

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

**MIKROSATELITINIO NESTABILUMO IR MATRIKSO
METALOPROTEINAZIŲ POLIMORFIZMO ANALIZĖ
SERGANČIŲJŲ VĖŽIU NAVIKUOSE IR KRAUJYJE**

Magistrantė AGNĖ GIRULYTĖ _____
(parašas)

Darbo vadovai

H.P. J. Didžiapetrienė _____
(parašas)

J.m.d. D.Stančiūtė _____
(parašas)

VU MF dekanė
Hab.dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

TURINYS

Santrumpos	3
1. ĮVADAS	4
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai	5
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
2.1. Sekų įvairovė žmogaus genome	6
2.1.1 Mikrosatelitai	7
2.1.2. Mikrosatelitinis nestabilumas ir jo įtaka navikui augti ir metastazuoti	8
2.2. Matrikso metaloproteinazės	11
2.2.1. Matrikso metaloproteinazių įtaka navikui augti ir metastazuoti.....	14
2.2.2. Matrikso metaloproteinazės koduojančių genų mutacijos ir vėžys	16
3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS	19
3.1. Tiriamoji medžiaga	19
3.2. Darbe naudojamos medžiagos ir tirpalai	19
3.3. Tyrimo metodai.....	20
3.3.1. Genominės DNR išskyrimas iš kraujo.....	20
3.3.2. Genominės DNR išskyrimas iš naviko	21
3.3.3. DNR koncentracijos ir grynumo nustatymas.....	22
3.3.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR).....	23
3.3.4.1. PGR mikrosatelitinių pasikartojimų analizei	23
3.3.4.2. PGR MMP polimorfizmų analizei	28
3.3.5. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodas	30
3.4. Statistinė analizė	32
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
4.1. Mikrosatelitinės sekos CYAR04 analizė	36
4.2. Mikrosatelitinės sekos D5S818 analizė	38
4.3. Mikrosatelitinės sekos D13S317 analizė	39
4.4. Mikrosatelitinės sekos I-FABP analizė.....	39
4.5. Mikrosatelitinės sekos TH01 analizė.....	39
4.6. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo analizė.....	42
4.7. MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo analizė	45
5. IŠVADOS	49
SUMMARY	50
LITERATŪROS SĄRAŠAS	51
PADĖKA	57

Santrumpos:

APC – genas slopiklis;

BCL – apoptozę slopinantis baltymas, nustatytas B ląstelių limfomoje;

BM – bazinė membrana;

CYAR04 – citochromo P450 aromatazės genas;

EGFR – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus genas;

MYC – transkripcijos faktoriaus genas;

Ras – onkogenas;

FABP – riebiašias rūgštis sujungiančio baltymo genas;

FHIT – trapi histidino triada;

GPI inkaras – glikozilfosfatidilinozitolinis inkaras;

Her-2/neu —EGFR tipo receptoriaus ekstraląstelinis domenas;

LINE – ilgos išsibarsčiusios sekos;

LTR – ilgos galinės sekos;

MMP – matrikso metaloproteinazė;

MMP AI – matrikso metaloproteinazių audininiai inhibitoriai;

MT-MMP – membraninio tipo matrikso metaloproteinazė;

p16 – genas slopiklis;

p53 – genas slopiklis;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

PTEN – fosfatazės ir tensino homologo genas;

RASSF1A – ras asociacijos domeno A1 šeimos genas;

RB – retinoblastomos baltymo genas;

SINE – trumpos išsibarsčiusios sekos;

TH01 – tirozino hidroksilazės 1 genas.

1. ĮVADAS

Onkologines ligas lemia įvairaus pobūdžio molekuliniai pokyčiai (genų mutacijos, genų raiška, baltymų aktyvumas ir baltymų tarpusavio sąveikos), kuriuos galima nustatyti molekulių lygmenyje ir panaudoti kaip molekulinis vėžio žymenis. Vėžio slopiklių (pvz., p53, RB, FHIT, p16, RASSF1A, APC ir PTEN) ir onkogenų (pvz., EGFR, MYC, Ras, Her-2/neu, ciklinas D1 ir BCL-2) mutacijos - vieni svarbiausių pažeidimų, prisidedančių prie vėžio atsiradimo ir vystymosi mechanizmo. Sparti genominių ir proteominių technologijų raida leidžia sukurti dar naujesnės kartos molekulinis vėžio žymenis, kurie yra atrankūs vėžiui. Todėl plėtojami tyrimai, kuriuose specifiniai žymenys naudojami ligos eigai sekti bei ligos prognozei vertinti [1].

Pastaraisiais metais daugėja tyrimų įrodančių, kad heterozigotriškumo praradimo ir mikrosatelitinių sekų nestabilumo tyrimai gali būti taikomi vertinant chemoterapinio gydymo efektyvumą bei ligos prognozę. Pavyzdžiui, 5 chromosomoje esančių D5S2055 ir D5S818 pasikartojančių sekų alelių praradimas ar papildomas atsiradimas siejami su ankstyvomis šlapimo pūslės vėžio stadijomis. Be to, šie chromosominiai persitvarkymai turi įtakos šalia esančių genų, susijusių su greitesniu ligos progresavimu, raiškai. [2].

Matrikso metaloproteinazės (MMP) – tai šeima fermentų, galinčių skaidyti ir modifikuoti įvairius ekstraląstelinio užpildo ir bazinės membranos (BM) komponentus, tokius kaip kolagenas, lamininas, fibronektinas, proteoglikanai. Metalo jonas, esantis šių fermentų katalitiniame domene, yra būtinas MMP fermentiniam aktyvumui. Be šios pagrindinės funkcijos, šiuo metu jau žinoma, kad šių fermentų proteolitiniais taikiniai yra ir kitos proteinazės, proteinazių slopikliai, krešėjimo, augimo veiksniai, augimo veiksnius surišantys baltymai, ląstelių paviršiniai receptoriai ir adhezijos molekulės [3].

Žmogaus genome buvo identifikuota daugiau kaip 4 milijonai vieno nukleotido polimorfizmo atvejų. Susiejus tam tikros genomo dalies pokyčius su liga ar polinkiu ja sirgti, galima identifikuoti genetinį žymenį. Tokiais genetiniais žymenimis bandoma panaudoti vieno nukleotido polimorfizmus. Molekuliniai genetiniai tyrimai rodo, kad MMP genų promotorinėse dalyse randami vieno nukleotido polimorfizmai turi reikšmės šių fermentų raiškos padidėjimui ir galėtų padėti įvertinti navikinio proceso plitimą [4].

Klinikinėje diagnostikoje ir gydyme vis plačiau taikomi ląstelės biologijos ir molekulinės biologijos metodai, kurie įgalina tiksliau įvertinti pakitimus biologiniuose audiniuose. Naujausių ląstelės ir molekulinės biologijos mokslų pasiekimų pritaikymas

praktikoje, siekiant sukurti žymenų sistemas, padedančias tiksliau diagnozuoti bei įvertinti ligos eigą bei taikyti individualizuotą gydymą yra labai aktualus ir perspektyvus.

Šis darbas yra skirtas mikrosatelitinio nestabilumo ir MMP polimorfizmo tyrimams sergant šlapimo pūslės vėžiu, siekiant ateityje šiuos žymenis panaudoti vertinant ligos prognozę.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Ir mikrosatelitinis nestabilumas, ir matrikso metaloproteinazės gali būti naudojami navikinės ligos eigai sekti ir prognozei vertinti. Atliekant bakalauro darbą, įsisavinti DNR išskyrimo, polimerazės grandininės reakcijos (PGR) ir restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodai. Magistro darbas yra ankstesniojo darbo tęsinys. Šio darbo tikslas – nustatyti mikrosatelitinio nestabilumo ir MMP polimorfizmų skirtumus sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose ir kraujyje.

Siekiant šio tikslo buvo keliami tokie uždaviniai:

- nustatyti mikrosatelitinių pasikartojimų CYAR04, D5S818, D13S317, I-FABP ir TH01 pokyčius sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose ir kraujyje;
- įvertinti ligos remisijos trukmės priklausomybę nuo mikrosatelitinio nestabilumo, ligos stadijos, naviko diferenciacijos laipsnio;
- nustatyti želatinazės B (MMP-9) geno promotorinėje dalyje galimą vieno nukleotido pakaitą (-1562 C/T) sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose ir kraujyje, ir įvertinti polimorfizmų variantus priklausomai nuo diferenciacijos laipsnio;
- nustatyti stromelizino-1 (MMP-3) geno promotorinėje dalyje galimą vieno nukleotido pakaitą (-1171 5A/6A) sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose ir kraujyje, ir įvertinti polimorfizmų variantus priklausomai nuo diferenciacijos laipsnio.

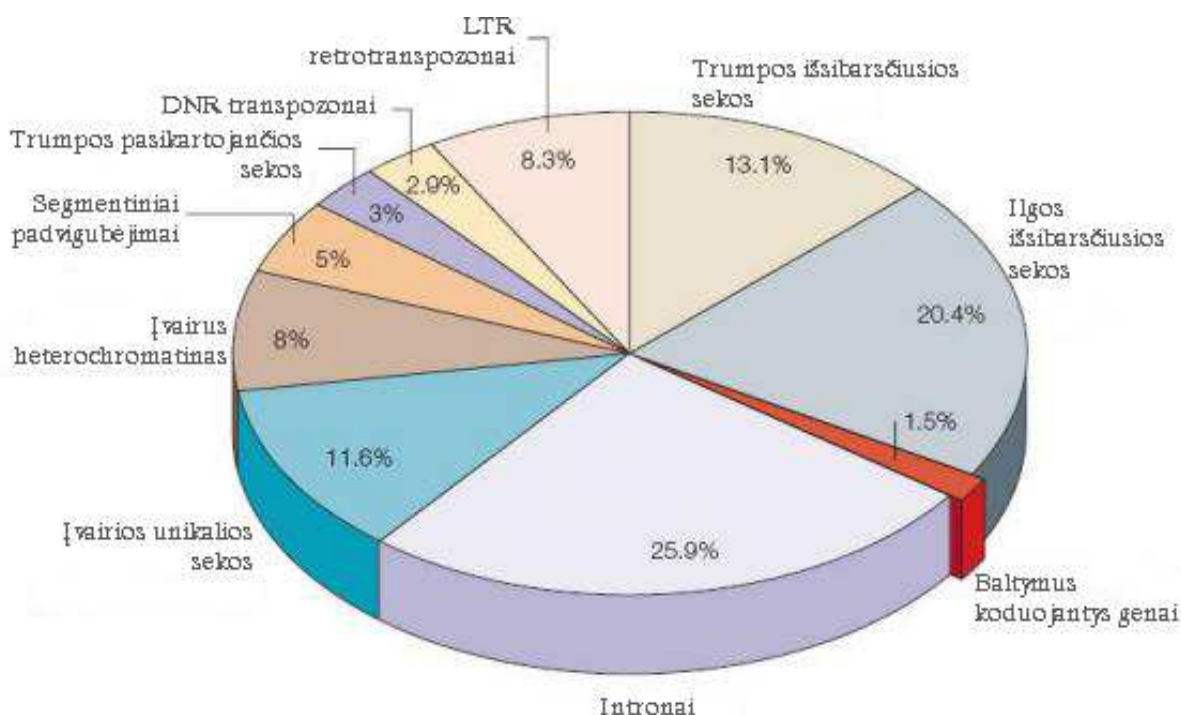
2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Sekų įvairovė žmogaus genome

Žmogaus genomą sudaro apie 25000 genų, tai yra apie trys milijardai bazių porų. Jie išsidėstę kiekvienoje ląstelėje esančiame 46 chromosomų rinkinyje, kurių pusė paveldima iš motinos, kita pusė iš tėvo. Maža dalis DNR, 16500 bazių porų, kurios sudaro apytiksliai 0,0003% viso geno, paveldima tik iš motinos, mitochondrijų geno sudėtyje[6].

Genomą sudaro baltymus koduojantys genai, intronai, įvairios unikalios sekos, heterochromatinas, segmentiniai padvigubėjimai, trumpos pasikartojančios sekos, DNR transpozonai, retrovirus panašūs elementai, turintys ilgas galines sekas, trumpos ir ilgos išsibarsčiusios sekos (1 pav.).

Pasaulinė praktika rodo, kad vėžio diagnostikoje vis labiau taikomi molekuliniai genetiniai tyrimų metodai. Jau neabejojama molekulinės diagnostikos onkologijoje aktualumu, pateikiami vis nauji duomenys apie sindromus ir genus, kurie svarbūs paveldimam vėžiui vystytis.



1 pav. Genomo sudėtis [5]

Genomo analizei dažniausiai naudojamos kelių tipų DNR sekos – satelitai, minisatelitai, mikrosatelitai, ilgos ir trumpos išsibarsčiusios sekos. Satelitinė DNR yra sudaryta iš labai didelių paeiliui pasikartojančių DNR sekų, kurių atskiro elemento nukleotidų skaičius įvairuoja nuo kelių nukleotidų iki pakankamai ilgos sekos. Satelitinė DNR sudaro genomo heterochromatininių sričių pagrindą.

Minisatelitai tai yra apie 15 bazių porų pasikartojimai, aptinkami telomerinėse chromosomų dalyse ar šalia jų. Šios sekos sutinkamos stuburiniuose organizmuose, vabzdžiuose, augaluose, grybuose. Jos yra variabilios, todėl dar vadinamos VNTR (*angl.* Variable Number Tandem Repeats).

Be minisatelitų, išskiriamos mikrosatelitinės DNR sekos arba trumpi tandeminiai pasikartojimai (*angl.* STR – Short Tandem Repeat). Tai trumpi, dažniausiai 1-6 bp pasikartojimai, kurių dydis svyruoja apie 100 bazių porų. Mikrosatelitai yra labai polimorfiški populiacijose ir randami visuose eukariotų genomuose [6].

SINES (*angl.* Short Interspersed Nucleotide Elements) tai trumpos išsibarsčiusios sekos, sudarytos iš 100-400 bp. Alu pasikartojimai tai svarbiausia trumpoms išsibarsčiusioms sekoms priklausanti sekų šeima, savo struktūroje turinti AluI restrikcijos endonukleazės kirpimo taikinį (AG^{CT}). Šie pasikartojimai žmogaus genome pasitaiko dažniau nei kas trys tukstančiai bazių porų.

LINES (*angl.* Long Interspersed Nucleotide Elements) - ilgos išsibarsčiusios sekos, išsidėsčiusios AT turtingose euchromatininėse srityse. Tai patys svarbiausi žmogaus genomo judrieji elementai, kurie gali koduoti produktus užtikrinančius retrotranspoziciją.

Žinduolių judriųjų genomo elementų klasei priklauso į retrovirusus panašūs elementai turintys ilgas galines sekas (*angl.* LTR retrotransposons), kuriose yra transkripcijos valdymo elementai [7,8].

2.1.1 Mikrosatelitai

Kiekvienas individas turi unikalų mikrosatelitų rinkinį, kurio pusę perduoda savo palikuonims pagal Mendelio dėsnis [9]. Mikrosatelitinės DNR sekos tiriamos vertinant genetines paveldimas ligas, chromosomų lūžius saitus bei genetinius pažeidimus navikiniuose audiniuose [10].

Žmogaus genome yra apie 40 000 mikrosatelitinių lokusų, kurie sudaro apie 3% visos DNR. Bendras mikrosatelitinių pasikartojimų tankis yra panašus, tačiau įvairuoja

chromosomose [11]. Mikrosatelitus galima suskirstyti į mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ir heksanukleotidinius pasikartojimus, pagal pasikartojančio vieneto dydį. Mikrosatelitinių pasikartojimų dažnis mažėja didėjant pasikartojančio vieneto dydžiui pvz.: penta- ir heksanukleotidiniai pasikartojimai yra sąlyginai reti [12]. Mikrosatelitai yra pasiskirstę po visą genomą koduojančiuose ir nekoduojančiuose regionuose, tačiau jų tiksli funkcija nėra aiški [11,12].

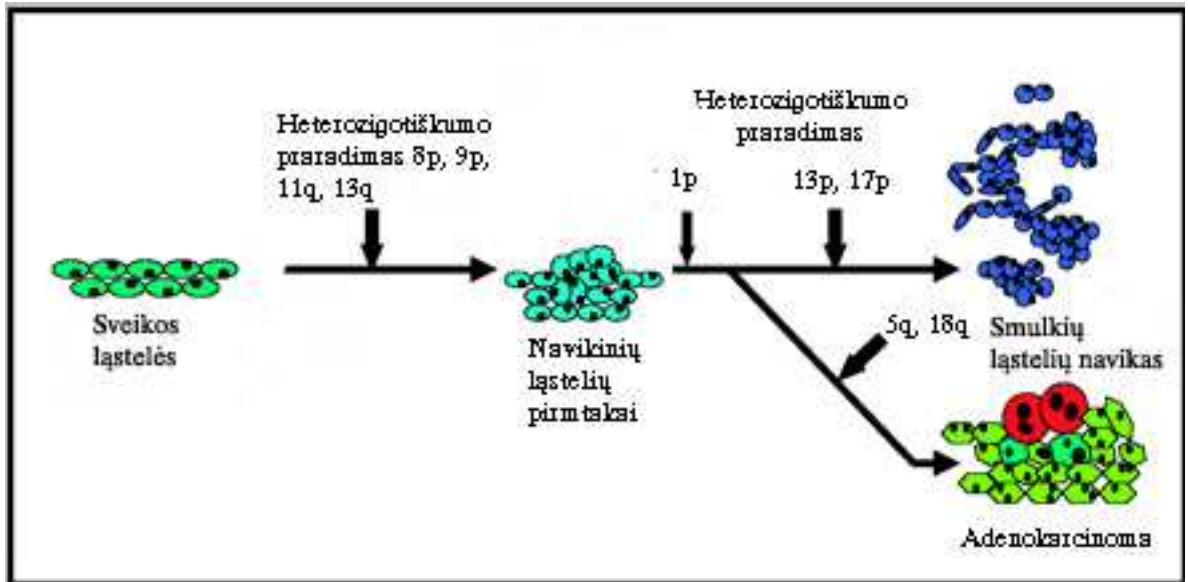
Mikrosatelitų struktūrą galima suskirstyti į paprastus ir sudėtinius pasikartojimus. Paprasti mikrosatelitai yra sudaryti iš nepertrauktų pasikartojimų, taip pat gali turėti skirtingų alelių su vieno nukleotido intarpu arba iškrita viename iš pasikartojimų. Sudėtiniai mikrosatelitai sudaryti iš pertrauktų arba besiskiriančių seka ar dydžiu pasikartojimų [13].

Labai polimorfiškų (turinčių daug alelių) mikrosatelitinių sekų analizė naudojama mikrosatelitinio nestabilumo ir heterozigotiškumo praradimo tyrimams. Šie reiškiniai yra neatsiejami nuo navikinio proceso.

2.1.2. Mikrosatelitinis nestabilumas ir jo įtaka navikui augti ir metastazuoti

Somatinis pažeidimas mikrosatelitinėse DNR sekose atsiradęs dėl vieno ar daugiau tandemiškai pasikartojančių sekų iškritos arba intarpo yra vadinamas mikrosatelitiniu nestabilumu [14]. Toks pažeidimas gali būti identifiкуotas tik tuo atveju, jeigu pasikeitimas įvyko daugelyje ląstelių, o tai jau yra navikinio proceso rodiklis. Molekulinis mechanizmas, kurio dėka atsiranda mutacijos mikrosatelitiniuose lokusuose, yra poreplikacinio klaidų ištaisymo mechanizmo sutrikimas. Manoma, kad klaidos atsiranda dėl DNR polimerazės „praslydimo“ [8].

Heterozigotiškumo praradimas, tai procesas, kurio metu netenkama vieno iš paveldėtų alelių esančių heterozigotinėje būklėje. Vėžio atveju tai paprastai nurodo, kad prarastame regione buvo vėžio slopiklis. Naviką slopinantys genai lėtina ląstelių dalijimąsi, taisy DNR klaidas ir dalyvauja programuotoje ląstelių žūtyje [15]. Heterozigotiškumo praradimo sąvoka paremta hipoteze, kad vėžio slopiklių „išjungimui“ būdinga dviejų įvykių kinetika t.y. reikalingos dvi iš eilės įvykstančios mutacijos (2 pav.). Remiantis šia teorija abu vėžio slopiklio aleliai turi būti inaktyvinti, tam kad prasidėtų navikinis procesas. Kitoje chromosomoje likęs vėžio supresijos genas dažniausiai nuslopinamas taškinės mutacijos [16].



2 pav. Heterozigotiškumo praradimo įtaka naviko atsiradimui ir vystymuisi [1]

Daug heterozigotiškumo praradimo atvejų identifikuojama vėžiu sergančių asmenų DNR netoli mikrosatelitinių pasikartojimų [10].

1 lentelėje pateikti dažnai tiriama mikrosatelitiniai pasikartojimai ir sergančiųjų vėžiu lokalizacijos, kuriose stebėtas mikrosatelitinis nestabilumas ir heterozigotiškumo praradimas.

1 lentelė. Mikrosatelitiniai pasikartojimai, jų vieta chromosomose, PGR produkto ilgis ir ligos lokalizacija

Mikrosatelitiniai pasikartojimai	Vieta	PGR produkto ilgis	Liga
CYAR04	15 q21.1	173-201 bp	Gimdos kaklelio vėžys[17];
D5S818	5 q21-q31	108-179 bp	Gerklų vėžys [22]; Krūties vėžys[21]; Prostatos vėžys[20]; Plaučių vėžys [2]; Šlapimo pūslės vėžys[19];
D13S317	13 q22-q31	157-210 bp	Gerklų vėžys [22]; Krūties vėžys[21]; Kepenų vėžys [57]; Sėklidžių vėžys [24]; Plaučių vėžys [2];
TH01	11 p15.5-p15	171-215 bp	Prostatos vėžys [20]; Krūties vėžys [21];
D18S58	18q22.3	144 – 160 bp	Šlapimo pūslės vėžys [27]; Tiesiosios žarnos vėžys [26].

CYAR04. Tai tetranukleotidinis AAAT žymuo, esantis citochromo P450 aromatazės gene 15 chromosomoje, q21.1 regione, 4 egzone. Tai citochromo P450 forma, kuri dalyvauja estrogenų biosintezėje. Pasikartojimų skaičius svyruoja nuo 5 iki 12, o PGR produkto dydis nuo 173 bp iki 201bp. Šio žymens heterozigotiškumo praradimas navike identifikuotas sergančiosioms gimdos kaklelio vėžiu [17].

D5S818. Tai keturių nukleotidų AGAT žymuo, kuris lokalizuotas 5 chromosomos ilgajame petyje, q21-q31 regione. Pasikartojimų skaičius svyruoja nuo 6 iki 16. Priklausomai nuo pasikartojimų skaičiaus, PGR produkto dydis kinta nuo 108 bp iki 179 bp [18]. D5S818 heterozigotiškumo praradimas siejamas su ankstyvosiomis šlapimo pūslės vėžio stadijomis [19]. D5S818 žymens heterozigotiškumo praradimas navikiniame audinyje stebėtas sergantiems gerklų [2], krūties [21], plaučių [22], šlapimo pūslės[19] ir priešinės liaukos [20] vėžiu, taip pat tiesiosios žarnos navikinių ląstelių linijose [23].

D13S317. Tai keturių TATC nukleotidų pasikartojimai esantys 13 chromosomoje, q22-q31 regione. Pasikartojimų skaičius svyruoja nuo 5 iki 16, o PGR produkto - nuo 157 bp iki 201 bp. Tačiau dažniausiai pasitaiko 13 pasikartojimų turintis alelis, kurio PGR produkto

dydis 198 bp [18]. D13S317 mikrosatelitinio žymens heterozigotiškumo praradimas nustatytas sergantiems gerklų [2], krūties [21], plaučių [22], kepenų [57] ir sėklidžių [24] vėžiu bei tiesiosios žarnos ir priešinės liaukos navikinių ląstelių linijose [23].

D18S58. Tai sudėtinio pasikartojimo mikrosatelitinis žymuo, kurio seka yra (GC)₅GA(CA)₁₇, išsidėstęs 18 chromosomos ilgajame petyje q22.3 regione. PGR produkto dydis yra nuo 144 bp iki 160 bp. D18S58 žymens mikrosatelitinis nestabilumas stebėtas sergantiems šlapimo pūslės [27] ir tiesiosios žarnos vėžiu [26].

I-FABP. Tai trijų nukleotidų TTA žymuo, kuris prasideda žarnų riebiųjų rūgščių sujungiančio baltymo gene 4 q28-q31, ties 3502 nukleotidu B introne. Pasikartojimų skaičius įvairuoja nuo 8 iki 14. Dažniausias pasikartojimų skaičius yra 13, o PGR produkto dydis 113bp [18].

TH01. Tai tetranukleotidiniai TCAT pasikartojimai, esantys tirozino hidroksilazės gene 11 chromosomoje p15.5-p15 regione, pirmame introne. Pasikartojimai prasideda nuo 1170 nukleotido, dažniausiai kartojasi 9 kartus (PGR produkto dydis 195 bp), tačiau gali įvairuoti nuo 3 iki 14 kartų (PGR produkto dydis nuo 171 bp iki 215 bp) [18]. TH01 sekos heterozigotiškumo praradimas stebėtas sergantiems krūties [14,21] ir priešinės liaukos [20]. Masters J.R ir bendraautorai atliko tyrimus su 253 ląstelių kultūrų linijomis, ir parodė, kad TH01 heterozigotiškumo praradimas navikinių ląstelių linijose yra 30% dažnesnis, lyginant su sveikų ląstelių linija [28].

TPOX. Tai teranukleotidiniai AATG pasikartojimai, esantys skydliaukės peroksidazės gene, 2 chromosomoje, p25.3 regione, 10 introne. Pasikartojimų skaičius svyruoja nuo 4 iki 16 pasikartojimų, o PGR produkto dydis nuo 216 bp iki 264 bp. Dažniausiai pasitaiko 11 pasikartojimų turintis alelis, kurio PGR produkto ilgis 244 bp [18].

2.2. Matrikso metaloproteinazės

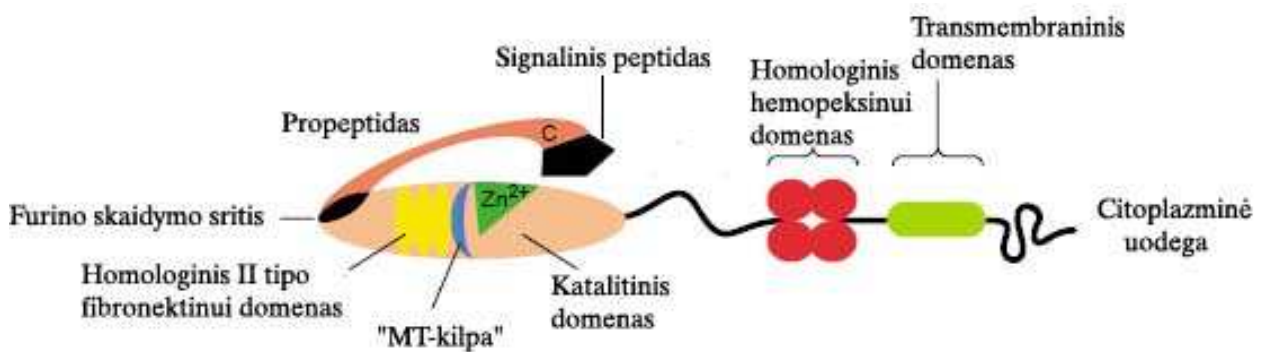
Matrikso metaloproteinazės (MMP) - tai šeima nuo cinko priklausomų proteolitinių fermentų, galinčių skaidyti ekstraląstelinio užpildo komponentus. Pagal savo domenų struktūrą, sekų panašumą bei substratinį specifiškumą MMP yra skirstomos į šešias grupes (2 lent.) [29]. MMP-4, MMP-5 ir MMP-6 buvo išbrauktos iš sąrašo, nes detalesni tyrimai parodė, kad tokių genų produktų išvis nėra [3].

2 lentelė. Matrikso metaloproteinazių (MMP) klasifikacija [29]

MMP grupės	Fermentas	
Kolagenazės	Kolagenazė-1	MMP-1
	Kolagenazė-2	MMP-8
	Kolagenazė-3	MMP-13
	Kolagenazė-4	MMP-18
Želatinazės	Želatinazė A	MMP-2
	Želatinazė B	MMP-9
Stromelizinai	Stromelizinas-1	MMP-3
	Stromelizinas-2	MMP-10
	Stromelizinas-3	MMP-11
Matrilizinai	Matrilizinas	MMP-7
	Matrilizinas-2	MMP-26
Membraninio tipo MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MP4-MMP MT5-MMP MT6-MMP		MMP-14
		MMP-15
		MMP-16
		MMP-17
		MMP-24
	Leukolizinas	MMP-25
Kitos MMP (neklasifikuotos)	Metaloestazė	MMP-12
		MMP-19
	Enamelizinas	MMP-20
		MMP-21
		MMP-22
		MMP-23
		MMP-27
	Epilizinas	MMP-28

Kiekviena MMP turi savo substratą. Skirtingų MMP substratinis specifiškumas nustatytas tyrimais *in vitro* pagal jų sugebėjimą degraduoti skirtingus ELM komponentus. MMP substratinis atpažinimas gali būti reguliuojamas papildomų domenų, esančių prie katalitinės srities. Tai būtų hemopeksino domenas įvairiose MMP arba homologinio II tipo fibronektinui domeno pasikartojimai želatinazėse. Šie domenai valdo proteolizės procesą prisijungdami prie specifinių substratų [30].

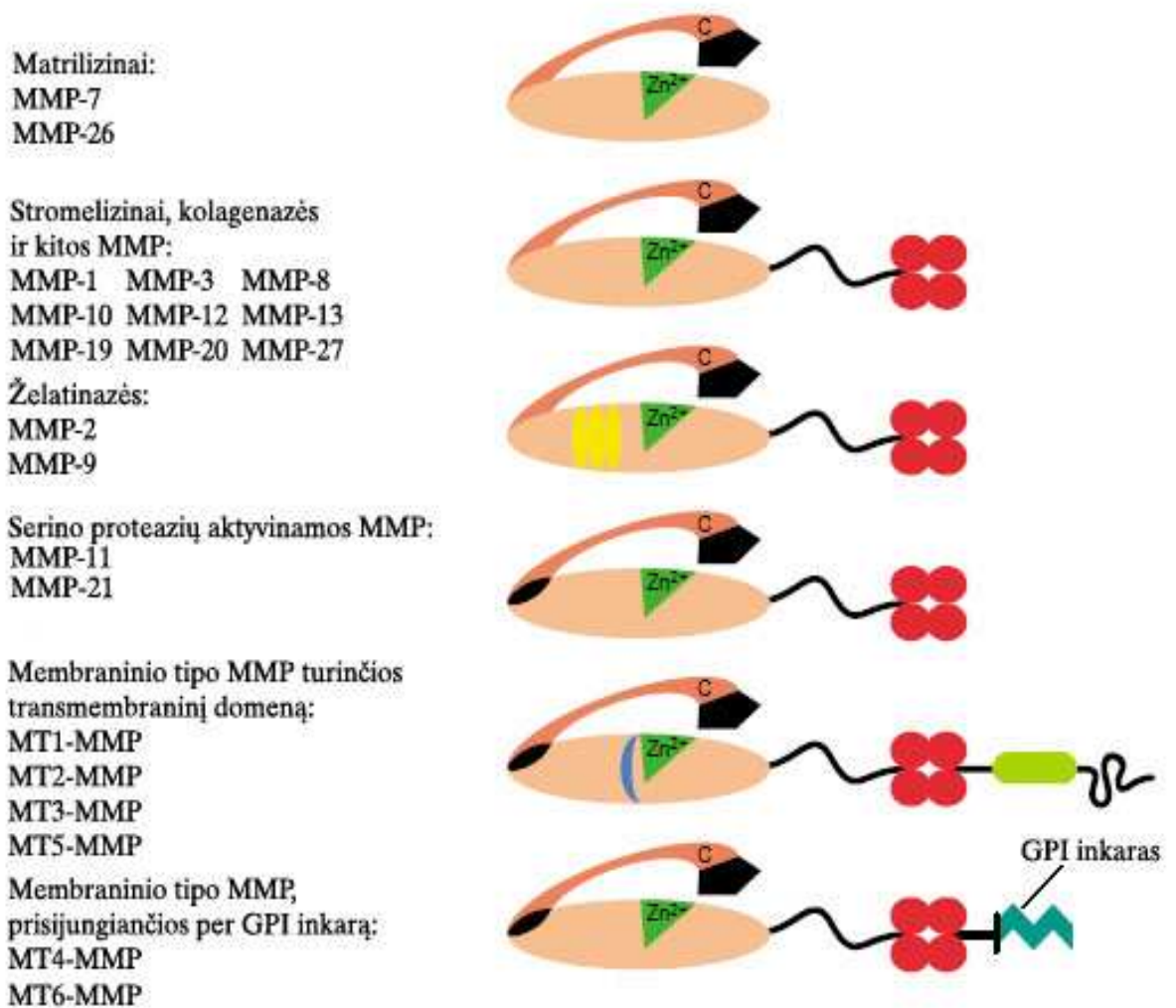
Matrikso metaloproteinazės yra sekretuojamos propeptidų (zimogenu) pavidalu, kurių sąlygoja 77 – 87 aminorūgščių propeptidas, esantis N gale. MMP charakteringą pirminę struktūrą sudaro signalinis peptidas, propeptidas ir katalitinis domenas (3 pav.). Katalitiniame domene esantis cinko jonas, būtinas MMP fermentiniam aktyvumui. MMP tampa aktyvi, kai nutrūksta jungtis tarp cinko jono ir cisteino. Keletas MMP yra išimtis šiai taisyklei. Tai MMP-11, MMP-28 ir visos transmembraninės MMP (MT1-MT6-MMP), kurios aktyvinamos serino proteazių per furino skaidymo sritį [31].



3 pav. Matrikso metaloproteinazių (MMP) struktūra [31]

Branduolinio magnetinio rezonanso (BMR) ir kristalografijos metodais nustatytos kai kurių MMP trimatės struktūros. Propeptidas susideda iš trijų α spiralių ir jas jungiančių kilpų. Katalitinis domenas sudarytas iš penkių β klosčių, trijų α spiralių ir jungiančiųjų kilpų [29].

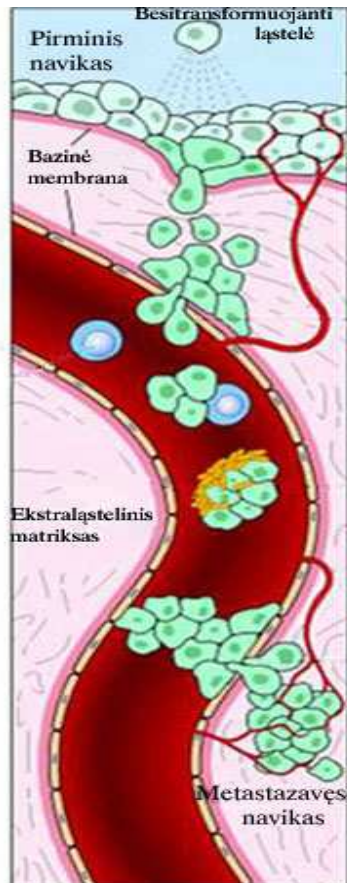
Priklausomai nuo fermentų grupės, MMP papildomai gali turėti homologinius domenus hemopeksinui ir II tipo fibronectinui, transmembraninį domeną, glikozilfosfatidilinozitolinį (GPI) inkarą ar citoplazminę uodegą (4 pav.) [31,32].



4 pav. Matrikso metaloproteinazių (MMP) domenų kompozicijos [31]

2.2.1. Matrikso metaloproteinazių įtaka navikui augti ir metastazuoti

Naviko progresavimas yra daugiapakopis procesas, kurio metu normali ląstelė kinta, atsiranda fenotipiniai pokyčiai, pradedami sekretuoti proteolitiniai fermentai ir įgyjama savybė plisti į sveikus organus ir audinius. Navikinių ląstelių invazijos ir metastazavimo procesai prasideda nuo ląstelių migravimo link kraujagyslių ar limfagyslių ir įsiskverbimo į jas (5 pav.). Šių procesų pagrindą sudaro proteolitinis ELM ir BM komponentų skaidymas, todėl šiame etape MMP yra vienos svarbiausių fermentų. Navikui metastazuojant, jo ląstelės turi mažiausiai 3 kartus pereiti per bazinės membranas [33,34,35].



5 pav. Navikinių ląstelių migracija iš pirminio židinio [35]

MMP dalyvauja vėžio invazijos ir metastazavimo procesuose ne tik šalindamos barjerus, bet kai kurios MMP, tarp jų, pvz., MMP-3 stimuliuoja epitelinio fenotipo virsmus į mezenchiminį fenotipą, kuris susijęs su agresyvesniu piktybinio proceso vystymusi [36].

Taip pat MMP naviko vystymąsi skatina reguliuodamos augimo ir angiogeninių faktorių išsiskyrimą, navikinių ląstelių apoptozės procesą, chemokinių gradientą [32].

Apie MMP sąsają su navikų augimu ir progresavimu liudija daugelio autorių duomenys. Piktybiniuose navikuose ekspresuojamų MMP įvairovė yra žymiai didesnė, nei gerybiniuose. Sergant gaubtinės žarnos adenokarcinoma ekspresuojamas matrilizinas (MMP-7), stromelizinas-1 (MMP-3), stromelizinas-3 (MMP-11), želatinazė-A (MMP-2) ir kolagenazė-1 (MMP-1), tuo tarpu gerybiniuose gaubtinės žarnos navikuose įvairiais kiekiais ekspresuojamas tik matrilizinas. Sergant krūties vėžiu, MMP-11 ekspresija siejama tik su piktybiniais navikais. Sveikame krūties audinyje bei nepiktybinėse fibroadenomose MMP-11 raiška nėra konstatuojama. Padidėjusi MMP-3 ekspresija pastebėta sergant krūties, plaučių, prostatos, kasos, tiesiosios žarnos vėžiu [3].

Padidėjusi MMP-9 raiška nustatyta sergant smegenų, krūties, skrandžio, prostatos vėžiu bei limfoma. MMP-2 ir MMP-9 gali aktyvinti MMP-13, o pastaroji gali aktyvinti MT1-MMP. Tokio tipo aktyvinimo kaskados gali būti reikalingos siekiant užtikrinti navikinių ir strominių ląstelių sąveiką [37].

2.2.2. Matrikso metaloproteinazes koduojančių genų mutacijos ir vėžys

Vėžiu vadinama grupė ligų, kurioms būdingas bruožas yra nekontroliuojamas ląstelių dauginimasis. Iš tokių pakitusių ląstelių formuojasi navikas. Pokyčiai, lemiantys ląstelės supiktybėjimą, gali būti įvairių genų mutacijų padarinys. Daugumos genų koduojančiose sekose įvairios mutacijos gali veikti geną dviem būdais: keičiant ekspresuojamo baltymo kokybę arba kiekį.

Pastaraisiais metais atsiranda vis daugiau tyrimų, susijusių su MMP genų mutacijomis, kurios, matyt, kartu su kitų genų mutacijomis gali lemti navikinio proceso raidą ir progresavimą (3 lent.) [34,38,39].

MMP-1 genas yra 11 chromosomos ilgajame petyje. Šio geno promotorinėje dalyje galima mutacija -1607 pozicijoje, kurioje yra guaninas (G). Šioje pozicijoje vienas alelis gali turėti 1G (delecija), o kitas - 2G (insercija). Paprastai 1G turinčių alelių sekose, -1602 pozicijoje yra transkripcijos veiksnio AP-1 jungimosi sritis, o -1607 pozicijoje yra 5'-GAT-3' seka. Įvykus mutacijai ir sekoje atsiradus dar vienam G, susidaro papildoma, kito transkripcijos veiksnio Ets, jungimosi sritis 5'-GGA-3', kuris kartu su AP-1 padidina promotoriaus aktyvumą. Todėl įvykus 2G mutacijai abiejuose aleliuose, padidėja geno transkripcinis aktyvumas, MMP-1 raiška išauga, o tai koreliuoja su piktybinių navikų vystymusi. Ši mutacija siejama su plaučių, inkstų, kiaušidžių, gimdos kaklelio ir gaubtinės žarnos vėžiu [34,38].

3 lentelė. Svarbiausi MMP genuose galimi polimorfizmai

Genas	Polimorfizmo vieta	Polimorfizmo prigimtis	Liga
MMP-1	-1607	+/- G	Plaučių vėžys [40]; Gimdos kaklelio vėžys [41]; Kiaušidžių vėžys [42]; Inkstų vėžys [43]; Gaubtinės žarnos vėžys [34];
MMP-2	-1306	C/T	Krūties vėžys [44]; Plaučių vėžys [45]; Skrandžio ir stemplės vėžys [46];
MMP-3	-1171	+/- A	Krūties vėžys [47]; Plaučių vėžys [43]; Širdies ir kraujagyslių ligos [48];
	-1602	+/- A	Krūties vėžys [34]; Gaubtinės žarnos vėžys [34];
MMP-9	-1562	C/T	Kraujagyslių ligos [49]; Plaučių vėžys [50];
	-90	(CA) _n	Dauginė sklerozė [51];
MMP-12	-82	A/G	Krūties vėžys [52]; Plaučių vėžys [53];
	1802	A/G	Krūties vėžys [52];

MMP-2 koduojančio geno promotorinėje dalyje galimas -1306 C/T polimorfizmas. MMP-2 raiška bus didesnė turint C/C genotipą palyginti su turinčiais C/T ar T/T genotipą. Sergantiems krūties, plaučių, skrandžio ar stemplės vėžiu dažniausiai nustatomas C/C genotipas, todėl iškelta hipotezė, kad šio genotipo asmenys turi didesnę riziką susirgti minėtų lokalizacijų vėžiu [44,45]. MMP-2 koduojančio geno promotorinėje dalyje yra daug reguliacinių *cis*-elementų, todėl šio geno raiškos valdyme dalyvauja dauguma transkripcijos veiksnių, tokių kaip Sp-1, Sp-3, AP-2. Nustatyta, kad -1306 C/T pakaita yra lokalizuota transkripcijos veiksnio Sp-1 atpažinimo sekoje. Įvykus pakaitai, Sp-1 jungimosi vieta išnyksta, todėl sumažėja geno promotoriaus aktyvumas (C/T ir T/T genotipai), taip pat ir MMP-2 raiška [45].

MMP-3 koduojantis genas yra išsidėstęs 11 chromosomos ilgajame petyje šalia MMP-1 koduojančio geno ir suformuoja genų sankibą. MMP-3 koduojančio geno promotoriaus -1171 pozicijoje gali būti 5 arba 6 adeninai (A). *In vitro* tyrimais nustatyta, kad 5A geno aktyvumas yra nuo dviejų iki keturių kartų didesnis nei 6A. Todėl 5A/5A genotipas yra siejamas su didesne rizika susirgti krūties vėžiu bei blogesne ligos prognoze. Šiai hipotezei

patvirtinti reikalingi išsamesni tyrimai. Be to, 5A/6A genotipas siejamas su skirtingu MMP-3 geno atsaku interleukinui ir TNF- α [33,36,47].

MMP-9 koduojantis genas išsidėstęs 20 chromosomoje. Šio geno promotorinėje dalyje galimas -1562 C/T polimorfizmas, siejamas su plaučių vėžiu bei širdies ir kraujagyslių ligomis. -1562 pozicijoje esant timidinui (T), promotoriaus aktyvumas didėja ir MMP-9 raiška išauga. Šis polimorfizmas yra išsidėstęs transkripcijos veiksnio Ets-1 jungimosi srityje, todėl ši mutacija gali įtakoti promotoriaus aktyvumą. Esant C/T ir T/T genotipui MMP-9 ekspresuojama žymiai daugiau, nei esant C/C genotipui, o didesnė MMP-9 ekspresija skatina greitesnę ELM degradaciją ir navikinių ląstelių invaziją [49,54].

MMP-9 geno promotorinėje dalyje identifikuotas dar vienas polimorfizmas, taip pat įtakojantis MMP-9 geno transkripcinį aktyvumą. Tai -90 pozicijoje esančio mikrosatelito CA (citozino – adenino) pasikartojimai. Priklausomai nuo CA pasikartojimų skaičiaus kinta ir promotoriaus aktyvumas. Kuo didesnis pasikartojimų skaičius, tuo promotoriaus aktyvumas didesnis. Dažniausiai sutinkami 14CA, 21CA, 22CA, 23CA pasikartojimai. Esant 22 ir daugiau CA pasikartojimų, šis MMP-9 mikrosatelito polimorfizmas siejamas su padidėjusia rizika susirgti daugine skleroze [55].

MMP-12 koduojančiame gene yra nustatyti du pagrindiniai polimorfizmai, kurie įtakoja geno aktyvumą. Tai -82 A/G ir 1082 A/G polimorfizmai, siejami su rizika susirgti krūties ar plaučių vėžiu. *In vitro* tyrimai rodo, kad esant -82 A/A genotipui afiniškumas AP-1 transkripcijos veiksniai yra didesnis, o tai sąlygoja didesnę MMP-12 promotoriaus aktyvumą [52].

1082 A/G polimorfizmas yra MMP-12 geno dalyje, koduojančioje homologinį hemopeksinui domeną, kuris yra atsakingas už MMP-12 aktyvumą. 375 kodone adenino (A) pakaita guaninu (G), keičia koduojamą aminorūgštį asparaginą (Asn) į seriną (Ser). Nors šio polimorfizmo funkcinė reikšmė nėra aiški, tačiau iškelta hipotezė, kad šis polimorfizmas gali padidinti riziką susirgti krūties vėžiu [52].

3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

3.1. Tiriamoji medžiaga

Tyrimams pasirinkta:

- sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujas – 29 ėminiai;
- sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikai – 58 mėginiai.

3.2. Darbe naudojamos medžiagos ir tirpalai

DNR išskyrimo rinkinys (Fermentas);

QIAXcel High Resolution rinkinys (1200) (QIAGEN);

Chloroformas (Merck);

96% etanolis (Sema);

70% etanolis (Sema);

Agarozė (Fermentas);

Etidžio bromidas (Amresco);

Akrlamidas (Fluka);

Bisakrlamidas (Roth);

TRIS (Amresco);

Boro rūgštis (Poch);

EDTA (Roth);

Dažas „6× Orange Loading Dye” (Fermentas);

DNR ilgio standartas „Mass Ruler DNA Ladder Low Range“ (Fermentas);

DNR ilgio standartas „pUC Mix Marker 8“ (Fermentas);

DNR ilgio standartas „Gene Ruler 50bp DNA Ladder“ (Fermentas);

DNR ilgio standartas „QX DNA Size Marker 100 bp – 3 kb“ (QIAGEN);

Taq DNR polimerazė (5 vnt./μl) (Fermentas);

Restrikcijos endonukleazė Pst I (10 vnt./μl) (Fermentas);

Restrikcijos endonukleazė PaeI (10 vnt./μl) (Fermentas);

Pradmenys:

CYAR04

5'-GGT AAG CAG GTA CTT AGT TAG CTA C-3';

5'-GTT ACA GTG AGC CAA GGT CGT GAG-3';

D5S818

5'-GGT GAT TTT CCT CTT TGG TAT CC-3';

5'-AGC CAC AGT TTA CAA CAT TTG TAT CT-3';

D13S317

5'-ACA GAA GTC TGG GAT GTG GAG GA-3';

5'-GGC AGC CCA AAA AGA CAG A-3';

I-FABP

5'-GTA GTA TCA GTT TCA TAG GGT CAC C-3';

5'-CAG TTC GTT TCC ATT GTC TGT CCG-3';

TH01

5'-GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT-3';

5'-ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG-3';

MMP-3

5'-GGT TCT CCA TTC CTT TGA TGG GGG GAA AGA-3';

5'-CTT CCT GGA ATT CAC ATC ACT GCC ACC ACT-3';

MMP-9

5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3';

5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3' (Fermentas).

3.3. Tyrimo metodai

3.3.1. Genominės DNR išskyrimas iš kraujo

Genominės DNR išskyrimui naudotas „Fermento“ DNR išskyrimo rinkinys. Darbas atliktas pagal gamintojų instrukcijas.

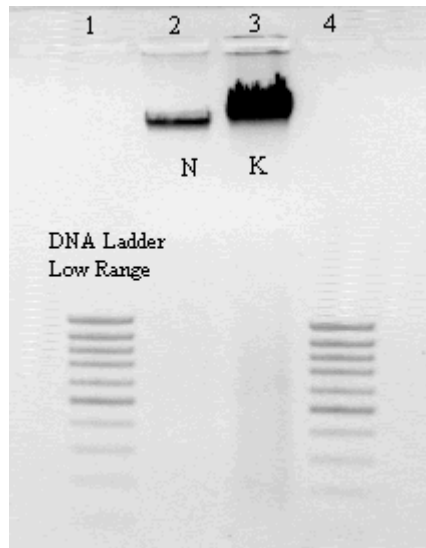
200 µl šviežio arba šaldyto kraujo užpilama lizuojančio tirpalo ir inkubuojama 65°C temperatūroje vandens vonioje 10 min. Į mišinį įpilama 600 µl chloroformo, sumaišoma ir

centrifuguojama 12000 rpm 5 min. Po centrifugavimo viršutinė fazė, kurioje yra DNR, perkeliama į mėgintuvėlius su paruoštu DNR nusodinimo tirpalu, kelis kartus sumaišoma ir laikoma 1-2 min. kambario temperatūroje. Centrifuguojama 12000 rpm 8 min. Supernatantas pašalinamas, DNR nuosėdos tirpinamos 100 µl 1,2M natrio chlorido tirpale. DNR išsodinama etanolio tirpalu. Centrifuguojama 12000 rpm 5 min. Etanolio tirpalas nupilamas, o nuosėdos tirpinamos 50 µl steriliame vandenyje.

3.3.2. Genominės DNR išskyrimas iš naviko

Navikinio audinio 30-50 mg mėginys užšaldomas skystu azotu ir susmulkinamas (homogenizuojamas). Susmulkintas mėginys lizuojamas buferiniu tirpalu (50 mM Tris HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1% SDS), pilama 100 µl proteinazės K (10mg/ml) tirpalo bei inkubuojama +55° C temperatūroje nuo 12 valandų iki 3 parų. Mėginio inkubavimas gali būti nutrauktas, kai mišinys tampa skystas, vientisas, be audinių gabalėlių. Deproteinizacija vykdoma fenolio ir chloroformo mišinio tirpalu, DNR išsodinama etanolio tirpalu. Išdžiovinta DNR tirpinama 100 µl steriliame H₂O.

Išgrynintos DNR kokybė ir koncentracija nustatoma 1,0% agarozės gelyje. Fotografuojama UV šviesoje (6 pav.).



6 pav. Genominės DNR išskyrimas iš kraujo ir naviko

1 ir 4 takeliuose – DNR ilgio standartas „Mass Ruler DNA Ladder Low Range“; 2 takelyje išgryninta DNR iš naviko, 3 takelyje išgryninta DNR iš kraujo.

3.3.3. DNR koncentracijos ir grynumo nustatymas

Išgryninta DNR 15-20 sekundžių centrifuguojama 10000-12000 aps./min. greičiu. Naujame mikromėgintuvėlyje 5 μ l tiriamosios DNR tirpalo skiedžiama distiliuotu vandeniu, kad bendras turinys jame būtų 50 μ l. Gautas tirpalas perpilamas į kiuvetę. DNR kiekis nustatomas spektrofotometru, matuojant optinį tankį 260 nm ilgio bangos šviesoje. DNR mėginio koncentracija (μ g/ml) apskaičiuojama įvertinant praskiedimą.

Kokybinė DNR analizė atliekama išmatavus optinį tankį 280 nm ilgio bangos šviesoje. Santykis A_{260}/A_{280} parodo DNR grynumą. DNR yra kokybiškai išgryninta, kai šis dydis yra didesnis nei 1,5; geriausia, jei šis santykis yra 1,7–1,9. Mažesnis santykis rodo, kad DNR mėginyje yra baltymų arba organinių medžiagų, didesnis – esama RNR.

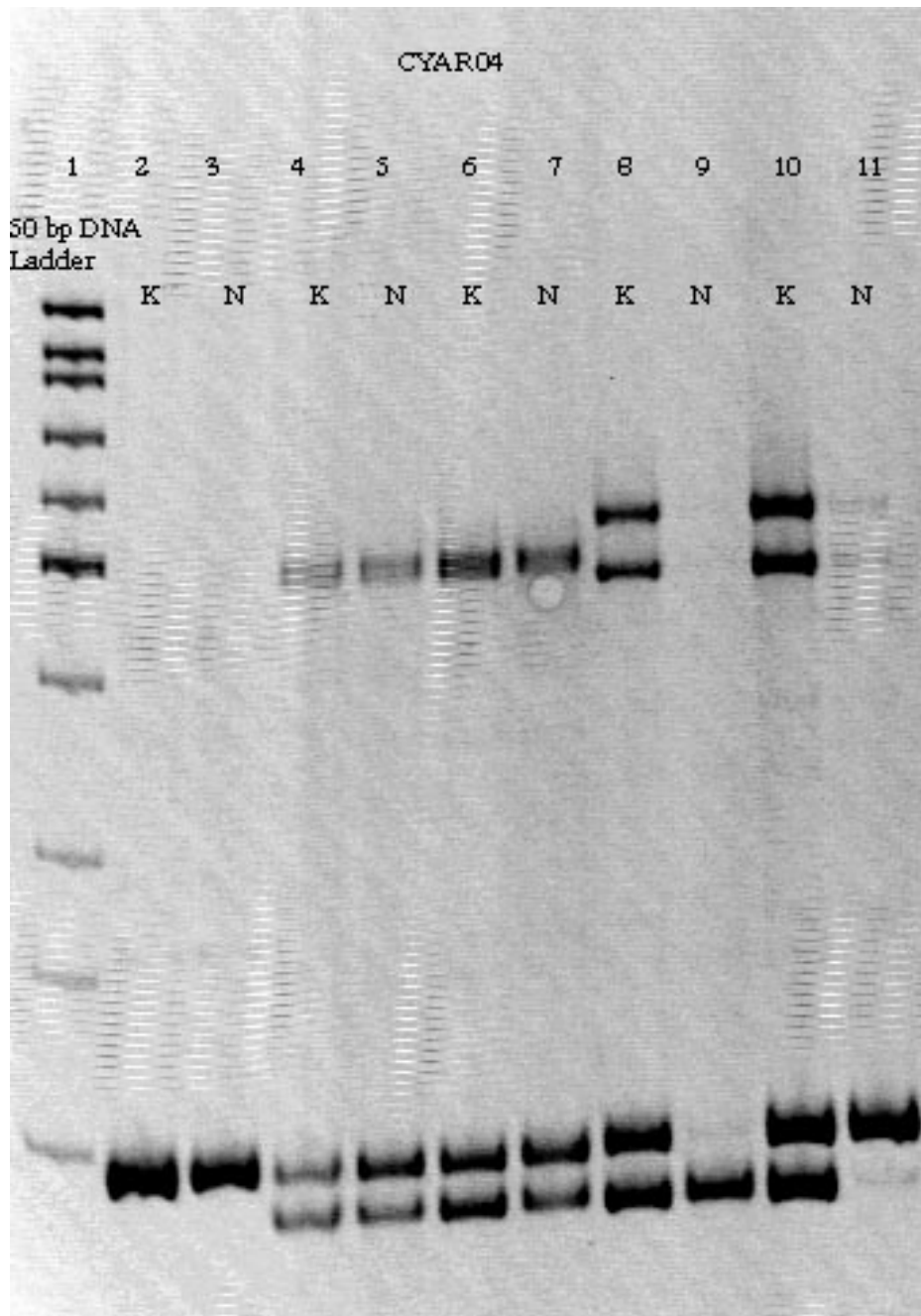
3.3.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

3.3.4.1. PGR mikrosatelitinių pasikartojimų analizei

Pradmenų poroms (CYAR04, D5S818, D13S317, I-FABP ir TH01) paruošiamas PGR mišinys: 1 μ l DNR, 2,5 μ l 10 \times PGR buferio, 2,5 μ l dNTP 2mM, 1 μ l MgCl₂ 25mM, 15 pmol tiesioginio pradmens, 15 pmol atvirkštinio pradmens, 0,25 vnt. Taq DNR polimerazės, dejonizuoto vandens iki 25 μ l.

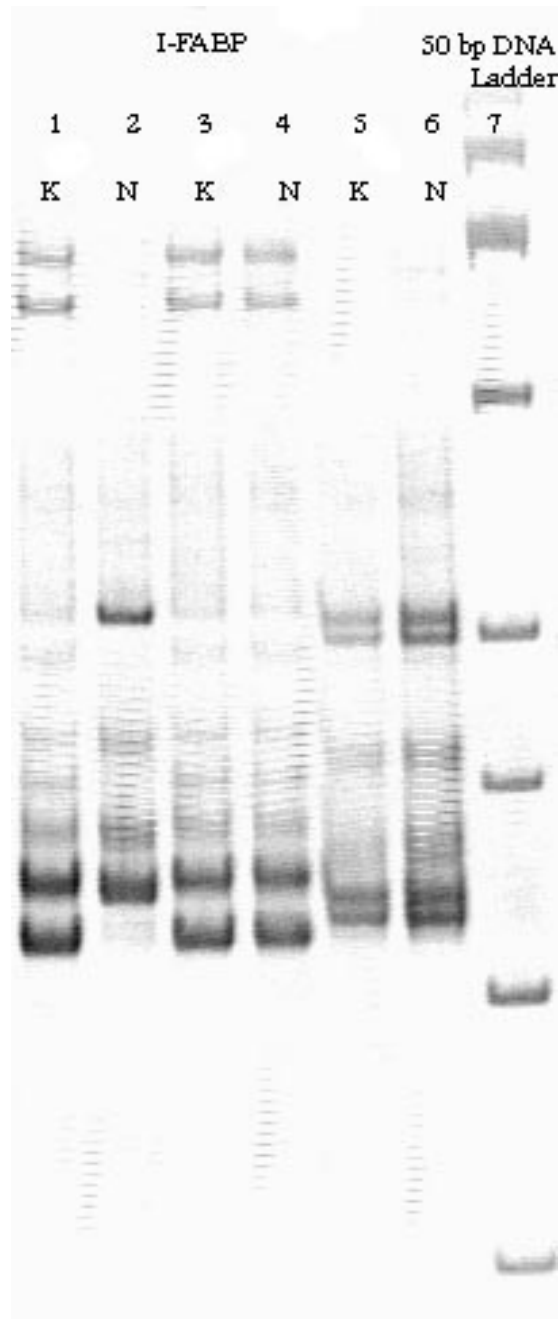
Atlikama polimerazės grandininė reakcija tokiu temperatūriniu režimu: pradinis ciklas – denatūracija 5 min 95°C temperatūroje; CYAR04, D5S818, I-FABP 29 vienodi ciklai - denatūracija 30 s 95°C temperatūroje, pradmens prijungimas 40 s 54°C temperatūroje, pratęsimas 40 s 72°C temperatūroje ir galutinis ciklas – pratęsimas 7 min 72°C temperatūroje. D13S317 ir TH01 29 vienodi ciklai - denatūracija 1 min 94°C temperatūroje, pradmens prijungimas 1 min 59°C temperatūroje, pratęsimas 1 min 72°C temperatūroje ir galutinis ciklas – pratęsimas 5 min 72°C temperatūroje.

PGR produktai analizuojami 10,0% poliakrilamido gelyje lyginami su DNR ilgio standartu. Gauti rezultatai fotografuojami UV šviesoje (7-9pav.). Taip pat PGR produktai analizuojami ir kapiliarinės elektroforezės (QIAGEN) metodu (10-11 pav.).



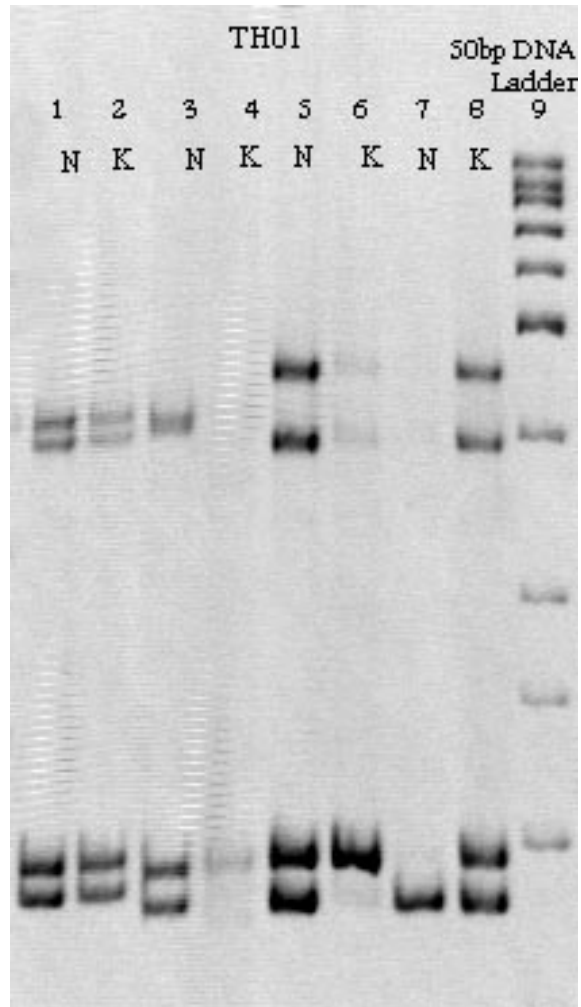
7 pav. CYAR04 mikrosatelitinės sekos identifikacija sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose

1 takelyje DNR ilgio standartas „50 bp DNA Ladder“, 2, 4, 6, 8 ir 10 takeliuose PGR produktas iš kraujo išskirtos DNR, 3, 5, 7, 9 ir 11 takeliuose PGR produktas iš naviko išskirtos DNR. Heterozigotiškumo pradimas identifikuojamas to paties paciento kraujyje (K) ir navike (N).



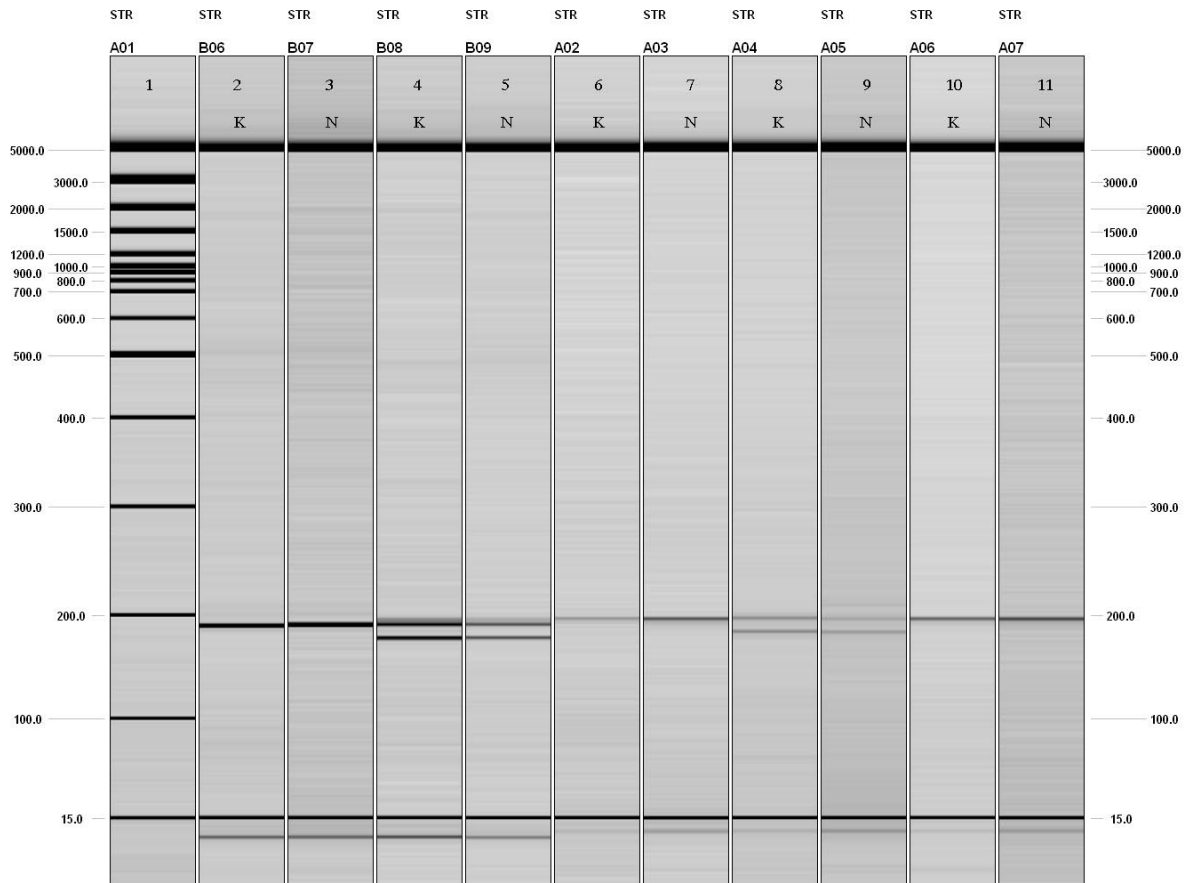
8 pav. I-FABP mikrosatelitnēs sekas identifikacija sergančiju šlapimo pūslēs vēžiu kraujyje ir navikuose

1, 3 ir 5 takeliuose PGR produkts iš kraujo išskirtos DNR, 2, 4 ir 6 takeliuose PGR produkts iš naviko išskirtos DNR, 7 takelyje DNR ilgio standarts „50 bp DNA Ladder“. Heterozigotiškumo praradimas identifikuojamas to paties paciento kraujyje (K) ir navike (N).



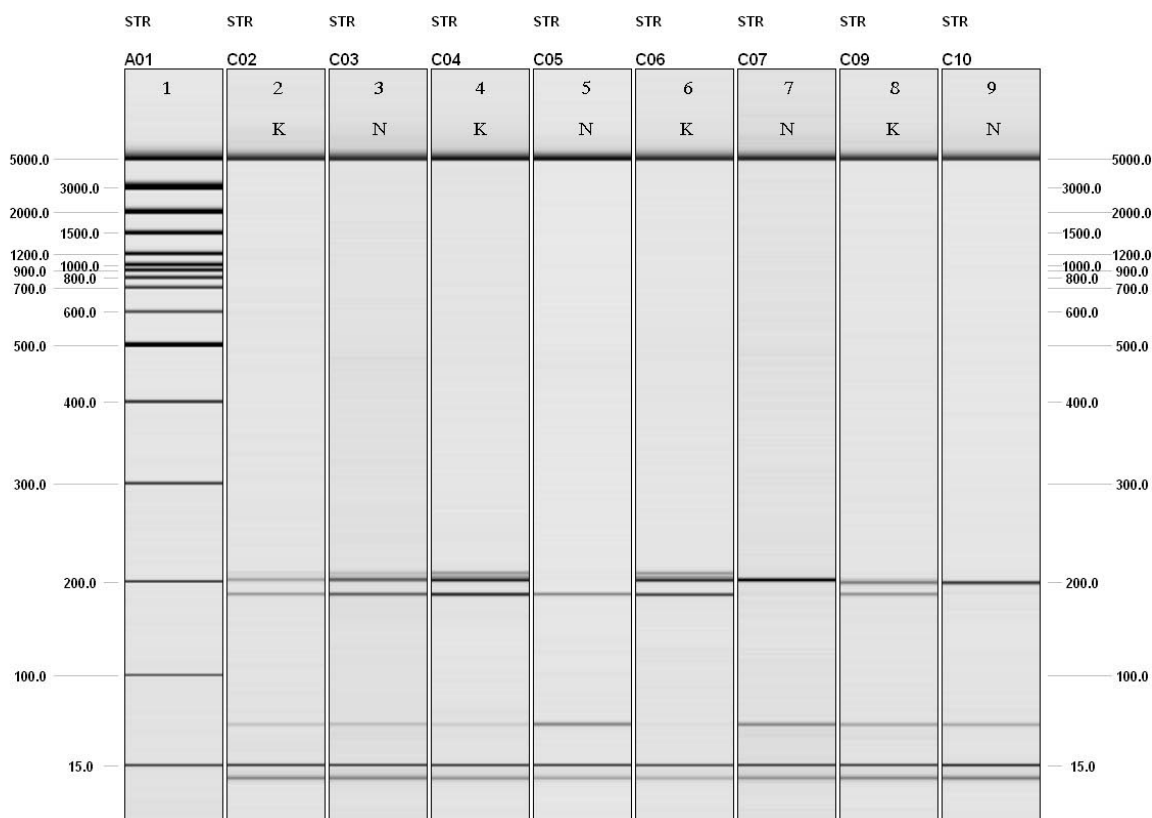
9 pav. TH01 mikrosatelitinės sekos identifikacija sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose.

1, 3, 5 ir 7 takeliuose PGR produktas iš naviko išskirtos DNR, 2, 4, 6 ir 8 takeliuose PGR produktas iš kraujo išskirtos DNR, 9 takelyje DNR ilgio standartas „50 bp DNA Ladder“. Heterozigotiškumo praradimas identifikuojamas to paties paciento kraujyje (K) ir navike (N).



10 pav. CYAR 04 mikrosatelitinės sekos identifikacija sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose

1 takelyje DNR ilgio standartas „QX DNA Size Marker 100 bp – 3 kb“, 2, 4, 6, 8 ir 10 takeliuose PGR produktas iš kraujo išskirtos DNR, 3, 5, 7, 9 ir 11 takeliuose PGR produktas iš naviko išskirtos DNR. Heterozigotiškumo praradimas identifikuojamas to paties paciento kraujyje (K) ir navike (N).



11 pav. TH01 mikrosatelitinės sekos identifikacija sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose

1 takelyje DNR ilgio standartas „QX DNA Size Marker 100 bp – 3 kb“, 2, 4, 6 ir 8 takeliuose PGR produktas iš kraujo išskirtos DNR, 3, 5, 7 ir 9 takeliuose PGR produktas iš naviko išskirtos DNR. Heterozigotiškumo praradimas identifikuojamas to paties paciento kraujyje (K) ir navike (N).

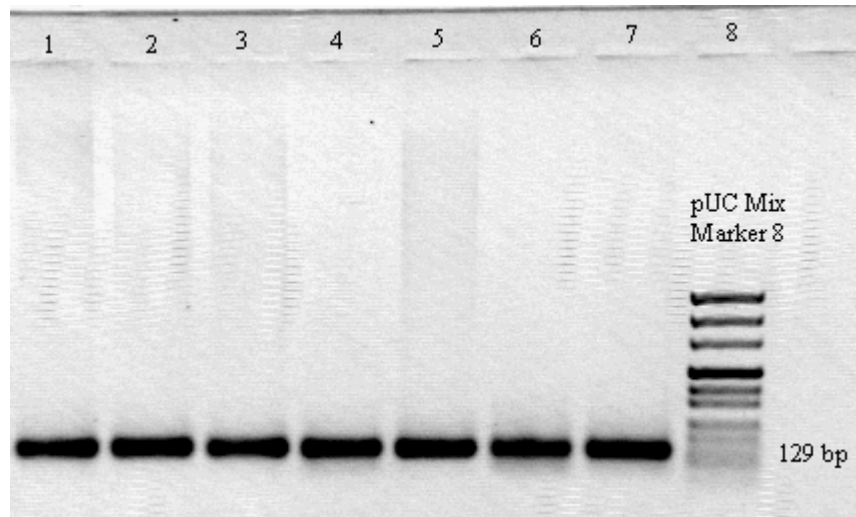
3.3.4.2. PGR MMP polimorfizmų analizei

Kiekvienai pradmenų porai (MMP-3 ir MMP-9) paruošiamas PGR mišinys: 1 μ l DNR, 2,5 μ l 10 \times PGR buferio, 2,5 μ l dNTP 2mM, 2 μ l MgCl₂ 25mM, 15 pmol tiesioginio pradmens, 15 pmol atvirkštinio pradmens, 0,2 vnt. Taq DNR polimerazės, dejonizuoto vandens iki 30 μ l.

Atlikama polimerazės grandininė reakcija tokiu temperatūriniu režimu: pradinis ciklas – denatūracija 5 min 94°C temperatūroje MMP-3 ir 2 min 95°C temperatūroje MMP-9; 35 vienodi ciklai MMP-3 – denatūracija 30 s 94°C temperatūroje, pradmens prijungimas 30 s 65°C temperatūroje, pratęsimas 30 s 72°C temperatūroje, ir galutinis ciklas – pratęsimas 5 min

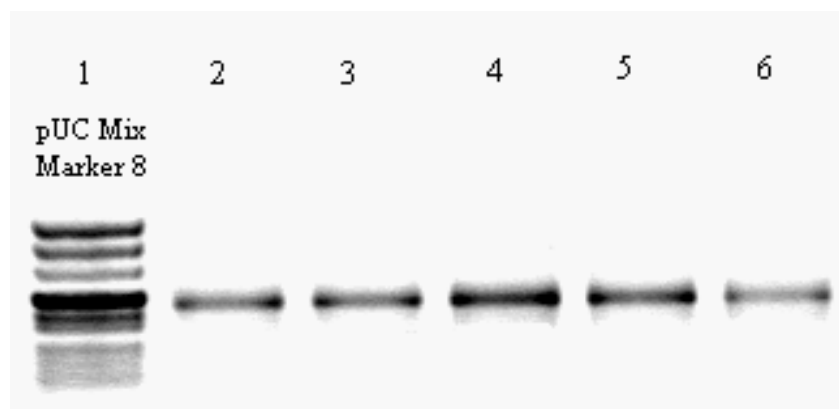
72°C temperatūroje. Ir 35 vienodi ciklai MMP-9 - denatūracija 30 s 95°C temperatūroje, pradžios prijungimas 30 s 60°C temperatūroje, pratęsimas 30 s 72°C temperatūroje, ir galutinis ciklas – pratęsimas 2 min 72°C temperatūroje.

PGR produktai analizuojami 1,0% agarozės gelyje ir lyginami su DNR ilgio standartu. Gauti rezultatai fotografuojami UV šviesoje (12-13 pav.).



12 pav. MMP-3 identifikacija sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose po polimerazės grandininės reakcijos (PGR)

1-7 takeliuose – PGR mišinys MMP-3 (129 bp); 8 takelyje – DNR ilgio standartas „pUC Mix Marker 8“

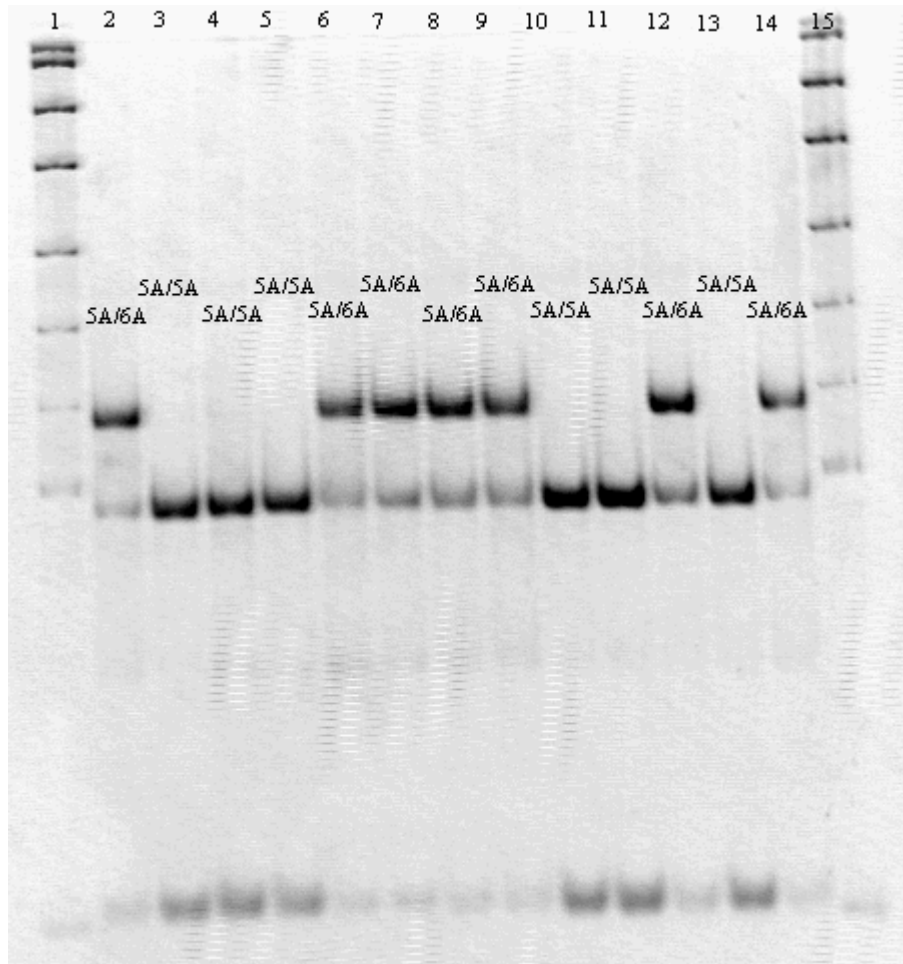


13 pav. MMP-9 identifikacija sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose po polimerazės grandininės reakcijos (PGR)

1 takelyje - DNR ilgio standartas „pUC Mix Marker 8“, 2-6 takeliuose - PGR mišinys MMP-9 (436 bp).

3.3.5. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodas

MMP-3 PGR produktų analizei RFIP metodu paruošiamas restrikcijos mišinys: 5 µl PGR produkto, 3 µl 10×buferio, 10 vnt. Pst I restrikcijos endonukleazės, sterilaus vandens iki 30µl. Restrikcijos reakcija vykdoma 2 valandas 37° C temperatūroje vandens vonioje. RFIP metodu gauti reakcijos produktai analizuojami 8,0% poliakrilamido gelyje. Fragmentai lyginami su DNR ilgio standartu, fotografuojami UV šviesoje (14 pav.).



14 pav. PGR produktų analizė restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodu (8,0% poliakrilamidiniame gelyje)

1 ir 15 takeliuose DNR ilgio standartas „pUC Mix Marker 8“, 2, 6-9, 12 ir 14 takeliuose 5A/6A genotipas, 3-5, 10-11 ir 13 takeliuose 5A/5A genotipas.

Restrikcijos endonukleazė karmo PGR metodu gautą MMP-3 tokiais fragmentais:

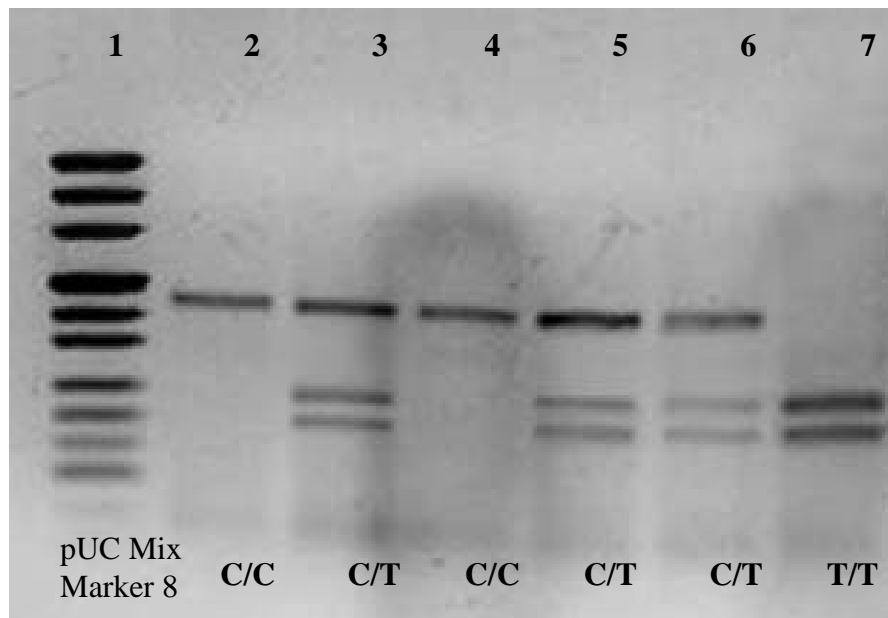
- esant 5A/5A genotipui – 97, 32 bp;
- esant 5A/6A genotipui – 129, 97, 32 bp;
- esant 6A/6A genotipui – 129 bp.

MMP-9 PGR produktų analizei RFIP metodu paruošiamas restrikcijos mišinys: 10 µl PGR produkto, 3 µl 10× buferio, 10 vnt. PaeI restrikcijos endonukleazės, sterilaus vandens iki 30µl. Restrikcijos reakcija vykdoma 1,5 valandos 37° C temperatūroje vandens vonioje.

RFIP metodu gauti reakcijos produktai analizuojami 2,0% agarozės gelyje. Fragmentai lyginami su DNR ilgio standartu, fotografuojami UV šviesoje (15 pav.).

Restrikcijos endonukleazė PaeI karmo PGR metodu gautą MMP-9 tokiais fragmentais:

- esant C/C genotipui – 436 bp;
- esant C/T genotipui – 436, 240, 196 bp;
- esant T/T genotipui – 240, 196 bp.



15 pav. MMP-9 PGR produktų analizė restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) metodu

1 takelyje – DNR ilgio standartas „pUC Mix Marker 8“; 2 ir 4 takeliuose – C/C genotipas; 2, 5 ir 6 takeliuose – C/T genotipas; 7 takelyje – T/T genotipas.

3.4. Statistinė analizė

Rezultatų statistiniam apdorojimui buvo naudojama programa SPSS 13.0. Ligos remisijos trukmė analizuota Kaplan – Meier metodu, skirtumas tarp kreivių vertintas log rangų tertu. Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, jeigu p reikšmė buvo mažesnė negu 0,05.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Mikrosatelitinio nestabilumo tyrimai, naudojant 5 pasikartojančias sekas (CYAR04, D5S818, D13S317, I-FABP ir TH01) buvo atlikti 29 kraujo ėminiuose ir 29 navikinio audinio mėginiuose. Iš visų pasirinktų kraujo ėminių ir navikinio audinio mėginių buvo išskirta DNR ir PGR, vertikalios ir kapiliarinės elektroforezės metodais nustatyti mikrosatelitinių sekų pokyčių variantai. Duomenys pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Duomenys apie šlapimo pūslės vėžiu sergančius tiriamuosius

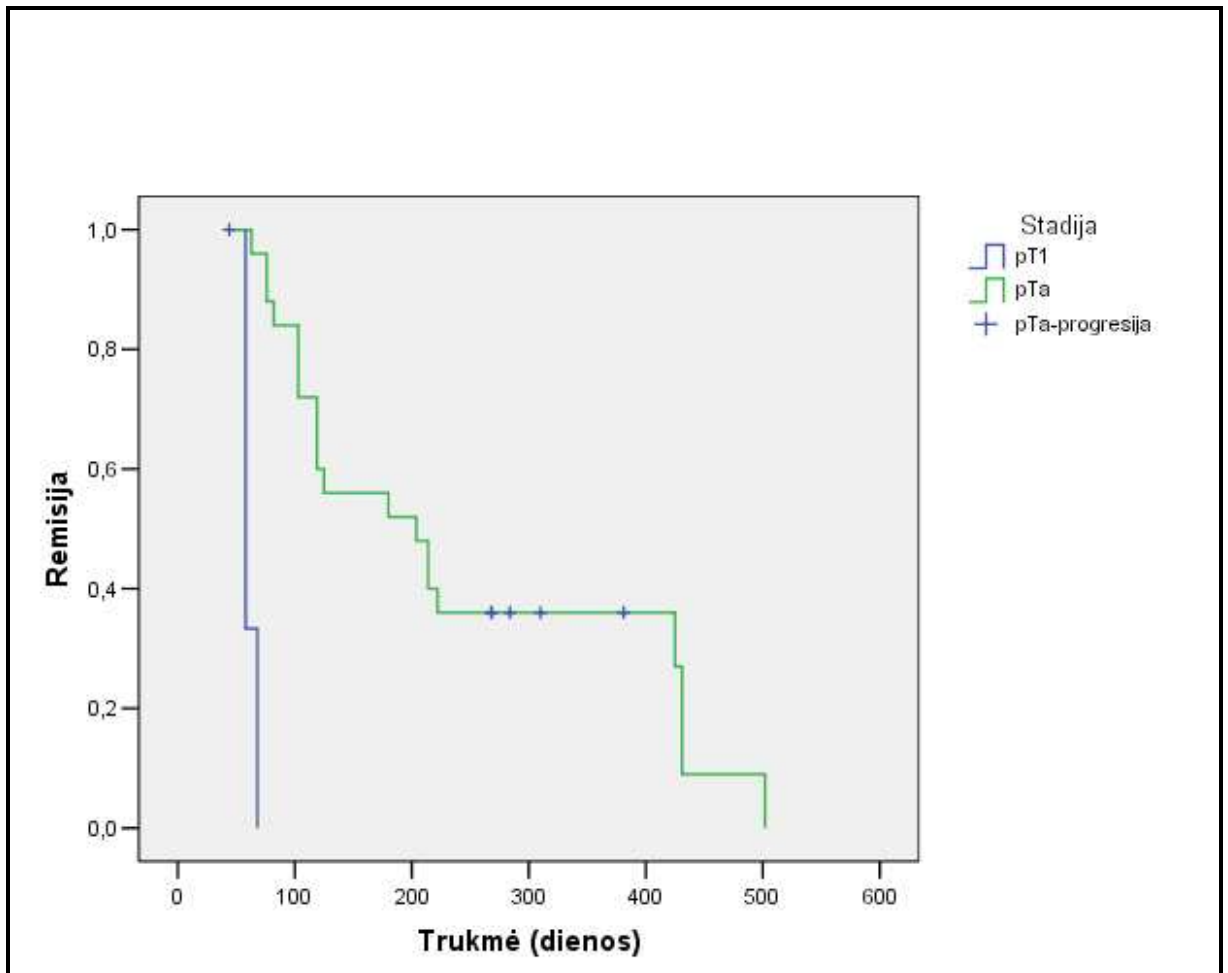
Atvejis	Lytis	Stadija	Dif. laipsnis	Pokyčiai
1	V	pTa	G1	CYAR04
2	V	pTa	G2	CYAR04
3	V	pTa	G2	-
4	V	pTa	G1	CYAR04
5	M	pTa	G2	CYAR04
6	M	pTa	G2	D13S317
7	V	pTa	G3	-
8	V	pTa	G2	TH01
9	V	pTa	G2	-
10	V	pTa	G1	-
11	V	pTa	G3	CYAR04
12	V	pTa	G2	-
13	V	pTa	G1	-
14	V	pTa	G2	-
15	V	pTa	G3	-
16	V	pT1	G3	-
17	M	pT1	G3	-
18	V	pTa	G1	-
19	V	pTa	G1	TH01
20	V	pTa	G2	-
21	V	pTa	G1	-
22	V	pTa	G2	-
23	V	pTa	G2	-
24	M	pT1	G3	TH01
25	V	pTa	G2	TH01
26	V	pTa	G1	-
27	V	pTa	G2	FABP, CYAR04
28	M	pTa	G2	-
29	V	pTa	G2	TH01

(V-vyras, M-moteris)

Iš pateiktų duomenų matyti, kad iš 29 dalyvavusių tyrime pacientų 24 buvo vyrai ir 5 moterys. 26 iš 29 tiriamųjų pacientų konstatuotas pirminis papildinis neinvazinis šlapimo

pūslės navikas (pTa), trims pacientams – šlapimo pūslės navikas išplitęs subepiteliniame audinyje (pT1). Mikrosatelitinis sekų pokyčiai identifikuoti 12 pacientų.

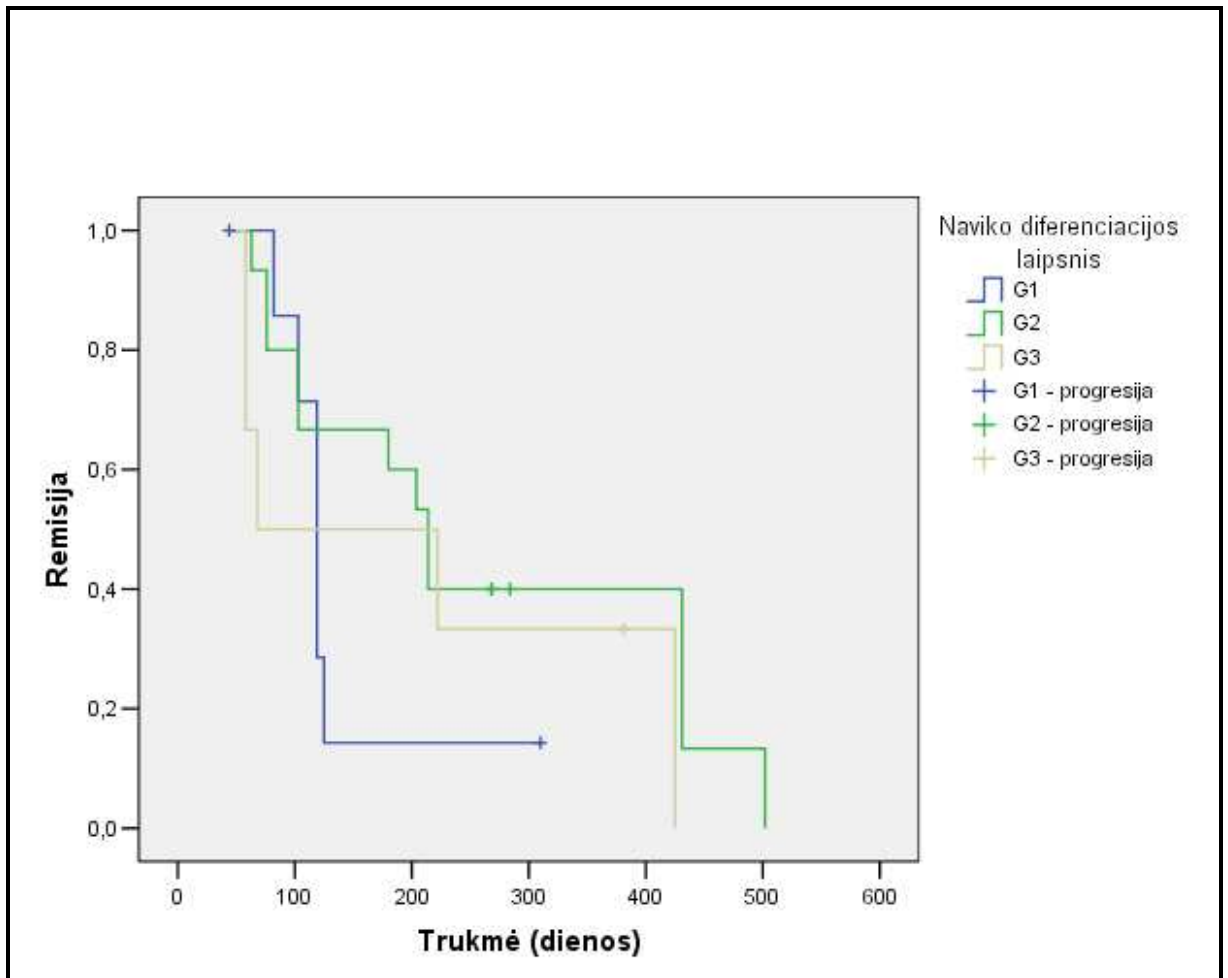
Atliktų tyrimų analizei naudojamas Kaplan-Meier'io metodas. Tyrime dalyvavę pacientai yra visi gyvi, todėl analizuota įvairių parametrų įtaka pacientų ligos remisijos trukmei.



16 pav. Ligos stadijos įtaka remisijos trukmei

Kaip matyti iš 16 pav. pateiktos kreivės ir 4 lentelės duomenų, didžiajai daliai tiriamųjų pacientų buvo diagnozuotas pTa stadijos navikas. Vidutinė pacientų ligos remisijos trukmė 246 ± 33 dienos. Tiriamųjų, kurių ligos stadija buvo pT1 vidutinė ligos remisijos trukmė 61 ± 3 dienos. Statistinio reikšmingumo koeficientas $p < 0,0001$.

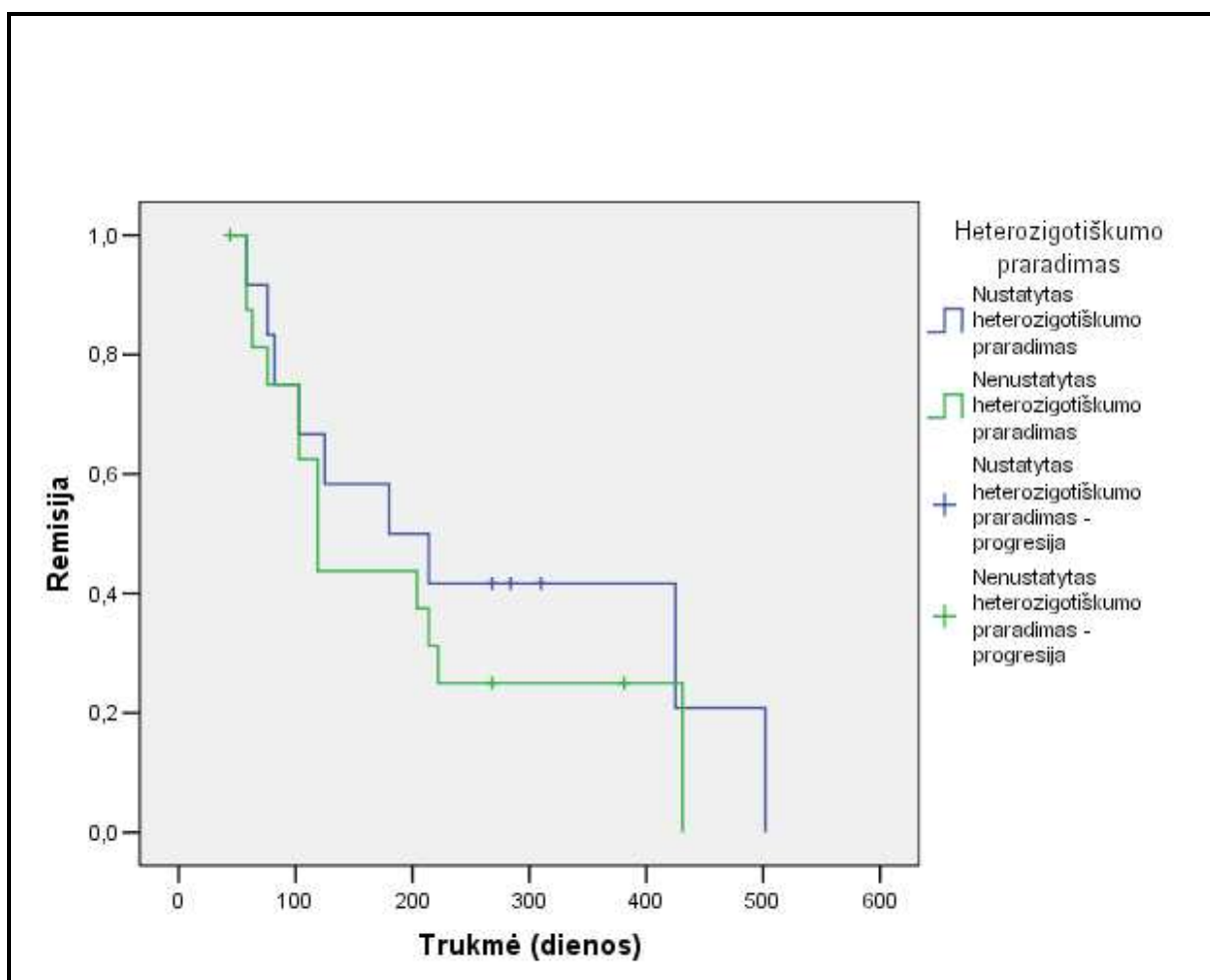
Išanalizuota naviko diferenciacijos laipsnio įtaka ligos remisijos trukmei (17 pav.).



17 pav. Naviko diferenciacijos laipsnio įtaka ligos remisijos trukmei

Taigi, iš 17 pav. pateiktos kreivės matyti, kad ilgiausias ligos remisijos laikas būdingas pacientams, kuriems konstatuotas G2 naviko diferenciacijos laipsnis. Vidutinė ligos remisijos trukmė 264 ± 44 dienos. Pacientams, kuriems konstatuotas G1 diferenciacijos laipsnio navikas, ilgiausia ligos remisijos trukmė ~ 300 dienų, tačiau vidutinė tik 140 ± 27 dienos. Pacientams, kuriems konstatuotas G3 diferenciacijos laipsnio navikas vidutinis ligos remisijos laikas 209 ± 74 dienos. Statistinis reikšmingumo koeficientas $p=0,345$.

Taip pat išanalizuota heterozigotiškumo praradimo įtaka ligos remisijos trukmei (18 pav.).



18 pav. Heterozigotiškumo praradimo įtaka ligos remisijos trukmei

Iš pateiktos kreivės matyti, kad ilgesnis ligos remisijos laikas būdingas tiriamiesiems, kuriems nustatytas bent vienos pasikartojančios sekos heterozigotiškumo praradimas. Vidutinė jų remisijos trukmė 263 ± 55 dienos. Gauti duomenys nėra statistiškai reikšmingi $p=0,395$.

Sekančiose rezultatų aptarimo dalyse detaliau išnagrinėti CYAR04, D5S818, D13S317, I-FABP ir TH01 tyrimų gautieji duomenys.

4.1. Mikrosatelitinės sekos CYAR04 analizė

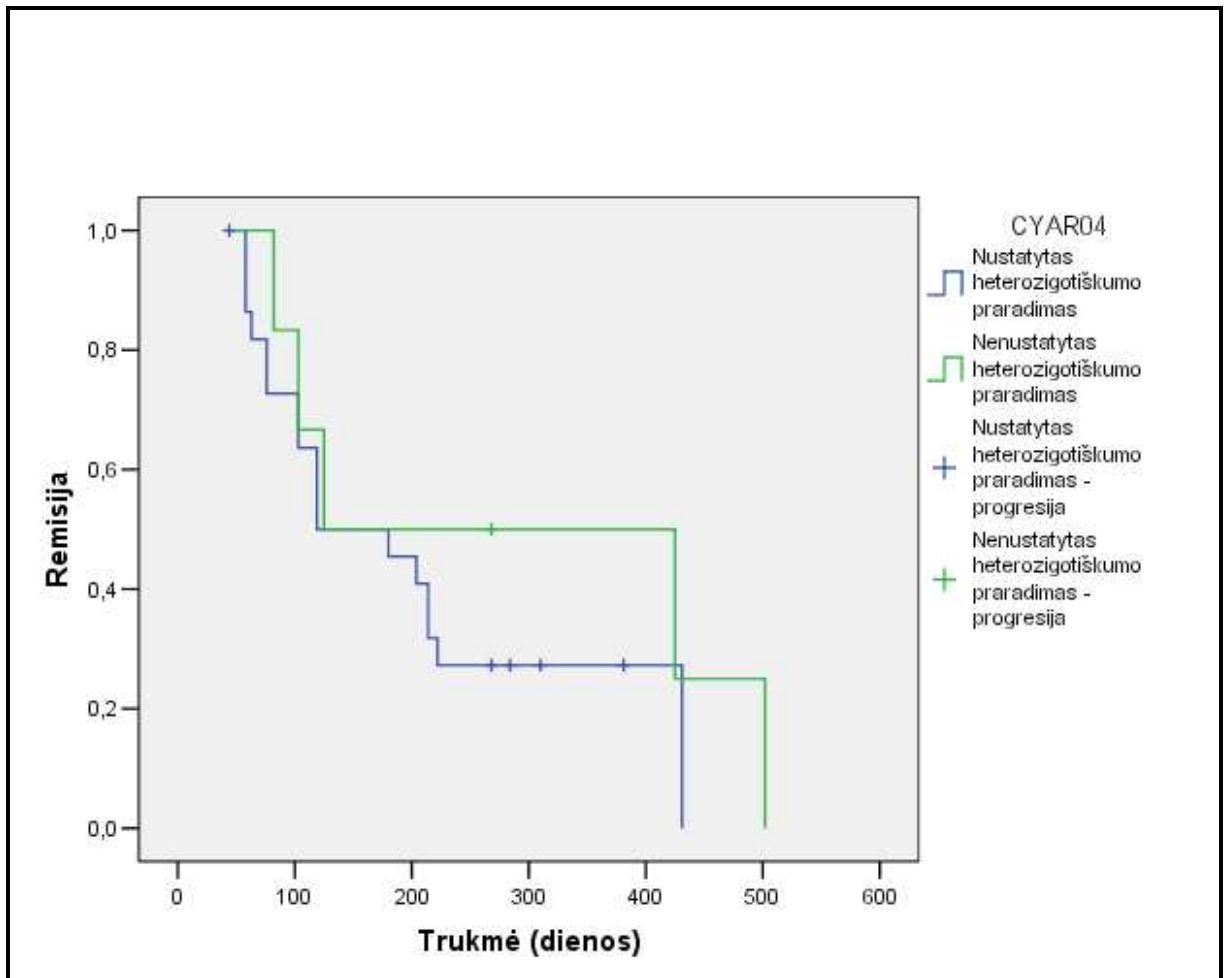
CYAR04 mikrosatelitinių pasikartojimų pokyčiai buvo vertinamas 29 sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose. Mikrosatelitinis nestabilumas nebuvo nustatytas

nei vienam tiriamajam pacientui. 6 pacientams nustatytas CYAR04 heterozigotiškumo praradimas. Iš visų tirtų pasikartojančių sekų CYAR04 heterozigotiškumo praradimo dažnis buvo didžiausias. CYAR04 pokyčiai nustatyti šešiuose navikuose, iš kurių dviems konstatuota G1 diferenciacijos laipsnis, trims - G2, o vienam - G3 diferenciacijos laipsnis (5 lent.)

5 lentelė. CYAR04 heterozigotiškumo praradimas priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio

	G1	G2	G3	Iš viso
Nustatytas	2	3	1	6
Nenustatytas	6	12	5	23
Iš viso	8	15	6	29
χ^2	0,15			
p	0,925			

Išanalizavus CYAR04 heterozigotiškumo praradimo pasiskirstymą priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio statistiškai reikšmingo skirtumo negauta ($p=0,925$). Norint tiksliau statistiškai įvertinti CYAR04 heterozigotiškumo praradimo priklausomybę nuo naviko diferenciacijos laipsnio reikia atlikti išsamesnį tyrimą ir išplėsti tiriamųjų pacientų populiaciją.



19 pav. CYAR04 heterozigotiškumo praradimo įtaka ligos remisijos trukmei

Kaip matyti iš 19 pav. pateiktos kreivės ilgesnis ligos remisijos laikas tų pacientų, kuriems buvo nustatytas pasikartojančios sekos CYAR04 heterozigotiškumo praradimas. Ilgiausia remisijos trukmė pacientams, neturintiems CYAR04 heterozigotiškumo praradimo ~430 dienų, o tiems, kuriems būdingas heterozigotiškumo praradimas - ~500 dienų. Vidutinė ligos remisijos trukmė tiriamųjų, kuriems nustatytas heterozigotiškumo praradimas yra 208 ± 32 dienos, tų, kuriems nėra heterozigotiškumo praradimo - 283 ± 84 dienos. Tačiau šio grafiko statistinis reikšmingumo koeficientas $p=0,371$, todėl norint daryti išsamesnes išvadas reikia atlikti didesnės apimties tyrimus.

4.2. Mikrosatelitinės sekos D5S818 analizė

Iš tirtų 29 kraujo ėminių ir 29 navikinio audinio mėginių mikrosatelitinis nestabilumas ar heterozigotiškumo praradimas nebuvo nustatytas nei vienam sergančiajam šlapimo pūslės vėžiui. Tačiau Kram A. ir bendr. teigia, kad D5S818 ir D5S2055, šalia esančios kiros

mikrosatelitinės sekos, išskritos yra dažniausiai nustatomos penktojoje chromosomoje sergantiesiems šlapimo pūslės vėžiu. Todėl manoma, kad šiame penktosios chromosomos regione q22-q31.1 yra genų susijusių su šlapimo pūslės vėžio vystymusi ir progresija [19].

4.3. Mikrosatelitinės sekos D13S317 analizė

Mikrosatelitinės sekos D13S317 analizė buvo atlikta 29 sergančiųjų šlapimo pūslės vėžių kraujyje ir navikuose. Mikrosatelitinis nestabilumas nebuvo nustatytas nei vienam tiriamajam pacientui, tačiau dviems iš jų buvo identifikuotas heterozigotiškumo praradimas. Pastarųjų naviko diferenciacijos laipsnis yra G2. Mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad 13 chromosomoje, q31.1 – q32.3 regione yra dideliu heterozigotiškumo praradimo dažniu pasižyminti sritis, kurioje yra trys mikrosatelitinės sekos: D13S317, D13S1818 ir D13S770 [60].

4.4. Mikrosatelitinės sekos I-FABP analizė

Mikrosatelitinės sekos I-FABP analizė buvo atlikti 29 pacientų, sergančių šlapimo pūslės vėžiu, kraujyje ir navikuose, iš kurių vienam nustatytas heterozigotiškumo praradimas, o mikrosatelitinis nestabilumas nestebėtas. Ši mikrosatelitinė seka yra žarnų riebiąsias rūgštis sujungiančio baltymo introne. Literatūros duomenų apie galimą šios mikrosatelitinės sekos nestabilumo įtaką sergant šlapimo pūslės vėžiu nerasta.

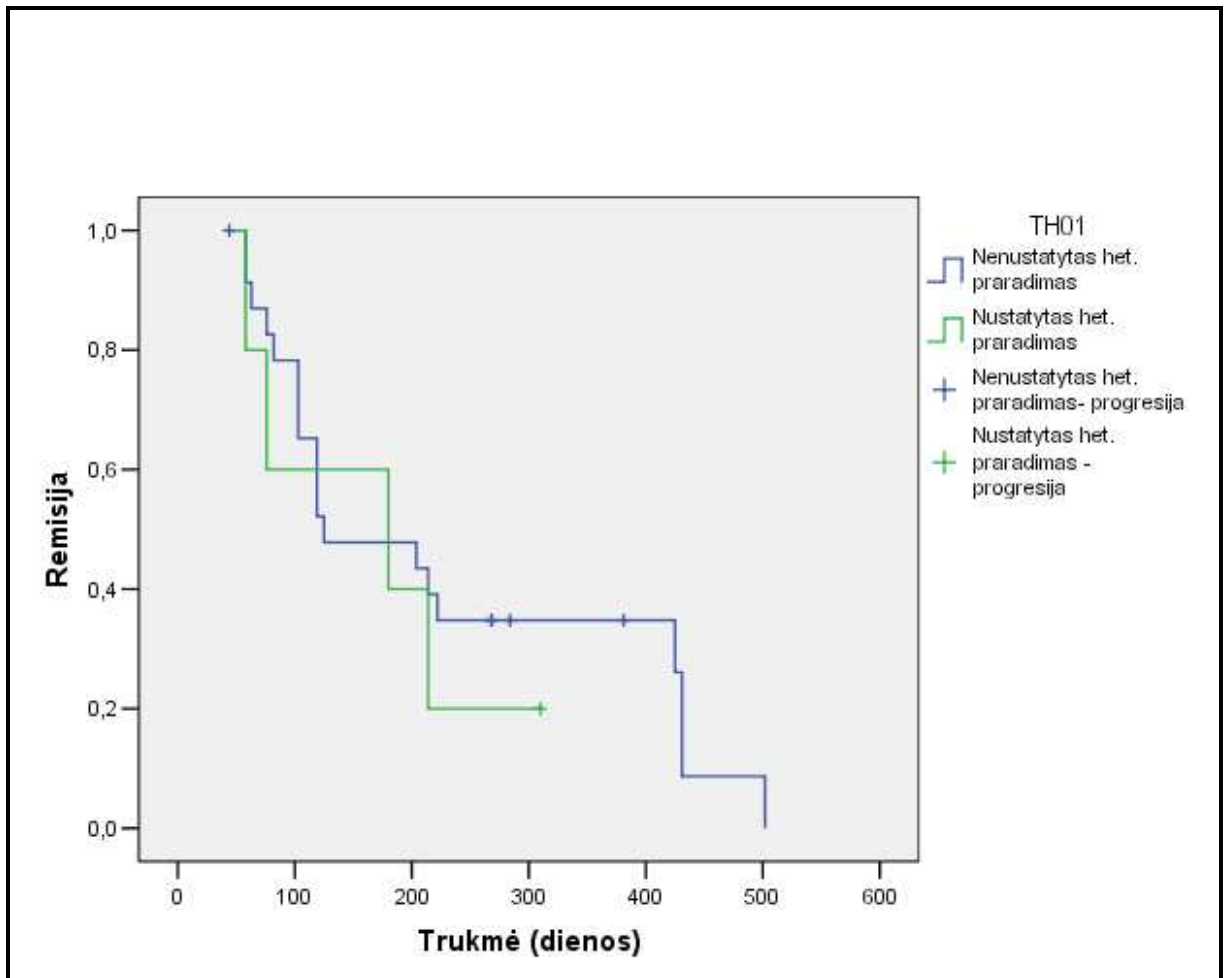
4.5. Mikrosatelitinės sekos TH01 analizė

Mikrosatelitinės sekos TH01 nestabilumo tyrimai buvo atlikti 29 sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir navikuose, iš kurių penkiems nustatytas heterozigotiškumo praradimas: vienam pacientui, kuriam konstatuotas G1 diferenciacijos laipsnio navikas, trims - G2 ir vienam pacientui, kuriam konstatuotas G3 diferenciacijos laipsnio navikas. Mikrosatelitinis nestabilumas tiriamiesiems nenustatytas.

6 lentelė. TH01 heterozigotiškumo praradimas priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio

	G1	G2	G3	Iš viso
Nustatytas	1	3	1	5
Nenustatytas	7	12	5	24
Iš viso	8	15	6	29
χ^2	0,21			
p	0,901			

Heterozigotiškumo praradimo priklausomybė nuo naviko diferenciacijos laipsnio nenustatyta. Literatūros duomenimis TH01 mikrosatelitinę seką galima būtų priskirti rečiau pažeidžiamų mikrosatelitinių sekų grupei [21]. Tačiau kitos mokslininkų grupės atliktų tyrimų duomenimis, nustatytas nemažas heterozigotiškumo praradimų dažnis byloja apie kaimynystėje esantį geną supresorių TSG101 (11p15) [14].



20 pav. TH01 heterozigotiškumo praradimo įtaka ligos remisijos trukmei

Iš pateiktos 20 pav. kreivės matyti, kad ilgesnė ligos remisijos trukmė būdinga pacientams, kuriems nebuvo nustatytas TH01 heterozigotiškumo praradimas. Jų ilgiausia ligos remisijos trukmė ~500 dienų, o vidutinė - 232 ± 35 dienos. Pacientams, kuriems buvo rastas pasikartojančios sekos TH01 heterozigotiškumo praradimas, ilgiausia ligos remisijos trukmė siekia tik 300 dienų, o vidutinė - 170 ± 40 dienos. Kaip matyti iš pateiktos kreivės, tik pacientams, kurių ligos remisijos trukmė ilgesnė nei 200 dienų ir nenustatytas TH01 heterozigotiškumo praradimas ilgesnio ligos remisijos laiko tikimybė yra didesnė. Tačiau gauti duomenys nėra statistiškai reikšmingi ($p=0,589$), reikalingi tolimesni tyrimai su didesne pacientų grupe.

4.6. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo analizė

MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo tyrimai atlikti 29 sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujo ėminiuose ir 58 navikinio audinio mėginiuose. Iš visų pasirinktų kraujo ėminių ir navikinio audinio mėginių buvo išskirta DNR ir RFIP metodu nustatyti kiekvieno sergančiojo MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizmo variantai (7 lent.).

7 lentelė. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje bei navikuose

	Sergantieji šlapimo pūslės vėžiu (kraujo ėminiai)	Sergantieji šlapimo pūslės vėžiu navikinio audinio mėginiai, n)	Iš viso
Tiriamoji medžiaga (n)	29	58	87
MMP-3 polimorfizmas			
5A/5A	7	16	23
5A/6A	18	35	53
6A/6A	4	7	11

Nors viename MMP-3 geno alelyje -1171 pozicijoje esant adenino delecijai (5A), lemiančiai didesnę promotoriaus aktyvumą, MMP-3 raiška didėja. Iš pateiktų duomenų (7 lent.) matyti, kad ištyrus 87 kraujo ir navikinio audinio mėginius tarp sergančiųjų vyrauja MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizmo variantas, lemiantis didesnę MMP-3 raišką.

Įvertinus MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantus sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje, gautas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp nustatytų MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantų ($p = 0,0002$) (8 lent.).

8 lentelė. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje

Sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu genotipas (kraujas)	Nustatyta	Nenustatyta	Iš viso
5A/5A	7	22	29
5A/6A	18	11	29
6A/6A	4	25	29
χ^2	16,86		
p	0,0002		

Taip pat įvertinus MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantus sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose gautas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,001$) (9 lent.).

9 lentelė. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose

Sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu genotipas (navikas)	Nustatyta	Nenustatyta	Iš viso
5A/5A	16	42	58
5A/6A	35	23	58
6A/6A	7	51	58
χ^2	31,71		
p	< 0,001		

Išanalizuota ir MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantai priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio (10 lent.).

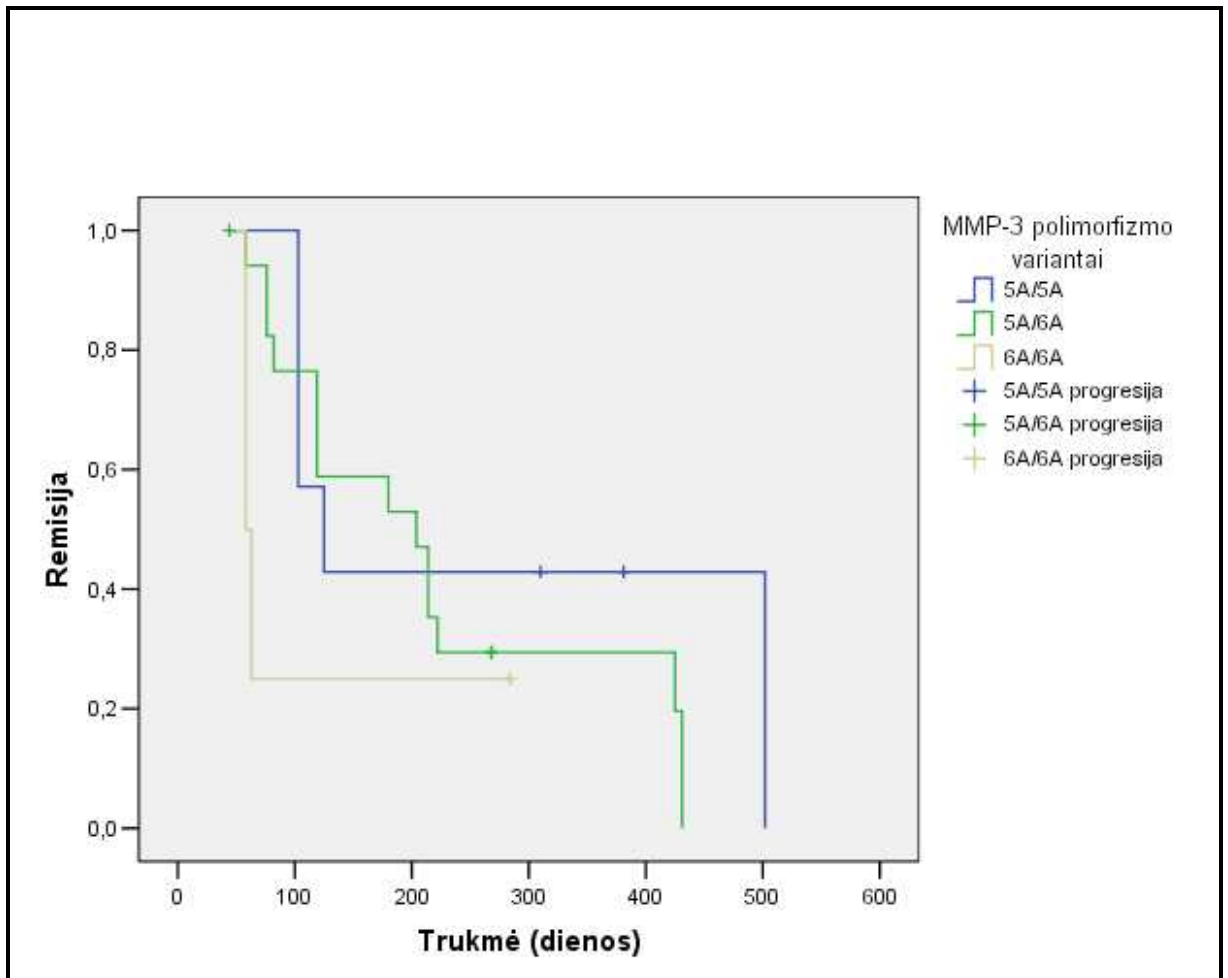
10 lentelė. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikiniame audinyje priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio

Naviko diferenciacijos laipsnis	MMP-3 POLIMORFIZMAS									χ^2	p
	5A/5A			5A/6A			6A/6A				
	1	2	Iš viso	1	2	Iš viso	1	2	Iš viso		
G1, gerai diferencijuotas	4	10	14	9	5	14	1	13	14	4,28	0,117
G2, vidutiniškai diferencijuotas	5	23	28	19	9	28	4	24	28	22,6 1	<0,001
G3, blogai diferencijuotas	7	9	16	7	9	16	2	14	16	4,69	0,096

Pastaba: 1 – MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmas nustatytas, 2 – nenustatytas.

Iš pateiktų duomenų matyti, kad statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,001$) gautas esant vidutiniškai diferencijuotam (G2) navikui. Literatūros šaltiniuose neradome darbų, kuriuose būtų tirtas MMP-3 polimorfizmas sergant šlapimo pūslės vėžiu. Tačiau yra darbų, kuriuose autoriai teigia, kad didesnę MMP-3 raišką strominėse ląstelėse galima būtų susieti su blogesne sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu ligos prognoze [59].

Taigi palyginta MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantų įtaka ligos remisijos trukmei (21 pav.).



21 pav. MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantų įtaka ligos remisijos trukmei

Išanalizavus gautus duomenis akivaizdu, kad ilgiausia remisijos trukmė būdinga pacientams, kuriems nustatytas 5A/5A MMP-3 polimorfizmo variantas, tačiau tai nekoreliuoja su teiginiu, kad nors viename geno alelyje esant adenino delecijai (5A) didėja MMP-3 raiška ir skatinamas naviko augimas ir metastazavimas. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp tirtų MMP-3 polimorfizmo variantų negauta ($p=0,263$).

4.7. MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo analizė

MMP-9 geno promotorinėje dalyje -1562 pozicijoje galimo vieno nukleotido polimorfizmo (-1562 C/T) tyrimai atlikti 29 kraujo ėminiuose ir 58 navikinės medžiagos mėginiuose. Iš visų pasirinktų kraujo ėminių ir navikinio audinio mėginių buvo išskirta DNR ir RFIP metodu nustatyti kiekvieno sergančiojo MMP-9 -1562 C/T polimorfizmo variantai. Rezultatai pateikti 11 lentelėje.

11 lentelė. MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje bei navikuose

	Sergantieji šlapimo pūslės vėžiu (kraujo ėminiai)	Sergantieji šlapimo pūslės vėžiu navikinio audinio mėginiai, n)	Iš viso
Tiriamoji medžiaga (n)	29	58	87
MMP-9 polimorfizmas			
C/C	12	30	42
C/T	14	24	38
T/T	3	4	7

Iš pateiktų duomenų (11 lent.) matyti, kad ištyrus 87 kraujo ir navikinio audinio mėginius vyrauja MMP-9 -1562 polimorfizmo variantas C/C.

Įvertinus MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantus sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu gautas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp 29 tirtų kraujo ėminių (p = 0,005) (12 lent.)

12 lentelė. MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje

Sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu genotipas (kraujas)	Nustatyta	Nenustatyta	Iš viso
C/C	12	17	29
C/T	14	15	29
T/T	3	26	29
χ^2	10,66		
p	0,005		

Įvertinus MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantus sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose gautas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp 58 tirtų navikinės medžiagos mėginių (p < 0,0001) (13 lent.)

13 lentelė. MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose

Sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu genotipas (navikas)	Nustatyta	Nenustatyta	Iš viso
C/C	30	28	58
C/T	24	34	58
T/T	4	54	58
χ^2	28,76		
p	< 0,0001		

Taip pat palyginome galimus MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantus navikinio audinio mėginyje priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio (14 lent.).

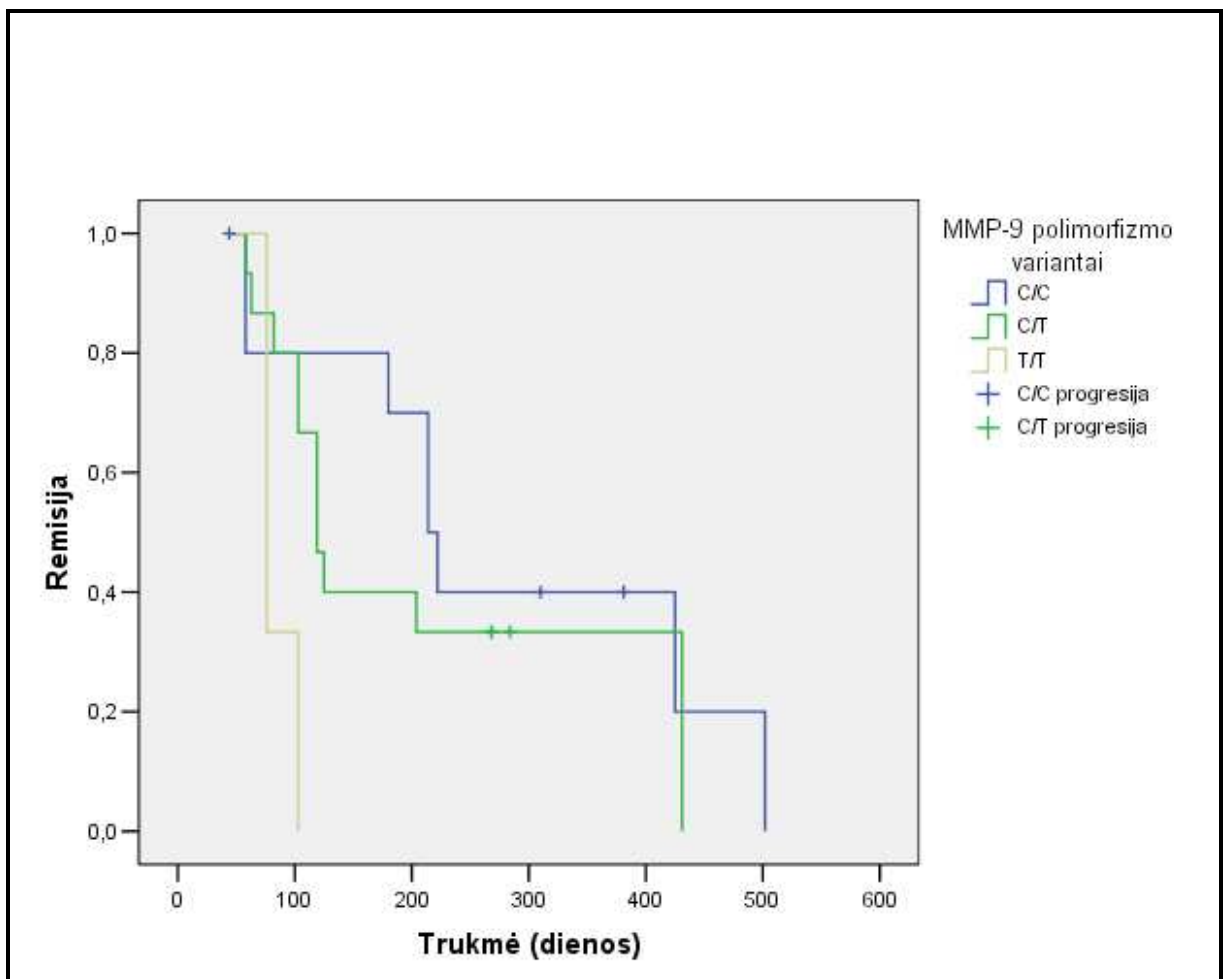
14 lentelė. MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu navikuose priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio

Naviko diferenciacijos laipsnis	MMP-9 POLIMORFIZMAS									χ^2	p
	C/C			C/T			T/T				
	1	2	Iš viso	1	2	Iš viso	1	2	Iš viso		
G1, gerai diferencijuotas	5	9	14	8	6	14	1	13	14	7,93	0,018
G2, vidutiniškai diferencijuotas	12	16	28	13	15	28	3	25	28	9,75	0,007
G3, blogai diferencijuotas	13	3	16	3	13	16	0	16	16	26,06	<0,0001

Pastaba: 1 – MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmas nustatytas, 2 – nenustatytas.

Statistiškai reikšmingi skirtumai ($p = 0,018$, $p = 0,007$ ir $p < 0,0001$) gauti esant visiems naviko diferenciacijos laipsniams. Literatūros duomenimis, MMP-9 gali būti prognostiniu žymeniu diagnozuojant šlapimo pūslės vėžį ankstyvose stadijose [58]. Kadangi MMP-9, skaidydama ekstraląstelinį užpildą ir BM komponentus, padeda navikinėms ląstelėms plisti į tolimesnes organizmo vietas, todėl svarbu nustatyti šio fermento geno

promotorinės dalies (-1562 C/T) polimorfizmą, siekiant sužinoti, kokios fermento raiškos (padidėjusios ar sumažėjusios) galima tikėtis ligos metu.



22 pav. MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantų įtaka ligos remisijos trukmei

Išanalizavus gautus duomenis matyti, kad ilgiausias remisijos laikas būdingas MMP-9 C/C polimorfizmo variantui, kuris nenulemia didesnės MMP-9 raiškos. Vidutinė remisijos trukmė C/C polimorfizmo variantui 280 ± 55 dienos. T/T polimorfizmo varianto, kuris lemia padidėjusia MMP-9 ekspresiją, vidutinė remisijos trukmė tik 85 ± 9 dienos. Gautų duomenų statistinis reikšmingumo koeficientas $p=0,038$.

5. IŠVADOS

- Panaudojus PGR, vertikalios ir kapiliarinės elektroforezės metodus nustatyti šeši CYAR04, du D13S317, vienas I-FABP ir penki TH01 žymenų heterozigotiškumo praradimo atvejai 29 pacientų sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu grupėje.
- Kaplan-Meier metodu įvertinta ligos remisijos trukmės priklausomybė nuo heterozigotiškumo praradimo, ligos stadijos ir naviko diferenciacijos laipsnio, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo negauta.
- Nustatyti visi MMP-3 (-1171 5A/6A) polimorfizmo variantai sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir įvairių diferenciacijos laipsnių (G1, G2, G3) navikuose: statistiškai reikšmingas skirtumas gautas esant vidutiniškai diferencijuotam navikui (G2).
- Trys MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmo variantai (C/C, C/T ir T/T) identifikuoti sergančiųjų šlapimo pūslės vėžiu kraujyje ir įvairių diferenciacijos laipsnių (G1, G2, G3) navikuose: statistiškai reikšmingas skirtumas gautas esant visiems diferenciacijos laipsniams.
- Nustatyta statistiškai reikšminga ligos remisijos priklausomybė nuo MMP-9 polimorfizmo variantų.

Microsatellite Instability and Matrix Metalloproteinases Polymorphism Analysis in Cancer Patients Tumours and Blood

SUMMARY

Carcinoma of bladder is one of the leading causes of death. Successful treatment of bladder cancer depends on the early detection and specific diagnostic approaches. In the present study, microsatellite instability (MSI) and matrix metalloproteinases (MMPs) polymorphism has been evaluated as a prognostic marker in patients with bladder cancer.

Microsatellites are short sequences of 1-6 bp repeated in tandem throughout the genome, and because of their polymorphic nature, they have been widely used as genetic markers. The detection of genomic instability is an important step in molecular analysis of tumourgenesis. Analysis of highly polymorphic microsatellite loci not only provides information about microsatellite instability but also allows the detection of allelic deletion in tumour cells.

Ample evidence indicates that MMPs also contribute in multiple ways to all stages of malignant progression, including tumor invasion, blood vessel penetration, metastases and tumor angiogenesis. A number of DNA polymorphisms in the MMP genes are associated with differences in MMP activity. Five or six adenosines (5A or 6A) single nucleotide polymorphism (SNP) at position -1171 in the MMP-3 promoter and a cytosine (C) - thymidine (T) single nucleotide polymorphism (SNP) at position -1562 in the MMP-9 promoter are reported to affect expression of these genes. However, the relationship between the polymorphism and susceptibility of the cancer remains ambiguous.

The aim of this study was to examine the specific microsatellite markers and to determine the prevalence of a single nucleotide polymorphism (-1171 5A/6A) in the MMP-3 and (-1562 C/T) in the MMP-9 gene promoters, and evaluate these polymorphisms on clinical stage.

PCR and capillary electrophoresis method was used to determine microsatellite status in 29 bladder cancer patients tumours and blood. PCR-RFLP method was used for MMP-3 and MMP-9 polymorphisms identifications.

Significant association was found between tumour differentiation degree and analyzed polymorphisms in bladder cancer.

LITERATŪROS SĄRAŠAS:

1. Pan H, Califano J, Ponte JF, Russo AL, Cheng KH, Thiagalingam A, Nemani P, Sidransky D, Thiagalingam S. Loss of Heterozygosity Patterns Provide Fingerprints for Genetic Heterogeneity in Multistep Cancer Progression or Tobacco Smoke-Induced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*. 2005; 65(5):1664-9.
2. Rogowski M, Walenczak I, Pepinski W, Skawronska M, Sieskiewicz A, Klatka J. Loss of heterozygosity in laryngeal cancer. *Annales Academiae Medicae Bialostocensis*. 2004; 49:262-4.
3. Greenlee KJ, Werb Z, Kherdmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious and multifaceted. *Physiological review*. 2007; 87:69-98.
4. Zhao GR, Yang F, Yuan YJ, Gao XM, Zhang JP. Progress in detection methods of single nucleotide polymorphisms. *Yi Chuan* 2005; 27(1):123-9.
5. <http://www.genomesize.com>
6. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5:435-45.
7. Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(12):973-82.
8. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*, 3rd ed. Garland Sciences. 2004: 240-73.
9. Gilmore S, Peakall R, Robertson J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis Sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Science International*. 2003; 131(1):65-74(10).
10. Rubocki RJ, Duffy KJ, Shepard KL, McCue BJ, Shepard SJ, Wisecarver JL. Loss of heterozygosity detected in a short tandem repeat (STR) locus commonly used for human DNA identification. *Journal of Forensic Science*. 2000; 40:1087-89.
11. Subramanian S, Mishra RK, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biology*. 2003; 4:R13.
12. Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eucariotic genomes. Survey and analysis. *Genome Research*. 2000; 10:967-81.

13. Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee A, Mohyuddin A. A comprehensive survey of human Y-chromosomal satellites. *The American Journal of Human Genetics*. 2004; 71:1183-97.
14. Powierska-Czarny j, Sliwka DM, Czarny J, Grzybowski T, Wozniak M, Drewa G, Czechowicz W, Sir J. Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer with the use of a well characterized multiplex system. *Acta Biochimica Polonia*. 2003; 50 (4):1195-203.
15. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics 3*. Longon Garland Science. 2004; 1-696.
16. Knudson AB. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971; 68:820-3.
17. Kersemaekers AMF, Kenter GG, Hermans J, Fleuren GJ, Vijver MJ. Allelic loss and prognosis in carcinoma of the uterine cervix. *International Journal of Cancer*. 1999; 79(4):411-7.
18. <http://www.cstl.nist.gov/biotech>.
19. Kram A, Li L, Zhang RD, Yoon DS, Ro JY, Jonston D, Grossman HB, Scherer S, Czemiak B. Mapping and Genome Sequence Analysis of Chromosome 5 Regions Involved in Bladder Cancer Progression. *Laboratory Investigation*. 2001; 81(7):1039-48.
20. Knobloch R, Konrad L, Bartz J. P, Brandt H, Wille S, Heidenreich A, Moll R, Hofmann R. Genetic Pathways and New Progression Markers for Prostate Cancer Suggested by Microsatellite Allelotyping. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10:1064-73.
21. Kalfoglou EA, Faikoglu R, Ozcan S, Petridis G, Yukseloglu H, Atasoy S. DNA analysis as a tool for breast cancer malpractice determination: An interdisciplinary approach. *Oncology Reports*. 2006; 16:203-6.
22. Peloso G, Grignani P, Rosso R, Previdere C. Forensic evaluation of tetranucleotide STR instability in lung cancer. *International Congress Series*. 2003; 1239:719-21.
23. Yamashita K, Yasuda S, Kuba T, Otani Y, Fujiwara M, Oukayasu I. Unique characteristics of rectal carcinoma cell lines derived from invasive carcinomas in ulcerative colitis patients. *Cancer Sci* 2004; 95(3):211-7.
24. Jones T, Mingsheng W, Sung MT, Shaobo Z, Ulbright TM, Eble JN, Beck S, Foster RS, Anagnostou JJ, Conner C, Liang C. Clonal origin of metastatic testicular teratomas. 2006; 12(18):5377-83.

25. Karan D, Schmied BM, Dave BJ, Wittel UA, Lin MF, Batra S. Decreased androgen-responsive growth of human prostate cancer is associated with increased genetic alterations. *Clinical Cancer Research*. 2001; 7:3472-80.
26. Gryfe R, Kim H, Hseih ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2000; 342(2):69-77.
27. Vaish M, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumours: a clinical significance. *BMC Urology*. 2005; 5(2).
28. Masters JR, Thomson JA, Daly-Bruns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, Toji LH, Ohno T, Tanabe H, Arlett CF, Kelland LR, Harrison M, Virmani A, Ward TH, Ayres KL, Debenham PG. Short tandem repeat profiling an international reference standard for human cell lines. *PNAS*. 2001; 98(14):8012-7.
29. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, function and biochemistry. *Circulation Research* 2003; 92:827-39.
30. Kridel SJ, Sawai H, Ratrikov BI, Chen EI, Li W, Godzik A, Strongin AY, Smith JW. A unique substrate binding mode discriminates membrane type-1 matrix metalloproteinase from other matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(26):23788-93.
31. Lafleur MA, Madeleine M, Edwards DR, Edwards H. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med.* 2003; Vol. 5, DOI: 10.1017/S1462399403006628.
32. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *The International Journal of Development Biology* 2004; 48: 411-24.
33. Smolarz B, Szylo K, Romanowicz-Makowska H, Niewimdomski M, Kozłowska E, Kulig A. PCR Analysis of Matrix Metalloproteinase 3 (MMP-3) Gene Promoter Polymorphism in Ovarian Cancer. *Pol J Pathol* 2003; 54(4):233-8.
34. Zinzindohoue F, Lecomte T, Ferraz JM, Houllier AM, Cugnenc PH, Berger A, Blons H, Laurent-Puig P. Prognostic Significance of MMP-1 and MMP-3 Functional Promoter Polymorphisms in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11:594-9.
35. Kumar V, Fausto N, Abbas A, editors. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, 2005.

36. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001; 17:463-516.
37. Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, Nakachi K, Matsusaki K, Chayama K, Yasuiet W. 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; 131:19-25.
38. Fong YC, Dutton CM, Cha SS, Garamszegi N, Sim FH, Scully SP. Absence of a Correlation between the Presence of a Single Nucleotide Polymorphism in the Matrox Metalloproteinase 1 Promoter and Outcome in Patients of Chondrosarcoma. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:7329-34.
39. Buckland PR. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762:17-28.
40. Su L, Zhou W, Park S, Wain JC, Lynch TJ, Liu G, Christiani DC. Matrix Metalloproteinase-1 Promoter Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2005; 14(3):567-70.
41. Nishioka Y, Sagae S, Nishikawa A, Ishioka S, Kudo R. A relationship between Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression. *Cancer Letters* 2003; 200(1): 49-55.
42. Wyatt CA, Coon CI, Gibson JJ, Brinckerhoff CE. Potential for the 2G Single Nucleotide Polymorphism in the Promoter of Matrix Metalloproteinase to Enhance Gene Expression in Normal Stromal Cells. *Cancer Research* 2002; 62:7200-2.
43. Fang S, Jin X, Wang R, Li Y, Gou W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Zhang J. Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in North China. *Carcinogenesis* 2005; 26(2):481-6.
44. Zhou Y, Yu C, Miao X, Tan W, Liang G, Xiong P, Sun T, Lin T. Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes. *Carcinogenesis* 2004; 25(3):399-404.
45. Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W, Zhang L, Lin D. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Research* 2002; 62:6430-33.
46. Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Liang G, Lu W, Lin D. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of

- development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Research* 2003; 63:3987-90.
47. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Koppel H, Leithner A, Wascher TC, Paulweber B, Samonigg H. The 5A/6A Polymorphism of the Matrix Metalloproteinase 3 Gene Promoter and Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2004;10:3518-20.
 48. Ribbens C, Martin Y, Franchimont N, Kaiser M, Jaspard J, Damas P, Houssiau F, and Malaise M. Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(2):161-6.
 49. Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Misima M. Matrix Metalloproteinase-9 Promoter Polymorphism Associated with Upper Lung Dominant Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1378-82.
 50. Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Ma H, Zhu J, Wei Q, Shen H. Functional Polymorphisms of Matrix Metalloproteinase-9 Are Associated with Risk of Occurrence and Metastasis of Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(15):5433-8.
 51. Fiotti N, Zivadinov R, Altamura N, Nasuelli D, Bratina A, Tommasi MA, Bosco A, Locatelli L, Grop A, Cazzato G, Guarnieri A, Giansante C, Zorzon M. MMP-9 microsatellite polymorphism and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2004; 152: 147-53.
 52. Shin A, Cai Q, Shu XO, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in the matrix metalloproteinase 12 gene (MMP-12) and breast cancer risk and survival: the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Research* 2005; 7:506-12.
 53. Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, Sandford AJ. The role of matrix metalloproteinase polymorphism in the rate of decline in lung function. *Human Molecular Genetics* 2002; 11(5):569-76.
 54. Yan J, Hales BF. Activator protein-1 (AP-1) DNA binding activity is induced by hydroxyurea in organogenesis stage mouse embryos. *Toxicological Sciences* 2005; 85:1013-23.
 55. Zhang B, Dhillon S, Geary, Howell WM, Iannotti F, Day INM, Ye S. Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2001; 32:2198-202.
 56. Parc Y, Gueroult S, Mourra N, Serfaty L, Flejou JF, Tiret E, Parc R. Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut.* 2004; 53:371-5.

57. Liu D, Wada I, Tateno H, Ogino D, Suzuki M, Li L, Lu W, Kojiro M, Fukayama M, Okabe H, Fukumoto M. Allelotypic, Characteristics of Thorotrast-Induced Intrahepatic cholangiocarcinoma: Comparison to Liver Cancers not Associated with Thorotrast. *Radiation Research*.2004; 161(2):235-43.
58. Sier CFM, Casetta G, Verheijen JH, Tizzani A, Agape V, Kos J, Blasi F, Hanemaaijer R. Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clinical Cancer Research* 2000; 6:2333-40.
59. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Anastasios Z, Ioanna G, Constantinos C, Andreas L, Helen L, George K, Constantinos D. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 Proteins in Bladder cancer: A Comparison With Clinicopathologic Features and Survival. *Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2001; 9(2):130-7.
60. Stembalska A, Blin N, Ramsey D, Sasiadek MM. Three distinct regions of deletion on 13q in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncology Reports* 2006; 16:417-21.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto dekanai hab.dr., prof. Zitai Aušrelei Kučinskienei už suteiktą galimybę studijuoti magistrantūroje.

Taip pat dėkoju savo darbo vadovėms H. P. J. Didžiapetrienei ir j. m. d. D. Stančiūtei už vadovavimą ir suteiktas žinias, už palaikymą, visokeriopą pagalbą atliekant tyrimus ir rašant šį darbą.

Esu dėkinga Vilniaus Universiteto Onkologijos instituto molekulinės onkologijos laboratorijos vedėjui už galimybę atlikti magistro darbą šioje laboratorijoje ir laboratorijos darbuotojams, už pasidalinimą patirtimi ir už pagalbą atliekant tyrimus.