خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۱ بهار ۹۴ (۵۴-۴۶)

مقاله پژوهشی

اثر داروی ایزوسورباید بر فعالیت ژلاتیناز A و B در رده‌های سلولی لوسمیک

فاطمه حاجی قاسمی[۱]، عباس میر شفیعی[۲]

چکیده

سابقه و هدف

ژلاتینازها زیرگروهی از ماتریکس متالوپروتئینازها(MMPs) می‌باشند که نقش مهمی در رشد تومور و آنژیوژنز دارند. MMP-2 و MMP-9 از این نظر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. ایزوسورباید دی نیترات دارویی رایج برای درمان بیماری‌های قلبی است و اثر مهارکنندگی آن بر رشد تومور و آنژیوزنز گزارش شده است. در این مطالعه، اثر ایزوسورباید دی‌نیترات بر فعالیت ژلاتیناز A و B در رده‌های سلولی لوسمیک در شرایط *in vitro* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های لوسمیک MOLT-4 ، JURKAT و U937، پس از کشت در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FBS در حضور ۲۵ ng/mL PMA، به عنوان القاکننده فعالیت ژلاتیناز، در مجاور غلظت‌های مختلف ایزوسورباید دی‌نیترات($۱۰^{-۴} \times ۴$ ، $۱۰^{-۵} \times ۴$ ، $۱۰^{-۶} \times ۴$ و $۱۰^{-۷} \times ۴$ مولار) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس فعالیت ژلاتیناز A و B در محیط کشت سلول‌ها به روش ژلاتین زایموگرافی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

فعالیت ژلاتیناز A و B در سلول‌های لوسمیک MOLT-4 ، JURKAT وU937 در حضور ایزوسورباید دی نیترات تفاوت معناداری با گروه کنترل نشان نداد. فعالیت ژلاتیناز A در سلول MOLT-4 در گروه کنترل و در غلظت $۱۰^{-۴} \times ۴$ مولار از دارو به ترتیب ۰ ± ۱ و ۰/۰۶ ± ۱/۰۴ به دست آمد.

نتیجه گیری

در این مطالعه ایزوسورباید دی‌نیترات تأثیری بر فعالیت ژلاتیناز A و B در سلول‌های لوسمیک نشان نداد. احتمالاً فعالیت ضد توموری و ضد آنژیوژنز ایزوسورباید که توسط دیگران گزارش شده است، وابسته به مکانیسم‌های دیگری غیر وابسته به ژلاتینازهاست.

کلمات کلیدی: ایزوسورباید، ژلاتینازها، لوسمی

تاریخ دریافت : ۹۲/۱۱/۲۶
تاریخ پذیرش : ۹۳/۱۰/۲۷

۱- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ دانشیار گروه ایمنی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۷۴۳۵-۱۴۱۵۵
۲- PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

مقدمه

ژلاتینازها زیر گروهی از ماتریکس متالوپروتئینازها (matrix metalloproteinases = MMPs) محسوب می‌شوند. MMPs گروهی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده ماتریکس خارج سلولی هستند و نقش مهمی در التهاب، رشد و متاستاز سرطان دارند(۳-۱). به علاوه نقش ماتریکس متالوپروتئینازها در آنژیوژنز(رگزایی) در بیماری‌های مختلف نشان داده شده است(۶-۴). در بین ماتریکس متالوپروتئینازها، ماتریکس متالوپروتئیناز-۲(MMP-2) و ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-9) که به ترتیب ژلاتیناز A و ژلاتیناز B نامیده می‌شوند، دارای اهمیت ویژه‌ای در پدیده آنژیوژنز، رشد و متاستاز تومور هستند(۷).

ترکیبات دهنده نیتریک اکساید(NO donors) به میزان گسترده‌ای در درمان بیماری‌های قلبی ـ عروقی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۹، ۸). ایزوسوربراید، به عنوان یک دهنده نیتریک اکساید، دارویی رایج برای درمان بیماری‌های قلبی است(۱۱، ۱۰). در پژوهش‌های به عمل آمده توسط محققین، اثرات درمانی دیگری از جمله نقش ضد التهابی، ضد توموری و غیره برای ترکیبات دهنده نیتریک اکساید ذکر شده است(۱۵-۱۲). والانس و همکاران در سال ۲۰۰۴ میلادی اثرات ضد التهابی ایزوسوربراید را به دلیل ویژگی دهندگی نیتریک اکساید این دارو، در بیماری التهابی روده گزارش کردند(۱۳). هم چنین مارتلتی و همکاران مهار التهاب در بافت‌های مغز بیماران میگرنی از طریق ممانعت از مهاجرت لکوسیت‌های فعال از بین سلول‌های اندوتلیال توسط ایزوسوربراید را نشان دادند(۱۴). در بررسی به عمل آمده توسط پیپیلی - سنیتوز در سال ۱۹۹۵، اثر مهارکنندگی رشد، متاستاز و آنژیوژنز توسط ایزوسوربراید در مدل‌های حیوانی نشان داده شد(۱۵).

از طرفی آنژیوژنز نقش مهمی در رشد، گسترش و متاستاز تومور در سرطان خون(لوسمی) داشته و ماتریکس متالوپروتئینازها دارای اهمیت قابل توجهی در پدیده آنژیوژنز در بیماران لوسمیک هستند(۱۸-۱۶).

با توجه به اثرات ضد توموری، ضد آنژیوژنیک و ضد التهابی ایزوسوربراید و از طرفی نقش مهم ژلاتینازها در رشد و متاستاز تومور، التهاب و آنژیوژنز، در این مطالعه اثر ایزوسوربراید دی نیترات بر فعالیت ژلاتینازهای A و B در ۳ رده سلولی لوسمیک در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت(۱۵-۱۳، ۷-۱).

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، محیط کشت RPMI ، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، دی متیل سولفوکساید(DMSO)، فایکول هایپاک، phorbol myristate acetate (PMA) و تریپان‌بلو از شرکت سیگما (USA) تهیه شد.

سرم جنین گوساله(FBS) از شرکت جیبکو(USA) خریداری گردید. داروی خالص ایزوسوربراید دی نیترات (ISDN) توسط شرکت داروسازی سها هلال(تهران- ایران) به ما هدیه گردید. پلیت‌های کشت ۹۶ و ۲۴ خانه، فلاسک‌های کشت و لوله‌های درب‌دار استریل از شرکت NUNC (آمریکا، فالکون) خریداری گردید.

تهیه غلظت‌های مختلف از داروی ایزوسوربراید دی نیترات:

ابتدا داروی ایزوسوربراید دی‌نیترات(ISDN) در DMSO حل شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. سپس در هنگام تیمار سلول‌ها، غلظت‌های ۴×۱۰^{-۴} ، ۴×۱۰^{-۵} ، ۴×۱۰^{-۶} ، ۴×۱۰^{-۷} مولار از دارو در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید.

رده‌های سلولی:

رده‌های سلولی لوسمیک انسانی MOLT-4 و JURKAT (T-Cell) و U937(منوسیت) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در شرایط *in vitro* ، در محیط کشت حاوی RPMI 1640 و ۱۰٪ FCS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و (CO_2(٪۵ ، کشت و تکثیر داده شدند. قبل از تیمار سلول‌ها، به منظور سنجش درصد سلول‌های زنده از روش رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو استفاده شد(۱۹).

تیمار سلول‌ها:

رده‌های سلولی در شرایط رشد بهینه به گروه‌های سه چاهکی تقسیم شده و به تعداد $۱۰^{۶}$/mL در پلیت‌های

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

کشت ۲۴ خانه در محیط کشت RPMI 1640 حاوی FCS ۱۰٪ کشت داده شدند. غلظت‌های ۴×۱۰^{-۴} ، ۴×۱۰^{-۵} ، ۴×۱۰^{-۶}، ۴×۱۰^{-۷} مولار از داروی ایزوسورباید در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید. یک گروه سلولی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. گروه شاهد(کنترل) تنها در مجاورت محرک PMA (۲۵ ng/mL) و گروه‌های دیگر در مجاورت غلظت‌های مختلف از ایزوسورباید(۴×۱۰^{-۴}، ۴×۱۰^{-۵} ، ۴×۱۰^{-۶}، ۴×۱۰^{-۷} مولار) در حضور PMA ۲۵ ng/mL به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند(۲۰).

پس از انقضای زمان انکوباسیون، مقداری از سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری و جهت انجام آزمایش‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه‌گیری فعالیت ژلاتینازهای A و B به روش ژلاتین زایموگرافی:

فعالیت ژلاتینازهای A و B در محیط کشت سلول به روش ژلاتین زایموگرافی بر طبق روش تغییریافته کلینر و استلر ـ استیونسون اندازه‌گیری شد(۲۱). به این صورت که سوپرناتانت کشت سلولی به طور جداگانه در ژل ۱۰٪ پلی‌اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (PAGE – SDS) کوپلیمریزه شده با ۲ mg/mL ژلاتین در حضور SDS ۰/۱٪ در شرایط غیر احیا و با ولتاژ ۸۰ به مدت ۳ ساعت الکتروفورز گردید.

بعد از الکتروفورز، ژل‌ها در تریتون X-۱۰۰ (۲/۵٪) جهت خارج نمودن SDS شستشو داده شدند و سپس در یک بافر حاوی ۰/۱ M Tris-HCl (pH ۷/۴) و ۱۰ mM $CaCl_2$ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. متعاقباً ژل‌ها با رنگ کوماسی بلو ۰/۵٪ رنگ‌آمیزی و سپس رنگ‌بری شد. فعالیت پروتئولیتیک آنزیم ژلاتیناز به صورت باندهای سفید ناشی از لیز ژلاتین در یک زمینه آبی تشخیص داده می‌شود. حجم نسبی باندهای لیز شده نسبت به باند کنترل با استفاده از سیستم (Vilber Lourmat, Marne-la UVI Pro gel documentation Vallee Cedex 1, rance) اندازه‌گیری و به صورت فعالیت ژلاتینولیتیک نسبی بیان گردید.

تحلیل آماری نتایج:

فعالیت ژلاتیناز در محیط کشت ۳ رده سلولی لوسمیک در طی ۳ آزمایش جداگانه اندازه‌گیری و نتایج وارد نرم‌افزار آماری SPSS۱۱/۵ شده و میانگین و انحراف معیار داده‌ها در غلظت‌های مختلف داروی ایزوسورباید، تعیین گردید. سپس مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه(ANOVA) و با $p< ۰/۰۵$ انجام شد.

یافته‌ها

۱- اثر داروی ایزوسورباید دی‌نیترات بر فعالیت ژلاتیناز A (MMP-2) در رده‌های سلولی لوسمیک انسانی تحریک شده با PMA :

رده سلولی لوسمیک MOLT-4:

سلول‌های لوسمیک MOLT-4 بدون تحریک با PMA ، هیچ گونه باند مربوط به فعالیت ژلاتیناز A (MMP-2) را نشان ندادند. PMA به طور معناداری فعالیت ژلاتیناز A را در سلول‌های MOLT-4 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف هیچ گونه تاثیری بر فعالیت ژلاتیناز A در سلول‌های MOLT-4 نشان نداد.

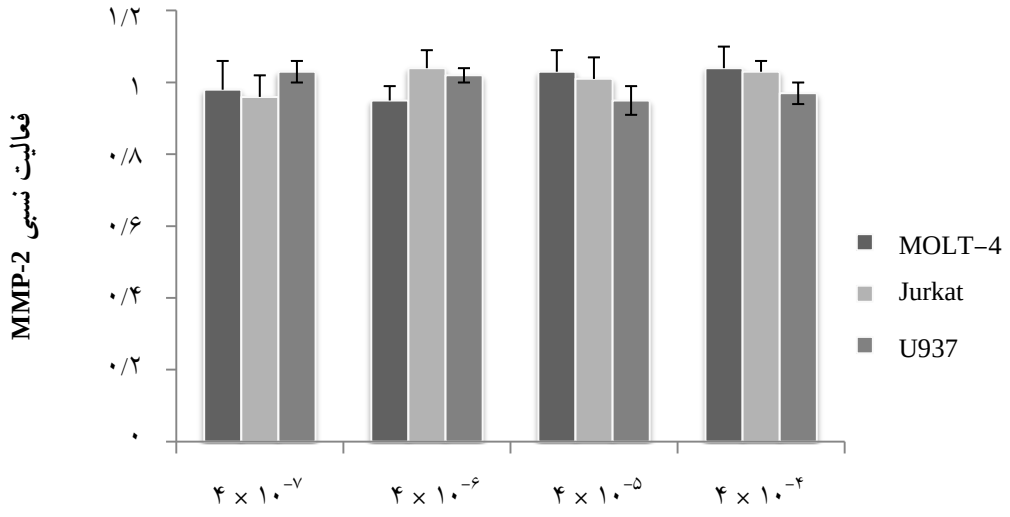
رده سلولی لوسمیک JURKAT :

سلول‌های لوسمیک JURKAT بدون اثر محرک PMA ، هیچ گونه باند مربوط به فعالیت ژلاتیناز A (MMP-2) را نشان ندادند. PMA به طور معناداری فعالیت ژلاتیناز A را در سلول‌های JURKAT پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف هیچ گونه تاثیری بر فعالیت ژلاتیناز A در سلول‌های JURKAT نشان نداد.

رده سلولی لوسمیک U937:

سلول‌های لوسمیک U937 بدون اثر محرک PMA ، یک باند ضعیف مربوط به فعالیت ژلاتیناز A(MMP-2) نشان دادند. PMA به طور معناداری فعالیت ژلاتیناز A را در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]



نمودار ۱: اثر داروی ایزوسورباید دی‌نیترات بر فعالیت ژلاتیناز A (MMP-2) در رده‌های سلولی لوسمیک انسانی MOLT-4 ، JURKAT و U937 تحریک شده با PMA . فعالیت ژلاتیناز A (MMP-2) در محیط کشت سلول به روش ژلاتین زایموگرافی اندازه‌گیری شد. داده‌ها، میانگین ± انحراف معیار به دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. ۰/۰۵ >p معنادار در نظر گرفته می‌شود.

سلول‌های U937 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف هیچ گونه تاثیری بر فعالیت ژلاتیناز A در سلول‌های U937 نشان نداد(نمودار ۱). هر آزمایش برای هر رده سلولی ۳ بار تکرار شده است.

۲- اثر داروی ایزوسورباید دی‌نیترات بر فعالیت ژلاتیناز B (MMP-9) در رده‌های سلولی لوسمیک انسانی تحریک شده با PMA :

رده سلولی لوسمیک MOLT-4:

سلول‌های لوسمیک MOLT-4 بدون تحریک با PMA ، هیچ گونه باند مربوط به فعالیت ژلاتیناز B را (MMP-9) نشان ندادند. PMA به طور معناداری فعالیت ژلاتیناز B را در سلول‌های MOLT-4 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف هیچ گونه تاثیری بر فعالیت ژلاتیناز B در سلول‌های MOLT-4 نشان نداد.

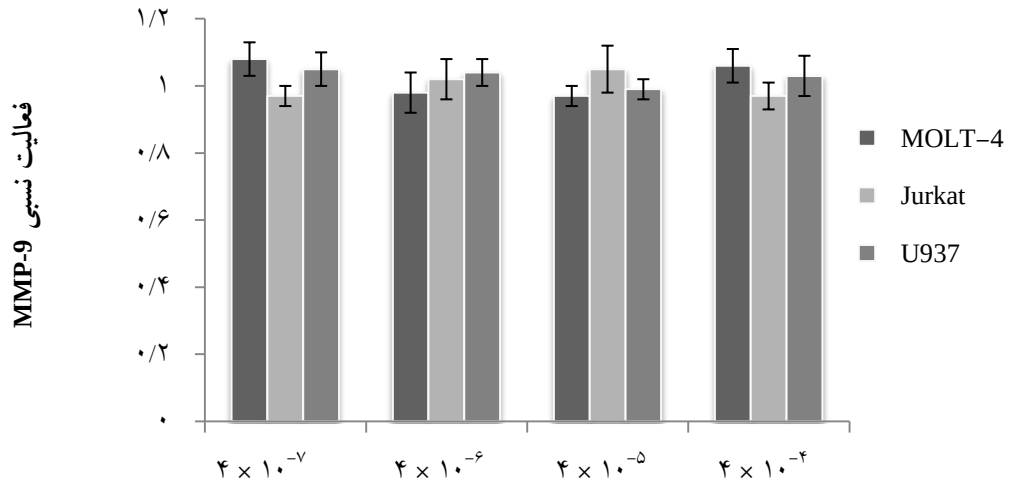
رده سلولی لوسمیک JURKAT:

سلول‌های لوسمیک JURKAT بدون اثر محرک، هیچ گونه باند مربوط به فعالیت ژلاتیناز B را (MMP-9) نشان ندادند. PMA به طور معناداری فعالیت ژلاتیناز B را در سلول‌های JURKAT پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسورباید در دوزهای به کار رفته هیچ گونه تاثیری بر فعالیت ژلاتیناز B در سلول‌های JURKAT نشان نداد.

رده سلولی لوسمیک U937:

سلول‌های لوسمیک U937 بدون اثر محرک، یک باند ضعیف مربوط به فعالیت ژلاتیناز B (MMP-9) نشان دادند. PMA به طور معناداری فعالیت ژلاتیناز B را در سلول‌های U937 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داد. ایزوسورباید در غلظت‌های مختلف هیچ گونه تاثیر معناداری بر فعالیت ژلاتیناز B در سلول‌های U937 نشان نداد(نمودار ۲). هر آزمایش برای

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]



نمودار ۲: اثر داروی ایزوسورباید دی‌نیترات بر فعالیت ژلاتیناز B (MMP-9) در رده‌های سلولی لوسمیک انسانی MOLT-4 ، JURKAT و U937 تحریک شده با PMA . فعالیت ژلاتیناز B (MMP-9) در محیط کشت سلول به روش ژلاتین زایموگرافی اندازه‌گیری شد. داده‌ها، میانگین ± انحراف معیار به دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. ۰/۰۵ >p معنادار در نظر گرفته می‌شود.

هر رده سلولی ۳ بار تکرار شده است.

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، بین فعالیت ژلاتینازهای A و B در رده‌های سلولی سرطان خون انسانی MOLT-4 ، JURKAT و U937 در غلظت‌های مختلف ایزوسورباید دی نیترات(۴×۱۰^{-۴} ، ۴×۱۰^{-۵}، ۴×۱۰^{-۶}، ۴×۱۰^{-۷} مولار) با یکدیگر و هم چنین بین هر غلظت با گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد.

مشابه نتایج به دست آمده در این تحقیق، در مطالعه به عمل آمده توسط لدینقام و همکاران در سال ۱۹۹۹ بر زنان باردار در شرایط *in vivo* و هم چنین بر فیبروبلاست‌های گردن رحم زنان غیر باردار در شرایط *in vitro* ، نشان داده شد که ایزوسورباید منونیترات هیچ‌گونه تأثیر معناداری بر میزان ترشح ماتریکس متالوپروتئینازها نداشته است(۲۲).

بر اساس اطلاعات موجود تاکنون تاثیر داروی ایزوسورباید بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها در رده‌های سلولی لوسمیک انسانی مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه به عمل آمده توسط حاجی قاسمی و همکار در سال ۱۳۸۷، نشان داده شده است که ایزوسورباید دی‌نیترات هیچ تاثیر معناداری بر میزان تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروق(Vascular = VEGF Endothelial Cell Growth Factor) در سلول‌های رده لوسمیک نداشته است(۲۳). نتایج مطالعه حاجی قاسمی و همکار تاییدکننده یافته‌های مطالعه حاضر است. زیرا VEGF و ماتریکس متالو پروتئینازها، هر دو جزو فاکتورهای مؤثر در فرآیند آنژیوژنز(رگزایی) بوده و هم چنین MMP-2 در تنظیم تولید VEGF تاثیرگذار است(۲۵، ۲۴). بنابراین به نظر می‌رسد عدم تاثیر ایزوسورباید بر تولید VEGF که در مطالعه حاجی قاسمی و همکار ذکر شده است، تا حدی ناشی از عدم تاثیر این دارو بر فعالیت MMP-2 باشد.

در مطالعه دیگری که توسط حاجی قاسمی و همکار در سال ۱۳۹۰ انجام شد، گزارش شده است که ایزوسورباید دی نیترات تاثیری بر فعالیت تکثیری سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-164 نداشته است(۲۶). نتایج مطالعه حاجی قاسمی و همکار می‌تواند به طور غیرمستقیم تایید کننده نتایج مطالعه حاضر باشد(۲۶). چرا که میزان فعالیت ژلاتینازها می‌تواند نشان دهنده میزان تولید آن‌ها و در نتیجه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

نمایانگر میزان تکثیر سلول‌های مولد آن‌ها باشد. به نظر می‌رسد عدم تاثیر ایزوسورباید دی‌نیترات بر فعالیت ژلاتینازهای A و B در مطالعه حاضر، تا حدی ناشی از عدم تاثیر دارو بر فعالیت تکثیری سلول‌های لوسمیک مورد مطالعه باشد.

در مطالعه به عمل آمده توسط پیپیلی سینتوز و همکاران در سال ۱۹۹۵ بر موش‌های مبتلا به کارسینوم ریه، کاهش چشمگیری در رشد، آنژیوژنز و متاستاز سلول‌های سرطانی توسط ایزوسورباید در شرایط *in vitro* گزارش شده است(۱۵).

هم چنین ناسلند و همکاران در سال ۲۰۰۰، مهار فعالیت آنژیوژنز وابسته به bFGF تلقیح شده در داخل صفاق توسط ایزوسورباید دی‌نیترات را نشان دادند(۲۶). در مطالعه به عمل آمده توسط پریناندی در سال ۲۰۰۷ نیز مهار آنژیوژنز به صورت وابسته به دوز توسط یک دهنده نیتریک اکساید(نیتروآسپرین)، گزارش شده است (۲۷). آنژیوژنز پدیده پیچیده‌ای است که در رشد، تهاجم و متاستاز تومور نقش مهمی دارد(۲۴، ۲۳).

فاکتورهای متعددی از جمله کموکاین‌ها و رسپتورهای آن‌ها، سایتوکاین‌های التهابی، فاکتورهای رشد، اینتگرین‌ها، مولکول‌های چسبندگی سلولی، ماتریکس متالوپروتئینازها و غیره در فرآیند آنژیوژنز نقش دارند(۲۸).

ماتریکس متالوپروتئینازها از واسطه‌های مهم آنژیوژنز، گسترش و متاستاز تومور هستند(۲۳).

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر که عدم تاثیر ایزوسورباید دی‌نیترات بر فعالیت ژلاتینازهای A و B را نشان داده، به نظر می‌رسد که مکانیسم مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید غیر وابسته به ژلاتینازها بوده و احتمالاً مکانیسم‌های دیگری در این پدیده دخالت دارند. مطالعه به عمل آمده توسط ناسلند و همکاران که نشان دادند ایزوسورباید مونو نیترات فعالیت آنژیوژنز ناشی از bFGF تلقیح شده در داخل صفاق را مهار کرده است، تاییدکننده این ادعاست و نشان می‌دهد که اثر ضد آنژیوژنز یزوسورباید، ممکن است تا حدودی ناشی از مهار آنژیوژنز وابسته به bFGF باشد(۲۶).

در یک مطالعه دیگر توسط مارتلتی و همکاران در سال ۱۹۹۷، کاهش بیان مولکول چسبنده ICAM-1 پس از مصرف ایزوسورباید مشاهده شده است(۱۴). با توجه به این که مولکول‌های چسبنده نقش مهمی در آنژیوژنز دارند، به نظر می‌رسد که کاهش بیان مولکول‌های چسبنده، یک مکانیسم احتمالی دیگر اثرات ضد آنژیوژنیک ایزوسورباید باشد. نکته قابل توجه این است که مطالعه‌های فوق‌الذکر که مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید را گزارش کرده‌اند، در مدل‌های حیوانی و شرایط *in vivo* انجام شده‌اند. علاوه بر این که در مطالعه‌های مذکور، فعالیت ژلاتینازها اندازه‌گیری نشده است(۲۷، ۲۶، ۱۵).

لیکن پژوهش حاضر در شرایط *in vitro* و بر رده‌های سلولی لوسمیک انسانی انجام شده است. با در نظر گرفتن این مطلب که شبکه گسترده‌ای از عوامل و مدیاتورهای مختلف در تنظیم آنژیوژنز نقش دارند و با توجه به نقش مهم آنژیوژنز در تهاجم و متاستاز سرطان و هم چنین نقش مهم متاستاز در لوسمی، بهتر است که تاثیر ایزوسورباید بر سایر عوامل مؤثر بر آنژیوژنز از جمله فاکتورهای رشد، مولکول‌های چسبنده و غیره در رده‌های سلولی لوسمیک و بیماران مبتلا به لوسمی در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد بررسی قرار گیرد(۲۴، ۲۳، ۱۶).

نتیجه‌گیری

ایزوسورباید دی‌نیترات در غلظت‌های به کار رفته در این مطالعه هیچ گونه تاثیری بر فعالیت ژلاتینازهای A و B در سلول‌های لوسمیک مورد مطالعه نداشت. لذا به نظر می‌رسد اثرات ضد توموری ایزوسورباید دی‌نیترات که در مطالعه‌های دیگران گزارش شده است، ناشی از اثرات مهاری دارو بر سایر فعالیت‌های سلول‌های توموری غیر از فعالیت ژلاتینازها و یا به دلیل افزایش تعداد یا فعالیت برخی از سلول‌های سیستم ایمنی باشد(۳۰، ۲۹، ۲۷، ۲۶). علاوه بر این احتمال دارد فاکتورهای مهارکننده‌ای در شرایط *in vivo* نقش داشته باشند که در مطالعه‌های *in vitro* قابل بررسی نباشند. به نظر می‌رسد با بررسی اثر ایزوسورباید بر فعالیت انواع ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول‌های طبیعی و سرطانی در شرایط *in vivo* ، اطلاعات مفیدی در مورد مکانیسم‌های مهار آنژیوژنز توسط

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

ایزوسورباید به دست آید. این اطلاعات قطعاً در طراحی مطالعه‌های بعدی و سایر استفاده‌های درمانی داروی ایزوسورباید مفید خواهند بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که در نگارش مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع نبوده است.

References :

1- Mehta V, Russin J, Spirtos A, He S, Adamczyk P, Amar AP, *et al*. Matrix Metalloproteinases in Cerebral Vasospasm following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Neurol Res Int 2013; 2013: 943761.
2- Slattery ML, John E, Torres-Mejia G, Stern M, Lundgreen A, Hines L, *et al*. Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. PLoS One 2013; 8(5): e63165.
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- Yang Y, Thompson JF, Taheri S, Salayandia VM, McAvoy TA, Hill JW, *et al*. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery. J Cereb Blood Flow Metab 2013; 33(7): 1104-14.
5- Verslegers M, Lemmens K, Van Hove I, Moons L. Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. Prog Neurobiol 2013; 105: 60-78.
6- Hadler-Olsen E, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. Tumour Biol 2013; 34(4): 2041-51.
7- Selivanova SV, Stellfeld T, Heinrich TK, Mueller A, Krämer SD, Schubiger PA, *et al*. Design, synthesis and initial evaluation of a high affinity positron emission tomography probe for imaging matrix metalloproteinases 2 and 9. J Med Chem 2013; 56(12): 4912-20.
8- Naghavi N, de Mel A, Alavijeh OS, Cousins BG, Seifalian AM. Nitric oxide donors for cardiovascular implant applications. Small 2013; 9(1): 22-35.
9- Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. Cardiology 2012; 122(1): 55-68.
10- Freund Y, Delerme S, Boddaert J, Baker E, Riou B, Ray P. Isosorbide dinitrate bolus for heart failure in elderly emergency patients: a retrospective study. Eur J Emerg Med 2011; 18(5): 272-5.
11- Mitchell JE, Ferdinand KC, Watson KE, Wenger NK, Watkins LO, Flack JM, et al. Treatment of heart failure in African Americans--a call to action. J Natl Med Assoc 2011; 103(2): 86-98.
12- Xie K, Huang S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. Free Radic Biol Med 2003; 34(8): 969-86 .
13- 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): G865-74.
14- 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.
15- Pipili-Synetos E, Papageorgiou A, Sakkoula E, Sotiropoulou G, Fotsis T, Karakiulakis G, *et al*. Inhibition of angiogenesis, tumor growth and metastasis by the NO-releasing vasodilators, isosorbide mononitrate and dinitrate. Br J Pharmacol 1995; 116(2): 1829-34.
16- Leblebisatan G, Antmen B, Saşmaz I, Kilinç Y. Vascular endothelial growth factor levels in childhood acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia. Indian J Hematol Blood Transfus 2012; 28(1): 24-8.
17- 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.
18- Aricò 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.
19- Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. Methods Enzymol 1978; 52: 60-71.
20- Hajighasemi F, Hajighasemi S. Effect of Propranolol on Angiogenic Factors in Human Hematopoietic Cell Lines *in vitro*. Iran Biomed J 2009; 13(4): 223-8.
21- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of pictogram quantities of gelatinases. Anal Biochem 1994; 218(2): 325-9.
22- 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.
23- Hajighasemi F, Mirshafiey A. The effect of Isosorbide Dinitrate on vascular endothelial growth factor production by human leukemic cell lines *in vitro*. TUMJ 2009; 66(12): 872-7. [Article in Farsi]
24- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999; 274(31): 21491-4.
25- Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. Bratisl Lek Listy 2005; 106(3): 127-32.
26- Hajighasemi F, Resvan Madani FZ. The effects of isosorbide dinitrate on *in vitro* proliferation of WEHI-

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

164 cells and peripheral blood mononuclear cells. TUMJ 2012; 69(11): 671-7. [Article in Farsi]
27- Näslund 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.
28- 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.
29- Zhang L, Shi J, Feng J, Klocker H, Lee C, Zhang J. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis 2004; 7(4): 327-32.
30- 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(1): 46-54

Original Article

The effect of isosorbide on gelatinase-A and gelatinase-B activity in leukemic cell lines

Hajighasemi F.[1], Mirshafiey A.[2]

[1]Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
[2]Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Gelatinases are a subgroup of matrix metalloproteinases (MMPs) and have an important role in tumor growth and angiogenesis. In this regard, MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) have particular value. Isosorbide dinitrate (a nitric oxide donor) has been broadly used in treatment of cardiac diseases and its inhibitory effect on angiogenesis and tumor growth have been reported *in vivo*. In this study, the effect of isosorbide dinitrate on gelatinase-A and gelatinase B activity in leukemic cell lines has been assessed *in vitro*.

Materials and Methods

MOLT-4, JURKAT and U937 leukemic cells were cultured in complete RPMI medium and then incubated with different concentrations of isosorbide (4×10^{-7}, 4×10^{-6}, 4×10^{-5}, 4×10^{-4} M) in the presence of phorbol myristate acetate (PMA) (25 ng/mL), as a gelatinase inducer, for 24 hours. Afterwards, the gelatinase A and B activity in the cell culture medium was evaluated by gelatin zymography.

Results

The gelatinase A and B activity of MOLT-4, JURKAT and U937 leukemic cells treated with isosorbide did not show any significant difference with control. The gelatinase A activity was 1 ± 0.0 and 1.04 ± 0.06 in the control and 4×10^{-4} M concentration of the isosorbide in MOLT-4 cell line, respectively.

Conclusions

In this study, isosorbide did not show any significant effect on gelatinase A and B activity in leukemic cells. The anti-tumoral and anti- angiogenic effect of isosorbide was reported by others to be possibly due to non-gelatinase activity mediated mechanism.

Key words: Isosorbide, Gelatinases, Leukemia

Received: 15 Feb 2014
Accepted: 17 Jan 2015

Correspondence: Hajighasemi F., PhD of Immunology. Associate Professor of Faculty of Medicine, Shahed University.
P.O.Box: 14155-7435, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88964792; Fax: (+9821) 88966310
E-mail: *resoome@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]