

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 MMulV 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^۱
الهام مسلمی^۲
حمیدرضا 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 سلول های سرطانی و هم در سلول های سالم بیان می شود. 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 روش ها: 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 جمع آوری گردید. RNA نمونه ها به کمک محلول RNX-PLUS استخراج شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای Random Hexamer و Oligo dT و آنزیم MMuLV انجام شد. بیان ژن *TIMP-2* با کمک Real-time PCR انجام گرفت.

یافته ها: با ارزیابی بیان ژن *TIMP-2* مشخص گردید که بیان این ژن ۱/۱۳ برابر نسبت به نمونه های نرمال افزایش یافته بود ($p < 0/001$). علاوه بر این بین اندازه تومور و میزان بیان ژن *TIMP-2* رابطه معنا داری 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 نمونه های نرمال ($p < 0/005$) 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 می تواند 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 می رسد که بیان ژن *TIMP-2* می تواند 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

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

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

E-mail: elham_moslemi60@yahoo.com

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 نانو تکنولوژی، 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

شایع ترین نوع سرطان پوست در میان سفید پوستان می باشند و علاوه بر این شایع ترین سرطان در کشور ما نیز محسوب می شوند. به طور کلی میزان شیوع سرطان پوست در ایران ۱۰/۱۳۳۹ در هر ۱۰۰ هزار نفر است. میزان شیوع برای BCC (Basal Cell Carcinoma) ۷/۵۳ و برای SCC (Squamous Cell Carcinoma) ۱/۷۹ و برای ملانوما ۰/۳۹ از هر ۱۰۰ هزار نفر می باشد. ایستگاه تحقیقاتی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران در بابل به عنوان یک مرکز ثبت سرطان در منطقه شمالی ایران فعالیت می کند. طبق آمار این مرکز سرطان غیرملانومایی پوست جزء سرطان های شایع منطقه شمالی است و حتی در طی سالیان اخیر موارد گزارش شده آن افزایش قابل ملاحظه ای داشته است به طوری که از سال ۱۳۷۷ تا سال ۱۳۸۳ میزان آن حدود ۲/۵ برابر شده است (۱). سرطان پوست معمولاً در لایه بیرونی پوست به وجود می آید و ممکن است ابتدا به صورت یک تورم، برآمدگی و یا بخشی متفاوت با سایر بخش های پوست ظاهر شود (۲). سرطان پوست به دو نوع سرطان ملانوما و غیر ملانوما تقسیم می شود. سرطان غیر ملانومایی پوست (NMSC) به دو نوع BCC و SCC تقسیم می شود (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 داده اند که سطح بیان تلومراز در مقایسه با سایر سرطان ها در BCC بیش تر است و هم چنین پروتئین BCL-2 که یک مهار کننده شناخته شده آپوپتوز است نیز به صورت دائمی بیان می شود (۵). تهاجم تومور، متاستاز و آنژیوژنز نیازمند تجزیه ماتریکس خارج سلولی (Extra Cellular Matrix) و افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) می باشد. ماتریکس متالو

پروتئینازها یا همان MMP ها از خانواده آنزیم های وابسته به روی هستند که توانایی تجزیه ECM را دارند و فعالیت آن ها توسط مهار کننده های بافتی ماتریکس متالوپروتئینازها یا همان TIMP ها (Tissue Inhibitors of Matrix Metallo Proteinases) مهار می شود. TIMP ها پروتئین های ترشحی با وزن مولکولی کم هستند که به فرم فعال MMP ها متصل شده و مهار کننده فعالیت آنزیمی آن ها می باشند (۶). TIMP ها در اکثر بافت ها و مایعات بدن به شکل محلول وجود دارند و تفاوت آن ها در توزیع بافتی است. چهار ژن پارالوگ هستند و شامل TIMP-1، TIMP-2، TIMP-3 و TIMP-4 می باشند. TIMP-2 عضو منحصر به فرد از خانواده TIMP ها می باشد و روی کروموزوم ۱۷ در موقعیت 17q25 قرار دارد و دارای ۵ ناحیه اگزون است (۷). ژن TIMP-2 علاوه بر مهار MMP ها به طور انتخابی با MT1-MMP واکنش می دهد تا فعالیت Pro-MMP2 را تسهیل کند. بنابراین عملکرد TIMP-2 هم به عنوان مهار کننده MMP ها است و هم برای فعالیت Pro-MMP-2 نیاز است (۸).

تعادل بین MMP و TIMP در فعالیتهای فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی بدن ضروری است و عدم تعادل بین MMP و TIMP می تواند به تهاجم تومور، متاستاز و آنژیوژنز منجر شود و این عدم تعادل با ایجاد سرطان های متفاوتی مانند ریه، کولون، سینه و پروستات ارتباط دارد. مطالعات نشان داده اند که بین بیان TIMP-2 و متاستاز تومورها رابطه عکس وجود دارد (۹). به طور کلی به نظر می رسد ژن TIMP-2 به عنوان یک شاخص مهم در پیش بینی، تشخیص و بررسی پیشرفت سرطان پوست و هم چنین به عنوان یک فاکتور آگاهی دهنده در مراحل ابتدایی بیماری می تواند باشد. تا کنون در ایران مطالعاتی در زمینه بررسی میزان بیان ژن TIMP-2 در نمونه های 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

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

مواد و روش ها

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 برش گیری انتخاب و جمع آوری گردید. طیف سنی افراد انتخاب شده ۳۰ تا ۸۰ سال بود. نمونه ها پس از جمع آوری 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 برش ها با اندازه ۱۰ میکرون از بافت پارافینه تهیه گردید. برای انجام پارافین زدایی و استخراج RNA از محلول RNX-Plus (CinnaGene, Iran) استفاده شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر 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، ۱۰۰ U آنزیم (M-MuLV) می باشد. نمونه ها به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد 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.

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

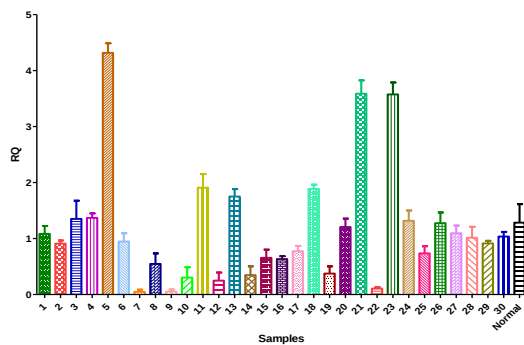
نام پرایمر	اندازه محصول PCR
TIMP-2 F	88bp
TIMP-2 R	88bp
GAPDH F	124bp
GAPDH R	124bp

انجام واکنش Real-time PCR

تعیین کمیت نسبی در Real timePCR به وسیله اندازه گیری 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 سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد (۹). در نهایت نتایج به دست آمده توسط نرم افزار Graph pad و با آزمون One way ANOVA آنالیز و نمودار آن رسم گردید.

یافته ها

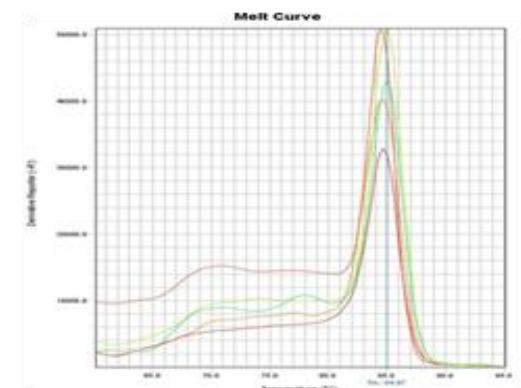
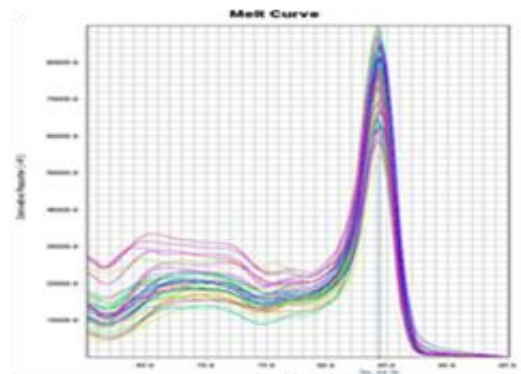
نمونه های جمع آوری شده براساس سن شامل ۱۷ نمونه بالای ۶۵ سال و ۱۳ نمونه کم تر از ۶۵ سال، براساس جنسیت شامل ۲۵ نمونه مرد و ۵ نمونه زن بودند و در ۱۵ نمونه اندازه تومورها بین ۱ الی ۲ سانتی متر، در ۷ نمونه اندازه تومورها کم تر از ۱ سانتی متر و در ۸ نمونه اندازه تومورها بیش تر از ۲ سانتی متر بود. با توجه به 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



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

در این مطالعه برای اولین بار از بلوک های پارافینه جهت بررسی نقش ژن *TIMP-2* در افراد مبتلا به سرطان پوست استفاده شد. اگرچه بلوک های پارافینه ذخایر با ارزشی جهت بررسی بیماری می باشند ولی استخراج RNA از آن ها کاری دشوار است اما نتایج این مطالعه نشان داد که می توان از بلوک های 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 فیبروبلاست ها در بافت پیوندی مجاور تومور بالا است و همچنین در سلول های بازولوئید توموری که در حاشیه تومور قرار دارند بیان ژن ها پایین تر است. علاوه بر این میزان بیان کلاژناز در سلول های نرمال پایین است و بیان ژن *TIMP* در تمام بافت های بررسی شده نا چیز 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 به طور چشم گیری نسبت به SCC بیش تر است و همچنین به کمک هیبریداسیون درجا مشخص شد که سلول های 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 نمونه های مبتلا به BCC و نمونه های نرمال پرداختند و به این نتیجه رسیدند که میزان بیان *MMP* ها در نمونه های BCC نسبت به نمونه های نرمال بیش تر بود. *TIMP* ها در نمونه های افراد بیمار نیز مشاهده شدند و براساس نتایج ایمونوشیمی حضور *TIMP-1* مشاهده شد نه *TIMP-2* و علاوه بر این

حضور *TIMP* ها در بافت های توموری مشاهده شد (۱۲). Krengel و همکارانش با روش ایمونوهیستوشیمی به مقایسه بیان *MMP-2*، *TIMP-2* و *MT1-MMP* در ضایعات پوستی ملانوسیتی *nevi* پرداختند و به این نتیجه رسیدند که *MMP-2* توسط ضایعات کارتیوسیتی بیان می شوند و اشعه UV باعث تنظیم مثبت بیان این ژن می شود. بیان *MMP-2* در سلول های ملانوسیتی *nevus* مشاهده نشد ولی در مقابل، *TIMP-2* توسط سلول های ملانوسیتی *nevus* بیان شد و اشعه UV باعث تنظیم منفی بیان ژن *TIMP-2* نمی شود (۱۳).

نتایج نشان داد که میزان mRNA مربوط به *TIMP-2* در بافت های سرطانی و بافت های اطراف تومور افزایش یافته است. افزایش بیان ژن *TIMP-2* به ویژه در نمونه ها با اندازه تومور بیش تر از ۲ سانتی متر مشاهده شد. از محدودیت های این مطالعه می توان 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 سلول های بافت پوست مورد بررسی قرار می دهد. نتایج این مطالعه می تواند در پیشرفت پیش آگهی از سرطان موثر واقع گردد. مطالعه حاضر و نیز گزارش های گذشته نشان می دهند که پیشگویی صحیح پیامد در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان مشکل بالینی و پیچیده مطرح می باشد. با وجود مطالعات گسترده ای که در زمینه سرطان در سراسر جهان صورت گرفته، صحت عوامل تعیین شده هم چنان جای تردید دارد. افزون بر آن پیشرفت بیماری با افزایش خطر مرگ ناشی از این بیماری همراه می باشند. انجام مطالعات آتی جهت تعیین نقش عوامل مختلف بالینی و آسیب شناختی در جهت شناخت پیش آگهی سرطان پوست ضروری به نظر می رسد.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که *TIMP-2* می تواند نقش مهم و موثری در تشخیص اولیه سرطان پوست به عنوان یک مارکر زیستی مستقل از مرحله

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.