

The Role of TIMP-2 Gene in Skin Cancer

Negar Zoghaghi¹,
Elham Moslemi²,
Hamid Reza Kheiri Manjili³

¹MSc in Molecular Cell Biology, Faculty of Biology, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran

³Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

(Received February 25, 2016 ; Accepted September 6, 2016)

Abstract

Background and purpose: Skin cancer is one of the most common types of cancer. Several studies suggest a high incidence of skin cancer in most countries. *TIMP-2* is the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase and exist in both cancer and normal cells. The aim of this study was to investigate the expression of *TIMP-2* gene in patients with skin cancer and evaluating the association between the expression of this gene and the disease progression.

Materials and methods: In this study 60 FFPE samples of skin cancer (n=30) and noncarcinoma cases (n=30) were collected from Tehran Milad Hospital. The cancer patients aged 30 to 80 years old. RNA was extracted using RNX solution, and then cDNA synthesis was carried out by Oligo dT and Random Hexamer primers and MMuV enzyme. The gene expression was evaluated by Real-time PCR.

Results: The *TIMP-2* gene expression in carcinoma samples increased 1.13 folds compared to normal tissue samples. Also a direct correlation was seen between tumor size and *TIMP-2* gene expression. In fact the gene expression in tumors= 2 cm was more than 6.72 compared with normal samples (P<0.0005). The mean expression levels of *TIMP-2* gene in tumors<1 cm and 1-2 cm were 0.57 and 1.003, respectively (P< 0.001). Moreover, the *TIMP-2* gene expression was found to be higher in male.

Conclusion: According to current findings, expression of *TIMP-2* gene has a considerable role in skin cancer development. In other words, the gene expression increases by increase in tumor size and patients age. So, it seems that *TIMP-2* gene expression could be a reliable biomarker for evaluation of skin cancer in early stages.

Keywords: *TIMP-2*, skin neoplasms, Real-time PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 38-44 (Persian).

نقش ژن *TIMP-2* در سرطان پوستنگار ذقانی^۱الهام مسلمی^۲حمیدرضا خیری منجیلی^۳

چکیده

سابقه و هدف: امروزه سرطان پوست شایع ترین نوع سرطان است و بررسی انجام شده در اکثر کشورها حکایت از شیوع بالای سرطان پوست دارد. ژن *TIMP-2* به عنوان مهارکننده بافتی ماتریکس متالوپروتئیناز است و هم در سلول‌های سرطانی و هم در سلول‌های سالم بیان می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن *TIMP-2* در افراد مبتلا به سرطان پوست و هم چنین بررسی ارتباط پیشرفت بیماری با میزان بیان این ژن بوده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه موردی- شاهدی حاضر تعداد ۶۰ نمونه بلوک پارافینه شامل ۳۰ نمونه از افراد مبتلا به سرطان در بازه سنی ۳۰ تا ۸۰ سال و ۳۰ نمونه از افراد نرمال از بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری گردید. RNA نمونه‌ها به کمک محلول RNX-PLUS استخراج شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای Oligo dT و Random Hexamer و آنزیم MMuLV انجام شد. بیان ژن *TIMP-2* با کمک Real-time PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: با ارزیابی بیان ژن *TIMP-2* مشخص گردید که بیان این ژن ۱/۱۳ برابر نسبت به نمونه‌های نرمال افزایش یافته بود ($p < 0/001$). علاوه بر این بین اندازه تومور و میزان بیان ژن *TIMP-2* رابطه معناداری وجود داشت به طوری که میزان بیان ژن *TIMP-2* برای تومورها با اندازه بیش تر از ۲ سانتی متر برابر با ۶/۷۲ نسبت به نمونه‌های نرمال ($p < 0/0005$) و میانگین بیان ژن برای تومورها با اندازه کم تر از ۱ سانتی متر و بین ۱ تا ۲ سانتی متر به ترتیب ۰/۵۷ و ۱/۰۳ بود ($p < 0/001$). هم چنین در مردان میزان بیان ژن *TIMP-2* بیش از زنان بود.

استنتاج: ژن *TIMP-2* در پیشرفت سرطان پوست می‌تواند نقش موثری داشته باشد به طوری که با افزایش اندازه تومور و سن بیمار میزان بیان ژن *TIMP-2* افزایش یافت. در نهایت به نظر می‌رسد که بیان ژن *TIMP-2* می‌تواند به عنوان بیومارکر قابل اعتماد برای ارزیابی سرطان پوست در مراحل اولیه بیماری باشد.

واژه های کلیدی: سرطان پوست، *TIMP-2*، Real Time PCR

مقدمه

عمومی در ایران است و شایع ترین سرطان در کشور ما می‌باشد. سرطان پوست ملانوما (Melanoma Skin Cancer) و غیر ملانوما (Non Melanoma Skin Cancer) امروزه

سرطان پوست شایع ترین سرطان در جهان است. این سرطان رتبه اول در بین مردان و رتبه دوم در بین زنان را به خود اختصاص داده است. سرطان پوست یک مشکل سلامت

E-mail: elham_moslemi60@yahoo.com

مؤلف مسئول: الهام مسلمی - تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق (قیامدشت)، گروه زیست شناسی

۱. کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق (قیامدشت)، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق (قیامدشت)، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه نانوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۱/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۱۶

شایع‌ترین نوع سرطان پوست در میان سفیدپوستان می‌باشند و علاوه بر این شایع‌ترین سرطان در کشور ما نیز محسوب می‌شوند. به‌طور کلی میزان شیوع سرطان پوست در ایران ۱۰/۱۳۳۹ در هر ۱۰۰ هزار نفر است. میزان شیوع برای (Basal Cell Carcinoma) BCC ۷/۵۳ و برای (Squamous Cell Carcinoma) SCC ۱/۷۹ و برای ملانوما ۰/۳۹ از هر ۱۰۰ هزار نفر می‌باشد. ایستگاه تحقیقاتی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران در بابل به عنوان یک مرکز ثبت سرطان در منطقه شمالی ایران فعالیت می‌کند. طبق آمار این مرکز سرطان غیرملانومایی پوست جزء سرطان‌های شایع منطقه شمالی است و حتی در طی سالیان اخیر موارد گزارش شده آن افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است به‌طوری‌که از سال ۱۳۷۷ تا سال ۱۳۸۳ میزان آن حدود ۲/۵ برابر شده است (۱). سرطان پوست معمولاً در لایه بیرونی پوست به وجود می‌آید و ممکن است ابتدا به صورت یک تورم، برآمدگی و یا بخشی متفاوت با سایر بخش‌های پوست ظاهر شود (۲). سرطان پوست به دو نوع سرطان ملانوما و غیر ملانوما تقسیم می‌شود. سرطان غیر ملانومایی پوست (NMSC) به دو نوع BCC و SCC تقسیم می‌شود (۳). افزایش شیوع سرطان پوست به دلیل مواجهه طولانی مدت با نور خورشید و یا تماس با اشعه UV، عوامل ژنتیکی و برخی عوامل دیگر است (۴). اختلال در مسیر Hedgehog-Patched در ایجاد سرطان پوست نقش کلیدی دارد. در این مسیر سیگنالینگ، تومور ساپرسور *PTCH* نقش مهمی دارد. علاوه بر این جهش در تومور ساپرسور *P53* در ۵۰ درصد بیماران مبتلا به BCC یافت شده است. مطالعات نشان داده‌اند که سطح بیان تلومرز در مقایسه با سایر سرطان‌ها در BCC بیش‌تر است و هم‌چنین پروتئین BCL-2 که یک مهارکننده شناخته شده آپوپتوز است نیز به صورت دائمی بیان می‌شود (۵). تهاجم تومور، متاستاز و آنژیوژنز نیازمند تجزیه ماتریکس خارج سلولی (Extra Cellular Matrix) و افزایش بیان ماتریکس متالوپروتینازها (MMPs) می‌باشد. ماتریکس متالو

پروتینازها یا همان MMPها از خانواده آنزیم‌های وابسته به روی هستند که توانایی تجزیه ECM را دارند و فعالیت آن‌ها توسط مهارکننده‌های بافتی ماتریکس متالوپروتینازها یا همان TIMPها (Tissue Inhibitors of Matrix Metallo Proteinases) مهار می‌شود. TIMPها پروتئین‌های ترشحی با وزن مولکولی کم هستند که به فرم فعال MMPها متصل شده و مهارکننده فعالیت آنزیمی آن‌ها می‌باشند (۶). TIMPها در اکثر بافت‌ها و مایعات بدن به شکل محلول وجود دارند و تفاوت آن‌ها در توزیع بافتی است. چهار ژن پارالوگ هستند و شامل *TIMP-1*، *TIMP-2*، *TIMP-3* و *TIMP-4* می‌باشند. *TIMP-2* عضو منحصر به فرد از خانواده TIMPها می‌باشد و روی کروموزوم ۱۷ در موقعیت 17q25 قرار دارد و دارای ۵ ناحیه اگزون است (۷). ژن *TIMP-2* علاوه بر مهار MMPها به طور انتخابی با MT1-MMP واکنش می‌دهد تا فعالیت Pro-MMP2 را تسهیل کند. بنابراین عملکرد *TIMP-2* هم به عنوان مهارکننده MMPها است و هم برای فعالیت Pro-MMP2 نیاز است (۸).

تعادل بین MMP و TIMP در فعالیتهای فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی بدن ضروری است و عدم تعادل بین MMP و TIMP می‌تواند به تهاجم تومور، متاستاز و آنژیوژنز منجر شود و این عدم تعادل با ایجاد سرطان‌های متفاوتی مانند ریه، کولون، سینه و پروستات ارتباط دارد. مطالعات نشان داده‌اند که بین بیان *TIMP-2* و متاستاز تومورها رابطه عکس وجود دارد (۹). به‌طور کلی به نظر می‌رسد ژن *TIMP-2* به عنوان یک شاخص مهم در پیش‌بینی، تشخیص و بررسی پیشرفت سرطان پوست و هم‌چنین به عنوان یک فاکتور آگاهی‌دهنده در مراحل ابتدایی بیماری می‌تواند باشد. تا کنون در ایران مطالعاتی در زمینه بررسی میزان بیان ژن *TIMP-2* در نمونه‌های افراد مبتلا به سرطان پوست صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه شناسایی ژن *TIMP-2* به عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص اولیه و زود هنگام در افراد

در نهایت پرایمرهای طراحی شده توسط NCBI و برنامه Gene Runner، Blast گردیدند تا دقت و اختصاصیت آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. توالی و مشخصات پرایمرها در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است.

جدول شماره ۱: توالی و مشخصات پرایمرهای ویژه Real timePCR

نام پرایمر	انحازه محصول PCR
<i>TIMP-2 F</i>	88bp CCCAGAAGAAGAGCTGAAC
<i>TIMP-2 R</i>	GAGGAGATGTAGCACGGGAT
<i>GAPDH F</i>	124bp ATGGAGAAGGCTGGGGCT
<i>GAPDH R</i>	ATCTTGAGGCTGTGTGCATACCTTCTC

انجام واکنش Real-time PCR

تعیین کمیت نسبی در Real timePCR به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایر گرین با استفاده از دستگاه Step one-ABI 7500 انجام گرفت. اجزای واکنش Real timePCR در حجم نهایی ۲۰ μL و شامل SYBR TM(2X) Master Mix و Forward and Reverse Primers (0.4 μM) با برنامه دمایی به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد (۹). در نهایت نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار Graph pad و با آزمون One way ANOVA آنالیز و نمودار آن رسم گردید.

یافته‌ها

نمونه‌های جمع‌آوری شده براساس سن شامل ۱۷ نمونه بالای ۶۵ سال و ۱۳ نمونه کم‌تر از ۶۵ سال، براساس جنسیت شامل ۲۵ نمونه مرد و ۵ نمونه زن بودند و در ۱۵ نمونه اندازه تومورها بین ۱ الی ۲ سانتی‌متر، در ۷ نمونه اندازه تومورها کم‌تر از ۱ سانتی‌متر و در ۸ نمونه اندازه تومورها بیش‌تر از ۲ سانتی‌متر بود. با توجه به این نکته که از رنگ فلوروسانت سایر گرین استفاده شده است، به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها و رنگ فلورسانس (SYBER green) و اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیر اختصاصی

مبتلا به سرطان پوست با تکنیک Real-time PCR بوده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه موردی - شاهدی ۳۰ بلوک پارافینه فرد مبتلا به سرطان پوست پس از بررسی توسط متخصص پاتولوژی و ۳۰ نمونه از افراد سالم از بیمارستان میلاد تهران از سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۲ جهت برش‌گیری انتخاب و جمع‌آوری گردید. طیف سنی افراد انتخاب شده ۳۰ تا ۸۰ سال بود. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال داده شدند و بلافاصله مراحل استخراج RNA روی آن‌ها انجام گرفت.

استخراج RNA

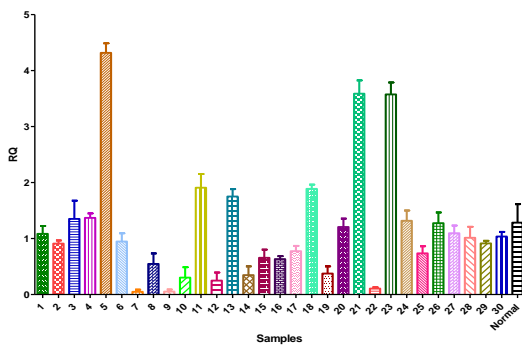
جهت استخراج RNA از بافت پارافینه، ابتدا توسط دستگاه میکروتوم برش‌ها با اندازه ۱۰ میکرون از بافت پارافینه تهیه گردید. برای انجام پارافین‌زدایی و استخراج RNA از محلول RNX-Plus (CinnaGene, Iran) استفاده شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی و تایید گردید (۹).

سنتز cDNA

مواد مورد نیاز جهت سنتز cDNA شامل ۰/۵ Mm dNTP، ۰/۲ μg Random Hexamer، ۰/۵ μg Oligo dT، ۱۰۰U آنزیم (M-MuLV) می‌باشد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۹).

طراحی پرایمر

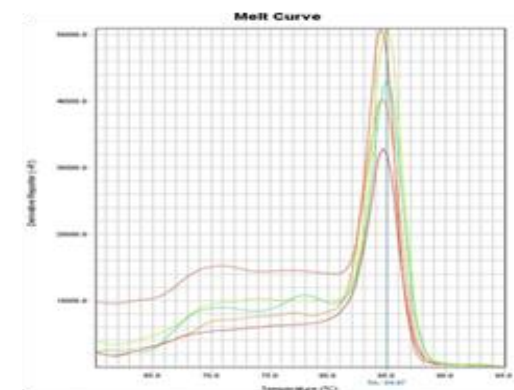
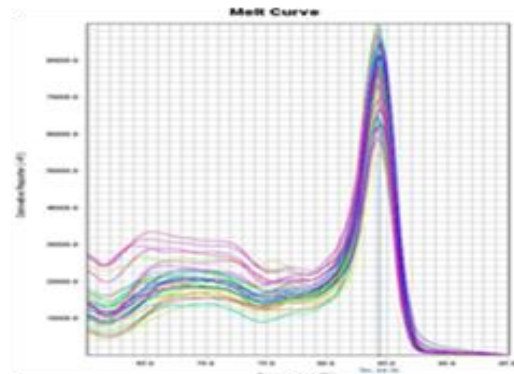
توالی ژن *TIMP-2* و گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده بود از سایت NCBI به دست آمد. سپس توسط برنامه Primer Express پرایمرهای اختصاصی که به صورت exon-exon junction بود، طراحی گردید.



نمودار شماره ۲: آنالیز بررسی بیان ژن TIMP-2 در نمونه های بیمار نسبت به کنترل RQ: میزان بیان ژن TIMP-2

در تصویر شماره ۲ مشاهده می شود که اکثر نمونه های بیمار در مقایسه با نمونه نرمال افزایش بیان نشان می دهند که در این امر نمونه های نرمال در فرمول RQ برابر با ۱ بوده که با رنگ سیاه در سمت راست نمودار مشخص شده و تمام نمونه ها نسبت به نمونه های نرمال سنجیده میشوند. در میان نمونه های بررسی شده سه نمونه افزایش بیان بالایی را برای ژن TIMP-2 نشان دادند که نمونه های شماره ۵، ۲۱ و ۲۳ بودند. هر سه نمونه متعلق به مردان بالای ۷۰ سال و مبتلا به BCC و اندازه تومور در هر سه نمونه بیش تر از ۲ سانتی متر بود که می توان ادعا کرد بین افزایش اندازه تومور و سن بیمار با افزایش بیان ژن TIMP-2 ارتباط معنی داری وجود دارد. این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن TIMP-2 با افزایش سن افزایش می یابد. میزان بیان ژن در افراد بیمار با سن کم تر از ۶۵ سال به صورت میانگین ۱/۰۵ برابر، نسبت به افراد نرمال افزایش یافته بود و در افراد بالای ۶۵ سال این مقدار به ۱/۳۵ برابر نسبت به افراد نرمال تغییر و افزایش بیان نشان داده است. این طبقه بندی فقط با گروه سنی افراد انجام شده و هیچ فاکتور دیگری در نظر گرفته نشده است. در طی بررسی های انجام شده مشخص شد که بین اندازه تومور و میزان بیان ژن TIMP-2 رابطه مستقیمی وجود دارد. در تومورها با اندازه بیش تر از ۲ سانتی متر بیش ترین بیان برای ژن TIMP-2 مشاهده شد.

در محصول PCR، نمودار منحنی ذوب برای ژن TIMP-2 و GAPDH (نمودار شماره ۱) به صورت جداگانه توسط دستگاه Real time PCR (Step One) رسم گردید که این امر تاییدی بر پیوند صحیح پرایمرها به ژن TIMP-2 می باشد.



نمودار شماره ۱: آنالیز منحنی ذوب برای دو ژن مورد مطالعه A: ژن TIMP-2 , B: GAPDH

ct نمونه ها پس از انجام واکنش تکثیر توسط دستگاه محاسبه و به RQ (Relative quantification) یا میزان بیان تبدیل شد و سپس اندازه گیری میزان بیان ژن با روش $\Delta\Delta CT$ انجام شد. میزان بیان نمونه های بیمار به صورت مقایسه ای با نمونه های نرمال بیان گردید که در این امر نتایج به دست آمده نسبت به میزان بیان همان ژن در بافت نرمال می باشد. RQ نمونه ها توسط دستگاه محاسبه و نمودار آن رسم گردید و نتایج به دست آمده توسط نرم افزار Graph pad نیز مجدداً رسم گردید (نمودار شماره ۲).

بحث

حضور *TIMP* ها در بافت‌های توموری مشاهده شد (۱۲).
Krengel و همکارانش با روش ایمونوهیستوشیمی به مقایسه بیان *MMP-2*، *TIMP-2* و *MTI-MMP* در ضایعات پوستی ملانوسیتی *nevi* پرداختند و به این نتیجه رسیدند که *MMP-2* توسط ضایعات کارتیوسیتی بیان می‌شوند و اشعه UV باعث تنظیم مثبت بیان این ژن می‌شود. بیان *MMP-2* در سلول‌های ملانوسیتی *nevus* مشاهده نشد ولی در مقابل، *TIMP-2* توسط سلول‌های ملانوسیتی *nevus* بیان شد و اشعه UV باعث تنظیم منفی بیان ژن *TIMP-2* نمی‌شود (۱۳).

نتایج نشان داد که میزان mRNA مربوط به *TIMP-2* در بافت‌های سرطانی و بافت‌های اطراف تومور افزایش یافته است. افزایش بیان ژن *TIMP-2* به ویژه در نمونه‌ها با اندازه تومور بیش‌تر از ۲ سانتی‌متر مشاهده شد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم دسترسی به مرحله بیماری افراد بیمار مبتلا به سرطان پوست اشاره کرد. این اولین گزارشی است که در جهان با شناسایی mRNA ژن *TIMP-2* بیان این ژن را در بافت پوست افراد مبتلا به سرطان پوست در ایران نشان داده و نقش آن را در سلول‌های بافت پوست مورد بررسی قرار می‌دهد. نتایج این مطالعه می‌تواند در پیشرفت پیش‌آگهی از سرطان موثر واقع گردد. مطالعه حاضر و نیز گزارش‌های گذشته نشان می‌دهند که پیشگویی صحیح پیامد در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان مشکل بالینی و پیچیده مطرح می‌باشد. با وجود مطالعات گسترده‌ای که در زمینه سرطان در سراسر جهان صورت گرفته، صحت عوامل تعیین شده هم‌چنان جای تردید دارد. افزون بر آن پیشرفت بیماری با افزایش خطر مرگ ناشی از این بیماری همراه می‌باشند. انجام مطالعات آتی جهت تعیین نقش عوامل مختلف بالینی و آسیب‌شناختی در جهت شناخت پیش‌آگهی سرطان پوست ضروری به نظر می‌رسد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که *TIMP-2* می‌تواند نقش مهم و موثری در تشخیص اولیه سرطان پوست به عنوان یک مارکر زیستی مستقل از مرحله

در این مطالعه برای اولین بار از بلوک‌های پارافینه جهت بررسی نقش ژن *TIMP-2* در افراد مبتلا به سرطان پوست استفاده شد. اگرچه بلوک‌های پارافینه ذخایر با ارزشی جهت بررسی بیماری می‌باشند ولی استخراج RNA از آن‌ها کاری دشوار است اما نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از بلوک‌های پارافینه نیز برای بررسی بیان ژن استفاده کرد.

Burgess و همکارانش با کمک تکنیک هیبریداسیون درجا به بررسی شناسایی محل کلاژناز و بیان ژن *TIMP* در ۱۱ نمونه از افراد مبتلا به SCC پرداختند و نشان دادند که در ۱۰ نمونه از ۱۱ نمونه SCC میزان بیان کلاژناز در استرومای فیروبلاست‌ها در بافت پیوندی مجاور تومور بالا است و هم‌چنین در سلول‌های بازولوئید توموری که در حاشیه تومور قرار دارند بیان ژن‌ها پایین‌تر است. علاوه بر این میزان بیان کلاژناز در سلول‌های نرمال پایین است و بیان ژن *TIMP* در تمام بافت‌های بررسی شده ناچیز بوده است (۱۰).

در مطالعه دیگری که توسط Wagner و همکارانش با کمک تکنیک نورترن بلات انجام شد و به بررسی بیان ژن *TIMP-2* در سرطان پوست پرداختند، نشان دادند که بیان ژن *TIMP-2* در سرطان پوست BCC به‌طور چشم‌گیری نسبت به SCC بیش‌تر است و هم‌چنین به کمک هیبریداسیون درجا مشخص شد که سلول‌های استرومای تومور منبع مهمی از *TIMP-2* هم در BCC و هم در SCC هستند (۱۱).

Varani و همکاران با بررسی افراد مبتلا به BCC با کمک روش ایمونوشیمی به مقایسه میزان *MMP-2* و *MMP-9* و *TIMP-1* و *TIMP-2* در نمونه‌های مبتلا به BCC و نمونه‌های نرمال پرداختند و به این نتیجه رسیدند که میزان بیان *MMP* ها در نمونه‌های BCC نسبت به نمونه‌های نرمال بیش‌تر بود. *TIMP* ها در نمونه‌های افراد بیمار نیز مشاهده شدند و براساس نتایج ایمونوشیمی حضور *TIMP-1* مشاهده شد نه *TIMP-2* و علاوه بر این

برای تایید دقیق نقش پیش آگهی دهنده این فاکتور مورد نیاز است.

تومور برعهده داشته باشد. این مطالب اطلاعات اولیه در زمینه نقش TIMP-2 بوده و مطالعات گسترده تری

References

1. Shariat zadeh MA, Hamta A, Solimani M, Rasoli Z. Determination of chromosomal changes in DMBA-induced skin cancer in SD rat strains. *Arak Medical University Journal* 2009; 12(2): 73-87.
2. Stang A, Jöckel KH. Does skin cancer screening save lives? A detailed analysis of mortality time trends in SchleswigHolstein and Germany. *Cancer* 2016; 122(3): 432-437.
3. Ransohoff KJ, Jaju PD, Tang JY, Carbone M, Leachman S, Sarin KY. Familial skin cancer syndromes: Increased melanoma risk. *JAAD* 2016; 74(3): 423-434.
4. Wu S, Hu L, Wang Y, Li Y. The Raman spectrum character of skin tumor induced by UVB. *SPIE Digital Library* 2016. doi:10.1117/12.2208890
5. Mantese SAO, Camargo ALV, Gomides Berbert MDA, Gomides AM, Rocha A. Carcinoma basocelular-Análise de 300 casos observados em Uberlândia-MG Basal cell Carcinoma-Analysis of 300 cases observed in Uberlândia-MG, Brazil. *An Bras Dermatol* 2006; 18(2): 136-142.
6. Zurac S, Neagu M, Constantin C, Cioplea M, Nedelcu R, Bastian A, et al. Variations in the expression of TIMP1, TIMP2 and TIMP3 in cutaneous melanoma with regression and their possible function as prognostic predictors. *Oncol Letters* 2016; 11(5): 3354-3360.
7. Yu WP, Brenner S, Venkatesh B. Duplication, degeneration and subfunctionalization of the nested synapsin-Timp genes in Fugu. *Trends Genet* 2003; 19(4): 180-183.
8. Suarez Roa ML, Asbun Bojalil J, Ruiz Godoy LM, Meneses García AA. Immunoexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in different areas of oral squamous cell carcinoma. *Aust D J* 2012; 57(3): 300-307.
9. Izadi A, Moslemi E, Poorhosseini SM, Yassae VR, Kheiri H R, Elikai HR. UBD identify in paraffin tissues in patients with colorectal cancer. *JIMS* 2014; 32(291): 972-981.
10. Burgess L, Chen J, Wolter NE, Wilson B, Zheng G. Topical MMP beacon enabled fluorescence-guided resection of oral carcinoma. *Biomed Opt Express* 2016; 7(3): 1089-1099.
11. Wagner S, Nagel S, Kluge B, Schwab S, Heiland S, Koziol J, Gardner H, Hacke W. Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. *Brain Research* 2003; 984(1): 63-75.
12. Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, et al. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer* 2000; 82(3): 657-665.
13. Krengel S, Alexander M, Brinckmann J, Tronnier M. MMP 2, TIMP 2 and MT1 MMP are differentially expressed in lesional skin of melanocytic nevi and their expression is modulated by UVB light. *J Cutan Pathol* 2002; 29(7): 390-396.