

Original Article

Study of PAI-1 -675 4G/5G Polymorphism among patients with breast cancer from North West of Iran

Mahdieh Younesi¹, Mohammadali Hosseinpour Feizi^{1*}, Nasser Pouladi²

¹Department of Animal Biology, School of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

²Department of Biology, School of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: pourfeizi@eastp.ir

Received: 13 November 2015 Accepted: 8 March 2016 First Published online: 9 December 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 February-March; 39(6):81-85

Abstract

Background: Previous studies have shown the association of genetic factors such as PAI-1 4G/5G polymorphism with susceptibility to breast cancer patients. The aim of this study was to investigate the effect of this polymorphism in breast cancer patients from North West of Iran.

Methods: 160 breast cancer patients and 160 healthy individuals were selected. Peripheral blood-DNA samples were taken and used for PCR amplification using the allele specific primers.

Results: Based on molecular studies, all patients and control group were divided into three genotypes 4G/4G, 4G/5G and 5G/5G. Genotype distribution between patients (11.25%, 71.25% and 17.50%, respectively) and controls (10.62%, 71.87% and 17.50%, respectively). Additionally, the frequencies of the 4G and 5G alleles between patients (46.87% and 53.12%, respectively) and control group (46.56% and 53.43%, respectively).

Conclusion: The genotypic and allelic frequencies of PAI-1 4G/5G polymorphism showed no significant difference between breast cancer patients and control individuals in this cohort.

Keywords: Breast Cancer, Polymorphism, PAI-1

How to cite this article: Younesi M, Hosseinpour Feizi M.A, Pouladi N. [Study of PAI-1 -675 4G/5G Polymorphism among patients with breast cancer from North West of Iran]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 February-March;39(6):81-85. Persian.

مقاله پژوهشی

مطالعه پلی مورفسم PAI-1 -675 4G/5G در بیماران مبتلا به سرطان پستان از شمال غرب ایران

مهدیه یونسی^۱، محمدعلی حسین پور فیضی^{۲*}، ناصر پولادی^۲

^۱گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
 *نویسنده رابط؛ ایمیل: pourfeizi@eastp.ir

دریافت: ۱۳۹۴/۶/۹ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۹/۱۸
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، بهمن و اسفند ۱۳۹۶؛ ۳۹(۶): ۸۱-۸۵

چکیده

زمینه: مطالعات پیشین ارتباط برخی از عوامل ژنتیکی مانند پلی مورفسم PAI-1 4G/5G با استعداد ابتلای به سرطان پستان را نشان داده اند. لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثر این پلی مورفسم در بیماران مبتلا به سرطان پستان از شمال غرب ایران می باشد.

روش کار: ۱۶۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۶۰ فرد سالم از جمعیت شمال غرب ایران انتخاب شدند. DNA خون محیطی نمونه ها جهت تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلل مورد استفاده قرار گرفتند. داده های جمع آوری و با استفاده از آزمون دقیق فیشر و نرم افزار SPSS با سطح معناداری ۰/۰۵ مطالعه و بررسی شدند.

یافته ها: بر اساس مطالعات مولکولی، تمام بیماران و گروه کنترل به سه ژنوتیپ G/4G^۴، G/5G^۴ و G/5G^۵ تقسیم شدند. توزیع ژنوتیپ بین بیماران (به ترتیب ۱۱/۲۵٪، ۷۱/۲۵٪ و ۱۷/۵۰٪) و در گروه کنترل (به ترتیب ۱۰/۶۲٪، ۷۱/۸۷٪ و ۱۷/۵۰٪) بود. علاوه بر این، فرکانس آلل G^۴ و G^۵ بین بیماران (به ترتیب ۴۶/۸۷٪ و ۵۳/۱۲٪) و در گروه کنترل (به ترتیب ۴۶/۵۶٪ و ۵۳/۴۳٪) محاسبه گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که فرکانس های ژنوتیپی و آللی پلی مورفسم PAI-1 4G/5G تفاوت معناداری را بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد گروه کنترل در جمعیت مورد مطالعه ما نشان ندادند.

کلید واژه ها: سرطان پستان، پلی مورفسم، PAI-1

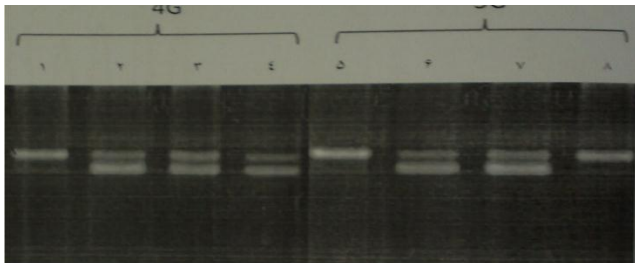
نحوه استناد به این مقاله: یونسی م، حسین پور فیضی م، ع، پولادی ن. مطالعه پلی مورفسم PAI-1 -675 4G/5G در بیماران مبتلا به سرطان پستان از شمال غرب ایران. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۶): ۸۱-۸۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی رایت کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

لکوسیت‌های خون محیطی استخراج گردید (۱۲). تشخیص پلی مورفیسم G/5G^۴ از پروموتور ژن PAI-1 توسط سیستم تکثیر مقاوم به جهش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (ARMS-PCR) و با استفاده از یک آغازگر کنترل بالا دست (۵'-AAGCTTTTACCATGG-۵')، یک آغازگر اختصاصی آلل G^۴ یا G^۵ (به ترتیب ۵'-AGAGTCTGGACA-۵' یا ۵'-CGTGGGGA-۵')، یک آغازگر پایین دست مشترک (۵'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTC-۵') (AGAGTCTGGACACGTGGGGG-۳')، و یک آغازگر پایین دست مشترک (۵'-TAG-۳') انجام گردید (۱۳و۴). این آغازگرها یک قطعه ۱۴۱ جفت بازی برای آلل G^۴ یا G^۵ و همچنین یک قطعه ۲۵۶ جفت بازی برای کنترل داخلی را تکثیر می‌کنند. محصولات تکثیری به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۲٪ جداسازی و با استفاده از تجسم اتیدیوم بروماید رؤیت گردید (شکل ۱). افراد با توجه به حضور قطعه ۱۴۱ جفت بازی تولید شده توسط دو آغازگر اختصاصی آلل در سه گروه G/4G^۴، G/5G^۴ و G/5G^۵ طبقه‌بندی شدند. علاوه بر این، از روش تعیین توالی نیز جهت تأیید نمونه‌ها استفاده شد. برای این منظور ۱۰ نمونه از هر گروه بیمار و کنترل انتخاب شد و با روش توالی‌یابی دقت و صحت نتایج تأیید گردید. ارتباط بین پلی‌مورفیسم PAI-1 4G/5G و سرطان پستان، همچنین تفاوت در فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی بین بیماران و گروه کنترل از طریق آزمون دقیق فیشر و نرم افزار SPSS با $P < 0.05$ به لحاظ آماری معنادار، نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱: نتایج حاصل از ARMS-PCR برای پلی‌مورفیسم PAI-1 4G/5G (۱ و ۵- نمونه‌های کنترل منفی، ۲ و ۶- نمونه‌های کنترل مثبت، ۳ و ۷- نمونه هتروزیگوت G/4G^۴، ۴ و ۸- نمونه هموزیگوت G/5G^۵)

یافته‌ها

برای تعیین اینکه آیا پلی‌مورفیسم PAI-1 4G/5G در ابتلای سرطان پستان کمک می‌کند، فرکانس‌های ژنوتیپی و آللی در ۱۶۰ بیمار (با میانگین سنی ۴۶/۸۴ سال، دامنه ۲۵-۸۳ سال) و ۱۶۰ فرد گروه کنترل (با متوسط سن ۴۶/۵۰ سال، دامنه ۱۴-۹۴ سال) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. در میان بیماران مورد مطالعه ۱۵۸ نفر (۹۸/۷۵٪) کارسینومای تهاجمی داکتال و ۲ نفر (۱/۲۵٪) کارسینومای غیرتهاجمی داکتال داشتند.

پیشرفت سرطان منجر به تهاجم و در نهایت متاستاز می‌شود، که علت اکثر مرگ و میرهای ناشی از سرطان می‌باشد (۳-۱). متاستاز یک فرایند چند عاملی است که شامل چسبندگی به غشای پایه، ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک و مهاجرت سلول‌های سرطانی به عروق و گره‌های لنفاوی و به دنبال آن نشت در مکان‌های دور دست می‌باشد (۱). PAI-1 یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی در حدود ۵۰ کیلو دالتون است و متعلق به ابر خانواده بازدارنده پروتئیناز سرین می‌باشد (۴). همچنین PAI-1 مهارکننده اصلی سیستم فعال-کننده پلاسمینوژن بوده و توسط اندوتلیوم عروق سنتز می‌گردد (۴). PAI-1 نه تنها مانع از سیستم تجزیه فیبرین می‌شود بلکه در مهاجرت، تهاجم و مدولاسیون از چسبندگی سلول در طی پروسه‌های التهابی نیز نقش دارد (۶و۵). ژن PAI-1 انسانی بر روی بازوی بلند کروموزوم هفت واقع شده و شامل نه اگزون و هشت اینترون می‌باشد (۷و۴). در میان واریانت‌های ژن PAI-1، پلی‌مورفیسم G/5G^۴ به دلیل محل آن در پروموتور ژن که نشان‌دهنده نقش احتمالی آن در تنظیم رونویسی PAI-1 می‌باشد، اغلب مورد مطالعه بوده است (۸و۱). ارتباط پلی‌مورفیسم PAI-1 4G/5G با استعداد ابتلا به اختلالات مختلفی مانند انفارکتوس حاد میوکارد، بیماری عروق کرونر، دیابت نوع دو و بیماری‌های دیگری همچون بیماری بورگر نشان داده شده است (۱۰و۹). همچنین بیان بالای PAI-1 با پیش آگهی ضعیف در انواع سرطان‌های پستان، روده بزرگ و کلیه ارتباط نزدیکی داشته است (۷). لذا ما فرض کردیم که پلی‌مورفیسم PAI-1 4G/5G ممکن است بر روی ابتلا به سرطان پستان تأثیر داشته باشد. پس هدف از این مطالعه، بررسی اثر این پلی‌مورفیسم در ابتلا به سرطان پستان در جمعیت شمال غرب ایران می‌باشد.

روش کار

این مطالعه توصیفی-تحلیلی در طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ انجام گرفت و شامل ۱۶۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۶۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل بود. تشخیص بیماران با توجه به معیارهای سرطان پستان (تست‌های غربالگری و تست‌های تشخیصی) توسط متخصصان و با تأیید پاتولوژیست صورت گرفت (۱۱). افراد گروه کنترل به صورت تصادفی از جمعیت عمومی و بدون هیچگونه سابقه قبلی از سرطان در خانواده خود انتخاب شدند. حجم نمونه با توجه به سایر مقالات موجود انتخاب شد و تمامی افراد مورد مطالعه از جمعیت شمال غرب ایران شامل استان‌های آذربایجان شرقی و غربی بودند. خون محیطی بیماران پس از جراحی در بیمارستان و خون محیطی اهدا کنندگان سالم در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه تبریز با رضایت افراد و طبق قوانین بیمارستانی نمونه‌برداری شد. DNA ژنومی با روش نمک اشباع از

جدول ۱: توزیع ژنوتیپ و آلل بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل

ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G
n=160 (100%) گروه بیمار	18 (11/25)	114 (71/25)	28 (17/50)	150 (96/87)	170 (53/12)
n=160 (100%) گروه کنترل	17 (10/62)	115 (71/87)	28 (17/50)	149 (96/56)	171 (53/43)
OR (95% CI)	1/067 (0/404-2/822)	0/970 (0/501-1/876)	1/000 (0/454-2/203)	1/013 (0/559-1/834)	0/988 (0/545-1/789)
P-value	0/760	0/985	1/000	0/951	0/949

*P-values < 0/05

سرطان پستان را مورد بررسی قرار داده‌اند، اما نتایج حاصل از این مطالعات متناقض می‌باشد (۸). برخی از این مطالعات نشان داده که افزایش سطح PAI-1 با آلل G4 همراهی دارد و حاملان ژنوتیپ 4G/4G دارای حساسیت افزایش یافته به اختلالات هستند. به عنوان مثال در تحقیقات سرطان پستان شانگهای بقا ضعیف در بیماران هموزیگوت برای آلل G4 مشاهده شده و این اثر در بیماران مبتلا به بیماری پیشرفته‌تر مشهود بود (۱۶). در مطالعه دیگری که در اسپانیا انجام گرفت فرکانس بالاتری از آلل G4 در بیماران مبتلا به سرطان پستان با تومورهای درجه بالاتر مشاهده شد (۱۸). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که آلل G5 یا ژنوتیپ G/5G5 می‌تواند یک عامل خطر برای توسعه بیماری محسوب شود. به عنوان مثال Lei و همکاران در طی مطالعه خود گزارش دادند که ژنوتیپ G/5G5 با متاستاز به غدد لنفاوی و بقای ضعیف مرتبط می‌باشد (۲). همچنین Yagmurdur و همکاران نیز اعلام کردند که آلل G4 تأثیر منفی بر عود موضعی و بقای عاری از بیماری در مبتلایان کارسینومای تهاجمی داکتال دارند (۱۹). از سوی دیگر، Blasiak و Sternlicht هیچ ارتباطی میان پلی مورفیسیم PAI-1 و استعداد ابتلا به سرطان پستان نیافتند (۵۰). مطالعه ما نیز در توافق با دو مطالعه قبلی، هیچ ارتباط ژنوتیپی و آللی بین بیماران و گروه کنترل برای پلی مورفیسیم PAI-1 4G/5G در جمعیت مورد بررسی نشان ندادند. در ضمن فرکانس ژنوتیپی پلی-مورفیسیم PAI-1 در میان نژادها و گروه‌های قومی متفاوت می‌باشد. بر اساس اطلاعات منتشر شده، شیوع ژنوتیپ 4G/4G در جمعیت ترکیه حدود ۱/۱۵٪، در جمعیت بریتانیا ۳۱/۱٪ و در جمعیت سوئد ۳۳/۷٪ می‌باشد (۱۵ و ۲۰). شیوع ژنوتیپ 4G/4G در جمعیت مورد مطالعه ما (۱۱/۲۵٪) در توافق با داده‌های حاصل از جمعیت ترکیه است.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که فرکانس‌های ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسیم PAI-1 4G/5G تفاوت معناداری بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل در جمعیت مورد مطالعه نشان نداده است. با این حال، مطالعات در مقیاس بزرگ‌تر و در سایر گروه‌های قومی برای روشن شدن نقش دقیق پلی مورفیسیم PAI-1 4G/5G در بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد نیاز می‌باشد.

بر اساس مطالعات مولکولی، همه بیماران و گروه کنترل به سه ژنوتیپ 4G/4G، 4G/5G و 5G/5G در ناحیه پروموتور ژن PAI-1 تقسیم شدند. توزیع ژنوتیپ بین بیماران مبتلا به سرطان پستان (به ترتیب ۱۱/۲۵٪، ۷۱/۲۵٪ و ۱۷/۵۰٪) و در گروه کنترل (به ترتیب ۱۰/۶۲٪، ۷۱/۸۷٪ و ۱۷/۵۰٪) بود. علاوه بر این فرکانس آلل‌های G4 و G5 بین بیماران (به ترتیب ۴۶/۸۷٪ و ۵۳/۱۲٪) و در گروه کنترل (به ترتیب ۴۶/۵۶٪ و ۵۳/۴۳٪) محاسبه گردید. این نتایج نشان می‌دهد که فرکانس‌های ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسیم PAI-1 4G/5G تفاوت معناداری بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد گروه کنترل در جمعیت مورد مطالعه ما نشان ندادند. جدول ۱ توزیع ژنوتیپ و آلل بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل را نشان می‌دهد.

بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های زنان در سراسر جهان و پنجم علت مرگ و میر در میان زنان ایرانی محسوب می‌شود (۱۴ و ۱۵). عوامل ژنتیکی و محیطی نقش بسیار مهمی را در بروز سرطان پستان ایفا می‌کنند (۱۵). گسترش دانش ما در تمام جنبه‌های سرطان پستان، به خصوص شناسایی حساسیت‌های ژنتیکی مرتبط با این سرطان، به منظور دستیابی به غربالگری موفق، تشخیص زودرس و درمان‌های کارآمد، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. در حال حاضر شناخته شده که PAI-1 توسط انواع متعددی از سلول‌ها سنتز شده، فعل و انفعالات مولکولی متعددی دارد و تأثیر کلی آن فراتر از یک مهارکننده پروتئاز ساده می‌باشد (۱۶). سطح پلاسمایی این پروتئین مربوط به پلی مورفیسیم حذف/درج-675 4G/5G در ژن PAI-1 می‌باشد (۴). این پلی-مورفیسیم به اتصال پروتئین‌های تنظیم‌کننده رونویسی از ژن PAI-1 تأثیر می‌گذارد (۱۷ و ۱۸). هر دو آلل G4 و G5 می‌توانند به فعال‌کننده رونویسی متصل شوند، در حالی که آلل G5 به پروتئین رپرسور نیز در این محل متصل شده و در نتیجه رونویسی پایین‌تری از ژن PAI-1 را ارائه می‌دهد (۱۷ و ۱۴). با توجه به شواهدی که پیشرفت سرطان پستان را با افزایش سطح PAI-1 همراه می‌داند، ارزیابی ارتباط بین این پلی مورفیسیم و بیماران مبتلا به سرطان پستان معقول و منطقی به نظر می‌رسد. مطالعات متعدد نقش پلی مورفیسیم PAI-1 4G/5G در

قدردانی

ما از تمامی کارکنان بیمارستان نورنجات و آزمایشگاه پاتولوژی آذربایجان جهت همکاری در نمونه‌گیری و جمع‌آوری داده‌های بالینی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

1. Blasiak J, Smolarz B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *Acta Biochim Pol* 2000; **47**: 191-199. doi: 10.1042/bst028a226a
2. Lei H, Hemminki K, Johansson R, Altieri A, Enquist K, Henriksson R, et al. PAI-1 -675 4G/5G polymorphism as a prognostic biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **109**: 165-175. doi: 10.1007/s10549-007-9635-3
3. Eroglu A, Ulu A, Cam R, Akar N. Plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism in patients with breast cancer. *J BUON* 2006; **11**: 481-484. doi: 10.1007/s11239-006-9054-z
4. Bonyadi M, Shaghagh Z, Haghi M, Dastgiri S. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism in Iranian Azeri Turkish patients with FMF disease and its association with amyloidosis. *Eur J Pediatr* 2013; **172**: 91-98. doi: 10.1007/s00431-012-1844-z
5. Sternlicht MD, Dunning AM, Moore DH, Pharoah PD, Ginzinger DG, Chin K, et al. Prognostic value of PAI-1 in invasive breast cancer: evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI-1 expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 2107-2114. doi: 10.1158/1055-9965.epi-06-0351
6. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Scientific World Journal* 2014; **2014**: 858293. doi: 10.1155/2014/858293
7. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. Clinicopathological significance of plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G polymorphism in breast cancer: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2013; **44**: 39-45. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.12.002
8. Palmirotta R, Ferroni P, Savonarola A, Martini F, Ciatti F, Laudisi A, et al. Prognostic value of pre-surgical plasma PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) levels in breast cancer. *Thromb Res* 2009; **124**: 403-408. doi: 10.1016/j.thromres.2009.02.014
9. Testa R, Bonfigli AR, Sirolla C, Boemi M, Manfrini S, Mari D, et al. Effect of 4G/5G PAI-1 polymorphism on the response of PAI-1 activity to vitamin E supplementation in Type 2 diabetic patients. *Diabetes Nutr Metab* 2004; **17**: 217-221. doi: 10.1016/j.numecd.2006.10.001
10. Anderson JL, Muhlestein JB, Habashi J, Carlquist JF, Bair TL, Elmer SP, et al. Lack of association of a common polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene with coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999; **34**: 1778-1783. doi: 10.1016/s0735-1097(99)00424-6
11. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York, Springer, 2010; PP: 347-376. doi: 10.1007/978-0-387-88441-7_32
12. Miller SA, Dynes DD, Polesky F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
13. Shaghagh Z, Bonyadi M, Somi MH, Khoshbaten M. Association of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism with inflammatory bowel disease in Iranian Azeri Turkish patients. *Saudi J Gastroenterol* 2014; **20**: 54-58. doi: 10.4103/1319-3767.126322
14. Sedaie Bonab A, Pouladi N, Hosseinpourfeizi MA, Ravanbakhsh Gavvani R, Dehghan R, Azarfam P, et al. Single-strand conformational polymorphism analysis of a common single nucleotide variation in WRAP53 gene, rs2287499, and evaluating its association in relation to breast cancer risk and prognosis among Iranian-Azeri population. *Med Oncol* 2014; **31**: 168. doi: 10.1007/s12032-014-0168-4
15. Ozen F, Erdis E, Sik E, Silan F, Uludag A, Ozdemir O. Germ-line MTHFR C677T, FV H1299R and PAI-1 5G/4G variations in breast carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**: 2903-2908. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.5.2903
16. Zhang X, Shu XO, Cai Q, Ruan Z, Gao YT, Zheng W. Functional plasminogen activator inhibitor-1 gene variants and breast cancer survival. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 6037-6042. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-05-2851
17. Zhang H, Dong P, Yang X, Liu Z. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with coronary artery disease risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2014; **7**: 3777-3788. doi: 10.1371/journal.pone.0033511
18. Castello R, Espana F, Vazquez C, Fuster C, Almenar SM, Aznar J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thromb Res* 2006; **117**: 487-492. doi: 10.1016/j.thromres.2005.03.025
19. Yagmurdu MC, Atac FB, Tutar NU, Verdi H, Isiklar I, Ozdemir BH, et al. Prognostic value of the PAI-1 4G/5G polymorphism in invasive ductal carcinoma of the breast. *Int Surg* 2008; **93**: 163-168. doi: 10.1160/th07-06-0395