ORIGINAL ARTICLE

Effect of isosorbide on matrix metalloproteinases activity of leukemic THP-1 and fibrosarcoma Wehi-164 cells in vitro

Fatemeh Hajighasemi[1],
Fatemeh Rezaeian[2]

[1] Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
[2] MD, Department of Immunology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

(Received August 4, 2013; Accepted February 23, 2014)

Abstract

Background and purpose: Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of enzymes degredating the extracellular matrix. MMPs have an important role in inflammation, tumor growth, metastasis and angiogenesis. Among the MMPs, MMP1 and MMP2 have special implication in angiogenesis. Isosorbide, as a nitric oxide donor, has been widely used in treatment of many cardiovascular diseases. Besides the inhibitory effect of isosorbide on angiogenesis, tumor growth and metastasis has been revealed in vivo. Regarding the important role of MMPs in tumor growth, metastasis and angiogenesis and also the suppressive effect of isosorbide on angiogenesis, tumor growth and metastasis, In this study, the isosorbide effect on MMP-2 and MMP-9 activity of leukemic and fibrosarcoma cells has been evaluated.

Materials and methods: The leukemic THP-1 and fibrosarcoma Wehi-164 cells were cultured in complete RPMI medium. Then the cells in the presence of phorbol myristate acetate (PMA) (25 ng/ml), incubated with different concentrations of isosorbide (0.0004, 0.004, 0.04, and 0.4 mM) for 24 hours. Thereafter, the isosorbide effect on MMP-2 and MMP-9 activity of the cells was evaluated by gelatin zymography assay. Statistical comparisons between the groups were done by analysis of variance (ANOVA).

Results: The MMPs activity of PMA-stimulated leukemic THP-1 and fibrosarcoma Wehi-164 cells treated with different concentrations of isosorbide did not show any statistical significant difference with untreated control cells.

Conclusion: The results of this study demonstrated that isosorbide had no statistical significant effect on MMPs activity of leukemic THP-1 and fibrosarcoma Wehi-164 cells. These findings proposed that anti- angiogenic effect of isosorbide, which was declared by other investigations, may possibly be owing to non-MMP activity mediated mechanisms.

Keywords: Isosorbide, matrix metalloproteinase, Wehi-164, THP-1

J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(Suppl 2): 108-115 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم ویژه‌نامه ۲ اسفند سال ۱۳۹۲ (۱۱۵-۱۰۸)

اثر ایزوسورباید بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در رده‌های سلولی فیبرو سارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه حاجی قاسمی[۱]

فاطمه رضائیان[۲]

چکیده

سابقه و هدف: ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs یا Matrix metalloproteinases) گروهی از آنزیم‌های تجزیه کننده ماتریکس خارج سلولی هستند که نقش مهمی در التهاب، آنژیوژنز (رگ‌زایی)، رشد و متاستاز سرطان دارند. ایزوسورباید، به عنوان یک دهنده نیتریک اکساید donor (NO یا Nitric oxide) دارویی رایج در درمان بیماری‌های قلبی است. به علاوه، اثر مهار کنندگی ایزوسورباید بر رشد و متاستاز تومور و آنژیوژنز در in vivo نشان داده شده است. با توجه به نقش مهم MMPs در رشد، متاستاز و آنژیوژنز تومور و نظر به اثر مهاری ایزوسورباید بر رشد، متاستاز و آنژیوژنز تومور، در این مطالعه اثر ایزوسورباید بر فعالیت MMP-۲ و MMP-۹ در رده‌های سلولی سرطانی لوسمیک THP-۱ و فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ در شرایط in vitro مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سلول‌ها پس از کشت در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute) کامل، در حضور PMA (Phorbol myristate acetate) (۲۵ ng/ml) در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسورباید دی نیترات (۰/۴، ۰/۰۴، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۰۴ میلی‌مولار) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس فعالیت MMP-۲ و MMP-۹ در محیط کشت سلول‌ها به روش ژلاتین زایموگرافی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان فعالیت MMP-۲ و MMP-۹ در سلول‌های لوسمیک THP-۱ و فیبروسارکومایی Wehi-۱۵۴ در حضور غلظت‌های مختلف ایزوسورباید تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد.

استنتاج: در این مطالعه، ایزوسورباید تأثیر معنی‌داری بر فعالیت MMP-۲ و MMP-۹ در سلول‌های لوسمیک THP-۱ و فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ نشان نداد. احتمال می‌رود فعالیت ضد آنژیوژنز ایزوسورباید که توسط دیگران گزارش شده است، ناشی از مکانیسم(های) دیگر مستقل از ماتریکس متالوپروتئینازها باشد.

واژه‌های کلیدی: ایزوسورباید، ماتریکس متالوپروتئیناز، Wehi-۱۶۴، THP-۱

مقدمه

ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix metalloproteinases یا MMPs) گروهی از اندوپپتیدازهای تجزیه کننده ماتریکس خارج سلولی هستند که نقش مهمی در رشد، گسترش و متاستاز تومور دارند (۳-۱). یکی از عوامل مؤثر در رشد و متاستاز تومور، پدیده آنژیوژنز (رگ‌زایی) است (۵، ۴). نقش ماتریکس متالوپروتئینازها در آنژیوژنز در بیماری‌های مختلف گزارش شده است (۸-۶). ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-۲) و ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-۹) که به ترتیب ۷۲ و ۹۲ کیلو دالتون وزن دارند، دارای اهمیت خاصی در پدیده آنژیوژنز، رشد و متاستاز سرطان هستند (۱۰، ۹، ۳).

از طرف دیگر، آنژیوژنز نقش مهمی در رشد، گسترش و متاستاز تومور در سرطان‌های خون (لوسمی) و فیبرو سارکوما دارد (۱۲، ۱۱) و ماتریکس متالوپروتئینازها نیز اهمیت ویژه‌ای در پدیده آنژیوژنز در بیماران لوسمیک و بیماران مبتلا به فیبروسارکوما دارند (۱۵-۱۳).

مولف مسئول: فاطمه حاجی قاسمی- تهران: بلوار کشاورز، خیابان شهید برادران عبداله‌زاده، شماره ۳۱. E-mail: resoome@yahoo.com

۱. دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. پزشک عمومی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۰/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۲/۴

ایزوسورباید، به عنوان یک دهنده نیتریک اکساید، دارویی متداول برای درمان بیماری‌های قلبی است (۱۷، ۱۶). در مطالعات به عمل آمده توسط پژوهشگران، اثرات درمانی دیگری از جمله نقش ضد التهابی، ضد توموری و غیره برای ایزوسورباید ذکر شده است (۲۰-۱۸).

Vallance و همکاران اثرات ضد التهابی ایزوسورباید را به دلیل ویژگی دهندگی نیتریک اکساید این دارو در بیماری التهابی روده گزارش کردند (۱۸). همچنین Martelletti و همکاران مهار التهاب در بافت‌های مغز بیماران میگرنی از طریق ممانعت از مهاجرت لکوسیت‌های فعال از بین سلول‌های اندوتلیال توسط ایزوسورباید را نشان دادند (۱۹). در بررسی به عمل آمده توسط Pipili-Synetos و همکاران اثر مهار کنندگی رشد، متاستاز و آنژیوژنز توسط ایزوسورباید در مدل‌های حیوانی نشان داده شد (۲۰).

با توجه به اثرات ضد توموری، ضد آنژیوژنیک و ضد التهابی داروی ایزوسورباید و از طرفی، نقش مهم آنژیوژنز در رشد، گسترش و متاستاز تومور در سرطان‌های خون (لوسمی) و فیبروسارکوما (۱۲، ۱۱) و نظر به این که ماتریکس متالوپروتئینازها اهمیت ویژه‌ای در پدیده آنژیوژنز در بیماران لوسمیک و بیماران مبتلا به فیبروسارکوما دارند (۱۵-۱۳)؛ در این مطالعه، اثر ایزوسورباید بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ (که دارای اهمیت خاصی در پدیده آنژیوژنز، رشد و متاستاز سرطان هستند) در رده‌های سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ در شرایط in vitro مورد بررسی گرفت. یافته‌های حاصل از این پژوهش در بررسی دقیق‌تر مکانیسم(های) اثر ضد آنژیوژنیک ایزوسورباید و همچنین طراحی مطالعات بعدی برای یافتن روش‌های احتمالی استفاده از ایزوسورباید در درمان بیماری‌هایی که آنژیوژنز نقش مهمی در پاتوژنز آن‌ها دارد (از جمله سرطان‌های لوسمیک و فیبروسارکوما)، مفید و راه‌گشا خواهد بود.

مواد و روش‌ها

مواد

محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute)، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، Dimethyl sulfoxide (DMSO)، Phorbol myristate acetate (PMA) و تریپان بلو (ساخت شرکت سیگما، USA) تهیه شد. سرم جنین گوساله (FBS یا serum Fetal bovine) (ساخت شرکت Gibco، USA) خریداری گردید. داروی خالص ایزوسورباید دی نیترات (ISDN یا Isosorbide dinitrate) (ساخت شرکت داروسازی سها هلال، ایران) هدیه شد. پلیت‌های کشت ۹۶ و ۲۴ خانه، فلاسک‌های کشت و لوله‌های درب‌دار استریل (ساخت شرکت NUNC، Falcon، USA) خریداری گردید.

تهیه غلظت‌های مختلف داروی ایزوسورباید دی نیترات

ابتدا دارو در DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C- نگهداری شد. سپس در هنگام تیمار سلول‌ها، غلظت‌های ۰/۴-۰/۰۰۰۴ میلی مولار از دارو در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ تهیه گردید.

رده‌های سلولی

رده‌های سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در شرایط In vitro، در محیط کشت حاوی RPMI ۱۶۴۰ و FCS (Fetal calf serum) ۱۰ درصد در دمای ۳۷ °C و CO_2 (۵ درصد)، کشت و تکثیر داده شدند.

اندازه‌گیری درصد سلول‌های زنده

قبل از تیمار سلول‌ها، به منظور سنجش درصد سلول‌های زنده از روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو TB (Trypan blue dye exclusion) (۲۱) استفاده شد.

تیمار سلول‌ها

سلول‌ها در شرایط رشد مناسب به گروه‌های سه چاهکی تقسیم شدند و $۱۰^۶$ سلول در یک ml در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی FCS ۱۰ درصد کشت داده شدند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و گروه‌های دیگر در مجاورت غلظت‌های مختلف از

ایزوسورباید (۰/۴، ۰/۰۴، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۰۴ میلی‌مولار) در حضور PMA (۲۵ ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. غلظت‌های مورد استفاده دارو بر اساس مطالعه قبلی (۲۲) انتخاب شدند؛ زیرا در این غلظت‌ها، ایزوسورباید هیچ گونه اثر سمی بر سلول‌های مورد مطالعه ندارد. پس از انقضای زمان انکوباسیون، مقداری از سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری و جهت انجام آزمایش‌های مربوط در ۲۰ °C- نگهداری گردید.

اندازه‌گیری فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها به روش ژلاتین زایموگرافی

فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ در محیط کشت سلول به روش ژلاتین زایموگرافی مطابق روش تعدیل یافته Kleiner و Stetler-Stevenson اندازه‌گیری شد (۲۳). به این صورت که سوپرناتانت‌های کشت سلولی تحت الکتروفورز در ژل ۱۰ درصد پلی اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis یا SDS-PAGE) کوپلیمریزه شده با ۲ mgl/ml ژلاتین در حضور ۰/۱ SDS درصد در شرایط غیر احیا و تحت ولتاژ ۸۰ به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند. بعد از الکتروفورز، ژل‌ها در تریتون X-۱۰۰ (۲/۵ درصد) جهت خارج نمودن SDS شستشو داده شد و سپس در یک بافر حاوی Tris-HCl (۰/۱ M، pH ۷/۴) و $CaCl_2$ (۱۰ mM) در دمای ۳۷ °C به مدت یک شب انکوبه شدند. پس از آن، ژل‌ها با رنگ کوماسی بلو ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی و سپس رنگ‌بری شدند. فعالیت پروتئولیتیک آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز به صورت باندهای سفید ناشی از لیز ژلاتین در یک زمینه آبی تشخیص داده می‌شد. حجم نسبی باندهای لیز شده نسبت به باند کنترل با استفاده از سیستم Gel documentation UVI Pro (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex۱، فرانسه) اندازه‌گیری شد و به صورت فعالیت ژلاتینولیتیک نسبی بیان گردید.

تحلیل آماری نتایج

فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ در محیط کشت سلول‌های سرطانی طی ۳ آزمایش جداگانه اندازه‌گیری و نتایج وارد نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۱/۵ (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL) شد. میانگین و انحراف معیار داده‌های به دست آمده در غلظت‌های مختلف داروی ایزوسورباید، تعیین گردید. سپس مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون Analysis of variance (ANOVA) انجام شد و $P < ۰/۰۵۰$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارهای مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف دارو بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ در رده‌های سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، در نرم‌افزار Excel رسم شدند.

یافته‌ها

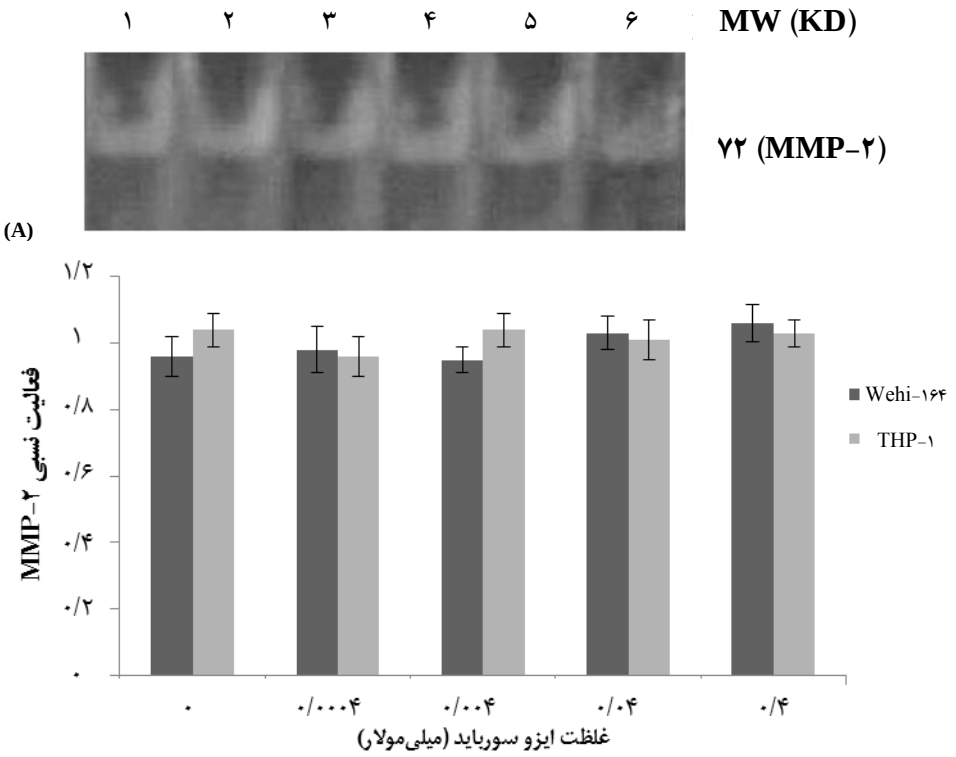
۱- اثر داروی ایزوسورباید دی نیترات بر فعالیت MMP-۲ در رده‌های سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ تحریک شده با PMA

- رده سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴

در عدم حضور محرک PMA سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴، یک باند ضعیف و مشخص مربوط به فعالیت MMP-۲ نشان دادند. PMA به طور معنی‌داری فعالیت MMP-۲ را در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف، هیچ گونه تأثیری بر فعالیت MMP-۲ در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ نشان نداد. اثر غلظت‌های مختلف ایزوسورباید بر فعالیت MMP-۲ در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ در نمودار شماره ۱ نمایش داده شده است.

- رده سلولی لوسمیک THP-۱

سلول‌های لوسمیک THP-۱ بدون تحریک، هیچ گونه باند مربوط به فعالیت MMP-۲ نشان ندادند. PMA به طور معنی‌داری موجب القای فعالیت MMP-۲ در سلول‌های لوسمیک THP-۱ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل گردید. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف،



(B)

نمودار شماره ۱: اثر داروی ایزوسورباید بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-۲) در رده‌های سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ تحریک شده با PMA. سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ (به تعداد $۱۰^{۶}$ سلول در یک ml محیط کشت) تحریک شده با PMA (۲۵ ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از ایزوسورباید (۰/۴-۰/۰۰۰۴ میلی‌مولار) قرار گرفتند. فعالیت MMP-۲ در محیط کشت سلول‌ها به روش ژلاتین زایموگرافی اندازه‌گیری شد. (A) زایموگرام فعالیت MMP-۲ در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴. ستون ۱ معرف سلول‌های Wehi-۱۶۴ تیمار نشده است. ستون‌های ۲ الی ۵ معرف غلظت‌های ۰/۰۰۰۴، ۰/۰۰۴، ۰/۰۴ و ۰/۴ میلی‌مولار از ایزوسورباید و ستون ۶ معرف کنترل است. (B) فعالیت MMP-۲ در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ تحریک شده با PMA توسط اسکن زایموگرام‌ها و دانسیتومتری باندهای MMP-۲ اندازه‌گیری شد. داده‌ها، میانگین ± انحراف معیار به دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

*** P > ۰/۱۰۰**

هیچ گونه تأثیری بر فعالیت MMP-۲ در سلول‌های لوسمیک THP-۱ نشان نداد. اثر غلظت‌های مختلف ایزوسورباید بر فعالیت MMP-۲ در سلول‌های لوسمیک THP-۱ در نمودار شماره ۱ نمایش داده شده است.

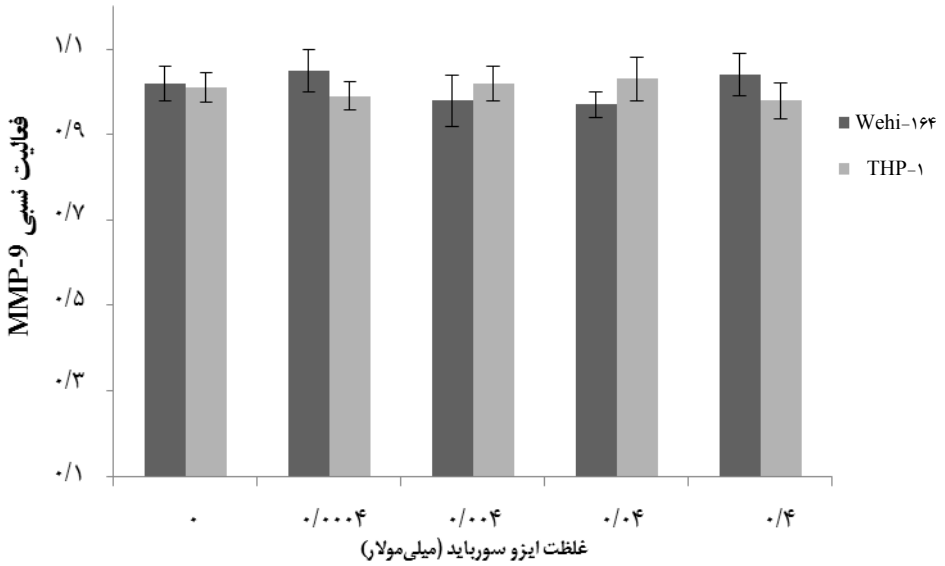
۲- اثر داروی ایزوسورباید دی نیترات بر فعالیت MMP-۹ در رده‌های سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ تحریک شده با PMA

- رده سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴

سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ بدون اثر محرک، هیچ گونه باند مربوط به فعالیت MMP-۹ نشان ندادند. PMA به طور معنی‌داری موجب القای فعالیت MMP-۹ در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل گردید. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف، هیچ گونه تأثیری بر فعالیت MMP-۹ در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ نشان نداد. اثر غلظت‌های مختلف ایزوسورباید بر فعالیت MMP-۹ در سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ در نمودار شماره ۲ نمایش داده شده است.

- رده سلولی لوسمیک THP-۱

سلول‌های لوسمیک THP-۱ بدون محرک، یک باند ضعیف و مشخص مربوط به فعالیت MMP-۹ نشان دادند.



نمودار شماره ۲: اثر داروی ایزوسوربايد بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-۹) در رده‌های سلولی فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ تحریک شده با PMA. سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ و لوسمیک THP-۱ (به تعداد ml/ ۱۰^۶) تحریک شده با PMA (۲۵ ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از ایزوسوربايد (۰/۴-۰/۰۰۰۴ میلی‌مولار) قرار گرفتند. فعالیت MMP-۹ در محیط کشت سلول به روش ژلاتین زایموگرافی اندازه‌گیری شد. داده‌ها، میانگین ± انحراف معیار به دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. P < ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.
*** P > ۰/۱۰۰**

PMA به طور معنی‌داری فعالیت MMP-۹ را در سلول‌های لوسمیک THP-۱پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسوربايد در غلظت‌های مختلف هیچ گونه تأثیری بر فعالیت MMP-۹ در سلول‌های لوسمیک THP-۱ نشان نداد. اثر غلظت‌های مختلف ایزوسوربايد بر فعالیت MMP-۹ در سلول‌های لوسمیک THP-۱ در نمودار شماره ۲ نمایش داده شده است.

بحث

با مروری بر مطالعات انجام شده توسط پژوهشگران، تا کنون مستنداتی در مورد تأثیر داروی ایزوسوربايد بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در رده‌های سلولی لوسمیک THP-۱ و فیبروسارکومایی یافت نشده است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که بین فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ در رده‌های سلولی لوسمیک THP-۱ و فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ در غلظت‌های مختلف ایزوسوربايد دی نیترات (۰/۴-۰/۰۰۰۴ میلی‌مولار) با یکدیگر و همچنین بین هر غلظت با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

ماتریکس متالوپروتئینازها از واسطه‌های مهم آنژیوژنز، گسترش و متاستاز تومور هستند (۹-۶). Ledingham و همکاران در مطالعه خود بر زنان باردار در شرایط in vivo و همچنین بر فیبروبلاست‌های گردن رحم زنان غیر باردار در شرایط in vitro، نشان دادند که ایزوسوربايد منو نیترات هیچ گونه تأثیر معنی‌داری بر میزان ترشح ماتریکس متالو پروتئینازها ندارد (۲۴) که تأیید کننده نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر است. همچنین Medina و همکاران گزارش کردند که پیش داروهای آسپیرین حاوی ایزوسوربايد تأثیری بر ترشح MMP-۲ ندارند (۲۵) که تأییدی بر نتایج مطالعه اخیر می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، مطالعات Ledingham و همکاران (۲۴) و مطالعه Medina و همکاران (۲۵) در خصوص عدم تأثیر ایزوسوربايد دی نیترات

بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها، به نظر می‌رسد که مکانیسم مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید غیر وابسته به ماتریکس متالوپروتئینازها می‌باشد و احتمال دارد مکانیسم‌های دیگری در این پدیده دخیل باشند. در تحقیقات به عمل آمده توسط Naslund و Norrby، اثر مهاری ایزوسورباید مونو نیترات بر فعالیت آنژیوژنز ناشی از bFGF (Basic fibroblast growth factor) تلقیح شده در داخل صفاق گزارش شده است (۲۶) که نشان می‌دهد اثر ضد آنژیوژنز ایزوسورباید ممکن است تا حدودی ناشی از مهار آنژیوژنز وابسته به bFGF باشد و تأیید کننده نتایج حاصل از مطالعه حاضر است.

همچنین Martelletti و همکاران، کاهش بیان مولکول چسبنده ICAM-۱ پس از مصرف ایزوسورباید را مشاهده کردند (۱۹). با توجه به نقش مهم مولکول‌های چسبنده در پدیده آنژیوژنز، امکان دارد یک مکانیسم احتمالی دیگر اثرات ضد آنژیوژنیک ایزوسورباید، کاهش بیان مولکول‌های چسبنده باشد.

در مطالعه به عمل آمده توسط حاجی قاسمی و میرشفیعی (۲۷) نشان داده شد که ایزوسورباید دی نیترات هیچ تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید عامل رشد اندوتلیال عروق (Vascular endothelial cell growth factor یا VEGF) در سلول‌های رده لوسمیک نداشته است. نتایج مطالعه حاجی قاسمی و میرشفیعی (۲۷) تأیید کننده یافته‌های مطالعه حاضر است؛ چرا که VEGF و ماتریکس متالوپروتئینازها، هر دو جزء عوامل مؤثر در فرایند آنژیوژنز هستند و همچنین MMP-۲ در تنظیم تولید VEGF، تأثیرگذار است (۲۹، ۲۸). بنابراین، به نظر می‌رسد عدم تأثیر ایزوسورباید بر تولید VEGF که در مطالعه حاجی قاسمی و میرشفیعی (۲۷) ذکر شده است، تا حدی ناشی از عدم تأثیر این دارو بر فعالیت MMP-۲ باشد.

در مطالعه دیگر انجام شده توسط حاجی قاسمی و رضوان مدنی گزارش شده است که ایزوسورباید دی نیترات تأثیری بر فعالیت تکثیری سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-۱۶۴ نداشته است. نتایج مطالعه حاجی قاسمی و رضوان مدنی می‌تواند به طور غیر مستقیم تأیید کننده نتایج مطالعه حاضر باشد؛ چرا که میزان فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها می‌تواند نشان دهنده میزان تولید آن و در نتیجه نمایانگر میزان تکثیر سلول‌های مولد آن باشد (۲۲). به نظر می‌رسد عدم تأثیر ایزوسورباید دی نیترات بر فعالیت MMP-۲ و MMP-۹ در مطالعه حاضر، تا حدی ناشی از عدم تأثیر دارو بر فعالیت تکثیری سلول‌های مورد مطالعه باشد.

در مطالعه به عمل آمده توسط Pipili-Synetos و همکاران بر موش‌های مبتلا به کارسینوم ریه، کاهش چشمگیری در رشد، آنژیوژنز و متاستاز سلول‌های سرطانی توسط ایزوسورباید در شرایط in vivo گزارش شده است (۲۰). همچنین Naslund و Norrby، مهار فعالیت آنژیوژنز وابسته به bFGF تلقیح شده در داخل صفاق توسط ایزوسورباید دی نیترات را نشان دادند (۲۶). در مطالعات به عمل آمده توسط Parinandi و همکاران نیز، مهار آنژیوژنز به صورت وابسته به دوز توسط یک دهنده نیتریک اکساید (نیتروآسپیرین)، گزارش شده است (۳۰). نکته قابل تأمل این است که مطالعات فوق که مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید را گزارش کرده‌اند، در مدل‌های حیوانی و شرایط in vivo انجام شده‌اند. به علاوه، در این مطالعات، فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها اندازه‌گیری نشده است (۲۶، ۲۰)؛ اما پژوهش حاضر در شرایط in vitro و بر رده‌های سلولی لوسمیک و فیبروسارکومایی انجام شده است.

آنژیوژنز پدیده پیچیده‌ای است که در رشد، تهاجم و متاستاز تومور نقش مهمی دارد (۵، ۴). عوامل متعددی در فرایند آنژیوژنز نقش دارند که عبارت از کموکاین‌ها و رسپتورهای آن‌ها، سایتوکاین‌های التهابی، عوامل رشد، اینتگرین‌ها، ماتریکس متالوپروتئینازها و غیره هستند (۳۱).

با در نظرگیری این مطلب که شبکه گسترده‌ای از عوامل و مدیاتورهای مختلف در تنظیم آنژیوژنز نقش دارند (۳۱) و با توجه به نقش مهم آنژیوژنز در تهاجم و متاستاز سرطان (۵، ۴) و همچنین نقش مهم آنژیوژنز در لوسمی و فیبروسارکوما (۱۲، ۱۱)، بررسی تأثیر ایزوسورباید بر سایر عوامل مؤثر بر آنژیوژنز از جمله عوامل رشد، مولکول‌های چسبنده و غیره در رده‌های

سلولی لوسمیک و فیبروسارکومایی و بیماران مربوط، در شرایط in vitro و in vivo ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ایزوسورباید دی نیترات در غلظت‌ها و زمان به کار رفته در این مطالعه، هیچ گونه تأثیری بر فعالیت MMP-۲ و MMP-۹ در سلول‌های لوسمیک و فیبروسارکومایی مورد مطالعه ندارد. بنابراین به نظر می‌رسد اثرات ضد توموری ایزوسورباید دی نیترات که در سایر پژوهش‌ها گزارش شده است (۲۶، ۲۰)، ناشی از اثرات مهاری دارو بر سایر فعالیت‌های سلول‌های سرطانی (غیر از فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها) باشد و یا این که به علت افزایش تعداد یا فعالیت بعضی از سلول‌های ایمنی باشد (۳۲). همچنین این که ممکن است عوامل مهار کننده تأثیرگذار در شرایط in vivo، قابل بررسی در مطالعات in vitro نباشند. به نظر می‌رسد با مطالعه اثر ایزوسورباید بر فعالیت سایر انواع ماتریکس متالوپروتئینازها و دیگر عوامل مؤثر بر فعالیت آنژیوژنز در سلول‌های طبیعی و توموری در شرایط آزمایشگاهی و in vivo، اطلاعات دقیق‌تری در مورد مکانیسم‌های مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید به دست آید. نتایج این مطالعات می‌تواند در طراحی روش‌های درمانی مبتنی بر استفاده از ایزوسورباید برای بیماری‌های مرتبط در کنار کاربرد این دارو در درمان بیماری‌های قلبی سودمند باشد.

References

1. Zhao W, Guo W, Zhou Q, Ma SN, Wang R, Qiu Y, et al. In Vitro Antimetastatic Effect of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor ZSTK474 on Prostate Cancer PC3 Cells. Int J Mol Sci 2013; 14(7): 13577-91.
2. Li W, Saji S, Sato F, Noda M, Toi M. Potential clinical applications of matrix metalloproteinase inhibitors and their future prospects. Int J Biol Markers 2013; 28(2): 117-30.
3. Weng Y, Cai M, Zhu J, Geng J, Zhu K, Jin X, et al. Matrix metalloproteinase activity in early-stage lung cancer. Onkologie 2013; 36(5): 256-9.
4. Mina LA, Yu M, Johnson C, Burkhardt C, Miller KD, Zon R. A phase II study of combined VEGF inhibitor (bevacizumab+sorafenib) in patients with metastatic breast cancer: Hoosier Oncology Group Study BRE06-109. Invest New Drugs 2013; 31(5): 1307-10.
5. Pan Q, Pan H, Lou H, Xu Y, Tian L. Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. Cancer Cell Int 2013; 13(1): 69.
6. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. Mediators Inflamm 2013; 2013: 928315.
7. Ortak H, Demir S, Ates O, Sogut E, Alim S, Benli I. Association of MMP2-1306C/T and TIMP2G-418C polymorphisms in retinal vein occlusion. Exp Eye Res 2013; 113: 151-5.
8. Nguyen VT, Qian ZJ, Ryu B, Kim KN, Kim D, Kim YM, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) inhibitory effects of an octameric oligopeptide isolated from abalone Haliotis discus hannai. Food Chem 2013; 141(1): 503-9.
9. Lee H, Chang KW, Yang HY, Lin PW, Chen SU, Huang YL. MT1-MMP regulates MMP-2 expression and angiogenesis-related functions in human umbilical vein endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2013; 437(2): 232-8.
10. Ryu JH, Shin JY, Kim SA, Kang SW, Kim H, Kang S, et al. Non-invasive optical imaging of matrix metalloproteinase activity with albumin-based fluorogenic nanoprobes during angiogenesis in a mouse hindlimb ischemia model. Biomaterials 2013; 34(28): 6871-81.
11. Leblebisatan G, Antmen B, Sasmaz I, Kilinc Y. Vascular endothelial growth factor levels in childhood acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia. Indian J Hematol Blood Transfus 2012; 28(1): 24-8.
12. Lee HJ, Kim SA, Lee HJ, Jeong SJ, Han I, Jung JH, et al. Paeonol oxime inhibits bFGF-induced angiogenesis and reduces VEGF levels in fibrosarcoma cells. PLoS One 2010; 5(8): e12358.
13. Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K, Nadkarni A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. Mutat Res 2013; 753(1): 7-23.
14. Arico A, Giantin M, Gelain M, Riondato F, Mortarino M, Comazzi S, et al. Matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor expression in canine leukaemias. Vet J 2013; 196(2): 260-2.
15. Hwang YP, Yun HJ, Kim HG, Han EH, Choi JH, Chung YC, et al. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKCalpha/ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression.

Toxicol Lett 2011; 203(1): 9-19.
16. Taylor AL, Sabolinski ML, Tam SW, Ziesche S, Ghali JK, Archambault WT, et al. Effect of fixed-dose combined isosorbide dinitrate/hydralazine in elderly patients in the African-American heart failure trial. J Card Fail 2012; 18(8): 600-6.
17. Tan Z, Shang X, Li L, Tian L, Ma Y, Peng Y, et al. Clinical study of isosorbide mononitrate treatment for angina pectoris in coronary heart disease. Exp Ther Med 2013; 5(4): 1133-6.
18. Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, et al. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 287(4): G865-G874.
19. Martelletti P, Stirparo G, Morrone S, Rinaldi C, Giacovazzo M. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), soluble ICAM-1 and interleukin-4 by nitric oxide expression in migraine patients. J Mol Med (Berl) 1997; 75(6): 448-53.
20. Pipili-Synetos E, Papageorgiou A, Sakkoula E, Sotiropoulou G, Fotsis T, Karakiulakis G, et al. Inhibition of angiogenesis, tumour growth and metastasis by the NO-releasing vasodilators, isosorbide mononitrate and dinitrate. Br J Pharmacol 1995; 116(2): 1829-34.
21. Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. Methods Enzymol 1978; 52: 60-71.
22. Hajighasemi F, Resvan Madani FZ. The effects of isosorbide dinitrate on in vitro proliferation of WEHI-164 cells and peripheral blood mononuclear cells. Tehran Univ Med J 2012; 69(11): 671-7. (Persian).
23. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. Anal Biochem 1994; 218(2): 325-9.
24. Ledingham MA, Denison FC, Riley SC, Norman JE. Matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors are produced by the human uterine cervix but their secretion is not regulated by nitric oxide donors. Hum Reprod 1999; 14(8): 2089-96.
25. Medina C, Harmon S, Inkielewicz I, Santos-Martinez MJ, Jones M, Cantwell P, et al. Differential inhibition of tumour cell-induced platelet aggregation by the nicotinate aspirin prodrug (ST0702) and aspirin. Br J Pharmacol 2012; 166(3): 938-49.
26. Naslund I, Norrby K. NO and de novo mammalian angiogenesis: further evidence that NO inhibits bFGF-induced angiogenesis while not influencing VEGF165-induced angiogenesis. APMIS 2000; 108(1): 29-37.
27. Hajighasemi F, Mirshafiey A. The effect of Isosorbide Dinitrate on vascular endothelial growth factor production by human leukemic cell lines in vitro. Tehran Univ Med J 2009; 66(12): 827-77. (Persian).
28. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999; 274(31): 21491-4.
29. Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. Bratisl Lek Listy 2005; 106(3): 127-32.
30. Parinandi NL, Sharma A, Eubank TD, Kaufman BF, Kutala VK, Marsh CB, et al. Nitroaspirin (NCX-4016), an NO donor, is antiangiogenic through induction of loss of redox-dependent viability and cytoskeletal reorganization in endothelial cells. Antioxid Redox Signal 2007; 9(11): 1837-49.
31. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. J Mol Med (Berl) 2013; 91(3): 323-8.
32. Massari F, D'Andrea L, Cervo MA, Serra FP, Covelli V, Buscaino GA. Quantitative and qualitative modifications of lymphocyte subsets after sublingual administration of isosorbide dinitrate in migraineurs. Preliminary report. Acta Neurol (Napoli) 1994; 16(1-2): 11-8.