

افزایش احتمال متاستاز سرطان پستان در زنان حامل آلل 5A پروموتور ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۳

سمانه حاجی حسینی: کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی امام صادق (ع) گراش
مجید متولی باشی: استادیار زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان
زهره جتعی نجف‌آبادی: استادیار زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

چکیده

مقدمه: سرطان پستان، شایعترین بدخیمی در زنان ایرانی است که علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر در تشخیص و درمان آن، برخی از بیماران در نتیجه متاستاز و شروع مجدد بیماری از بین می‌روند. آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز نقش مهمی در تکامل و شکل‌گیری غدد پستانی دارند. آنزیم‌های مذکور با تجزیه ترکیبات مختلف ماتریکس خارج سلولی، زمینه را جهت تشکیل مجاری و غدد شیر ساز فراهم می‌کنند. آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ (MMP3) یکی از مهمترین اعضای خانواده ماتریکس متالوپروتئینازهاست و در شکل‌گیری، ایجاد مجاری و لوله‌های جدید در غدد پستانی نقش دارد. در ناحیه ۱۱۷۱- پروموتور ژن MMP3 پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی 5A/6A ناشی از دخول و حذف نوکلئوتید داکسی آدنوزین وجود دارد. این پلی مرفیسم بر میزان ظهور MMP3 مؤثر است به طوری که آلل 5A قوی‌تر بوده و ظهوری در حدود دو برابر بیشتر از آلل 6A دارد. افزایش ظهور MMP3 در نتیجه پلی مرفیسم مذکور شرایط را به سمت سرطانی شدن و ایجاد تومورهای بدخیم فراهم می‌کند.

روش بررسی: ژنوتیپ حاصل از SNP ژن MMP3 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۶۰ نمونه کنترل سالم از جمعیت اصفهان تعیین گردید. بیماران مبتلا به سرطان پستان به دو گروه بیماران متاستازی (M+) و غیر متاستازی (M-) تقسیم شدند.

یافته‌ها: نتایج، گویای فراوانی بالای آلل 5A در گروه (M+) ($OR = 2/91$, $P = 0/74$, $95\% CI -1/98 - 8/94$)، در مقایسه با فراوانی آلل 5A در گروه (M-) و کنترل‌های سالم است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر تصور می‌شود که افزایش ظهور MMP3 در حاملین آلل 5A مبتلا به سرطان پستان، احتمال متاستاز را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ (MMP3)، پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP)، متاستاز و سرطان پستان

مقدمه

سرطان پستان، شایعترین بدخیمی در زنان ایرانی است که ۱۸/۹ درصد از آمار سرطان در این جنس را تشکیل می دهد. علی‌رغم پیشرفت های چشمگیر در تشخیص و درمان سرطان پستان، مرگ و میر در نتیجه متاستاز سرطان پستان در زنان مبتلا با وجود انجام جراحی و درمان های لازم به عنوان معضل پزشکی همچنان باقی مانده است [۱]. ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده بزرگ آنزیم های پروتئاز می هستند و تاکنون ۲۶ عضو از این خانواده شناسایی شده است. اعضای مختلف این خانواده آنزیمی با فعالیت وابسته به روی (Zn) باعث تجزیه ترکیبات موجود در ECM می شوند [۵] و MMPs با تغییر در بافت ها می توانند در بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک چون تومورزایی، گسترش سرطان و متاستاز مؤثر باشند. در دوران حاملگی که اوج عملکرد غدد پستانی است، ظهور MMPs پایین است، سپس با کاهش عملکرد این غدد، سنتز پروتئازهای تجزیه کننده ماتریکس خارج سلولی (extra cellular matrix) به طور چشمگیری افزایش می یابد [۲، ۳، ۴]. ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ (MMP3) که به Stromelysin-1 موسوم است، یکی از اعضای مهم خانواده MMPs است. این آنزیم باعث تجزیه غشای پایه و سایر ترکیبات موجود در ماتریکس خارج سلولی می شود. همچنین MMP3 سایر آنزیم های خانواده MMPs نظیر MMP1 و MMP9 را نیز القاء می کند [۵، ۷ و ۸]. در شرایط طبیعی افزایش ظهور MMP3 منجر به شکل گیری، ایجاد مجاری و لوله های جدید در غدد پستانی می شود، در حالی که وجود ناپایداری های ژنومی و پلی مرفیسم های موجود در نواحی تنظیمی افزایش دهنده ظهور MMP3، شرایط را به سمت سرطانی شدن پیش می برد [۹، ۱۰ و ۱۱]. جایگاه کروموزومی ژن MMP3 به صورت q22.1۱ و در مجاورت ژن MMP1 است. در ناحیه 1171- پروموتور ژن MMP3 پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی Single Nucleotide Polymorphism (SNP) به صورت 5A/6A ناشی از دخول و حذف نوکلئوتید آدنوزین وجود دارد. این پلی مرفیسم بر میزان ظهور MMP3 مؤثر است، به طوری که آلل 5A قوی تر بوده و ظهوری در حدود دو برابر بیشتر از آلل 6A دارد. بنابراین گمان می کنیم که حاملین آلل 5A به صورت همو و هتروزیگوت مستعد متاستاز سرطان خصوصاً سرطان پستان هستند.

روش بررسی

این مطالعه به صورت مقطعی در بیمارستان سیدالشهداء اصفهان انجام شد و طی آن ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان

از مرداد ماه ۱۳۸۴ تا فروردین ماه ۱۳۸۵ بررسی شدند. همه بیماران طبق گزارش آسیب شناسی، مبتلا به سرطان پستان بودند. بیماران مبتلا به سرطان پستان به دو گروه ۶۰ نفره بیماران متاستازی M+ و غیر متاستازی M- تقسیم شدند. جهت اطمینان از نتایج، مطالعات در یک گروه ۶۰ نفره از کنترل های سالم نیز انجام گرفت. متوسط سن بیماران در حدود ۴۷ سال (۶۸-۲۷ سال) بوده و گزینش کنترل ها نیز بر اساس همین میانگین سنی است. از افراد مراجعه کننده سابقه خانوادگی از نظر وجود فرد مبتلا به سرطان، نوع سرطان و نسبت فرد بیمار با مراجعه کننده پرسیده شد. حدود ۱۰ میلی لیتر خون وریدی در لوله های حاوی EDTA ریخته و در دمای 4°C نگهداری گردید. سپس DNA ژنومی با روش رسوب نمکی استخراج شد [۱۲]. تعیین ژنوتیپ SNP ژن MMP3 با استفاده از تکنیک Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) صورت پذیرفت. طراحی پرایمرهای PCR به گونه ای بود که امکان شناسایی دو فرم آللی 5A و 6A با استفاده از تکنیک مذکور وجود داشته باشد به گونه ای که سایت برش آنزیم محدودالانثر Tth111I برای فرم آللی 5A ایجاد شود. نتایج به صورت باندهای ۹۷ و ۳۲ جفت بازی برای آلل 5A و ۱۲۹ جفت بازی برای آلل 6A مشاهده گردید. پس از انجام مراحل آزمایشگاهی در ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان (۶۰ بیمار متاستازی و ۶۰ بیمار غیرمتاستازی) و ۶۰ کنترل سالم، مطالعات آماری انجام گرفت. داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS12.0 وارد بانک اطلاعاتی شده و توسط همین نرم افزار تجزیه و تحلیل آماری صورت گرفت. جهت بررسی تأثیر پلی مرفیسم 5A/6A پروموتور ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۳، Odds ratio (OR) محاسبه گردید. از آزمون مربع کای نیز جهت مقایسه ارتباط متغیرها استفاده شد. ضریب اطمینان برای تمام آنالیزهای آماری ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در مجموع، ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران به دو گروه بیماران متاستازی (M+) و غیر متاستازی (M-) تقسیم شدند. میانگین سنی بیماران حدود ۴۸ سال با دامنه تغییرات ۶۸-۲۷ سال بود. همچنین مطالعات روی ۶۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل نیز انجام شد. گزینش افراد کنترل به گونه ای بود که از نظر جنسیت، سن و عوامل مؤثر با بیماران هماهنگ باشند. ژنوتیپ ژن MMP3 ۱۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان (۶۰ بیمار متاستازی و ۶۰ غیر متاستازی) و ۶۰ کنترل سالم با استفاده از تکنیک PCR-RFLP تعیین گردید. تعیین ژنوتیپ افراد بر اساس قطعات

ژنوتیپ‌های مختلف پروموتور ژن MMP3 در بیماران مبتلا به سرطان پستان متاستازی و غیر متاستازی و کنترل های سالم در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. جهت بررسی پلی‌مرفیسم 5A/6A در شروع و گسترش سرطان پستان، ارزیابی Odds Ratio (OR) انجام شد. نتایج حاصل از تعیین OR پیوستگی بالایی را در آلل 5A بین گروه (+M) و کنترل های سالم نشان می دهد (جدول شماره ۳).

جدول ۱- ژنوتیپ و فراوانی آللی MMP3 در بیماران مبتلا به

سرطان پستان و کنترل های سالم		
MMP3 ژنوتیپ	کنترل (%)	بیمار n=120 (%)
5A/5A	۸ (۱۳/۳)	۲۸ (۲۳/۳)
5A/6A	۳۸ (۶۳/۳)	۶۲ (۵۱/۶)
6A/6A	۱۴ (۲۳/۳)	۳۰ (۲۵/۰)

OR = ۱/۶۳, P = ۰/۶۱, CI %۹۵, ۰/۵۹-۴/۴

جدول ۲- مقایسه تست X² در گروه های مورد مطالعه کنترل،

بیماران متاستازی و غیر متاستازی			
M+	M-	کنترل	P (X ²)
۲/۴۰۰	۴/۴۰۰	۵/۴۶۷	مربع کای (X ²)
۲	۲	۲	درجه آزادی (df)
۰/۶	۰/۱۱	۰/۰۶۵	P

جدول ۳- فراوانی آللی و OR در گروه های کنترل و بیماران

کنترل	M+	M-
5A/5A + 5A/6A	۴۸	۴۰
5A/5A	۲۰	۸
6A/6A	۱۲	۱۸
5A frequency	۰/۵۶	۰/۴

5A/5A: 6A/6A, OR= ۱/۶۳, CI %۹۵, ۰/۵۹-۴/۴, P= ۰/۶۱ (بیمار/ کنترل)

5A/5A+ 5A/6A: 6A/6A, OR= ۰/۹۸, CI %۹۵, ۰/۴۳-۱/۸۴, P= ۰/۴۷ (بیمار/ کنترل)

OR= ۲/۹, CI %۹۵, ۰/۹۴- ۸/۹, P= ۰/۷۴ (متاستاز/ کنترل)

OR= ۳/۷۵, CI %۹۵, ۱/۲۵-۱۱/۲۴, P= ۰/۷۸ (متاستاز/ غیر متاستازی)

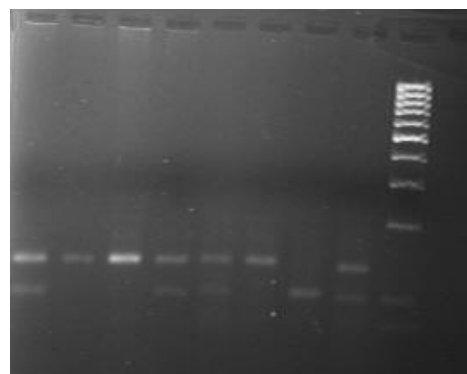
بحث

سرطان پستان از جمله ناهنجاری های شایع در میان زنان است و علی‌رغم درمان‌های مطلوب درصدی از بیماران با شروع مجدد بیماری و متاستاز مواجه می شوند. به طور کلی ایجاد تومور و گسترش آن فرایندی پیچیده و چند مرحله‌ای است که

DNA ایجاد شده پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالانژ Tth111I در الکتروفورز روی ژل آگارز انجام گرفت. محصول PCR ژن MMP3 با توجه به نوع پرایمرهای طراحی شده ۱۲۹ جفت باز است. آلل 6A به دلیل عدم وجود ناحیه برش آنزیم به صورت باند ۱۲۹ جفت بازی و آلل 5A با باندهای ۹۷ و ۳۲ جفت بازی قابل شناسایی است (شکل ۱). از میان بیماران مورد مطالعه، ۲۸ بیمار برای آلل 5A، ۳۰ نفر برای آلل 6A هموزیگوت بوده و ۶۲ نفر نیز هتروزیگوت 5A/6A بودند. فراوانی ژنوتیپ‌های 5A/5A، 5A/6A و 6A/6A در کنترل‌های سالم به ترتیب عبارتند از ۸، ۳۸ و ۱۴. جدول شماره ۱ فراوانی ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 را در دو گروه کنترل و بیمار نشان می دهد. جهت بررسی توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 از تست χ^2 استفاده شد. نتایج حاصل از مقایسه توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 در بیماران مبتلا به سرطان پستان غیر متاستازی (M-) با کنترل های سالم نشان دهنده توزیع یکنواخت ژنوتیپ های 5A/5A، 5A/6A و 6A/6A در گروه‌های مذکور است ($\chi^2 = 2.4, P = 0.6$).

شکل ۱- نتایج حاصل از RFLP در دو گروه کنترل و بیمار

1 2 3 4 5 6 7 8 L



L مارکر استفاده شده از نوع:

Gene Ruler TM 50bp DNA Ladder (# SM 0373)

۱ و ۴ ژنوتیپ 5A/6A در نمونه فرد سالم

۲ و ۳ ژنوتیپ 6A/6A در نمونه افراد سالم

۵ ژنوتیپ 5A/6A در نمونه فرد بیمار غیر متاستازی

۶ ژنوتیپ 6A/6A در نمونه فرد بیمار غیر متاستازی

۷ ژنوتیپ 5A/5A در نمونه فرد بیمار متاستازی

۸ ژنوتیپ 5A/6A در نمونه فرد بیمار متاستازی

نتایج حاصل از تعیین χ^2 جهت مقایسه توزیع ژنوتیپ های مختلف پروموتور ژن MMP3 در دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به سرطان پستان متاستازی (+M) نشان دهنده معناداری توزیع ژنوتیپ های مذکور است ($\chi^2 = 4.4, P = 0.11$). نتایج حاصل از مقایسه توزیع

Krippel با استناد به نتایج به دست آمده توسط Gillardi، بالا بودن احتمال متاستاز در بیماران حامل ژنوتیپ 5A/5A را در نتیجه افزایش ظهور آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ در بیماران مذکور می‌داند. نتایج همگی مؤید نقش MMP3 به عنوان فاکتوری مؤثر در گسترش سرطان و متاستاز سرطان پستان هستند در حالیکه بنظر می‌رسد که در شروع سرطان تومورزایی تأثیری نداشته باشد. بنابراین گرچه پلی مرفیسم 5A/6A پروموتور ژن MMP3 بر میزان ظهور آن تأثیر دارد ولی ممکن است این تأثیر در حدی نبوده که توسط مطالعات کنترل/ شاهد و با تعداد محدود نمونه مورد مطالعه تأیید گردد. از طرفی این امکان نیز وجود دارد که علاوه بر افزایش در میزان ظهور MMP3، فاکتورهای تنظیم کننده دیگری نیز در شروع سرطان پستان مؤثر باشند که مطالعه حاضر به بررسی آن نپرداخته است. در مطالعه مشابه انجام شده روی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و کنترل‌های سالم در جمعیت لهستان هیچ پیوستگی بین پلی مرفیسم 5A/6A پروموتور ژن MMP3 در شروع و متاستاز سرطان تخمدان دیده نشد [۱۴]. همچنین مطالعه ای که توسط Hinoda روی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد، نشان می‌دهد که فراوانی ژنوتیپ 6A/6A در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نسبت به گروه کنترل بیشتر است. این امر می‌تواند به واسطه پیوستگی ژنی MMP3 لکوس مجاور آن، MMP1 باشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر گرچه با نتایج مطالعات سایرین مطابقت دارد ولی عدم پیوستگی پلی مرفیسم مذکور با شروع سرطان پستان در ایران می‌تواند به واسطه تعداد محدود نمونه مورد مطالعه باشد. نتایج لزوم انجام مطالعات مشابه در سایر نواحی ایران را نشان می‌دهد. از طرفی به واسطه پیوستگی ژنوتیپ 5A/5A با متاستاز سرطان پستان می‌توان با تعیین ژنوتیپ پروموتور ژن MMP3 در زنان مبتلا به سرطان پستان که تحت درمان قرار گرفته‌اند، افراد با ریسک بیشتر نسبت به متاستاز را مشخص نمود و با کنترل‌های پیشگیرانه، تلفات ناشی از متاستاز سرطان پستان را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

از اداره تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت‌ها و همچنین از بیمارستان سیدالشهداء اصفهان به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه خون بیماران و اطلاعات پزشکی آنها سپاسگزاریم.

در هر مرحله تغییرات مولکولی پیچیده‌ای چون رشد و تکثیر سلول، عدم پاسخ به سیگنال‌های مهار کننده رشد سلولی و سیگنال‌های القاء کننده آپوپتوز، آنژئوژنز، تهاجم و متاستاز رخ می‌دهد. در نتیجه این تغییرات، شکل سلول و فعالیت‌های آن تغییر یافته به گونه‌ای که سلول‌های مجاور و در نهایت بافت را درگیر می‌کند. بنابراین لازم است مطالعات بیشتر جهت شناسایی عوامل مؤثر در متاستاز سرطان انجام شود. مطالعات اخیر در ارتباط با نقش آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ در تجزیه و تخریب ترکیبات ماتریکس خارج سلولی نظیر کلاژن، الاستین، لامنین، فیبرونکتین و ... این احتمال را بوجود می‌آورد که افزایش در میزان ظهور آنزیم مذکور به واسطه پلی مرفیسم تک نوکلئوتیدی 5A/6A در ناحیه ۱۱۷۱- پروموتور خود زمینه را جهت شروع و گسترش سرطان و از جمله سرطان پستان فراهم می‌آورد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر گویای عدم پیوستگی پلی مرفیسم 5A/6A ژن MMP3 با شروع سرطان پستان است (OR = ۰/۷۸، P = ۰/۴۳، ۰/۳۴ - ۱/۶۴ CI = ۰/۹۵).

با این حال فراوانی بالای ژنوتیپ 5A/5A در بیماران مبتلا به سرطان پستان متاستازی بیانگر تأثیر ژنوتیپ مذکور در گسترش سرطان پستان و متاستاز است (OR = ۲/۹۱، P = ۰/۷۴، ۰/۹۴ - ۸/۹۸ CI = ۰/۹۵). نتایج مذکور با نتایج حاصل از مطالعات مشابه در سایر جمعیت‌ها نظیر ایتالیا، سوئد و استرالیا هماهنگی دارد. Gillardi در سال ۲۰۰۲ با مطالعه ای مشابه روی ۸۶ بیمار و ۱۱۰ کنترل از جمعیت ایتالیا نشان داد که فراوانی آلل 5A ژن MMP3 در بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به کنترل‌های سالم بیشتر است و فرم آلی هموزیگوت 5A/5A احتمال متاستاز را در بیماران مبتلا به سرطان پستان به میزان ۲/۴ برابر افزایش می‌دهد. Lei نیز در سال ۲۰۰۲ مطالعات مشابهی را در دو جمعیت اروپایی سوئد و چک انجام داد. نتایج حاصل در دو جمعیت مذکور متفاوت است. OR ناشی از مقایسه ژنوتیپ 5A/5A با ژنوتیپ 6A/6A در دو گروه کنترل و بیمار به ترتیب در جمعیت سوئد و چک ۰/۷ و ۱/۲ به دست آمده است که نشان دهنده عدم تأثیر پلی مرفیسم مذکور در جمعیت سوئد است. Lei نیز معتقد است که پلی مرفیسم 5A/6A پروموتور ژن MMP3 تأثیری در شروع سرطان پستان ندارد و با توجه به نقش آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ در تجزیه ECM، می‌تواند در متاستاز و گسترش سرطان پستان مؤثر باشد [۱۳]. مطالعات انجام شده توسط Krippel در سال ۲۰۰۴ در جمعیت استرالیا نیز نشان می‌دهد که ژنوتیپ 5A/5A احتمال متاستاز لنفاوی را در بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش می‌دهد.

منابع

1. Uria J.A, Stahle- Bachdahi M, Fueyo A, Lopez-otin C. Regulation of collagenase-expression in human breast carcinoma is mediated by stromal epithelial cell intractions. *Cancer Research* 1997; 57: 4882- 8.
2. Bertucci F, Nasser v, Granjeaud S, Eisinger F, Adelaide J, Houlgatte R. Gene expression profiles of poor- prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Human Molecular Genetic* 2002; 11: 863- 72.
3. Reed J.C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Current Opinion about Oncology* 1999; 11: 68-75.
4. Ya S, Eriksson P, Hamsten A, Henney A.M. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 13055-60.
5. Fang S, Jin X, Wang R, Li Y, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, and Zhang J. Polymorphism in the MMP-1 and MMP-3 promoter and non- small cell lung carcinoma in the north of China. *Carcinogenesis* 2005; 26: 481-6.
6. Ghilardi G, Bionidi M.L, Caputo M, Leviti S, Demonti M, Guagnellini E, Scorza R. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clinical Cancer Research* 2002; 11: 121-5.
7. Zhang J, Jin X, Fang S.H, Li Y, Wang R, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Kuang G, Dong Z. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric adeno carcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2519-24.
8. Shan K, Ying W, Jian-Hui Z, Wei G, Na W, Yan L. The function of the SNP in the MMP1 and MMP3 promoter in susceptibility to endometriosis in China. *Molecular human Reproduction* 2005; 11: 423- 7.
9. Mercapide J, Lopez De Cicco R, Castresana, J.S, Klein- Szanto A.J. Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 expression account for invasive properties of human astrocytoma cell lines. *International Journal of Cancer* 2003; 106: 676- 82.
10. Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Feding-Habermann B. Activated integrin alpha and beta cooperates with MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer. *National Academy of Science* 2002; 4: 1120- 5.
11. Shapiro S.D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequence. *Current Opinion Cell Biology* 1998; 10: 602-8.
12. Kang S, Wang Y, Zhang J.H, Wei G, Wang N, Li Y. The function of the SNP in the MMP-1 and MMP-3 promoter in susceptibility to endometriosis in China. *Molecular human Reproduction* 2005; 11: 423- 7.
13. Saad Z, Bramwell V.H, Wison S.M, O'Malley F.P, Jeacock J, Chambers A.F. Expression of genes that contribute to proliferative and metastatic ability in breast cancer resected during various menstrual phases. *Lancet* 1998; 135: 1170- 3.
14. Somerville R, Oblander S, Apte S. Matrix metalloproteinase: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 2003; 4: 216- 27.
15. Stamekovic I. Extra cellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. *Journal of Pathology* 2003; 200: 448- 64.
16. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out produce for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16, 1215.
17. Heikkila P. Effect of bisphosphonates and small cyclic peptides on matrix metalloproteinases and human cancer cells. Helsinki, Finland, 2005.
18. Palosaari H. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in nature human odontoblasts and pulp tissue. Helsinki, Finland, 2003.
19. Posthumus M.D. Matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Helsinki, Finland, 2005.