سرمی MMP-1 و بازدارنده بافت متالوپروتیناز ۱ (TIMP-1) در بیماران با سرطان بیشتر از گروه سالم می‌باشد.[۱۶] سطوح سرمی MMP-1 و TIMP-1 با نمای مورفولوژیک تومور مانند اندازه تومور، عمق تهاجم به دیواره عروق، متاستاز به گره لنفاوی و نیز مراحل پاتولوژیک بیماری ارتباط مثبت دارد. هرچند به‌طور معناداری با سن، جنس، محل تومور یا نوع بافت ارتباطی وجود ندارد. این پژوهشگران نتیجه گرفتند که افزایش MMP-1 و TIMP-1 می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای مناسب برای تشخیص سرطان پیشرفته باشند.

همچنین در مطالعه حاضر، سطح فعالیت ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱ و ۱۳ تفاوت چشمگیری را در مرحله‌بندی بیماری داشته است. مشابه نتایج ما، Kohrmann و همکاران نشان دادند که بیان ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱، ۲، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ در بافت تومور نسبت به بافت سالم بالاتر می‌باشد.[۱۷] در این بین، بیان ماتریکس متالوپروتیینازهای ۱، ۸، ۱۰ و ۱۱ به درجه تومور بستگی دارد تا جایی‌که بیان آن‌ها در بافت‌های توموری در مرحله ۳ بیماری در مقایسه با نمونه بافت‌های توموری مرحله ۲ بیماری بالاتر می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که این ماتریکس متالوپروتیینازها با پیشرفت تومور و توسعه سرطان مرتبط باشد. ازاین‌رو، این ماتریکس متالوپروتیینازها می‌توانند کاندیدهای مناسبی برای تحلیل بیشتر فعالیت و نقش آن‌ها در سرطان پستان به‌شمار آیند. همچنین Benson و همکاران نشان دادند که بیان متالوپروتیینازهای ۱، ۹، ۱۱، ۱۵، ۲۴ و ۲۵ در بافت‌های سرطانی پستان در مقایسه با بافت‌های سالم پستان افزایش داشتند.[۱۸] اما، بیان MMP-10 و MMP-19 در بافت سرطانی نسبت به بافت‌های طبیعی کاهش یافته بود. لیکن در MMPهای مرتبط با بافت غشایی مانند MMP-15 و MMP-24، یک افزایش وابسته به مرحله بیماری را نشان دادند و در میان کلاژنازها، تنها MMP-1 در سرطان سینه بیان بالایی داشت. افزایش بیان MMP-1 در سرطان سینه با افزایش مرحله بیماری همراه بوده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که از MMP ها بتوان به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی و یا با اهداف دارویی در آینده استفاده نمود. هرچند Aroner و همکاران در گزارشی نشان دادند که میزان سطح بیان متالوپروتیینازهای ۱، ۳ و ۷ ارتباطی با مراحل بیماری به‌عنوان یک مارکر تشخیصی ندارد.[۱۹]

به‌نظر می‌رسد که یافته‌های مطالعه حاضر در کنار سایر مطالعات، نشان می‌دهند که MMPها می‌توانند برای شناسایی ماهیت متفاوتی از بافت‌های پستان مورد استفاده قرار گیرند و افزایش فعالیت MMPs انتخاب شده ممکن است بر بحران وقایع مولکولی مرتبط با پیشرفت تومور تاثیرگذار باشد. بنابراین، اندازه‌گیری MMPs به‌عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی می‌تواند به تشخیص مراحل مختلف سرطان کمک کند. هم‌راستا با مطالعه حاضر، Han و همکاران نشان دادند که حتی میزان بیان MMP می‌تواند میزان احتمال تبدیل یک تومور بدون تهاجم به نوع تهاجمی را افزایش دهد.[۲۰]

در بیشتر مطالعات، بیان ماتریکس متالوپروتیینازها در سطح پروتیینی افزایش داشته است. در مطالعه‌ای مشخص شد که MMPs در تومورهای بدخیم و خوش‌خیم در هر دو بیان می‌شوند، اما با میزان بیشتری در تومورهای بدخیم افزایش می‌یابند.[۲۰] اگرچه در نتایج این مطالعه و بیشتر مطالعات مشابه از غلظت پلاسمایی این آنزیم به‌عنوان فاکتوری مناسب‌تر برای بررسی وضعیت بیماران نام برده شده است ولی به‌نظر می‌رسد که هنوز دانشمندان بر سر این موضوع به یک تصمیم نهایی نرسیده‌اند. به‌نظر می‌رسد اختلافات ژنتیکی جمعیت‌ها و نیز تفاوت در روش‌های اندازه‌گیری MMPs از مهمترین دلایل چنین نتایج ضد و نقیضی باشد. به‌طورکلی نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در تشخیص و یافتن نشانگر زیستی مناسب جهت ردیابی پیشرفت سرطان پستان و همچنین مدیریت بیماری و مانیتورینگ پاسخ به درمان در بیماران بسیار ارزشمند باشد. در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که غلظت پلاسمایی ماتریکس متالوپروتیینازها برای بررسی متاستاز به غدد لنفاوی در بیماران مبتلا به سرطان پستان فاکتور مناسبی می‌تواند باشد. در پایان این‌که به دلیل محدودیت در تعداد نمونه‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر، برای اثبات صحت این نظریه، انجام یک مطالعه‌ی طولی آینده‌نگر بر روی گروه‌های

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-03]

مختلف بیماران با سرطان پستان از جمعیت ایران پیشنهاد می‌گردد. همچنین پیشنهاد می‌گردد که مطالعه به‌صورت چند مرکزی با تعداد بیماران بیشتر و بر روی انواع ساب‌تایپ‌های سرطان پستان و مقایسه تغییرات موتاسیون ژنومی این متالوپروتیینازها صورت گیرد.

سپاسگزاری: مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۱۳۹۶ به کد ۳۸۴۷۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران صورت گرفته است.

References

1. Vajaria BN, Patel KR, Begum R, Patel JB, Shah FD, Patel PS. Significance of phosphorylated epidermal growth factor receptor, matrix metalloproteinases, and E-cadherin in oral cancer. *Tumor Microenviron* 2018;1(1):16.
2. Yeh YC, Sheu B. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the gastrointestinal cancers: current knowledge and clinical potential. *Metalloproteinases Med* 2014;1:3-13.
3. Kotepui M, Punsawad C, Chupeerach C, Songsri A, Charoenkijkajorn L, Petmitr S. Differential expression of matrix metalloproteinase-13 in association with invasion of breast cancer. *Contemp Oncol* 2016;20(3):225-8.
4. Arkadash V, Yosef G, Shirian J, Cohen I, Horev Y, Grossman M, et al. Development of high affinity and high specificity inhibitors of matrix metalloproteinase 14 through computational design and directed evolution. *J Biol Chem* 2017;292(8):3481-95.
5. Ren F, Tang R, Zhang X, Madushi WM, Luo D, Dang Y, et al. Overexpression of MMP family members functions as prognostic biomarker for breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;10(8):e0135544.
6. Prasanna JS, Aishwarya MD, Karunakar P, Rekharani K, Vijayalakshmi B, Jharna P. Evaluation of collagenase-3 matrix metalloproteinase-13 gene-associated polymorphisms 11A/12A and− 77A/G and its associated alleles with and without periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 2018;22(6):474-9.
7. Farsinejad S, Rahaie M, Alizadeh AM, Mir-Derikvand M, Gheisary Z, Nosrati H, et al. Expression of the circulating and the tissue microRNAs after surgery, chemotherapy, and radiotherapy in mice mammary tumor. *Tumour Biol* 2016;37(10):14225-34.
8. Santos ASO, Costa FF, Esteves WT, Brito MAV, Furtado MAM, Martins MF. Linearization of the bradford protein assay to application in cow milk proteins quantification by UV-Vis spectrophotometry method. *Rev Inst Laticinios Candido Tostes* 2014;69(6):415-23.
9. Khalighfard S, Alizadeh AM, Irani S, Omranipour R. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. *Sci Rep* 2018;8(1):17981.
10. Xia W, Hammerberg C, Li Y, He T, Quan T, Voorhees JJ, et al. Expression of catalytically active matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts induces collagen fragmentation and functional alterations that resemble aged human skin. *Aging Cell* 2013;12(4):661-71.
11. Gonçalves Junior R, Pinheiro Ada R, Schoichet JJ, Nunes CH, Gonçalves R, Bonato LL, et al. MMP13, TIMP2 and TGFB3 gene polymorphisms in Brazilian chronic periodontitis and periimplantitis subjects. *Braz Dent J* 2016;27(2):128-34.
12. Wieczorek E, Galicki M, Tomasik B, Krol M, Jablonska E, Fendler W, et al. Expression of MMP and TIMP mRNA in peripheral blood leukocytes of patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Int J Biol Markers* 2016;31(3):e309-16.
13. Jonsson A, Hjalmarsson C, Falk P, Ivarsson ML. Levels of matrix metalloproteinases differ in plasma and serum - aspects regarding analysis of biological markers in cancer. *Br J Cancer* 2016;115(6):703-6.
14. Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, et al. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *Oncologist* 2000;5(2):108-14.
15. Hsiao CL, Liu LC, Shih TC, Lai YL, Hsu SW, Wang HC, et al. The association of matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphisms with breast cancer. *In Vivo* 2018;32(3):487-91.
16. Kemik O, Kemik AS, Sümer A, Dulger AC, Adas M, Begenik H, et al. Levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2011;17(16):2109-12.
17. Kohrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* 2009;9(1):188.
18. Benson CS, Babu SD, Radhakrishna S, Selvamurugan N, Sankar BR. Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis Markers* 2013;34(6):395-405.
19. Aroner SA, Rosner BA, Tamimi RM, Tworoger SS, Baur N, Joos TO, et al. Plasma matrix metalloproteinase 1, 3, and 7 levels and breast cancer risk in the Nurses' Health study. *Cancer Causes Control* 2014;25(12):1717-23.
20. Han Y, Jo H, Cho JH, Dhanasekaran DN, Song YS. Resveratrol as a tumor-suppressive nutraceutical modulating tumor microenvironment and malignant behaviors of cancer. *Int J Mol Sci* 2019;20(4). pii: E925.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-03]

TUMJ Tehran University Medical Journal, September 2019; Vol. 77, No. 6: 345-351 Original Article

Evaluation of matrix metalloproteinases 1 and 13 in the patients with breast cancer and their association with the clinical features

Solmaz Khalighfard Ph.D.[1]
Shiva Irani Ph.D.[1]
Ramesh Omranipour M.D.[2]
Ali Mohammad Alizadeh Ph.D.[2,3*]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Breast Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Cancer Research Center, Institute Cancer of Iran, Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 61192501
E-mail: aalizadeh@sina.tums.ac.ir

Abstract

Received: 21 Jan. 2019 Revised: 27 Feb. 2019 Accepted: 14 Sep. 2019 Available online: 22 Sep. 2019

Background: Metalloproteinase enzymes can lead to the digestion of the extracellular matrix and its compounds and ultimately facilitate the metastasis of cancer cells to other tissues. This study aimed to evaluate the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) 1 and 13 in the tissue and plasma samples of the patients with breast cancer and their relationship with clinical features of the disease.

Methods: In this experimental study, twenty-five patients with the diagnosis of non-metastatic luminal A breast cancer in the stage 2 or 3 from the patients referred to the Cancer Institute of Iran, as well as eight healthy subjects which was performed in the Cancer Research Center of Tehran University of Medical Sciences from March 2017 to September 2017, were entered into the study. After obtaining written consent, a few biopsies of breast tumor tissues and 10 cc of the whole blood were collected from all the subjects. Then, the collagen zymography assay was used to evaluate the activity of MMPs 1 and 13.

Results: The results of the present study showed that the activity of MMPs 1 and 13 in the plasma samples was significantly increased in comparison with the healthy group (respectively P=0.0055 and P=0.0263). Unlike the MMP-13, the activity level of the MMP-1 in the tumor and plasma samples was significantly different (P=0.0227). Plasma activity levels of MMP-1 (P=0.0037) and MMP-13 (P=0.0311) were also significantly different in stages 2 and 3 of the disease. Unlike the MMP-13, the activity level of MMP-1 was significantly different in lymph nodes between the tissue and plasma samples (respectively P=0.03 and P=0.015). Moreover, there was no significant difference in the activity level of MMPs 1 and 13 with menopausal and non-menopausal status between the tissue and plasma samples.

Conclusion: The results of the present study showed that plasma concentrations of the MMPs 1 and 13 in comparison with their tissue concentrations could be an appropriate diagnostic tool for breast cancer patients.

Keywords: breast cancer, matrix metalloproteinase, clinical status.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-03]