

MMP 1 ve 2 genleri promoter polimorfizmleri ve hepatoselüler karsinom riski: Türk hastalarda olgu-kontrol analizi

Promoter polymorphisms of MMP 1 and 2 genes and risk for hepatocellular carcinoma: Case-control analysis in Turkish patients

Mircelal Kazimi* Sinem Melek Nalbantoğlu**, Murat Kılıç***, Afig Berdeli**

Amaç: Tüm dünyada en progresif ve agresif kanser türlerinden biri olan hepatoselüler karsinom patogenezinde matriks metalloproteinazlar (MMP) güçlü prognostik indikatörler olarak gösterilmektedir. Ancak, MMPler ile kanıtlanan patogenetik bağlantı son derece sınırlıdır. Kanser metastazında invazyon ile ilişkisi dolayısıyla, matriks metalloproteinaz genleri, hepatoselüler karsinoma yakınlıkta aday genler olarak düşünülmektedir.

Bu çalışmada, MMP2 -735 C/T ve MMP1 -1607 1G/2G genlerinin polimorfizmlerinin hastaların klinikopatolojik değişkenleriyle korelasyonunun araştırılması ve bu klinikopatolojik değişkenlerin hastalık seyrine olan etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntem: Çalışmaya, Ege Üniversitesi Organ Nakli Merkezi'nde karaciğer sirozu zemininde gelişmiş hepatoselüler karsinom tanısı ile karaciğer nakli uygulanmış 73 hasta katılmıştır. DNA ekstraksiyonunu takiben polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) moleküler genetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Olgu-kontrol; genotip-fenotip bağlantı analizleri ile MMP2 -735 C/T ve MMP1 -1607 1G/2G polimorfizmleri hasta ve sağlıklı gruplar arasında risk faktörü olabirliği açısından incelenmiştir.

Bulgular: MMP2 -735 C/T ve MMP1 -1607 1G/2G polimorfizmleri Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur ($p > 0,05$). Olgu-kontrol analizinde genotip dağılımı ve allel frekansları hasta ve sağlıklı gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir ($p > 0,05$). Genotip - fenotip korelasyon analizinde MMP1 -1607 1G/2G polimorfizmi, hasta grubunda 2G/2G genotipi, portal ven invazyonu ile ilişki göstermiştir ($p < 0,02$). Çalışmanın nakil sonrası sonuçlarında, hastalardaki 4 yıllık sağ kalım hızı %77,3 ve nakil sonrası rekürrensiz sağ kalım hızı da %96,2 olarak bulunmuştur.

Sonuç: MMP2 -735 C/T ve MMP1 -1607 1G/2G polimorfizmleri ile Türk hepatoselüler karsinom prognozu ve nakil sonrası metastaz ve invazyonu arasında risk prediktörleri olarak bir bağlantı gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler karsinom, matriks metalloproteinazlar, MMP, tek nükleotid polimorfizmi.

*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Moleküler Tıp Laboratuvarı, İzmir, Türkiye
***Kent Hastanesi, Organ Nakli Merkezi, İzmir, Türkiye

Dr. Mircelal Kazimi
E-posta: kmrjalal@gmail.com

Makale Geliş Tarihi: 09.02.2010
Makale Kabul Tarihi: 06.04.2010

GİRİŞ

Hepatoselüler karsinom, genellikle sirotik karaciğer zemininde gelişen, nodüler lezyonlarla karakterize, sıklıkla hiler lenf ganglionlarına ve akciğere metastaz yapan karaciğerin malign neoplazisidir. Hepatit C ve hepatit B enfeksiyonu temelli siroz başta olmak üzere; alkolik karaciğer hastalığı, tirozinemi, hemokromatozis de hepatoselüler karsinom gelişimi için risk faktörleridir. Hepatoselüler karsinom lezyonlarında iyi, orta

ve kötü olarak evrelendirilen patolojik farklılaşma, hasta prognozunun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (1). Hepatoselüler karsinom, hepatit veya sirozun neden olduğu kronik karaciğer hasarının prevalansının yüksek olması nedeniyle dünyada solid organ malignitelerinde baş sırada yer almaktadır.

Hepatoselüler karsinomda uygulanan tedavi stratejileri cerrahi yaklaşım, lokorejyonel tedaviler, sistemik tedavi olarak gruplandırılabilir (2).

Tablo 1. Hasta karakteristikleri ve hepatoselüler karsinom prognostik risk faktörleri.

Faktör	Veri Sayısı (%)
Demografik veri	
Yaş (y)	55, 4932 ± 9,665 (Ortalama±S. Sapma; 2-65) yıl
Cinsiyet	
Erkek	60 (%82)
Kadın	13 (%18)
Klinik veri	
Etyoloji	
Siroz	
HBV	44 (%60,2)
HCV	9 (%12,3)
GDH glikojen depo hastalığı	3 (%4,1)
PBS primer biliyer siroz	3 (%4,1)
Alkol	3 (%4,1)
Kriptojenik	5 (%6,8)
HBV+HDV	3 (%4,1)
Tirozinemi	3 (%4,1)
Siroz dışı	0
Tümör verileri	
Nodül sayı ve büyüklüğü	
Milan ölçütlerine uygun (%91,78)	
Tek, ≤5 cm	48 (%65,7)
≤3 nodül, ≤3 cm	19 (%26)
Milan ölçütleri dışında (%8,21)	
≤3 nodül, <10 cm	6 (%8,2)
Portal Ven invazyonu	
Yok	31 (%42,5)
Var	42 (%57,5)
Histopatolojik derece-farklılaşma	
G1	20 (%27,39)
GII	37 (%50,6)
GIII-IV	16 (%21,9)
pTNM derecelendirme	
T1	5 (%6,8)
T2	20 (%27,3)
T3-4	48 (%65,7)
Serum AFP düzeyi (µg/L)	
<400 µg/L	64 (%87,6)
≥400 µg/L	9 (%12,3)

Kötü karaciğer fonksiyonlarında tümör rezeksiyonu gerçekleştirilemiyorsa, karaciğer nakli en iyi tedavi yaklaşımıdır. En uygun nakil adayları; tek lezyon<5 cm veya 3 nodüle kadar <3 cm kitlesi olan adaylardır. Son yıllarda hepatoselüler karsinomda canlı donör karaciğer nakli aday olmak için gerekli ölçütler genişletilmektedir (3). Bu seçim ölçütleri sayesinde, 5 yılda sağ kalım oranları >%70 ve bekleme listesinde ölüm oranları <%15 olmuştur (4).

Hepatoselüler karsinom vasküler tümördür, tümör hücresi invazyonu ve anjiyogenez, tümör büyüme ve yayılımında anahtar basamak olan biyolojik süreçtir (5). Matriks metalloproteinazların (MMP) tümör metastaz ve invazyonuna özellikle de nakil sonrası rekürrense olan etkisi klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Bununla birlikte MMP polimorfizmleri, (özellikle MMP1) kanser patogenezinde sınırlı sayıda çalışma ile dünya literatüründe yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı, Türk hastalarda, MMP2 -735 C/T ve MMP1 -1607 1G/2G polimorfizmlerinin hepatoselüler karsinom prognozunda ve nakil sonrası (OLT) metastaz ve invazyondaki yerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastaların Karakterizasyonu

Ege Üniversitesi Organ Nakli Merkezi hepatoselüler karsinomlu hastalarda Milan kriterlerine önem vermektedir, fakat organ nakli uygulanacak olan hastalarda, nodül karakteristikleri Milan ölçütlerini aşıyor ise bu noktada tümöröl kitlenin ölçüsü kadar önemli olan ven invazyonu, hilar lenf bezi invazyonu ve uzak metastaz (örn: akciğer) taramaları yapıldıktan sonra endikasyon içine dahil edilmektedir. Taramada, radyolojik yöntemler ile beraber AFP düzeyleri dikkate alınmaktadır. Karaciğer sirozu hastalarına ameliyat öncesi nakil öncesi dönemde biyokimyasal ve radyolojik taramalar uygulanmaktadır. Bu dönemde yüksek AFP değerleri tanı almadan önceki dö-

nemde hepatoselüler karsinom şüphesini uyandırır da, AFP normal ve düşük olan olgu gruplarında (bu çalışmada ≥400 µg/L olan 9 birey) abdominal-BT, abdominal-MR, abdominal Doppler USG uygulamaları ile birlikte akciğer, kemik ve uzak organ metastazları da taranmaktadır. Ameliyat öncesi olarak görünmeyen karsinomlar ise ameliyat sonrası hepatektomi sonrası patolojik inceleme sonucu saptanmaktadır (bu çalışmada karsinomlar ameliyat öncesi taramalarda saptanmıştır).

Çalışmaya 1999-2009 yılları arasında Ege Üniversitesi Organ Nakli Merkezi'nde karaciğer sirozu zemininde gelişmiş olan hepatoselüler karsinomlu ortotopik karaciğer nakli (OLT) uygulanmış toplam 73 hasta alınmıştır. 73 hastanın 60'ı erkek (%82), 13'ü (%18) kadındır. Tüm olgu grubu, karaciğer nakli öncesinde biyopsi, tomografi ve biyokimyasal kan parametrelerinin ameliyat öncesi olarak incelenmesi sonucu teşhis edilmiş ve bu nakil sonrası patolojik inceleme esnasında doğrulanmıştır. Hastalardan 17'sine (%23) kadavradan, 56'sına canlı donörden (%77) karaciğer nakli uygulanmıştır. 73 olgunun 67'si (%91,78) Milan ölçütlerinde (10), kalan 6 (%8,21) olgu ise Milan ölçütleri dışında gözlenmiştir. Milan ölçütleri dışında gözlenen 6 olgu, canlı donörden karaciğer nakli uygulanan %77'lik grup içinde yer almaktadır. Karaciğer nakli sonrası klinikopatolojik parametre olarak nodül sayısı, nodül boyutu, diferansiyasyon derecesi, portal ven invazyonu, AFP değerleri (ng/ml) ve sağlıklı (tümör rekürrensi gerçekleşmeden) sağ kalım oranları patolojik değerlendirmeye alınmıştır. Hepatoselüler karsinom histopatolojik olarak Grade I, Grade II ve Grade III-IV olarak derecelendirilmiştir (6). 73 hastada; 20 kişi Grade I olarak, 37 kişi Grade II ve 16 kişi Grade III-IV olarak derecelendirilmiştir.

Ayrıca, herhangi bir karaciğer hastalığı ve hiçbir sistemik ve kronik hastalığı olmayan 60 ve 137 sağlıklı birey kontrol

Tablo 2. MMP1 ve MMP2 gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde kullanılan teknik ve primerler.

Genetik polimorfizm	Primer sekansları	Primerlerin birleşme sıcaklığı	Kullanılan genotiplendirme metodu (Restriksiyon Enzim Kesimi)
MMP2-735 C/T	Sense-5'-ATAGGGTAAACCTCACCACATT-3'	56 °C	PCR-RFLP <i>XmnI</i>
	Antisense-5'-GGTAACATGAGGCTGAGACCTG-3'		
MMP1 -1607 1G/2G	Sense-5' TCG TGA GAA TGT CTT CCC ATT-3'	58 °C	PCR-RFLP <i>HinfI</i>
	Antisense-5'-TCT TGG ACT GAT TTC AGA ATA AGT GAA ATC-3'		

PCR-RFLP: Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi, Sense primer: baş oligonükleotid, Antisense primer: son oligonükleotid.

Tablo 3. Hasta ve kontrol grubu arasında araştırılan MMP polimorfizmleri genotip dağılımı ve allel frekansları.

POLİMORFİZİM	Genotip dağılımı	Hasta gurubu (n=73)		Kontrol gurubu (n=60-137)		p	OR	%95CI
		n	%	n	%			
MMP1-1607 1G/2G	1G/1G	7	9,6	7	11,7	>0,05	-	-
	1G/2G	33	45,2	33	55		-	-
	2G/2G	33	45,2	20	33,3		-	-
	1G	47	32,2	47	39,2	>0,05	-	-
	2G	99	67,8	73	60,8			
MMP2 -735 C/T	CC	44	60,3	76	55,5	>0,05	-	-
	CT	28	38,4	51	37,2		-	-
	TT	1	1,4	10	7,3	-	-	
	C	116	79,5	203	74,1	>0,05	-	-
	T	30	20,5	71	25,9		-	-

grubumuzu oluşturmuştur. Çalışmaya katılan hastaların tamamı gönüllü olur formunu imzalamışlardır. Karaciğer nakli (OLT) yapılan hasta grubunun klinikopatolojik parametreleri ve demografik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Karaciğer naklini takiben, multidisipliner bir yaklaşımla, hastalar tacrolimus, mycophenolate mofetil, rapamucine ve methylprednisolone'ı içeren rutin immünespresif tedavi görmüşlerdir. Nakil esnasında uzaklaştırılan tüm karaciğer organları patolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Hepatoselüler karsinomun evrelemesi International Union Against Cancer tarafından belirlenmiş pTNM klasifikasyonuna ve histolojik dereceleme Edmondson Ölçütleri'ne göre düzenlenmiştir. OLT'nin ardından tümör rekürrensi,

ilk yıl boyunca her 3 ayda bir ve ardından her 6 ayda, karaciğer ultrasonografisi ve α -fetoprotein düzeyleri ile belirlenmiştir (6). Tüm vücut bilgisayarlı tomografi ve kemik sintigrafisi yıllık olarak rekürrens şüphesine dayalı olarak yapılmış ve şüpheli lezyonlara, rekürrensi doğrulamak amacıyla biyopsi yapılmıştır.

Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden DNA eldesi için EDTA içeren tüpler içerisine 1 cc kan örneği gen mutasyon analizi için alınmıştır. Periferik kan lökositlerinden total genomik DNA ekstraksiyonu, tuzsuz yöntem olan kolon saflaştırılması ile yapılmıştır. Bu amaçla Qiagen mini blood DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. DNA saflığının ölçülmesi için, NanoDrop Spektrofotometre cihazında 280 nm dalga boyunda DNA solü-

yonunun absorpsiyon intensitesi ölçülmüştür. DNA kalitesini, 2 uL (100 ng) DNA molekülünün %1'lik agaroz jelde elektroforezi sonucunda belirlenmiştir. MMP gen polimorfizmlerinin genotipleme analizi polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) metodu ile gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyon reaksiyonları için 100 ng genomik DNA, 1X PCR Buffer (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8,3) ve 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 mM her bir deoksिनükleotid triphosphate (dNTP) (Promega, Madison, WI), 10 μ M sense ve 10 μ M antisense primerleri 1.0 U AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City CA) olmak üzere ve deionize su ile toplam 25 μ L'ye tamamlanan karışım PCR işlemine tabi tutulmuştur. Pozitif PCR ürünlerinin RFLP işlemi; MMP-1 -1607 1G/2G polimorfizmi için *XmnI* enzimi; MMP-2 C-735T polimorfizmi için *HinfI* restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 2).

Genotip dağılımı ve allel frekanslarının Hardy-Weinberg eşitlik analizi ile olgu ve kontrol grupları arası genotip dağılımı ve allel frekanslarının istatistik analizi SPSS 13,0 programında ki kare testi ile (p<0,05 anlamlı kabul edilerek) gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Olgu-Kontrol Analizi Sonuçları

MMP2 -735 C/T ve MMP1 -1607 1G/2G polimorfizmleri hastalar ve sağlıklılar arasında Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuş (p>0,05); CC, CT, CT ve 1G/1G,

Tablo 4. Hasta grubu klinikopatolojik verileri ile MMP gen polimorfizmleri genotip frekansları.

Polimorfizm	Genotip dağılımı	Klinikopatolojik Parametreler										
		Nodül sayısı ve büyüklüğü			p	Nodül Farklılaşması			p	Portal Ven İnvazyonu		p
		Tek, ≤ 5 cm n=48 (%65,7)	≤ 3 nodül, her biri ≤ 3 cm n=19 (%26)	≤ 3 nodül, her biri <10 cm n=6 (%8,2)		G1 n=20 (%27,39)	GII n=37 (%50,6)	GIII-IV n=16 (%21,9)		Var n=42 (%57,5)	Yok n=31 (%42,5)	
MMP1-1607 1G/2G	1G/1G	14* (%29,1)	7 (%36,8)	1 (%16,6)		6 (%30)	9 (%24,3)	6 (%37,5)		6 (%14,2)	12 (%38,7)	
	1G/2G	16 (%33,3)	5 (%26,3)	2 (%33,3)	>0,05	8 (%40)	12 (%32,4)	5 (%31,25)	>0,05	11 (%26,1)	10 (%32,2)	<0,02
	2G/2G	18 (%37,5)	7 (%36,8)	3 (%50)		6 (%30)	16 (%43,2)	5 (%31,25)		25 (%59,5)	9 (%29)	
MMP2 -735 C/T	CC	12 (%25)	4 (%21)	2 (%33,3)		6 (%30)	11 (%29,7)	3 (%18,75)		8 (%19)	8 (%25,8)	
	CT	16 (%33,3)	5 (%26,3)	1 (%16,6)	>0,05	7 (%35)	14 (%37,8)	5 (%31,25)	>0,05	10 (%23,8)	9 (%29)	>0,05
	TT	20 (%41,6)	10 (%52,6)	3 (%50)		7 (%35)	12 (%32,4)	8 (%50)		24 (%57,1)	14 (%45,1)	

*; her bir grupta yer alan hasta sayısı, n (%).

1G/2G, 2G/2G genotip dağılımı ve allel frekansları, iki grup arasında anlamlı farklılıkta saptanmamıştır ($p>0,05$); p ve OR değerleri %95 güvenlik aralıkları ile birlikte Tablo 3'de görülmektedir. Bununla birlikte, nodül sayısı, nodül boyutu, farklılaşma ve portal ven invazyonunu içeren klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılmalı olarak MMP gen polimorfizmleri genotip frekansları arasında, MMP1 -1607 1G/2G polimorfizmi, tamamı Milan ölçütlerinde olan hasta grubunda 2G/2G genotipi, portal ven invazyonu ile bağlantılı göstermiştir ($p<0,02$) (Tablo 4).

Ortotopik Karaciğer Nakli Sonrası Sonuçlar: Metastaz, Sağ kalım ve MMP 1 - 2

OLT sonrası ortalama hasta klinik izlemi 5,1887±1,9 (3-10) yıldır. Ortalama sağ kalım süresi 9,518±0,268 yıl (Ortalama±S.Sapma); (%95 CI; 8,992-10,044) ve ortanca değer (medyan) 5±1,8 olarak bulunmuştur. Gözlenen sağ kalım süreleri: 1 yıllık %100, 3 yıllık %95 ve 5 yıldan fazla 10 yıla kadar %39,6 olarak bulunmuştur. 3 veya 5 cm'den büyük olmayan ve nodül sayısı 3'den fazla olmayan hastalar (1 tümör ≤5 cm olan veya her biri 3 cm'den büyük olmadan 3 tümörden fazla olmamak kaydıyla) 73 bireylik grubumuzun %92'sini oluşturmaktadır ve %77,3'ü 4 yıllık sağ kalım ve %96,2'si nakil sonrası rekürrensiz sağ kalım sergilemişlerdir. Hastalarımızın hiçbiri, nakil sonrası kemoterapi veya radyoterapi almamışlardır. OLT'den 2 yıl sonra, 2 hastada (%2,7) tümör rekürrensi saptanmıştır. 2 hasta (%2,7), rekürrens gözlenmeden karsinom bağlantılı olmadan, biri OLT'den 5 yıl sonra akut myokard enfarktüsü sebebi, diğeri de OLT'den 3 yıl sonra kolanjiosepsis sebebi olarak ölmüştür. 73 bireylik hepatoselüler karsinom tanılı hastalarımızın 2'si karsinom dışı hastalıklardan mortal seyrettiği için, Türk hepatoselüler karsinomlu hastalarda karsinom bağlı sağ kalım süresini verecek olan Kaplan Meier sağ kalım analizi gerçekleştirilmesi uygun bulunmamıştır. Tümör rekürrensi, sadece 2 hastada baş gösterdiği için, yeterli sayıda hasta bulunmaması sebebiyle, MMP temelli metastaz ve invazyon ile ortaya çıkan rekürrens ve MMP gen polimorfizmi arasında bağlantı analizi gerçekleştirilmemiştir.

TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinom, genelde kronik karaciğer hastalığı zemininde oluşan karaciğerin primer bir tümörüdür. Hepatoselüler karsinom dünyadaki 5. en sık gö-

rülen kanser olup, kanser ile ilişkili ölümlerde ise 3. sırada gelmektedir (7). Hepatoselüler karsinom insidansı 65 yaş ve üstünde 1993 yılında 100.000 kişide 14 iken, 1999 yılında bu sayı 100.000 de 18,1 kişiye yükselmiştir (8). Şimdiye kadar hepatoselüler karsinom için hepatektomi en efektif tedavilerden biri olmasına rağmen, ameliyat sonrası rekürrens yaygındır ve uzun dönemli iyileşmenin önünde temel engel olarak durmaktadır (9). Çoğu organ nakli merkezi ve United Network for Organ Sharing (UNOS) birlikte "Milan Kriterleri"ni oluşturmuşlardır. 1993'te Bismuth ve ark. (10) retrospektif olarak rezeksiyon ve organ naklinin sonuçlarını karşılaştırmış, 3 cm'den büyük olmayan, 2 nodülden fazla olmayan ve portal ven invazyonu olmayan küçük tümörlerin nakil ile daha iyi sağ kalıma sahip olduklarını bildirmişlerdir. 1996 yılında, Mazzaferro ve ark. (11)'nin bildirisine göre, nakil yapılmış 48 hastanın retrospektif analizinde, 3 veya 5 cm'den büyük olmayan ve 3 tümörden fazla olmayan hastalarda %75'i 4 yıllık sağ kalım ve %83'ü rekürrens olmayan sağ kalım sergilemişlerdir. Bu çalışmada ise 3 veya 5 cm'den büyük olmayan ve 3 tümörden fazla olmayan hastalar, çalışma grubunun %92'sini oluşturmaktadır. Karakayalı ve ark.'nın 2008 yılı çalışmaları ile uyumlu olarak, hastaların %77,3'ü 4 yıllık sağ kalım ve %96,2'si nakil sonrası rekürrensiz sağ kalım görülmüştür (12). Karaciğer nakli yapılmış Türk hepatoselüler karsinom hastalarında gerçekleştirilmiş olan sağ kalım analizlerinde, 2008 yılında, Kıyıcı ve ark. (13) Milan ölçütlerini aşan hepatoselüler karsinom hastalarında azalmış sağ kalım oranları gözlemlenmişlerdir. OLT sonrası ortalama hasta klinik izlemi 5,1887 ±/± 1,9 (3-10) yıldır. Ortalama sağ kalım süresi 9,518±,268 yıl (Ortalama±S.Sapma); (%95 CI; 8,992-10,044) ve ortanca değer (medyan) 5±1,8 olarak bulunmuştur. Gözlenen sağ kalım süreleri: 1 yıllık %100, 3 yıllık %95 ve 5 yıldan fazla 10 yıla kadar %39,6 olarak gözlenmiş ve Haberal ve ark. (14, 15)'nin 2007 yılı çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur.

Matriks metalloproteinaz genlerinde gözlenebilen genetik varyantlar, bu enzimlerin biyolojik fonksiyonlarını etkileyerek, karsinogenezdeki rollerini değiştirebilir ve kanser-hücre büyümesi, difransiasyon, apoptozis, invazyon, metastaz, anjiogenez ve immün dayanıklılık üzerinde etkilere sahip olabilirler. MMP geni promoter bölgesinde MMP üretimi-

ni allel spesifik tarzda etkileyebilen çeşitli polimorfizmler karakterize edilmiştir. Son çalışmalarda fonksiyonel polimorfizmlerin, bir seri kanser türüne yakınlıkta bireysel farklılıkları oluşturduğu gözlenmiştir. Şimdiye kadar yapılmış olan uluslararası çalışmalarda MMP polimorfizmlerinin hepatoselüler karsinomdaki rolü spesifik olarak araştırılmamıştır. Dış kaynaklı geçmiş çalışmalarda MMP promoter bölgesindeki fonksiyonel polimorfizmlerin, kanser riski ile bağlantısı gösterilmiştir, ancak bu polimorfizmler, şimdiye kadar yapılan hiçbir çalışmada hepatoselüler karsinomda risk faktörleri olarak gösterilmemiştir. Özellikle, şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda matriks metalloproteinaz gen polimorfizmlerinin Türk hepatoselüler karsinom hastalarındaki genetik yakınlık ve riski araştırılmamıştır.

Geçmiş çalışmalarda analiz edilen MMP geninin promoter bölgelerindeki yedi polimorfizm; MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750), MMP-2 C-1306T (rs243865) ve C-735T (rs2285053), MMP-3 -1612 5A/6A (rs3025058), MMP-9 C-1562T, MMP-7 (A-181G ve C-153T) ve MMP-8 (C-799T ve A-381G) genlerindeki fonksiyonel polimorfizmler ile birlikte amino asit değişimine neden olmayan 2 'nonsynonymous' polimorfizm MMP-10 (A180G) ve MMP-21 (C572T) ile hepatoselüler karsinom arasında bağlantı kurulmamıştır (16).

Bununla birlikte, son çalışmalarda MMP-1 1G/2G, MMP-3 5A/6A ve MMP-9 C/T promoter bölgelerindeki fonksiyonel gen polimorfizmleri çeşitli kanser türlerinde prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Populasyon temelli uluslararası bir çalışmada, MMP-1 ve MMP-9 genotipleri dışında, MMP-3 geni 5A alleli hepatoselüler karsinom hastalarındaki zayıf prognozda risk faktörü olarak gösterilmiştir (17). Bu çalışmada da MMP1-1607 polimorfizmi 2G/2G genotipi, istatistik olarak anlamlı düzeyde portal ven invazyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu noktada etnik köken dahilinde, olgu-kontrol ve genotip-fenotip korelasyonunu içeren daha fazla örneklem büyüklüklerindeki ulusal ve uluslararası düzeyde retrospektif populasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

İnvazyon ve metastazda etkinliği kanıtlanmış MMP geni, hepatoselüler karsinomda genetik riske katkı sağlayan mekanizmalardan biri olarak düşünülebilir de, risk grubundaki bireylerde hepatoselüler karsinomun farklı frekans değerleri, po-

ligenik bir yatkınlığı düşündürmektedir. Genetik olarak heterojen insan populusyonlarında, genetik varyantların tespiti son derece zordur (18). Bu noktada, hepatoselüler karsinom patogenezi mekanizmalarının modifiye edici ek genetik faktörler ile düzenlendiği ve bu faktörlerin etkinliklerindeki farklılıkların hepatokarsinogeneze yatkınlığı ve muhtemelen de hepatoselüler karsinom prognozunu etkileyebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, Türk hastalarda bu çalışmada araştırılan *MMP1* ve 2 gen polimor-

fizmleri ile hepatoselüler karsinom riski ve nakil sonrası metastaz arasında güçlü bir prognostik bağlantı gözlenmemiştir. Bununla birlikte, polimorfik allellerin portal ven invazyonu ve Milan ölçütleri ile uyumluluğunun gösterilebilmesi için daha büyük hasta gruplarına ihtiyaç duyulmaktadır. Türk hepatoselüler karsinom hastalarında gerçekleştirilen ortotopik karaciğer nakli ve uzun dönem olgu takip süresince, sağ kalım ve rekürrens analizleri ile karaciğer fonksiyon testleri göz önüne alınarak, canlı donör ve kadavra donör nakillerinde birbirlerinden farklı

sonuçlar elde edilmemiştir. Ortotopik karaciğer nakli, her iki verici tipinde de (canlı ve kadavra) kusursuz karaciğer fonksiyonu göstererek, Milan ölçütlerini aşan ve organ naklinden daha iyi bir tedavi seçeneği olmayan progresif lokal tümörlerde dahi (çalışma grubunun %8'i) uzun dönem sağ kalım ve hastaliksız sağ-kalım sağlamıştır. Ancak karaciğer naklinde, özellikle kadavra vericinin bulunmadığı, kısıtlı süreçlerin olduğu ve bekleme listelerinin uzadığı acil durumlarda, canlı vericiler hayat kurtarıcı öneme sahiptirler.

SUMMARY

Promoter polymorphisms of MMP 1 and 2 genes and risk for hepatocellular carcinoma: Case-control analysis in Turkish patients

Purpose: Matrix metalloproteinases are established as strong prognostic markers for hepatocellular carcinoma which is one of the most progressive and aggressive cancer types worldwide. Hepatocellular carcinoma is very common in various populations, but the pathogenic link between MMPs is limited so far. Due to association with invasion in cancer metastasis, the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-2 are candidate genes for predisposition to hepatocellular carcinoma.

Patients and Methods: A total of 73 patients who were diagnosed as having hepatocellular carcinoma and had undergone liver transplantation were enrolled in the study. Following DNA extraction, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism molecular genetic analyses were performed. By case-control and genotype-phenotype correlation analysis, we investigated the risk of association of MMP-1 and MMP-2 promoter polymorphisms

in 73 Turkish hepatocellular carcinoma patients compared to healthy controls.

Results: Genotypic distributions of the MMP2 -735 C/T and MMP1 -1607 1G/2G polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium in patient and control groups ($p>0.05$). In case-control analyses, the distribution of the genotypes and allele frequencies in the cases did not differ from those in the control group ($p>0.05$). In genotype-phenotype correlation analysis; for MMP1 -1607 1G/2G polymorphism, 2G/2G genotype was associated with portal vein invasion ($p<0.02$). With regard to the post-transplantation results of the present study, the 4-year survival rate in the patients was 77,3% and the recurrence-free survival rate in the post-transplant phase was 96,2%.

Conclusion: No significant association was determined between Turkish hepatocellular carcinoma prognosis and post-transplantation metastasis and invasion with MMP2 -735 C/T and MMP1 -1607 1G/2G polymorphisms as risk predictors.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, matrix metalloproteinases, MMPs, single nucleotide polymorphism.

KATKIDA BULUNANLAR

Çalışmanın düşünülmesi ve planlanması:
Afiğ Berdeli

Verilerin elde edilmesi:
Afiğ Berdeli, Murat Kılıç, Mircelal Kazimi

Verilerin analizi ve yorumlanması:
Afiğ Berdeli, Murat Kılıç, Mircelal Kazimi

Yazının kaleme alınması:
Sinem Melek Nalbantoğlu

İstatistiksel değerlendirme:
Sinem Melek Nalbantoğlu

KAYNAKLAR

1. Kim S., Choi Y., Choung S., Jun J. Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Human Reproduction* 2005;20: 2904-2908.
2. Filik L., Oğuz D., (Treatment of Hepatocellular Carcinoma), *Güncel Gastroenteroloji* 2003; 7(1): 74-79.
3. Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 519-524.
4. Llovet JM, Bustamente J, Castells A. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999; 29: 62-67.
5. Sturk C, Dumont D. In: Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, et al, eds. *Basic Science of Oncology*. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2005:231-248.
6. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: A study of 100 cases among 48900 necropsies. *Cancer* 1954; 7:462-503.
7. Cole P, Morrison AS. Basic issues in population screening for cancer. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 1263-1272.
8. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology* 2004; 127: 1372-1380.
9. Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. *Hepatology* 2000; 32:1224-1229.
10. Bismuth H, Chiche L, Adam R, Castaing D, Diamond T, Dennison A. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Ann Surg* 1993; 218: 145-151.
11. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F., et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334:693-699.
12. Karakayali H, Sevmis S, Moray G, Yilmaz

- U, Ozcay F, Savas NA, Arslan G, Haberal M. Liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: one center's experience. *Transplant Proc* 2008; 40:213-218.
13. Kiyici M, Yilmaz M, Akyildiz M, Arıkan C, Aydın U, Sigirli D, Nart D, Yılmaz F, Ozacar T, Karasu Z, Kilic M. Association between hepatitis B and hepatocellular carcinoma recurrence in patients undergoing liver transplantation. *Transplant Proc* 2008 ;40:1511-1517.
14. Haberal M, Emiroglu R, Karakayali H, Moray G, Yilmaz U, Ozçay F, Bilezikci B, Arslan G. Expanded criteria for hepatocellular carcinoma and liver transplantation. *Int Surg* 2007;92:110-115.
15. Haberal M. Liver transplantation: experience at our center. *Transplant Proc* 2006; 38:2111-2116.
16. Zhai Y, Qiu W, Dong XJ, Zhang XM, Xie WM, Zhang HX, Yuan XY, Zhou GQ, He FC. Functional polymorphisms in the promoters of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 and MMP-13 are not associated with hepatocellular carcinoma risk, *Gut* 2007;56:445-447.
17. Okamoto K, Mandai M, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I, The association of MMP-1, -3 and -9 genotypes with the prognosis of HCV-related hepatocellular carcinoma patients, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2005;117-118:77-89.
18. Akkız H., Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma, *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3.