مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره اول (پیاپی ۳۸) بهار ۱۳۹۸
صفحات ۱۴-۶

Original Article

افزایش سطح بیان ژن *MMP-2* در بیماران فاقد عفونت ویروس‌های هپاتیت B و C مبتلا به سیروز کبدی

عباسعلی رضاییان[۱]، رامین یعقوبی[*۲]، بیتا گرامی‌زاده[۳]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران و گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، [۲]دانشیار، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، [۳]استاد، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

چکیده

سابقه و هدف: سیروز کبدی یکی از مهم‌ترین علل نیازمند دریافت پیوند کبد می‌باشد. عواملی مانند عفونت‌های ویروسی، بیماری‌های خودایمنی، مصرف دارو، بیماری‌های وراثتی، سابقه ژنتیکی و همچنین مصرف الکل در ایجاد آن دخالت دارند. هدف از این مطالعه راه‌اندازی روشی دقیق به منظور تعیین میزان بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز۲ (MMP-2) به عنوان معیاری به منظور بررسی فرایند ایجاد و تشدید سیروز کبدی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۳۳ بیمار از ۲۵۸ فرد مبتلا به سیروز کبدی پس از تایید عدم حضور عفونت ویروس‌های هپاتیت B و C، همراه با ۲۰ نفر گروه کنترل سالم مورد بررسی قرارگرفتند. میزان سطح بیان mRNA ژن *MMP-2* با استفاده از روش Real-time PCR ارزیابی و بهینه سازی گردید. سپس دو گروه بیمار وکنترل از نظر میزان سطح بیان mRNA ژن *MMP-2* مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: ارزیابی بیان mRNA افزایش معنی‌دار ژن *MMP-2* در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که عوامل غیرویروسی بیماری های مزمن کبدی نیز می‌توانند درافزایش سطح بیان ژن *MMP-2* و تشدید سیروز کبدی موثر باشند. اما برای تایید نتایج یاد شده ضرورت انجام مطالعات تکمیلی بیشتر وجود دارد.

واژگان کلیدی: ماتریکس متالوپروتئیناز ۲، سیروز، پیوند کبد.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۷

مقدمه

در سال ۱۹۶۲ ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix =MMP metalloproteinase) توسط جروم گراس (Jerome Gross) و چارلز لاپیر (Charles Lapiere) در دگردیسی قورباغه و به دلیل فعالیت آنزیمی (تخریب کلاژن) تشخیص داده شدند. این آنزیم کلاژناز، به عنوان MMP-1 نام‌گذاری گردید. در سال ۱۹۶۸ این آنزیم از پوست انسان نیز جداسازی گردید. ماتریکس متالوپروتئینازها یک خانواده بزرگ از اندوپپتیدازهای حاوی روی (Ze^{+2}) و وابسته به کلسیم هستند که مسئول

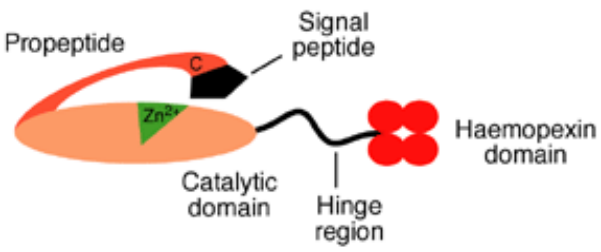
*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، بیمارستان نمازی، برج پژوهشی محمد رسول ا... ، طبقه ۷ ، مرکز تحقیقات پیوند.
تلفن: ۰۷۱۳۶۴۷۳۹۵٤ پست الکترونیک: rayaviro@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

بازسازی بافت و تخریب ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژناز، الاستاز، ژلاتین، گلیکوپروتئین‌های ماتریکس و پروتئوگلیکان‌ها می‌باشند. متالوپروتئیناز در شرایط طبیعی به میزان حداقل بیان شده و در یک حد متعادل نقش ترمیمی بافت را ایفا می‌کنند. این واحدهای پروتئینی توسط هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های تنظیم می‌گردند (۱).

این آنزیم‌ها در قالب یک زایموژن (Zymogens) تولید شده و برای فعالیت خود نیاز به آنزیم‌های پروتئولیتیکی مانند پلاسمین، فورین و سرین پروتئاز دارند. MMP ها از ٤ ناحیه ساختاری تشکیل شده‌اند. این مولکول‌های پروتئینی در ابتدا به مانند یک پروآنزیم غیرفعال، با یک ناحیه پروپپتید سنتز می‌شوند (شکل ۱). این ناحیه قبل از فعالیت می‌بایست جدا گردد. بخش دوم MMP ها ساختار کاتالایتیک دومین (Catalytic domain) می‌باشد. این قسمت تشکیل دهنده دهانه فعال است که برای فعالیت خود نیاز به فلز روی دارد. بخش سوم ناحیه لولا (Hinge region) می باشد. این ناحیه از ۷۵ اسید آمینه تشکیل شده است. دراصل پل ارتباطی پایانه آمینی و پایانه کربوکسیلی می‌باشد. ناحیه چهارم یا C ترمینال ساختاری شبیه به پروتئین Hemopexin سرم دارد. این ناحیه از چهار بخش بتا پروپلر (β-propeller) تشکیل شده است. تصور بر این است که این ناحیه به منظور بر هم کنش عملکرد پروتئین-پروتئین ضروری می‌باشد (۲).

شواهد نشان می‌دهد که مولکول‌های MMP می‌توانند در آپوپتوز نیز نقش داشته باشد. این مطلب بیانگر این موضوع است که مولکول‌های MMP از یک طرف به بقا و تکثیر سلولی کمک می‌کنند و از طرف دیگر باعث مرگ سلولی می‌شوند. به



شکل ۱: ساختار مولکولی ماتریکس متالوپروتئیناز (۵).

نظر می‌رسد که MMP ها در پاسخ به هر سوبسترا نوع خاصی از واکنش را دنبال می‌کنند. تا به امروز حداقل ۲٦ نوع مختلف از مولکول‌های MMP شناسایی شده‌اند. معمول‌ترین راه گروه‌بندی مولکول‌های MMP بر اساس نوع فعالیت آنزیمی و محل قرارگیری آن در سلول می‌باشد. این گروه‌ها شامل کلاژناز، ژلاتیناز، استرملیزین (Stromelysins) و تایپ‌های غشایی (Membrane-type MMPs= MT-MMPs) می‌باشند (۳).

از طرف دیگر سرطان کبد یا هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) یکی از شایع‌ترین تومورهای بدخیم در آسیا می‌باشد. در این نوع درگیری ابتدا رگ‌های خونی، بخش‌های داخلی و سپس متاستاز خارج کبدی رخ می دهد. از میان عوامل ایجاد کننده سرطان کبد، آلودگی به ویروس‌های هپاتیت B و C و مصرف بی‌رویه الکل از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند. از آن‌جایی که ماتریکس خارج سلولی اطراف بافت توموری و غشای پایه به عنوان یک مانع در برابر تهاجم سرطان در نظر گرفته شده است، تخریب ماتریکس خارج سلولی، از جمله غشای پایه، یک گام اولیه و ضروری است. این امر به کمک یکی از اعضای خانواده MMP به ویژه مواردی مانند MMP-2 محقق می‌شود (٤).

ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-2)، آنزیمی است که با عنوان ژلاتیناز A نیز شناسایی می‌شود و در انسان توسط ژن MMP-2 واقع بر روی کروموزوم ١٦ کد می‌شود. این ژن پلی‌مورف است و از متشکل ازدو توالی می باشد. این دو توالی در اگزون شماره یک و ۱۳ و همچنین اینترون‌های شماره ٦ و ۱۰ با هم متفاوتند و به دنبال آن دو رونوشت متفاوت و با عملکرد مختلف قرار دارند. به طور کلی پلی‌مورفیسم درمتالوپروتئینازها به ویژهMMP-2- مهم به نظر می‌رسد. زیرا بیان ژن و به دنبال آن عملکرد آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. تاکنون چندین نوع پلی‌مورفیسم در پروموتر ژن MMP-2 شناسایی شده است (٦).

MMP-2 به طور ذاتی تایپ‌های کلاژن (IV، V، VII، X و XI)، فیبرونکتین، الاستین و ژلاتین را تخریب می‌کند. به‌طور خاص MMP-2 مسئول تخریب کلاژن تایپ IV (یکی از اجزای مهم غشای پایه) است (۷) .

هدف از این مطالعه راه اندازی تکنیک تعیین میزان سطح بیان

mRNA ژن بیوماکر MMP-2 با استفاده از روش Real Time PCR و مقایسه تغییرات احتمالی آن در دو گروه افراد سالم و افراد دریافت کننده پیوند کبد فاقد عفونت ویروسی هپاتیت B و C بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمعیت مورد مطالعه: این پژوهش به صورت مقطعی بر روی ۲۵۸ بیمار مبتلا به درگیری کبدی انجام شد. افراد مورد بررسی در سال‌های ۱۳۹۱ تا۱۳۹۵ در بیمارستان نمازی شیراز تحت عمل پیوند کبد قرار گرفته بودند. شایان یادآوری است که نمونه‌ها از بانک نمونه مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا دریافت گردید. در ابتدا وجود و یا عدم وجود عفونت ویروس‌های هپاتیت B و C در بیمارن مورد مطالعه با استفاده از آزمون‌های ایمونولوژیک (کیت شرکت Diapro، ایتالیا)، روش الایزا مقدار HBsAg و روش‌های مولکولی میزان DNA ویروس هپاتیت B و C به ترتیب با روش های HBV-PCR (کیت شرکت سیناژن، ایران) و Nested-HCV-RT-PCR بررسی شد (۸ و ۹).

پس از غربال‌گری، جمعیت نهایی مورد مطالعه ۳۳ بیمار انتخاب شدند که فاقد هرگونه عفونت با ویروس‌های هپاتیت B و C بودند. همچنین ۲۰ نفر از افرادی که فاقد هرگونه درگیری کبدی بودند نیز به عنوان گروه کنترل سالم استفاده گردید.

ب) طراحی و آماده سازی پرایمر ژن MMP-2: ابتدا با استفاده از نرم‌افزارهایی مانند Gene runner و Oligo analyzer و همچنین به کار گیری multiple alignment از سایت NCBI، پرایمرهای اختصاصی برای نواحی اگزون جانکشن ژن MMP-2 طراحی گردید (جدول ۱). برای اطمینان از درستی کار ۳ پرایمر طراحی شد تا در صورت دست نیافتن به جواب مناسب از پرایمر بعدی استفاده شود. همچنین به منظور تایید صحت انجام عمل استخراج RNA از سلول‌های مورد نظر از پرایمر ژن محافظت شده GAPDH استفاده شد (۹).

ج) جداسازی RNA و تولید cDNA: در این مرحله ابتدا از خون افراد مورد مطالعه گلبول‌های سفید (بافی کوت) جداسازی گردید (۱۰) و سپس با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت تاکارا، اوتسا، شیگا، ژاپن) RNA استخراج شد. در ادامه با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت تاکارا، اوتسا، شیگا، ژاپن) RNA استخراج شده به cDNA تبدیل شد. این فرایند برای تمام نمونه‌های بیمار و نمونه‌های کنترل به طور مجزا انجام گردید. قابل توجه است که میزان RNA استخراج شده برای استفاده به منظور سنتز cDNA باید غلظتی برابر ۵۰۰ نانوگرم داشته باشد.

د) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): پس از مخلوط کردن واکنش گرهای PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت سیناژن)، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (غلظت ۱۰ پیکومول) و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده، در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. برنامه دمایی PCR با ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، واسرشت در دمای ۹٤ °C به مدت ٤٥ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰–۵۷ °C به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه اعمال گردید (۹ و ۱۱). سپس محصول PCR در کنار مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی و نمونه کنترل (GAPDH) بر روی ژل آگاروز ۱٪، الکتروفورز گردید و باندهای مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای هر دو ژن اشاره شده شیب دمایی ۵۷، ۵۸، ۵۹ و ۶۰ درجه سلیسیوس در نظر گرفته شد تامورد بررسی بهترین دمای حاصل، در برنامه

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های MMP مورد استفاده.

هدف	پرایمر	قطعه (جفت باز)	منبع
MMP-2	F1: 5′AAGGACAGCCCTGCAAGTTT 3′ R1: 5′GTCGTAGTCCTCAGTGGTGC 3′	۱۱۳	طراحی شده
MMP-2	F2: 5′CCCTGTGTCTTCCCCTTCAC 3′ R2: 5′ ATCGTAGTTGGCTGTGGTCG 3′	۱۰۵	طراحی شده
MMP-2	F3: 5′AGCCCAAGTGGGACAAGAAC3′ R3: 5′ACGAGCAAAGGCATCATCCA 3′	۹۲	طراحی شده
GAPDH	F:5′GGACTCATGACCACAGTCCA 3′ R: 5′CCAGTAGAGGCAGGGATGAT 3′	۱۱۹	(۸)

Real time PCR مورد استفاده قرار گیرد.

هـ) Real Time PCR: در میکروتیوب‌های ۰/۱ میلی‌لیتری در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۳/٤ میکرولیتر آب مقطر، ۰/٤ میکرولیتر از پرایمرهای MMP-2 و GAPDH (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۵ میکرولیتر از سایبرگرین (شرکت تاکارا، اوتسا، شیگا، ژاپن)، ۰/۲ میکرولیتر از رنگ راکس و ۱ میکرولیتر cDNA ریخته شد. سپس برنامه دمایی مطابق با جدول ۲ برای آن‌ها اعمال گردید (۱۲). در این مطالعه از دستگاه real time PCR مدل StepOnePlus ساخت شرکت ABI آمریکا استفاده گردید.

و) آنالیز آماری: داده ها با استفاده از نسخه بیستم نرم افزار *SPSS* مورد آنالیز قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری میزان افزایش بیان ژن‌ها از روش مرسوم Livak و با ارزیابی میزان $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. سطح معنی‌داری روابط آماری بر اساس $p \leq ۰/۰۵$ سنجیده شد.

یافته‌ها

الف) غربالگری هپاتیت B و C: نتایج آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی نشان داد که از ۲۵۸ بیمار مورد مطالعه تعداد ۳۳ نفر فاقد عفونت هپاتیت B و C بوده‌اند. این آزمون ها برای گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که همگی فاقد عفونت هپاتیت B و C می‌باشند. بنابراین ۳۳ بیمار فاقد عفونت ویروس‌های هپاتیت B و C به عنوان گروه بیمار در مطالعه وارد

جدول ۲: برنامه دمایی و زمانی Real-Time PCR ژن های MMP 2 و GAPDH

مراحل کار	دما	زمان	سیکل
واسرشت	۹۵°C	۲ دقیقه	۱
	۹۵°C	۱۵ ثانیه	
تکثیر	۵۸°C	۲۰ ثانیه	٤۰
	۷۲°C	۳۰ ثانیه	
	۹۵°C	۱۵ ثانیه	
منحنی ذوب	۵۸°C	۱ دقیقه	۱
	۹۵°C	۱۵ ثانیه	

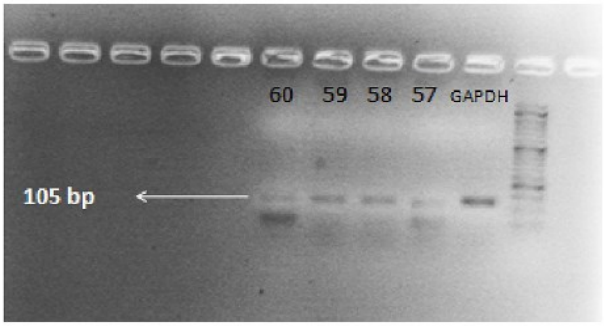
شدند.

ب) ارزیابی بالینی و آزمایشگاهی بیمارن مبتلا به سیروز کبدی: از ۳۳ بیمار مورد بررسی ۲۲ نفر مرد (٦٦/۷۰٪) و ۱۱ نفر زن (۳۳/۳۰٪) بودند. محدوده سنی این افراد بین ٦۰-٤ سال و میانگین سنی ۳٤/۷۰ سال بود. این افراد به دلایلی مانند: دلایل نامشخص یا کریپتوژن (۸٤/۸۵٪)، بیماری‌های خود ایمنی (٦/۰٦٪)، بیماری ویلسون (٦/۰٦٪) و یا سیروز الکلی (۳/۰۳٪) نیاز به پیوند کبد داشتند. همچنین درصد گروه خونی آن‌ها به ترتیب ۳۹/٤۰٪ گروه O^+، ۳۰/۳۰٪ گروه A^+، ۲٤/۲۰٪ گروه B^+، ۳٪ گروه A^- و ۳٪ گروه خونی O^- بود. همچنین گروه کنترل نیز شامل ۱۰ نفر مرد و ۱۰ نفر زن با محدوده سنی ٤۷-۲۰ سال و میانگین سنی ۳۳/٦۰ سال بودند.

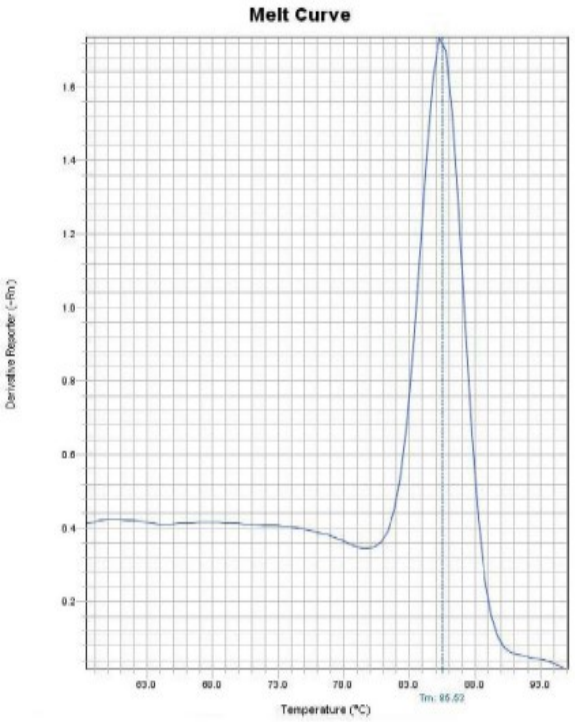
ج) ارزیابی پرایمرهای طراحی شده: از میان ۳ جفت پرایمر مورد استفاده، پرایمر ۱۰۵ جفت بازی بهترین باند را در روش PCR از خود نشان داد که در شکل ۲ در مقایسه با ژن GAPDH آورده شده است. همچنین گرادیانت دمایی نشان داد که دمای ۵۸ درجه سلیسیوس باند بهتری تشکیل می دهد و از آن می‌توان در تکنیک real time استفاده نمود.

د) آزمون Real Time PCR: نتایج نشان داد که پرایمر مورد استفاده از نظر منحنی ذوب فاقد باندهای اضافی بوده است و می‌توان از این پرایمر به منظوربررسی میزان C_T بیان ژن MMP-2 استفاده کرد (شکل ۳). همچنین E2 ژن‌های مورد مطالعه بیش از ۹۵٪ بود.

هـ) بیان ژن MMP-2: براساس آزمون آماری Livak، میانگین ΔC_T میزان بیان ژن MMP-2 در افراد بیمار نسبت به افراد سالم



شکل ۲: گرادیانت دمایی به منظور شناسایی حضور ژن MMP-2.



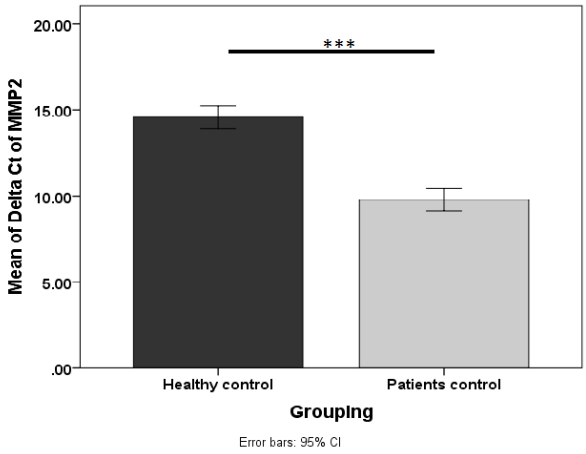
شکل ۳: منحنی ذوب ژن MMP-2.

طبق شکل ٤ به طور معنی‌داری کاهش دارد (ΔC_T با افزایش بیان رابطه معکوس دارد). همچنین میانگین افزایش بیان ژن MMP-2 در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل ۵۰/۵٦ برابر افزایش نشان داد.

بحث

سرطان اولیه کبد که در سطح سلول‌های کبد رخ می‌دهد پس از مدتی در صورت عدم توجه و رسیدگی به موقع، متاستاز داده و به غدد لنفاوی مجاور و در ادامه به ریه و استخوان‌ها راه پیدا خواهد کرد و تومورهای جدیدی را به وجود خواهد آورد. پیش‌آگهی از بروز چنین رویدادی می‌تواند تا حد زیادی از ایجاد تومورهای بدخیم کبدی جلوگیری نماید.

یکی ازعواملی که در پیش آگهی بروز سرطان کبدی نقش دارد افزایش سطح سرمی بیومارکرها است. در این بین بیومارکرهایی مانند MMP-2 نقش مهمی را در تشخیص زود هنگام بیماری ایفا می‌کنند (۱۳). در این پژوهش مشاهده شد که میانگین بیان ژن در گروه بیماران مبتلا به سیروز کبدی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد.



شکل ٤: مقایسه‌ی میزان بیان ژن MMP-2 و ارتباط معنی‌دار آن در دو گروه بیمار و سالم. $p \leq ۰۰۰۱/۰^{***}$.

عبدالطیف (Abdol-latif) و همکاران با مطالعه بر روی ۱۵ فرد مبتلا به فیبروز کبدی واجد RNA ویروس هپاتیت C، ۱۰ فرد مبتلا به سیروز کبدی ناشی از هپاتیت C و در ۱۵ نفر گروه کنترل MMP-2,9 اندازه گیری نمودند. در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری مقدار MMP-2,9 در افراد مبتلا به عفونت هپاتیت C افزایش نشان داد. اما بین حالت فیروز و نکروز رابطه معنی‌داری از لحاظ افزایش مقدار MMP-2,9 مشاهده نشد (١٤).

همچنین آکا (Akca) و همکاران با بررسی افراد مبتلا به سرطان کبد ناشی از هپاتیت C مشاهده نمودند که برخی افراد باوجود منفی بودن حضور آنزیم‌های کبدی در سرم، مقدار MMP-2 و MMP-9 در سرم شان افزایش معنی‌داری داشت (۱۵). لیانگ (Liang) و همکاران با مطالعه مراحل مختلف فیروز کبدی ناشی از ویروس هپاتیت B دریافتند که افراد مبتلا به فیروز کبدی در شکل پیشرفته بیماری سطح سرمی بیشتری از MMP-2 را در سرم خود دارند (١٦).

مولکول MMP-2 قادر به تخریب کلاژن نوع IV است و به وسیله TIMP2 مهار می‌شود. این پروتئین می‌تواند در تومورزایی همچون سرطان معده نقش داشته باشد. مقایسه نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات یاد شده نشان می‌دهد که چه در عفونت‌های ویروسی و چه عوامل غیرویروسی موثر در ایجاد بیماری‌های کبدی، افزایش رو به رشد میزان

MMP-2 نشان دهنده عملکرد غیرطبیعی کبد می‌باشد و سنجش آن می‌تواند پیش آگهی مناسبی برای ممانعت از پیشرفت درگیری کبدی باشد. همچنین نتایج این تحقیق و نتایج مشابه تایید کننده این مساله است که میزان بیان این آنزیم در محل درگیری به مراتب بیشتر از سایر نقاط دیگر کبد می‌باشد.

لوکاژویچ (Łukaszewicz) و همکاران میزان بیومارکرهای ۱۰۸ فرد مبتلا به سرطان معده و گروه کنترل را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که میزان MMP-2 و TIMP-2 در افراد واجد سرطان معده افزایش معنی‌داری از خود نشان می‌دهد. همین پژوهش نشان داد که در سایر بافت‌های سالم افراد مبتلا به سرطان معده، مقدار این بیومارکرها کاهش داشته است (۱۷).

جین (Jin) و همکاران با الگو قرار دادن موش‌های آزمایشگاهی و تزریق تتراکلراید کربن، فیبروز کبدی را به طور مصنوعی در موش‌ها ایجاد نمود. سپس مشاهده گردید که موش‌هایی که این ماده را دریافت کرده بودند نسبت به موش‌های گروه کنترل از میزان MMP-2 بیشتری در سرم خود داشتند (۱۸).

در سیروز کبدی ناشی از مصرف الکل، بافت فیبروز ضمن اینکه جای سلول‌های نرمال کبد را می‌گیرد، موجب تحریک سنتز پروتئین‌های ماتریکس نیز می‌شود. پریستوپا (Prystupa) و همکاران نیز با مطالعه بر روی ۶۰ فرد مبتلا به سیروز کبدی، یک گروه کنترل غیرالکلی و یک گروه الکلی فاقد سیروز کبدی مبادرت به اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های ماتریکسی MMP-2,8,9 نمودند. مقدار بیومارکرهای درون خون این افراد با روش ELISA سنجیده شد. مقدار MMP-2,8,9 در افراد دارای سیروز کبدی به مقدار زیادی افزایش نشان داد. همچنین اختلاف معنی‌داری در مقدار MMP-2 در بین هر سه گروه مشاهده گردید. افزایش مقدار MMP-2,8,9 در افراد الکلی نشان دهنده پیشرفت سیروز کبدی بود. بیشترین حساسیت مربوط به MMP-2 بود. زیرا در تمام گروه‌های واجد سیروز کبدی افزایش از خود نشان داد. MMP-8,9 تنها در افراد واجد سیروز کبدی غیرالکلی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (۱۹).

فونتانلی (Fontanelli) و همکاران نیز با مطالعه بر روی ۲۰ موش بالغ مشاهده نمودند که پس از یک دوره ۱۲۰ روزه خواندن الکل به موش‌های مورد مطالعه، به طور معنی‌داری مقدار MMP-2 و MMP-9 در ناحیه پروستات این موش‌ها افزایش پیدا کرد (۲۰).

به دلیل برخی محدودیت‌ها در گرفتن بیوپسی از بافت کبد، جستجوی مارکرهای غیرهجومی درسیروز کبدی مفید می‌باشد. مادورو (Madro) و همکاران با نمونه‌گیری از ٦٧ فرد الکلی مبتلا به سیروز کبدی مبادرت به بررسی MMP-2 و MMP-9 نمودند. در مقایسه با گروه کنترل (٢٦ نفر) مقدار MMP-2 افزایش معنی‌داری از خود نشان داد (۲۱).

مقایسه نتایج این مطالعه با سایر پژوهش‌ها، نشان داد که فرایند رو به افزایش درگیری کبد که با التهاب شروع و به سرطان ختم می‌شود، همراه با افزایش بیان MMP-2 می‌باشد. در اصل ژن این بیومارکرها به وسیله عفونت ویروسی و عوامل محرک دیگر غیرویروسی مانند مصرف الکل تحریک شده و به همین دلیل موجب تسریع فرایند تبدیل سیروز کبدی به سرطان کبدی (هپاتوسلولار کارسینوما) می‌شود.

همانطور که در این تحقیق نیز مشاهده گردید، آمارها نشان می‌دهند که سهم این افزایش بیان در مردها بیشتر از زن‌ها می باشد. این مساله به این دلیل اهمیت پیدا می‌کند که طبق آمار موجود در سال ۲۰۱۵ بیماری هپاتیت (خصوصا هپاتیت B و C) مسئول مرگ ۱/۳٤ میلیون نفر بوده است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق بر افزایش معنی‌دار بیان ژن MMP-2 در افراد مبتلا به درگیری کبدی با علت غیرویروسی دلالت داشت. بنابراین با توجه به اینکه در بسیاری از مبتلایان به بیماری‌های پیشرفته مزمن کبدی دارو درمانی و پیوند کبد به طور کامل در دسترس و ارزان نمی‌باشند، از این رو پیش‌آگهی از بروز چنین رویدادی با تعیین سطح میزان بیان ژن MMP-2 می‌تواند از افزایش روزافزون تومورهای بدخیم کبدی جلوگیری نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به دلیل همکاری در اعضا دانشگاه علوم پزشکی شیراز و حوزه معاونت تحقیقات و این پژوهش کمال تشکر را دارند.

References

1. Mandhare MN, Patil PH, Jagdale DM, KadamVJ. Targeting matrix metalloproteinases: An important strategy in cancer therapeutics. Int J Pharm Sci. 2012; 12: 27-39.
2. Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2012; 15: 201-212.
3. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q) SARs. Bioorg Med Chem. 2007; 15: 2223-2268.
4. Chung Tk, Moon SK. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 by hepatitis B virus infection in liver cells. Arch Biochem Biophys. 2002; 408: 147-154.
5. Riley GP. (2005). Domain structure of matrix metalloproteinase (MMPs) and ADAMTS. Retrieved from cambridge university press. Information website: https://www.researchgate.net/figure/Domain-structure-of-matrix-metalloproteinases-MMPs-and-ADAMTS-a-MMPs-The-archetypal_fig2_7938800.
6. Adabi Z, Mohsen Ziaei SA, Imani M, Samzadeh M, Narouie B, Jamaldini SH, Afshari M, Safavi M, Roshandel MR, Hasanzad M. Genetic polymorphism of MMP2 gene and susceptibility to prostate cancer. Arch Med Res. 2015; 46(7): 546-550.
7. Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J, Okada Y. Matrix metalloproteinases a disintegrin and metalloproteinasesand a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. Pathol Int. 2010; 60(7): 477-496.
8. Ebadi M, Yaghobi R, Geramizadeh B, Bahmani MK, Malek-Hosseini SA, Nemayandeh M. Prevalence of HCV and HGV infections in Iranian liver transplant recipients. Transplant Proc. 2011; 43(2): 618-620.
9. Janfeshan S, Yaghobi R, Eidi A, Karimi MH, Geramizadeh B, Malekhosseini SA, Kafilzadeh F. Expression profile of interferon regulatory factor 1 in chronic hepatitis B virus-infected liver transplant patient. Exp Clin Transplant. 2017; 15(6): 669-675.
10. Zare A, Karimi MH, Rashki A, Geramizadeh B, Afshari A, Miri HR, Yaghobi R. Association of the interleukin-27 gene expression and hepatitis B virus infection in liver transplanted patients. Exp Clin Transplant. 2017; 15(5): 554-560

11. Yang HK, Jeong KC, Kim YK, Jung ST. Role of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP-9 in soft tissue sarcoma. Clin Orthop Surg. 2014; 6(4): 443-454.

12. Afshari A, Yaghobi R, Karimi MH, Darbouy M, Azarpira N, Geramizadeh B, Malek-Hosseini SA, Nikeghbalian S. IL-17 mRNA expression and cytomegalovirus infection in liver transplant patients. Exp Clin Transplant. 2015; 13(1): 83-89.

13. Chen G, Qin Dang YW, Yang J. The prospective role of matrix metalloproteinase-2/9 and transforming growth factor beta 1 in accelerating the progression of hepatocellular carcinoma. Translat Cancer Res. 2017; 6(1): 229-231.

14. Abdel-Latif MS. Plasma Levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tumor necrosis factor-α in chronic hepatitis C virus patients. Open Microbiol J. 2015; 9:136-140.

15. Akca G, Tuncbilek S, Sepici-Dincel A. Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and total antioxidant status of patients with asymptomatic hepatitis C virus infection. Lett Appl Microbiol. 2013; 57: 436-442.

16. Liang B, Li Y, Zhao A, Xie F, Guo Z. Clinical utility of serum matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 concentrations in the assessment of liver fibrosis due to chronic hepatitis B. J Int Med Res. 2012; 40: 631-639.

17. Łukaszewicz-Zając M, Mroczko B, Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Gryko M, Kemona A, Kędra B, Szmitkowski M. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and their tissue inhibitor 2 (TIMP-2) in gastric cancer patients. Adv Med Sci. 2013; 58(2): 235-243.

18. Jin Z, Sun R, Wei H, Gao X, Chen Y, Tian Z. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: involvement of natural killer T cells. Hepatol. 2011; 53(1): 219-229.

19. Prystupa A, Boguszewska-Czubara A, Bojarska-Junak A, Toruń-Jurkowska A, Roliński J, Załuska W. Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, eastern Poland. Ann Agric Environ Med. 2015; 22(2): 325-328.

20. Fioruci-Fontanelli BA, Chuffa LGA, Mendes LO, Pinheiro PFF, Delella FK, Kurokawa CS, Felisbino SL, Martinez FE. MMP-2 and MMP-9 activities and TIMP-1 and TIMP-2 expression in the prostatic tissue of two ethanol-preferring rat models. Anal Cell Pathol. 2015; 1: 1-7.

21. Madro A, Czechowska G, Slomka M, Celinski K, Szymonik-Lesiuk S, Kurzepa J. The decrease of serum MMP-2 activity corresponds to alcoholic cirrhosis stage. Alcohol. 2012; 46(2): 155-157.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 1, April 2019

Original Article

Increase in the level of MMP-2 gene expression in liver cirrhotic patients without chronic viral hepatitis B and C infections

Abbasali Rezaeian[1], RaminYaghobi[2], Bita Geramizadeh[3]

[1]Ph.D. student, Department of Microbiology, College of Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran & Department of Microbiology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
[2]Associate Professor, Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[3]Professor, Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Liver cirrhosis is one of the most important causes of the need for liver transplantation. Several factors such as viral infections, autoimmune diseases, taking medication, hereditary diseases, genetic background, and also alcohol consumption are the causes of liver cirrhosis. The aim of this study was to optimize an accurate method in order to determine the rate of MMP-2 gene expression as a criterion in the evaluation of development and exacerbation of liver cirrhosis.

Materials & Methods: In this study 33 of 258 liver cirrhotic patients after approving the lack of presence of viral hepatitis C and B infections were evaluated with 20 healthy people as control. The rate of MMP-2 gene mRNA expression was appraised and optimized using Real-time PCR technique. Afterward, two patient and control groups were compared in terms of the MMP-2 gene expression.

Results: The evaluation of mRNA expression disclosed significant increase of MMP-2 gene in patients group in comparison to control group.

Conclusion: Outcomes of the research highlighted that non-viral agents of chronic liver diseases could have an influence on increasing the level of MMP-2 gene expression and liver cirrhosis exacerbation; however, to confirm the above-mentioned results further studies are required.

Keywords: Matrix metalloproteinase -2, Cirrhosis, Liver transplantation.

Correspondence to: Ramin Yaghobi

Tel: +98 7136473954

E-mail: rayaviro@yahoo.com

Journal of Microbial World 2019, 12(1): 6-14.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.