فصلنامه دانش و تندرستی، دوره ۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

مقایسه میزان ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ در سرم و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان

مرتضی صادقی*[۱] (M.Sc.)، مجید متولی‌باشی[۱] (Ph.D.)

۱- دانشگاه اصفهان- دانشکده علوم- گروه زیست‌شناسی- بخش ژنتیک.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۲، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۰/۶/۴

چکیده

مقدمه: *ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-9) به‌تازگی به‌عنوان یکی از ژن‌های مارکر برای بسیاری از سرطان‌ها گزارش شده است. باتوجه به یافته‌های قبلی درمورد این ژن، در این مطالعه به مقایسه ارتباط میزان پلاسمایی و سرمی این آنزیم با خصوصیات بالینی بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداختیم.*

مواد و روش‌ها: *در این مطالعه مورد- شاهدی، ۱۱۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان به همراه ۸۷ فرد سالم مورد تحقیق قرار گرفتند. برای بررسی میزان MMP-9 در سرم و پلاسمای بیماران از روش زیموگرافی ژلاتین و کیت بایو رد (Bio-Rad, Richmond, CA) استفاده شد.*

نتایج: *میزان MMP-9 پلاسمایی در بیماران بسیار بیشتر از افراد سالم بود و تفاوت آن بیشتر از میزان تفاوت MMP-9 سرمی این دو گروه بود (P<۰/۰۰۱). ارتباط معناداری بین افزایش میزان MMP-9 پلاسمایی و متاستاز به غدد لنفاوی (P=۰/۰۱۹، OR, ۳/۴) و تهاجم وریدی (P=۰/۰۳۳، OR, ۴/۱۴) بیماران مورد مطالعه وجود داشت. ارتباط خاصی بین میزان MMP-9 سرمی و متاستاز لنفاوی یا تهاجم وریدی مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج مطالعه نشان می‌دهد که برای تشخیص زودهنگام بدخیمی سرطان پستان، میزان پلاسمایی این آنزیم، مناسب‌تر از میزان سرمی آن است.*

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، ماتریکس متالوپروتئیناز-۹، میزان پلاسمایی، میزان سرمی.

Original Article **Knowledge & Health 2011;6(2):13-17**

Comparison of Serum and Plasma MMP-9 Level in Breast Cancer Patients

Morteza Sadeghi[1*], Majid Motevali Bashi[1]

1- Dept. of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Abstract:

Introduction: *Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) has recently been reported as a marker gene for several cancers. With respect to our previous results about this gene, in the present study we compare the correlation between the plasma and serum MMP-9 levels and clinical features of breast cancer patients.*

Methods: *In this case-control study, 114 breast cancer patients and 87 healthy controls were studded. MMP-9 level was quantitatively measured by zymography and Bio Rad kit (Bio-Rad, Richmond, CA).*

Results: *Plasma MMP-9 level was significantly elevated in breast cancer patients compared with the control subjects (P<0.001). Also there was a correlation between the plasma MMP-9 level and lymph node metastasis (OR, 3.4; P=0.019) and venous invasion (OR, 4.14; P=0.033) of the patients. There was no correlation between the serum MMP-9 level and lymphatic metastasis or venous invasion of the patients.*

Conclusion: *According to our findings, plasma MMP-9 level is a better marker than the serum MMP-9 level for early diagnosis of breast cancer metastasis.*

Keywords: Breast cancer, Matrix mataloproteinase-9, Plasma level, Serum level.

Conflict of Interest: No
Received: 23 November 2010 Accepted: 19 August 2011

***Corresponding author:** M. Sadeghi, **Email:** ms.sadeghi@yahoo.com*

***نویسنده مسوول:** اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم-۲، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک، **تلفن:** ۰۹۱۳۲۳۰۹۷۱۸، **Email**: ms.sadeghi@yahoo.com

مقدمه

ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از آنزیم‌های دارای فعالیت پروتئولیتیکی هستند که در هضم اتصالات خارج سلولی و بافت پایه نگهدارنده سلول‌ها ایفای نقش می‌کنند و از این لحاظ می‌توانند بر عملکرد سلول‌ها در مراحل سرطانی‌شدن و تسریع این مراحل تأثیرگذار باشند (۱). تحقیقات نشان می‌دهد که این خانواده آنزیمی نه تنها در تغییرات فیزیکی بافت غشای پایه و اتصالات خارج سلولی ایفای نقش می‌کنند، بلکه در شرایط پاتولوژیک شامل پیشرفت و رشد تومورها و متاستاز و بدخیمی بسیاری از سرطان‌ها نیز مؤثرند (۲، ۳، ۴ و ۵). ازآنجایی‌که تغییرات بافت‌ها بیشتر بازتاب تغییرات آنزیمی مایعات بدن است، اندازه‌گیری میزان ماتریکس متالوپروتئینازها در خون و ادرار، ابزاری مناسب برای بررسی تغییرات اتفاق‌افتاده در بافت‌ها شناخته شده است و کیت‌های تجاری زیادی مانند کیت‌های الایزا برای بررسی اختصاصی میزان این آنزیم‌ها در خون و ادرار تهیه شده است (۶).

در بین اعضای این خانواده، MMP-9 تنها عضوی است که قابلیت هضم ژلاتین را که یکی از مهم‌ترین ترکیبات بافت غشای پایه است، دارد و تاکنون به‌عنوان یک مارکر سرطانی امیدبخش برای بررسی وضعیت بیماران و پیشگیری از چندین سرطان شناخته شده است (۶). افزایش میزان این آنزیم در پلاسما یا سرم بیماران در بسیاری از سرطان‌ها ازجمله: سرطان‌های پستان، کلون، ریه، سر و گردن و معده گزارش شده است (۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). اگرچه سودمندی MMP-9 به‌عنوان یک مارکر تشخیصی در این سرطان‌ها به اثبات رسیده است، ولی در چندین مطالعه که میزان این آنزیم را در سرم و پلاسمای خون بیماران اندازه گرفته‌اند، نتایج غیرهمسانی گزارش کرده‌اند (۱۳، ۱۴ و ۱۵). به‌نظرمی‌رسد اختلاف جمعیت‌های مورد مطالعه و روش‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری، یکی از دلایل این ناهمگونی نتایج باشد. همچنین فرایندهای روی نمونه خون در طی مراحل اندازه‌گیری نیز می‌تواند نتایج را تحت تأثیر قرار دهد. در چندین مطالعه، تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، عامل اصلی مؤثر در میزان کلی MMP-9 خون گروه‌های مورد مطالعه معرفی شده است (۱۶، ۱۷ و ۱۸). در بعضی از مطالعات میزان MMP-9 سرمی خون افراد سه برابر بیشتر از میزان MMP-9 پلاسمایی آنان گزارش شده است، ولی با وجود بالابودن این میزان، بعضی محققان این میزان را برای تشخیص وضعیت بالینی بیماران، بی‌ارزش معرفی کرده‌اند و بیشتر بر روی میزان پلاسمایی این آنزیم تأکید کرده‌اند (۱۹). با وجود این در بعضی از مطالعات از میزان MMP-9 سرمی برای تشخیص وضعیت پیشرفت تومورهای سرطانی استفاده شده است (۲۰، ۲۱ و ۲۲).

ما در مطالعات قبلی خود بر روی جمعیت ایرانی، میزان پلاسمایی این آنزیم را، عاملی مناسب برای ارزیابی وضعیت بهبودی بعد از درمان بیماران سرطان پستان معرفی کردیم. باتوجه به اهمیت بالای میزان این آنزیم در سرطان‌ها و وجود بعضی ناهمگونی‌ها در نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان پلاسمایی و سرمی این آنزیم در مطالعه حاضر، بر آن شدیم تا به‌طور هم‌زمان میزان سرمی و پلاسمایی این آنزیم را در دو گروه بیماران سرطانی و افراد سالم اندازه‌گیری کنیم و ارتباط سطوح سرمی و پلاسمایی این آنزیم را با وضعیت بالینی بیماران بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد- شاهدی، میزان MMP-9 در پلاسما و سرم ۱۱۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۸۷ فرد سالم اندازه‌گیری شد. بیماران از بین افراد سرطانی بیمارستان امید اصفهان انتخاب شدند و گروه شاهد از بین افرادی که برای انجام تست‌های سلامتی و فشارخون به مرکز انتقال خون مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. اختلاف سنی دو گروه کمتر از ۳ سال بود. وجود سرطان پستان در بیماران را متخصص مربوط با انجام تست‌هایی مانند ماموگرافی، تأیید کرد. برای اندازه‌گیری میزان این آنزیم در سرم و پلاسمای افراد مورد مطالعه از زایموگرافی ژلاتین به‌این‌صورت استفاده شد: نمونه سرم و پلاسمای هر فرد در بافر لودینگ (۵٪ SDS، ۲۰٪ گلیسرول، در ۰/۴٪ Tris دارای PH برابر ۶/۸ و حاوی ۰/۰۲٪ برومو فنول بولو) حل شد و در ژل اکریلامید ۱۰٪ حاوی ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ژلاتین لود شد. بعد از اتمام الکترو فورز، ژل به مدت یک ساعت در بافر رناچوراسیون شامل (2.5% Triton X-100 in 50mM Tris–HCl (pH7.5)) در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید و سپس ژل به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه در بافر زیر با pH=۷/۵ انکوبه گردید (0.15 M NaCl, 10 mM CaCl2, 0.02% NaN3 in 50 mM Tris–HCl) و نهایتاً ژل با کوماسی بولو ۰/۰۵٪ رنگ‌آمیزی و با متانول ۳۰٪ و استیک اسید ۱۰٪ شستشو شد. برای مقایسه میزان نسبی پروتئین در سرم و پلاسمای بیماران از آزمون ویلکاکسون استفاده شد. میزان استاندارد MMP-9 در سرم و پلاسمای افراد با اسکن باندهای حاصل، با اسکنر دنسیتومتر (Epson GT-9500 Scanner) و آنالیز با نرم‌افزار (Biometra) Scan Pack 3.0 تعیین شد و همچنین از کیت پروتئین بایورد نیز (Bio-Rad, CA) برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین هر نمونه استفاده شد.

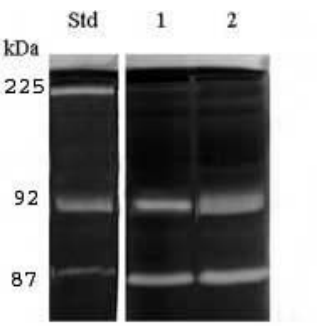
برای مقایسه ویژگی‌های دو جمعیت مورد مطالعه از آزمون کای- دو استفاده شد و $P<0/05$ در تمامی محاسبات معنادار درنظرگرفته‌شد.

نتایج

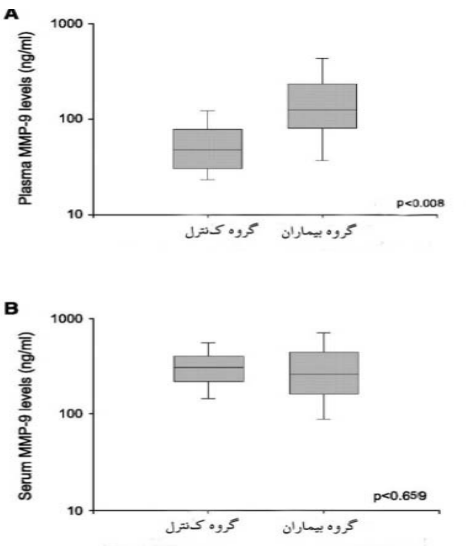
در این مطالعه برای بررسی میزان فرم فعال MMP-9 در سرم و پلاسمای بیماران مورد مطالعه از زیموگرافی ژلاتین (شکل ۱) و کیت تشخیص پروتئین (Bio-Rad, CA) استفاده شد. در بررسی ارتباط بین

جدول ۱- ارتباط بین میزان افزایش MMP-9 پلاسمایی و خصوصیات کلینیکی بیماران سرطان پستان

متغیر		میزان MMP-9 پلاسمایی		OR (٪۹۵CI)	P.V
		نرمال (<۸۰)	افزایش‌یافته (≥۸۰)		
مرحله سرطان					
	ابتدایی	۸ (۴۲/۱)	۱۹(۲۱/۸)	۱	۰/۰۷۲
	پیشرفته	۱۱(۵۷/۹)	۶۸ (۷۸/۲)	۲/۶ (۰/۹ -۷/۳)	
متاستاز به غدد لنفاوی					
	منفی	۱۲(۶۳/۲)	۲۹ (۳۳/۳)		۰/۰۱۹
	مثبت	۷ (۳۶/۸)	۵۸ (۶۶/۷)	۳/۴(۱/۲-۹/۶)	
تهاجم وریدی					
	منفی	۱۶(۸۴/۲)	۴۹(۵۶/۳)		۰/۰۳۳
	مثبت	۳ (۱۵/۸)	۳۸(۴۳/۷)	۱	



شکل ۱- زیموگرافی نمونه‌های پلاسما (۱) و سرم (۲) در دو بیمار مورد مطالعه Std ژلاتیناز استاندارد با وزن مولکولی ۸۷، ۹۲ و ۲۲۵ کیلودالتن



شکل ۲- مقایسه میزان MMP-9 سرمی و پلاسمایی در دو گروه مورد مطالعه (A: میزان سطح پلاسمایی آنزیم، B: میزان سطح سرمی آنزیم)

میزان سرمی و پلاسمایی این آنزیم در دو گروه مورد مطالعه، میزان کلی سرمی این آنزیم بسیار بیشتر از میزان پلاسمایی آن بود، ولی ارتباط خاصی بین میزان سرمی این آنزیم و خصوصیات بالینی بیماران مانند متاستاز به غدد لنفاوی و یا تهاجم وریدی بیماران مشاهده نشد. میزان افزایش این آنزیم در گروه بیماران نسبت‌به گروه شاهد در سطح پلاسمایی بیشتر از سطح سرمی بود (شکل ۲).

افزایش میزان MMP-9 پلاسمایی در بیماران نسبت‌به گروه شاهد با متاستاز به غدد لنفاوی (P=۰/۰۱۹، OR =۳/۴) و تهاجم وریدی (Venous Invasion) بیماران سرطان پستان در ارتباط بود (P=۰/۰۳۳، OR =۴/۱) (جدول ۱).

بحث

باتوجه به اهمیت بالای نقش میزان آنزیم MMP-9 در سرم و پلاسمای بیماران سرطانی و شناخته‌شدن این آنزیم به‌عنوان یک مارکر توموری در بسیاری از سرطان‌ها، در مطالعه حاضر به بررسی هم‌زمان سطح سرمی و پلاسمایی این آنزیم در بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد شاهد پرداختیم.

در مطالعاتی مشابه بر روی جمعیت‌های دیگر کشورها گزارش شده بود که میزان کلی MMP-9 سرمی بسیار بیشتر از میزان این آنزیم در پلاسمای افراد است (۱۹ و ۲۰). در این مطالعه نیز ما در نتایجی مشابه مشاهده کردیم که میزان کل MMP-9 سرمی در کل افراد مورد مطالعه ۳/۵ برابر، در افراد گروه شاهد ۶/۵ برابر و در افراد بیمار حدود ۲/۲ برابر بیشتر از میزان پلاسمایی این آنزیم است. ازآنجایی‌که لکوسیت‌های خون و پلاکت‌ها دارای میزان MMP-9 بالاتری نسبت‌به سایر سلول‌های خونی هستند، به‌نظرمی‌رسد این افزایش مقدار در سطح سرمی این آنزیم ناشی از آزادشدن آن در هنگام فعال‌شدن پلاکت‌ها یا در طی مراحل جمع‌آوری و فرایند تهیه نمونه باشد (۲۳ و ۲۴). ازآنجایی‌که میزان کلی MMP-9 در خون افراد دارای دو حالت آنزیم فعال و پروآنزیم غیرفعال است، در این مطالعه برای اندازه‌گیری

فرم فعال MMP-9 از زیموگرافی استفاده کردیم که یکی از تکنیک‌های حساس برای اندازه‌گیری فرم فعال MMP-9 است.

از مقایسه نتایج حاصل از میزان MMP-9 دو گروه این مطالعه مشخص شد که در بررسی متاستاز به غدد لنفاوی در بیماران مبتلا به سرطان پستان و تهاجم وریدی این بیماران، تغییرات میزان پلاسمایی این آنزیم بیشتر است و به‌نظرمی‌رسد برای بررسی وضعیت پیشرفت تومور در این بیماران و به‌خصوص برای مشخص کردن خطر تهاجم به غدد لنفاوی، میزان پلاسمایی این آنزیم عاملی مناسب‌تر از سطح سرمی این آنزیم است که به‌نظرمی‌رسد این خود دلیلی بر این مطلب باشد که بعضی دانشمندان مشتاق مطالعه روی میزان سرمی این آنزیم، نتایج ناکافی دارند (۲۵ و ۲۶) و مطالعات بر روی میزان پلاسمایی این آنزیم و شرایط بیماران سرطانی نتایج مستندتر و مستدل‌تری دارد (۲۷ و ۲۸).

استلا ماریس در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای مشابه بر روی جمعیت آرژانتین گزارش کرد که میزان پلاسمایی MMP-9 برای بررسی وضعیت بهبود بیماران سرطان پستان بسیار بهتر از میزان سرمی این آنزیم است (۲۹). پوسی مینافرا در مطالعه‌ای دیگر بر روی جمعیت ایتالیا در سال ۲۰۰۴ نشان داد که افزایش میزان پلاسمایی این آنزیم با افزایش بیان c-erbB-2 که یکی از اصلی‌ترین ژن‌های دخیل در سرطان پستان است، در ارتباط است و می‌توان از میزان پلاسمایی این آنزیم برای تقسیم بیماران سرطان پستان به زیرگروه‌های خاص استفاده کرد (۳۰). سومیاری و همکارانش در مطالعه‌ای (۲۰۰۶) بر روی جمعیت هلند، با مقایسه بین میزان پلاسمایی و سرمی این آنزیم در بیماران سرطان معده، در نتایجی مشابه اعلام کردند که باتوجه به بررسی وضعیت بهبودی بیماران سرطان پستان، میزان پلاسمایی این آنزیم فاکتوری مناسب‌تر از میزان سرمی است (۳۱). مانلو و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ بر روی جمعیت ایتالیا گزارش کردند که میزان پلاسمایی این آنزیم با بقای بیماران سرطانی پستان در ارتباط است و این گروه در مطالعه خود بر اهمیت نقش میزان پلاسمایی این آنزیم تأکید داشتند؛ زیرا معتقد بودند که فرایندهایی مانند کوراگولاسیون و فیبرینولایسیز، اندازه‌گیری میزان سرمی این آنزیم را با مشکل مواجه می‌کند (۳۲).

اگرچه در نتایج این مطالعه و اکثر مطالعات مشابه، از میزان پلاسمایی این آنزیم به‌عنوان عاملی مناسب‌تر برای بررسی وضعیت بیماران نام‌برده‌شده‌است، ولی به‌نظر می‌رسد که هنوز دانشمندان بر سر این موضوع به اتفاق نظر نرسیده‌اند، به‌طوری‌که دکوک و همکارانش در مطالعه خود در نتایجی متناقض با نتایج دیگر دانشمندان گزارش کردند که میزان پلاسمایی این آنزیم با خصوصیات بالینی بیماران سرطان پستان در ارتباط نیست (۱۴) که به‌نظرمی‌رسد اختلافات ژنتیکی جمعیت‌ها و همچنین متفاوت‌بودن روش‌های اندازه‌گیری از مهم‌ترین دلایل چنین نتایجی باشد.

در مطالعه حاضر مشاهده کردیم که ارتباط معناداری بین میزان بقای بیماران و همچنین متاستاز به غدد لنفاوی و میزان پلاسمایی MMP-9 وجود دارد، ولی ارتباط خاصی بین میزان سرمی این آنزیم و بقای بیماران یا متاستاز به غدد لنفاوی مشاهده نشد. طبق یافته‌های ما این اولین مطالعه‌ای است که در آن به بررسی هم‌زمان سطوح سرمی و پلاسمایی MMP-9 در بیماران مبتلا به سرطان پستان در جمعیت ایران پرداخته شده است. در یک نتیجه‌گیری کلی، طبق یافته‌های این مطالعه، برای بررسی متاستاز به غدد لنفاوی و همچنین تهاجم وریدی بیماران سرطان پستان میزان MMP-9 پلاسمایی عاملی مناسب‌تر و بهتر از میزان سرمی این آنزیم معرفی می‌گردد. به‌دلیل محدودیت در تعداد نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه، برای اثبات قطعی این نظریه، انجام یک مطالعه کلی بر روی گروه‌های مختلف از جمعیت ایران پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه اصفهان به‌خاطر فراهم‌کردن تجهیزات و از بیمارستان امید و سازمان انتقال خون اصفهان برای همکاری‌شان درزمینه جمع‌آوری نمونه‌ها، صمیمانه تشکر می‌شود.

References

1. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999;274(31):21491-4.
2. la-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. Biochimie 2005;87(3-4):273-86.
3. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol 2000;10(6):415-33.
4. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2002;2(3):161-74.
5. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. Ann Med 1999;31(1):34-45.
6. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. Ann N Y Acad Sci 1999;878:212-27.
7. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. Cancer Res 1993;53:140-6.
8. Hoikkala S, Paakko P, Soini Y, Makitaro R, Kinnula V, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue MMP-2/TIMP-2-complex are better prognostic factors than serum MMP-2, MMP-9 or TIMP-1 in stage I-III lung carcinoma. Cancer Lett 2006;236(1):125-32.
9. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. Int J Cancer 2005;116(1):422-7.
10. Shen KH, Chi CW, Lo SS, Kao HL, Lui WY, Wu CW. Serum matrix metalloproteinase-9 level associated with stromal reaction in patients with gastric cancer. Anticancer Res 2000;20(28): 1307-10.

11. Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, et al. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. Hepatology 1996;24(5):1058-62.

12. Endo K, Maehara Y, Baba H, Yamamoto M, Tomisaki S, Watanabe A, et al. Elevated levels of serum and plasma metalloproteinases in patients with gastric cancer. Anticancer Res 1997;17(3):2253-8.

13. Torii A, Kodera Y, Uesaka K, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, et al. Plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 in gastric cancer. Br J Surg 1997;84(1):133-6.

14. Decock J, Hendrickx W, Wildiers H, Christiaens MR, Neven P, Drijkoningen M, et al. Plasma gelatinase levels in patients with primary breast cancer in relation to axillary lymph node status, Her2/neu expression and other clinicopathological variables. Clin Exp Metastasis 2005;22(6):495-502.

15. Kirman I, Jain S, Cekic V, Belizon A, Balik E, Sylla P, et al. Altered plasma matrix metalloproteinase-9/tissue metalloproteinase-1 concentration during the early postoperative period in patients with colorectal cancer. Surg Endosc 2006;20(3):706-9.

16. Jung K. Serum or plasma: what kind of blood sample should be used to measure circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors? J Neuroimmunol 2005;162(1-2):1-2.

17. Mannello F, Luchetti F, Canonico B, Papa S. Effect of anticoagulants and cell separation media as preanalytical determinants on zymographic analysis of plasma matrix metalloproteinases. Clin Chem 2003;49:1956-7.

18. Mannello F. Effects of blood collection methods on gelatin zymography of matrix metalloproteinases. Clin Chem 2003;49:339-40.

19. Jung K, Laube C, Lein M, Lichtinghagen R, Tschesche H, SchnorrD, et al. Kind of sample as preanalytical determinant of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in blood. Clin Chem 1998;44(5):1060-2.

20. Dragutinovic VV, Radovanovic NS, Izrael-Zivkovic LT, Vrvic MM. Detection of gelatinase B activity in serum of gastric cancer patients. World J Gastroenterol 2006;12(5):105-9.

21. Rauvala M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. Gynecol Oncol 2005;99(3):656-63.

22. Chen W, Abnet CC, Wei WQ, Roth MJ, Lu N, Taylor PR, et al. Serum markers as predictors of esophageal squamous dysplasia and early cancer. Anticancer Res 2004;24(5):3245-9.

23. Kodama S, Iwata K, Iwata H, Yamashita K, Hayakawa T. Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. An application for rheumatoid arthritis serum and plasma. J Immunol Methods 1990;127(1):103-8.

24. Fujisawa T, Kato Y, Terada A, Iguchi K, Kamiya H. Matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood eosinophils. Int Arch Allergy Immunol 1999;120:65-9.

25. Oberg A, Hoyhtya M, Tavelin B, Stenling R, Lindmark G. Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. Anticancer Res 2000;20(2):1085-91.

26. Hrabec E, Strek M, Nowak D, Hrabec Z. Elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with lung cancer. Respir Med 2001;95(1):1-4.

27. Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP, et al. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients. Clin Chim Acta 2005;354:91-9.

28. Tamura M, Oda M, Matsumoto I, Tsunezuka Y, Kawakami K, Ohta Y, et al. The combination assay with circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, matrix metalloproteinase-9, and VEGF for diagnosing lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer. Ann Surg Oncol 2004;11(10):928-33.

29.Stella Maris Ranuncolo, Eduardo Armanasco, Carlos Cresta 2, Elisa Bal de Kier Joffe , Lydia Puricelli. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. Internat J of Cancer 2003;106(5):745-751.

30. La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. Br J Cancer 2004;90(7):1414-21.

31. Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, Olsen C, Hu H, Jordan R, et al. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at high risk of developing breast cancer. Cancer Lett 2006; 233(1):98-107.

32. Mannello F, Tonti GA. Gelatinase concentrations and zymographic profiles in human breast cancer: Matrix metalloproteinases circulating in plasma are better markers for the subclassification and early prediction of cancer: The coagulation/fibrinolysis pathways alter the release, activation and recovery of different gelatinases in serum. Int J Cancer 2007;121(1):216-23.