

## Hubungan Ekspresi Matriks Metaloproteinase-9 dan Tingkat Kedalaman Invasi Adenokarsinoma Kolorektal Invasif

Ade Fakhri, Salmiah Agus

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas  
Padang

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Matriks metaloproteinase-9 (MMP-9) merupakan salah satu anggota enzim metaloproteinase yang sering ditemukan pada adenokarsinoma kolorektal. MMP-9 mampu menghancurkan protein membrana basalis dan matriks ekstraseluler yang berperan pada invasi sel tumor. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis hubungan ekspresi MMP-9 dan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif.

#### Metode

Penelitian menggunakan 35 sampel blok parafin kasus adenokarsinoma yang telah didiagnosis pada Laboratorium Patologi Anatomi di Sumatera Barat sejak Januari 2012-Desember 2014. Ekspresi MMP-9 dinilai menggunakan pewarnaan imunohistokimia pada sitoplasma sel tumor. Ekspresi dinyatakan negatif bila <10% sel terwarnai, dan positif bila  $\geq 10\%$  sel terwarnai. Analisis statistik antara ekspresi MMP-9 dan kedalaman invasi dilakukan menggunakan uji *chi-square*.

#### Hasil

Ekspresi MMP-9 positif pada 28 kasus (80%) dan negatif pada 7 kasus (20%). Kelompok 1 (T1+T2) menunjukkan ekspresi positif pada 10 kasus (35,7%) dan Kelompok 2 (T3+T4) menunjukkan ekspresi positif pada 18 kasus (64,3%). Analisa statistik antara ekspresi MMP-9 dan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif menunjukkan hubungan tidak bermakna ( $p > 0,05$ ).

#### Kesimpulan

Ekspresi MMP-9 dapat digunakan untuk menentukan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif.

**Kata kunci:** invasi adenokarsinoma kolorektal, matriks metaloproteinase-9.

### ABSTRACT

#### Background

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is a member of metaloproteinase which often found in colorectal adenocarcinoma. MMP-9 have ability to degrade the basement membran and extracellular matrix, thus play important role in tumor cells invasion. The aim of this study is to analyzed the correlation between MMP-9 expression and the depth of invasion of invasive colorectal adenocarcinoma.

#### Methods

This study has was done on 35 paraffin embedded sample, which previously diagnosed as colorectal adenocarcinoma at pathology laboratories in West Sumatera from January 2012 until December 2014. MMP-9 expression was observed on the cytoplasm of tumor cells. Negative expression if <10% cells were stained, and positive when  $\geq 10\%$  of tumor epithelial cells were stained. Statistic analyzes beetwen MMP-9 expression and the depth of invasion of colorectal adenocarcinoma were analyzed using chi-square test.

#### Results

We found positive expression of MMP-9 in 28 (80%) cases and negative in 7 (20%) cases. Positive expression were found in 10 cases (35.7%) of group 1 (T1 and T2), and 18 cases (64.3%) of group 2 (T3 and T4). Statistic analyzes beetwen MMP-9 expression and the depth of invasion of invasive colorectal adenocarcinoma showed no significant differences ( $p > 0.05$ ).

#### Conclusion

MMP-9 expression could be used to examine the invasion depth of invasive colorectal adenocarcinoma ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** colorectal adenocarcinoma invasion, matriks metaloproteinase-9.

## PENDAHULUAN

Definisi karsinoma kolorektal menurut World Health Organisation (WHO) merupakan tumor ganas epitel kolon dan rektum,<sup>1</sup> sedangkan karsinoma kolorektal invasif adalah karsinoma kolorektal yang telah menembus lapisan muskularis mukosa sampai ke submukosa.<sup>2</sup> Karsinoma kolorektal adalah kanker ketiga paling sering didiagnosis di seluruh dunia pada tahun 2012, yaitu 1,4 juta kasus (9,7%), dengan angka kejadian pada laki-laki lebih tinggi dibandingkan perempuan. Angka kejadian paling tinggi ditemukan di Australia dan paling rendah di Afrika. Singapura merupakan negara paling tinggi angka kejadiannya di Asia Tenggara.<sup>3</sup>

Dalam beberapa dekade terakhir di negara-negara Asia terjadi peningkatan insiden karsinoma kolorektal.<sup>4</sup> Namun di beberapa negara data mengenai karsinoma kolorektal ini masih sangat sedikit.<sup>5</sup> Data dari Departemen Kesehatan RI tahun 2006 menunjukkan karsinoma kolorektal merupakan jenis kanker ketiga terbanyak di Indonesia, dengan jumlah kasus 1,8/100.000 penduduk.<sup>6</sup> Sedangkan data dari Badan Registrasi Kanker IAPI tahun 2008 menunjukkan kanker rektum menempati urutan ketiga dan kanker kolon menempati urutan ketujuh di Sumatera Barat.<sup>7</sup>

Walaupun dengan kemajuan dunia medis sudah banyak ditemukan pengobatan terbaru pada karsinoma kolorektal, tetapi ternyata angka ketahanan hidup 5 tahun masih rendah, yaitu 45% di seluruh dunia, dan 60% di Asia.<sup>8</sup> Angka ketahanan hidup untuk setiap stadium berbeda di mana pada stadium II sekitar 80% dan stadium III sekitar 60%.<sup>9</sup>

Matriks metaloproteinase-9 (MMP-9) merupakan anggota matriks metaloproteinase (MMP) jenis *gelatinase* yang paling utama, yang disebut *gelatinase* B atau 92 kDa *type* IV *collagenase*;<sup>10</sup> dan memiliki kemampuan untuk menghancurkan kolagen tipe IV membrana basalis dan matriks ekstraseluler, yang sangat berperan pada invasi dan metastasis.<sup>10</sup>

Struktur MMP-9 pada manusia terdiri atas satu NH<sub>2</sub>-terminal prodomain, satu domain katalitik, satu domain penghubung, dan satu domain COOH-terminal *hemopexin-like* yang membentuk proenzim dan enzim aktifnya pada manusia. Domain katalitik pada MMP-9 mengandung dua ion zinc, lima ion kalsium, dan tiga *repeats* homolog dengan modul fibronektin tipe II. Salah satu dari dua domain ion zinc

katalitik dan *cysteine switch motif* dari prodomain berfungsi menjaga MMP-9 tidak aktif. Ion zinc katalitik ini penting untuk aktivitas proteolitik.<sup>11</sup>

Pada level transkripsi MMP-9 diatur oleh banyak faktor di antaranya faktor transkripsi E-26 (Ets), NFκB, *polyomavirus enhancer A-binding protein-3* (PEA3), *activator protein-1* (AP-1), *specificity protein-1* (Sp-1), dan serum *amyloid A-activating factor* (SAF)-1. Faktor-faktor transkripsi ini saling berinteraksi untuk mengatur ekspresi MMP-9. Pada sebagian besar jaringan normal, ekspresi MMP-9 tidak ada atau sangat lemah, tetapi akan meningkat karena sekresi dari sitokin dan faktor pertumbuhan, yaitu IL-1 dan tumor necrosis factor alpha (TNFα) serta adanya kontak dengan matriks ekstraseluler. TNF-α memicu produksi MMP-9 melalui protein kinase C *signal-transduction pathway* (PKC *pathway*). Modifikasi *post-translational* (*S-nitrosylation* and *N-glycosylation*) terjadi untuk meningkatkan aktivitas MMP-9 ekstraseluler.<sup>11</sup>

Kedalaman invasi merupakan salah satu komponen stadium tumor, yang merupakan faktor prognostik penting kanker kolorektal. Meskipun ada banyak sistem yang dikembangkan untuk penentuan stadium kanker kolorektal, namun sistem TNM (Tumor, Node, Metastasis) yang ditetapkan oleh *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) dan *International Union Against Cancer* (UICC) paling sering digunakan. Sistem TNM lebih detail dan lebih *reproducible* dibandingkan sistem lain seperti Dukes atau Astler-Coller. Oleh karena itu sistem ini dianjurkan oleh AJCC dan UICC sebagai dasar dalam menentukan prognosis dan pengobatan pasien.<sup>12</sup>

Dewasa ini inhibitor MMP-9 mulai dikembangkan sebagai terapi anti metastasis, dan ekspresinya meningkat pada berbagai jenis kanker, di antaranya kanker payudara,<sup>13</sup> kanker prostat,<sup>14</sup> kanker nasofaring,<sup>15</sup> kanker laring,<sup>16</sup> karsinoma transisional kandung kemih,<sup>17</sup> dan kanker kolorektal.<sup>18-20</sup> Namun, beberapa penelitian masih melaporkan hasil kontroversial mengenai hubungan MMP-9 dengan parameter klinikopatologik pada adenokarsinoma kolorektal.<sup>19,21,22</sup> Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan ekspresi MMP-9 dan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif.

**METODE PENELITIAN**

Penelitian ini adalah penelitian observasional dengan pendekatan *cross-sectional*. Pengambilan sampel dilakukan secara *proportional stratified random* sampling. Sampel yang didapat adalah 35 blok parafin dari kasus-kasus yang sudah didiagnosis sebelumnya sebagai adenokarsinoma kolorektal pada Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, RSUP Dr. M. Djamil, RSI Ibnu Sina dan RS Siti Rahmah Padang periode Januari 2012-Desember 2014. Kriteria inklusi adalah kasus karsinoma kolorektal yang diperoleh melalui tindakan operasi dan telah didiagnosis secara histopatologi sebagai karsinoma kolorektal di keempat Laboratorium Patologi Anatomi tersebut. Kriteria eksklusi adalah kasus karsinoma kolorektal yang telah mendapatkan terapi atau kemoterapi, blok parafin rusak, atau data tidak lengkap. Data penelitian didapat dari status pengiriman pasien pada keempat laboratorium tersebut. Kedalaman invasi ditentukan berdasarkan sistem TNM yang disusun oleh AJCC. Sampel yang didapat dilakukan *review slide* untuk menentukan kedalaman invasi. Sampel dikelompokkan menjadi dua kelompok. Kelompok 1 terdiri atas tumor dengan kedalaman invasi T1 dan T2, sedangkan kelompok 2 terdiri atas tumor dengan kedalaman invasi T3 dan T4. Jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 28 sampel.

Blok parafin sampel kemudian dipotong ulang untuk pewarnaan imunohistokimia. Pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi poliklonal MMP-9 (bs-4593R, BISS). Ekspresi MMP-9 dinilai pada sitoplasma sel epitel tumor, sedangkan ekspresi pada lokasi lainnya diabaikan. Ekspresi dinyatakan negatif bila <10% sel terwarnai, dan positif bila ≥10% sel terwarnai.<sup>21</sup> Pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RS dr. Sardjito Yogyakarta. Analisis statistik hubungan ekspresi MMP-9 dengan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif diuji dengan uji *chi-square* dengan derajat kemaknaan 0,05.

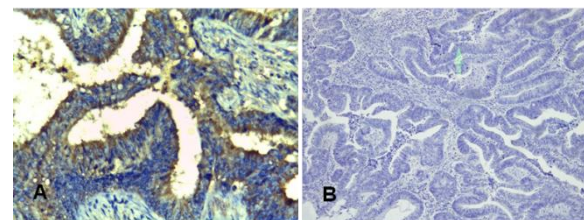
**HASIL**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 35 kasus adenokarsinoma kolorektal invasif. Dari analisis univariat yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik sampel penelitian.

Karakteristik	Jumlah	%
Usia (tahun)		
20-30	2	5,7
31-40	9	25,7
41-50	9	25,7
51-60	10	28,6
>60	5	14,3
Rata-rata usia : 47,43		
Rentang usia : 28-78		
Jenis kelamin		
Laki-laki	21	60
Perempuan	14	40
Kedalaman invasi		
T1+T2	13	37,1
T3+T4	22	62,9
Total	35	100
Ekspresi MMP-9		
Positif	28	80
Negatif	7	20
Total	35	100

Pada Tabel 1 tampak bahwa adenokarsinoma kolorektal invasif paling banyak diderita pada orang berumur 51-60 tahun (28,6%), dengan usia rata-rata 47,43 tahun dan laki-laki (60%) lebih banyak dari pada perempuan (40%) dengan perbandingan 3:2. Kasus kedalaman invasi T1 dan T2 (Kelompok 1) sebanyak 13 kasus (37,1%) dan kasus kedalaman invasi T3 dan T4 (kelompok 2) sebanyak 22 kasus (62,9%).<sup>4</sup> Ekspresi MMP-9 positif ditemukan pada 28 kasus (80%) dan negatif pada 7 kasus (20%).



Gambar 1. A. Ekspresi MMP-9 positif; B. Ekspresi MMP-9 negatif (pembesaran 40x).

Tabel 2. Hubungan ekspresi MMP-9 dengan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif.

Ekspresi MMP-9	Kedalaman invasi		Jumlah
	(T1+T2) Kelompok 1 F (%)	(T3+T4) Kelompok 2 F (%)	
Positif	10 (35,7)	18 (64,3)	28 (100)
Negatif	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (100)
Total	13 (37,1)	22 (62,9)	35 (100)

p=1,00

Pada Tabel 2 tampak ekspresi MMP-9 positif kelompok T3+T4 (64,3%) lebih tinggi

dibandingkan kelompok T1+T2 (35,7%). Persentase ekspresi positif MMP-9 pada kelompok T3+T4 lebih tinggi dibandingkan ekspresi negatif. Uji *chi-square* tidak dapat dilakukan karena adanya sel dengan nilai *expected* <5, maka dilakukan uji *Fisher exact*. Hasil uji *Fisher exact* antara ekspresi MMP-9 dan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif memperlihatkan hubungan tidak bermakna ( $p>0,05$ ).

### **DISKUSI**

Karakteristik pasien pada penelitian adenokarsinoma kolorektal invasif ini didapatkan kelompok usia terbanyak menderita adenokarsinoma kolorektal adalah 51-60 tahun (28,6%), usia paling rendah adalah 28 tahun dan paling tinggi 78 tahun, dengan usia rata-rata adalah 47,43 tahun. Pasien laki-laki lebih banyak daripada perempuan dengan perbandingan 3:2.

Penelitian terdahulu melaporkan kanker kolorektal pada laki-laki lebih tinggi dari pada perempuan dengan perbandingan 1,5:1,<sup>23</sup> pada usia 75-80 tahun<sup>24</sup>. Penelitian lain melaporkan pada usia 40-45 tahun.<sup>4</sup> Hal tersebut di atas diduga karena adanya perbedaan gaya hidup di masing-masing negara (diet, kebiasaan merokok, konsumsi alkohol, dll.)

Penelitian-penelitian ekspresi MMP-9 pada karsinoma kolorektal mendapatkan hasil yang bervariasi. Ekspresi MMP-9 pada sitoplasma sel kanker bervariasi antara 45,12-100%. Penelitian sebelumnya melaporkan ekspresi MMP-9 cukup tinggi pada karsinoma kolorektal, dengan imunoreaktivitas positif pada sel epitel tumor sebesar 45,12%.<sup>18,21</sup> Penelitian lain menemukan ekspresi MMP-9 pada sitoplasma sel epitel karsinoma kolorektal sebesar 69,1% dan pada sel epitel kanker kolorektal sebesar 9%. Penelitian lain melaporkan ekspresi MMP-9 pada membran sel, sel stroma yang mengalami radang; pada sitoplasma sel tumor (19,27%).

Hasil penelitian ini melaporkan ekspresi MMP-9 pada sitoplasma sel kanker kolorektal secara kuantitatif, tanpa menilai intensitas pewarnaan. Ekspresi MMP dinyatakan positif apabila ada timbul warna coklat pada >10% sel-sel kanker dan negatif apabila sel-sel kanker yang terwarnai  $\leq 10\%$ . Pada penelitian ini didapatkan ekspresi MMP-9 positif pada 28 kasus, yaitu pada kelompok 1 sebanyak 10 kasus (35,7%), dan kelompok 2 sebanyak 18

kasus (64,3%). Ekspresi negatif terlihat pada 7 kasus, yaitu 3 kasus (42,9%) pada kelompok 1, dan 4 kasus (57,1%).

Penelitian terdahulu menilai ekspresi MMP-9 secara semikuantitatif. Intensitas pewarnaan dinilai dengan skor 0 jika tidak ada sitoplasma sel epitel yang terwarnai, +1 jika meragukan, +2 jika sebagian sitoplasma terwarnai, dan +3 jika terwarnai kuat.<sup>15,26</sup> Penelitian lain melaporkan ekspresi MMP-9 pada sitoplasma sel epitel dengan menghitung intensitas pewarnaan dan distribusinya. Imunoreaktivitas diderajatkan dari (-) sampai (++)<sup>30</sup>. Nilai (-) jika hampir tidak ada imunoreaktivitas, nilai (+) jika 10-40% sel mengekspresikan MMP-9 dengan imunoreaktivitas lemah sampai sedang, dan (++) jika 40-100% sel mengekspresikan MMP-9 dengan imunoreaktivitas sedang sampai kuat. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian terdahulu menggunakan penilaian semikuantitatif; nilai positif jika ada sel-sel yang terwarnai >10%, dan negatif jika sel-sel yang terwarnai  $\leq 10\%$ .<sup>15,27,28</sup>

Pada penelitian ini terlihat bahwa semakin dalam invasi sel kanker kolorektal, semakin besar persentase ekspresi positif MMP-9, meskipun secara statistik terdapat hubungan yang tidak bermakna antara ekspresi MMP-9 dengan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif ( $p>0,05$ ).

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan ekspresi MMP-9 positif pada 85% sel kanker.<sup>29</sup> Ekspresi MMP-9 berhubungan dengan derajat histopatologi dan lokasi tumor, namun tidak terdapat hubungan dengan tingkat kedalaman invasi. Penelitian terdahulu melaporkan ekspresi MMP-9 yang lebih tinggi pada tumor dengan invasi lebih dalam, tapi secara statistik tidak bermakna. Namun, peneliti lain melaporkan adanya hubungan bermakna antara ekspresi MMP-9 dan kedalaman invasi.<sup>18,31</sup> Adanya perbedaan tersebut diduga karena kriteria penilaian ekspresi MMP-9 yang belum jelas dalam penilaian tingkat kedalaman invasi, baik karena waktu pengiriman sampel dari klinik, maupun kesalahan saat pemrosesan sampel di laboratorium patologi anatomik.

### **KESIMPULAN**

Ekspresi MMP-9 dapat digunakan untuk menentukan tingkat kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal invasif.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, *et al.* Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Digestive System. Lyon: IARC Press; 2000.
2. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3:153-73.
3. Globocan.iarc.fr. Graphs>bar chart by populations 2015 [cited 2014 December 14]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/bar\\_site\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/bar_site_sel.aspx).
4. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009; 22: 191-7.
5. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A. An overview of colorectal cancer survival rates and prognosis in asia. *World J Gastrointest Oncol.* 2012; 4: 71-5.
6. Departemen Kesehatan RI. Deteksi Dini Kanker Usus Besar 2006. [cited 2014 December 14]. Available from: <http://www.litbang.depkes.go.id/aktual/kliping/KankerUsus011106.htm>.
7. Badan Registrasi Kanker IAPI DJPMDKR, Yayasan Kanker Indonesia. Kanker di Indonesia 2008: Data Histopatologik. Jakarta: YKI; 2008.
8. Pappas A, Lagoudianakis E, Seretis C, Tsiambas E, Koronakis N, Toutouzas K, *et al.* Clinical role of her-2/neu expression in colorectal cancer. *J BUON: Official J Balkan Union Oncol.* 2013; 18: 98-104.
9. Cancer Research UK. Bowel cancer survival statistics [cited 2015 October 15]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bowel-cancer/survival#heading-Three>.
10. Farina AR, Mackay AR. Gelatinase b/mmp-9 in tumour pathogenesis and progression. *Cancer.* 2014; 6: 240-96.
11. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiol (Bethesda, Md).* 2013; 28: 391-403.
12. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, *et al.* Tnm and modified dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7: 2828-35.
13. Merdad A, Karim S, Schulten HJ, Dallol A, Buhmeida A, Al-Thubaity F, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (mmps) in primary human breast cancer: Mmp-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 2014; 34: 1355-66.
14. Schweigert D, Valuckas KP, Kovalcis V, Ulys A, Chvatovic G, Didziapetriene J. Significance of mmp-9 expression and mmp-9 polymorphism in prostate cancer. *Tumori.* 2013; 99: 523-9.
15. Gu ZD, Chen KN, Li M, Gu J, Li JY. Clinical significance of matrix metalloproteinase-9 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol: WJG.* 2005; 11: 871-4.
16. Colovic Z, Pesutic-Pisac V, Poljak NK, Racic G, Cikojevic D, Kontic M. Expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with squamous cell carcinoma of the larynx. *Collegium Antropologicum.* 2013; 37: 151-5.
17. Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, *et al.* Increased expression of mmp-9 and il-8 are correlated with poor prognosis of bladder cancer. *BMC Urol.* 2012; 12: 1-5.
18. Zuzga DS, Gibbons AV, Li P, Lubbe WJ, Chervoneva I, Pitari GM. Overexpression of matrix metalloproteinase 9 in tumor epithelial cells correlates with colorectal cancer metastasis. *Clin Translat Sci.* 2008;1:136-41.
19. Yang B, Tang F, Zhang B, Zhao Y, Feng J, Rao Z. Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer. *World J Surg Oncol.* 2014; 12: 24-30.
20. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, *et al.* Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer.* 2001; 92: 2680-91.
21. Kostova E, Slaninka-Miceska M, Labacevski N, Jakovski K, Trojchanec J, Atanasovska E, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 in patients with

- colorectal cancer. *Vojnosanitetski Pregled*. 2014; 71: 52-9.
22. Koskensalo S, Hagstrom J, Linder N, Lundin M, Sorsa T, Louhimo J, *et al*. Lack of mmp-9 expression is a marker for poor prognosis in dukes' b colorectal cancer. *BMC Clin Pathol*. 2012; 12: 24-31.
  23. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *British Med Bulletin*. 2002; 64: 1-25.
  24. Siegel R, DeSantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *Cancer J Clin*. 2014; 64: 104-17.
  25. Cdc.gov. Cdc - colorectal cancer rates by race and ethnicity 2015 [cited 2015 October 29]. Available from: <http://www.cdc.gov/cancer/colorectal/statistics/race.htm>
  26. Jensen SA, Vainer B, Bartels A, Brunner N, Sorensen JB. Expression of matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (timp-1) by colorectal cancer cells and adjacent stroma cells-associations with histopathology and patients outcome. *Eur J Cancer*. 2010; 46: 3233-42.
  27. Illemann M, Bird N, Majeed A, Sehested M, Laerum OD, Lund LR, *et al*. Mmp-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol Cancer Res*. 2006; 4: 293-302.
  28. Peschos D, Damala C, Stefanou D, Tsanou E, Assimakopoulos D, Vougiouklakis T, *et al*. Expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase b) in benign, premalignant and malignant laryngeal lesions. *Histol Histopathol*. 2006; 21: 603-8.
  29. Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, Collan Y, Laato M, Syrjanen S, *et al*. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (mmp-9) in stage ii colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer*. 2009; 40: 91-7.
  30. Kim TS, Kim YB. Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2 (mmp-2), and matrix metalloproteinase-9 (mmp-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma. *J Korean Med Sci*. 1999; 14: 263-70.
  31. Dragutinovic V, Radonjic NV, Petronijevic ND, Tatic SB, Dimitrijevic IB, Radovanovic NS, *et al*. Matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) and -9 (mmp-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. *Mol Cell Biochem*. 2011; 355: 173-8.