# اثر ایزوسورباید بر فعالیت تکثیری رده سلولی Wehi-164 و سلول‌های منونوکلئر خون محیطی در شرایط In vitro

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۸/۲۱

فاطمه حاجی‌قاسمی*
فاطمه زهرا رضوان مدنی

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

## چکیده

***زمینه و هدف:*** یکی از رایج‌ترین داروهای مورد استفاده برای درمان بیماری‌های ایسکمیک قلبی، ایزوسورباید دی‌نیترات می‌باشد. این دارو یک دهنده نیتریک اکساید (NO donor) بوده و با اثر گشادکنندگی عروق، موجب افزایش جریان خون و دسترسی مواد شیمیایی به بافت تومور می‌شود. ایزوسورباید در مدل‌های حیوانی موجب مهار آنژیوژنز و کنترل رشد و متاستاز تومور می‌گردد. هم‌چنین به اثرات ضد التهابی ایزوسورباید به‌دلیل ویژگی دهندگی نیتریک اکساید آن اشاره شده است. در مطالعه حاضر، اثر ایزوسورباید بر فعالیت تکثیری رده سلولی فیبروسارکومایی Wehi-164 و سلول‌های منونوکلئر خون محیطی نرمال مورد بررسی قرار گرفته است. ***روش بررسی:*** پس از کشت سلول‌ها در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ Fetal Calf Serum (FCS)، سلول‌ها در مجاور غلظت‌های مختلف ایزوسورباید دی نیترات ($۱/۶\times۱۰^{-۳}$ – $۴\times۱۰^{-۶}$ مولار) در فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار داده شدند و سپس میزان تکثیر سلولی در مقایسه با گروه کنترل با دو روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و M.T.T. مورد سنجش قرار گرفت. اختلاف نتایج به‌دست آمده بین گروه تست و کنترل با کمک آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد بررسی قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** میزان تکثیر سلولی در رده سلولی فیبروسارکومایی Wehi-164 و هم‌چنین سلول‌های منونوکلئر خون محیطی نرمال مورد مطالعه، در حضور غلظت‌های مختلف ایزوسورباید تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد. ***نتیجه‌گیری:*** در این مطالعه ایزوسورباید تأثیری بر فعالیت تکثیری رده سلولی فیبروسارکومایی Wehi-164 و سلول‌های منونوکلئر خون محیطی نرمال نشان نداد. احتمالا فعالیت ضد توموری ایزوسورباید که توسط دیگر محققین گزارش شده است، وابسته به مکانیسم(های) دیگری غیر از سیتوتوکسیسیتی است.

***کلمات کلیدی:*** ایزوسورباید، تکثیر، Wehi-164، سلول‌های منونوکلئر خون محیطی.

*نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید برادران عبداله‌زاده، شماره ۳۱، کد پستی: ۱۴۱۵۶۳۵۱۱۱، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵۷۴۳۵ تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲-۰۲۱
E-mail: resoome@yahoo.com

## مقدمه

داروی ایزوسورباید دی‌نیترات (Isosorbide Dinitrate (ISDN، دهنده نیتریک اکساید (NO donor) Nitric Oxide داروی رایج در درمان بیماری‌های قلبی است.[۱و۲] در مطالعه Pipili-Synetos نشان داده شد که ایزوسورباید مهارکننده رشد، متاستاز و آنژیوژنز در مدل‌های حیوانی می‌باشد.[۳] Vallance اثرات ضد التهابی ایزوسورباید را به‌دلیل ویژگی دهندگی نیتریک اکساید این دارو، در بیماری التهابی روده گزارش کرد.[۴] در مطالعات Martelletti، نشان داده شده است که ایزوسورباید با مهار IL-4 و ICAM-1 مانع از مهاجرت لکوسیت‌های فعال از بین سلول‌های اندوتلیال به بافت‌های مغزی در بیماران میگرنی‌شده و موجب مهار التهاب می‌گردد.[۵] Hung اثر چندین عامل آنتی‌اسپاستیک از جمله ایزوسورباید دی‌نیترات را بر C-Reactive Protein (CRP) بسیار حساس (HS-CRP) در مبتلایان به آنژین اسپاستیک کرونری مورد مطالعه قرار داد و کاهش سطح HS-CRP را بعد از درمان با داروهای مذکور اعلام کرد.[۶] هم‌چنین اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک دهندگان نیتریک اکساید (NO) برای سلول‌های توموری به‌دلیل ایجاد تغییراتی در نفوذپذیری میتوکندریایی



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07 ]

(انتقال و رهاسازی سیتوکروم C از میتوکندری) نشان داده شده است.[۷] به‌علاوه اثرات ضد پرولیفراسیون سلولی نیتریک اکساید (وابسته به کانال‌های پتاسیمی) در سلول‌های فیبروبلاست قلب رت (Rat)[۸] و نیز مهار مراحل G1 و G0 از چرخه سلولی عضلات صاف عروق ریه و القای آپوپتوز توسط NO گزارش شده است.[۹] مطالعه Perrotta نشان داد که NO و دهندگان NO از جمله ایزوسوربايد دی‌نیترات سبب افزایش اثر داروهای کموتراپی با دوز کم‌تر روی سلول‌های سرطانی می‌شوند.[۱۰] با توجه به اثرات ضد توموری و ضد التهابی ایزوسوربايد،[۳-۶] در این مطالعه اثر ایزوسوربايد بر فعالیت تکثیری یک رده سلولی سرطانی (سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-164) و سلول‌های منونوکلئر خون محیطی نرمال Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)، بررسی شد.

## روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات علوم پایه تجربی (Experimental) بوده و در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۸۹ انجام شده است.

مواد: محیط کشت RPMI، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، دی‌متیل سولفوکساید Dimethyl Sulfoxide (DMSO)، فایکول هایپاک (Ficoll hypaque) و تریپان بلو از (Sigma Co., USA) تهیه شد. سرم جنین گوساله Fetal Calf Serum (FCS) از (Gibco Co., USA) خریداری گردید. 3- (4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide (M.T.T.) از (Merck Co., Germany) تهیه گردید. داروی خالص Isosorbide Dinitrate (ISDN) توسط (Soha helal Co., Iran) به ما هدیه شد. پلیت‌های کشت ۹۶ و ۲۴ خانه، فلاسک‌های کشت و لوله‌های درب‌دار استریل از شرکت NUNC (Falcon Co., USA) خریداری گردید.

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) از ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر خون هپارینه افراد داوطلب سالم با استفاده از فایکول هایپاک طبق روش Boyum جدا شدند.[۱۱] با قرارگیری خون روی محلول فایکول و سانتریفوژ، لنفوسیت‌ها بر سطح محلول فایکول و در یک لایه شناور می‌شوند. این لایه لنفوسیتی با پیپت پاستور استریل برداشته شده و پس از سه بار شستشو در RPMI 1640 برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

رده سلولی: رده سلولی فیبروسارکومایی Wehi-164 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط In vitro، در محیط کشت حاوی RPMI 1640 و ۱۰٪FCS در دمای ۳۷ °C و (۵٪)$CO_2$، کشت داده شد.

تهیه غلظت‌های مختلف از داروی ایزوسوربايد دی‌نیترات: ابتدا دارو در DMSO حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C- نگه‌داری شد. سپس در هنگام تیمار سلول‌ها، غلظت‌های $۴\times۱۰^{-۶}$-$۱/۶\times۱۰^{-۳}$ مولار از دارو در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید.

تیمار سلول‌ها: سلول‌ها در شرایط رشد اپتیمم به گروه‌های سه چاهکی تقسیم شده و به تعداد $۲\times۱۰^{۴}$cell/ml از سلول Wehi-164 و $۲\times۱۰^{۵}$cell/ml از PBMCs به‌طور جداگانه در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FCS کشت داده شدند. یک گروه به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شده و گروه‌های دیگر در مجاورت غلظت‌های مختلف از ایزوسوربايد ($۴\times۱۰^{-۶}$-$۱/۶\times۱۰^{-۳}$ مولار) به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند.

اندازه‌گیری میزان تکثیر سلولی: به‌منظور سنجش تاثیر غلظت‌های مختلف دارو بر درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلولی، در پایان زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، از دو روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو Trypan Blue dye exclusion (TB) و M.T.T. استفاده شد.[۱۲و۱۳] الف) روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو: اساس روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو، عدم جذب رنگ توسط سلول‌های زنده و جذب آن توسط سلول‌های مرده است. درصد سلول‌های زنده (Viability) با شمارش مستقیم سلول‌های زنده و مرده محاسبه می‌شود. درصد سلول‌های زنده برابر است با تعداد سلول‌های زنده به تعداد کل سلول‌ها.[۱۲] این سنجش در سه دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت. ب) روش M.T.T.: این آزمایش در سه دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. مبنای تست M.T.T.، رنگ سنجی است که براساس احیا شدن و شکسته‌شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی M.T.T. به‌وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی‌رنگ نامحلول می‌باشد.[۱۳] پس از اتمام انکوباسیون در هر یک از سه دوره زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، محیط کشت رویی هر چاهک دور ریخته شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪FCS افزوده می‌شد. سپس ۲۰µl محلول M.T.T. (۵mg/ml) به هر چاهک اضافه نموده و



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07 ]

به‌مدت چهار ساعت در انکوباتور $CO_2$ در دمای ۳۷ °C قرار می‌دادیم. بعد از اتمام زمان انکوباسیون کریستال‌های بنفش رنگی بر سطح سلول‌ها ایجاد می‌گردید. متعاقبا محیط حاوی M.T.T. را از داخل چاهک‌ها خارج کرده و به هر چاهک ۱۰۰µl ایزوپروپانول اسیدی افزوده می‌شد. ایزوپروپانول اسیدی موجب حل شدن کریستال‌های موجود در کف هر چاهک شده و سپس میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوان (ELISA reader) خوانده شده و میزان سلول‌های زنده در هر چاهک محاسبه می‌شد.

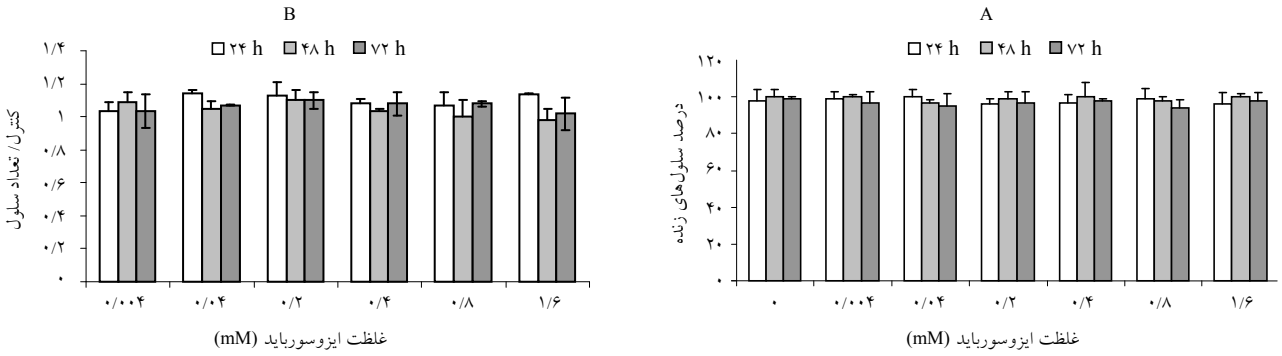
داده‌های به‌دست آمده در آزمایشات رنگ‌آمیزی با تریپان بلو (TB) و M.T.T.، وارد نرم‌افزار آماری SPSS ویراست ۱۱/۵ شده و میانگین و انحراف‌معیار نتایج به‌دست آمده در مورد رده سلولی Wehi-164 و هم‌چنین PBMCs در غلظت‌های مختلف داروی ایزوسوربراید، تعیین گردیده و سپس با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA، مورد مقایسه قرار گرفتند. P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود. نمودارهای مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف دارو بر فعالیت تکثیری سلول‌ها در زمان‌های مختلف در نرم‌افزار Excel رسم شدند.

## یافته‌ها

۱- اثر داروی ایزوسوربراید دی‌نیترات بر فعالیت تکثیری رده سلولی فیبروساکومایی: سلول‌های فیبروساکومایی Wehi-164 در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از داروی ایزوسوربراید قرار گرفتند. نتایج تاثیر ایزوسوربراید بر فعالیت تکثیری سلول Wehi-164 در نمودار ۱ (A و B) نمایش داده شده است.

A و B به‌ترتیب نمایانگر نتایج روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان بلو و M.T.T. هستند. چنان‌چه در نمودار ۱ (A و B) مشاهده می‌شود، ایزوسوربراید تاثیر معنی‌داری بر میزان تکثیر سلول‌های Wehi-164 در فواصل مختلف زمانی مورد آزمایش در این مطالعه نسبت به گروه کنترل نشان نداد. به‌علاوه در هیچ‌یک از غلظت‌های ایزوسوربراید، بین درصد سلول‌های زنده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

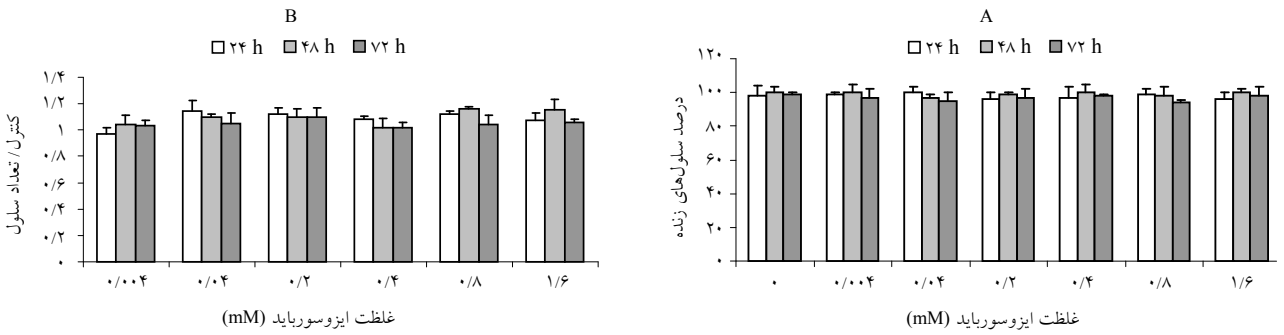
۲- اثر داروی ایزوسوربراید دی‌نیترات بر فعالیت تکثیری سلول‌های PBMCs: سلول‌های PBMCs، در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف از داروی ایزوسوربراید قرار گرفتند. نتایج تاثیر ایزوسوربراید بر فعالیت تکثیری سلول‌های PBMCs در نمودار ۲ (A و B) نمایش داده شده است. A و B به‌ترتیب نشان‌دهنده نتایج روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان بلو و M.T.T. هستند. چنان‌چه در نمودار ۲ (A و B) مشاهده می‌شود، ایزوسوربراید تاثیر معنی‌داری بر میزان تکثیر سلول‌های PBMCs، در فواصل مختلف زمانی مورد آزمایش در این مطالعه نسبت به گروه کنترل نشان نداد. به‌علاوه در هیچ‌یک از غلظت‌های ایزوسوربراید، بین درصد سلول‌های زنده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.




**نمودار-۱: اثر ایزوسوربراید دی‌نیترات بر فعالیت تکثیری رده سلولی فیبروساکومایی Wehi-164**. سلول‌های فیبروساکومایی Wehi-164 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسوربراید (۱/۶mM-۰/۰۰۴). نتایج تاثیر ایزوسوربراید بر فعالیت تکثیری سلول Wehi-164 در شکل ۱ (A و B). A و B نمایانگر نتایج روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان بلو و M.T.T. داده‌ها، میانگین± انحراف‌معیار، از سه آزمایش مختلف. P<۰/۰۵ معنی‌دار.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07 ]




**نمودار-۲: اثر ایزوسوربراید دی‌نیترات بر فعالیت تکثیری سلول‌های منو نوکلئار خون محیطی (PBMCs).** PBMCs در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسوربراید (۰/۰۰۴-۱/۶mM). نتایج تاثیر ایزوسوربراید بر فعالیت تکثیری PBMCs در شکل ۲ (A و B). A و B نمایانگر نتایج روش‌های رنگ‌آمیزی تریپان بلو و .M.T.T. داده‌ها، میانگین± انحراف‌معیار از سه آزمایش مختلف. P<۰/۰۵ معنی‌دار.

## بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق بین میزان تکثیر سلولی سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-164 و هم‌چنین PBMCs در غلظت‌های مختلف ایزوسوربراید دی‌نیترات (۰/۰۰۴-۱/۶mM) با یک‌دیگر و هم‌چنین بین هر غلظت با گروه کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در In vitro، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. هم‌چنین در هر یک از غلظت‌های دارو، درصد سلول‌های زنده بین زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. مطالعات محدودی در مورد اثرات ضد توموری ایزوسوربراید وجود دارند که اغلب در شرایط In vivo و در مدل‌های حیوانی انجام شده‌اند.[۳و۱۴و۱۵] بر اساس اطلاعات موجود تاکنون تأثیر ایزوسوربراید بر فعالیت تکثیری سلول‌های فیبروسارکومایی و یا PBMCs مورد مطالعه قرار نگرفته است.

تحقیق به‌عمل آمده توسط Parinandi روی چند دهنده NO نشان داده است که ایزوسوربراید دی‌نیترات در مقایسه با نیتروآسپرین، اثر کم‌تری در کاهش قابلیت حیات سلول‌های سرطان تخمدان انسان مقاوم به سیس‌پلاتین و سلول‌های اندوتلیال عروق گاو در In vitro داشته است که تا حدی نتایج مطالعه ما را تأیید می‌کند. در مطالعه ما ایزوسوربراید دی‌نیترات تأثیری بر فعالیت تکثیری سلول‌های Wehi-164 و PBMCs نشان نداد. در مطالعه حاضر تنها از داروی ایزوسوربراید دی‌نیترات استفاده شد و سایر دهندگان NO مشمول این مطالعه نبودند و لذا امکان مقایسه اثرات چند داروی دهنده نیتریک اکساید وجود نداشت. تفاوت دیگر مطالعه ما با Parinandi، اختلاف سلول‌های مورد بررسی است و تفاوت نتایج ما و Parinandi ممکن است ناشی از حساسیت متفاوت سلول‌ها نسبت به داروها باشد. به‌علاوه ما در مطالعه خود از روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و روش .M.T.T برای سنجش تکثیر سلولی استفاده کردیم در حالی‌که Parinandi از روش تعیین Viability سلولی با به‌کارگیری Redox-sensitive Alamar blue استفاده کرد.[۱۵]

در مطالعه به‌عمل آمده توسط Hajighasemi در شرایط In vitro، نشان داده شد که ایزوسوربراید دی‌نیترات هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروق Vascular Endothelial cell Growth Factor (VEGF) توسط رده‌های سلولی لوسمیک نداشته است.[۱۶] نتایج مطالعه Hajighasemi می‌تواند به‌صورت غیرمستقیم تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر باشد.[۱۶] چراکه میزان تولید VEGF می‌تواند تا حدی نشان‌گر میزان تکثیر سلول‌های مولد آن باشد. به‌نظر می‌رسد عدم تأثیر ایزوسوربراید دی‌نیترات بر میزان تولید VEGF در مطالعه Hajighasemi ممکن است تا حد زیادی ناشی از عدم تأثیر ایزوسوربراید دی‌نیترات بر فعالیت تکثیری سلول‌های مورد مطالعه تحقیق فوق‌الذکر باشد.[۱۶]

در مطالعه دیگری که توسط Pipili-Synetos روی موش‌های مبتلا به کارسینوم ریه در سال ۱۹۹۵ به‌عمل آمد، مشاهده شد که ایزوسوربراید مونونیترات و ایزوسوربراید دی‌نیترات موجب کاهش



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07 ]

چشمگیری در رشد، آنژیوژنز و متاستاز سلول‌های سرطانی ریه حیوان در In vivo می‌شود.[۳] علت تفاوت نتایج مطالعه ما با تحقیق به‌عمل آمده توسط Pipili-Synetos می‌تواند ناشی از اختلاف در رده سلولی مورد مطالعه و شرایط آزمایشگاهی باشد. مطالعه حاضر در شرایط In vitro انجام شد در حالی‌که Pipili-Synetos تحقیق خود را در شرایط In vivo انجام داده‌اند.[۳] مطالعاتی وجود دارند مبنی بر این‌که بعضی از دهندگان نیتریک اکساید موجب آپوپتوز می‌شوند[۹] و این‌که خود نیتریک اکساید سبب مهار تکثیر سلولی[۸] و در غلظت‌های بالا موجب آپوپتوز می‌شود.[۴] لیکن در هیچ‌یک از این مطالعات از ایزوسورباید استفاده نشده است. با توجه به این‌که برای مهار تکثیر سلول غلظت کافی از نیتریک اکساید اندوژن مورد نیاز است،[۱۷] ممکن است در مطالعه حاضر سطح NO داخل سلول به‌میزان لازم برای توقف رشد سلولی نرسیده باشد. زیرا در بعضی شرایط، نیمه‌عمر NO کوتاه بوده و یا این‌که در داخل سلول به فرم غیرفعال تبدیل می‌گردد.[۱۷]

اثرات مهاری ایزوسورباید بر رشد تومور که در مطالعه Pipili-Synetos گزارش شده است،[۳] از طریق مکانیسم‌های غیر سیتوتوکسیک بوده و مکانیسم‌های ضد توموری دیگری مانند مهار آنژیوژنز[۳و۱۴] و یا اثرات ضد التهابی ایزوسورباید از طریق کاهش بیان ICAM-1 باشند.[۵] آنژیوژنز یا رگ‌زایی یک فرایند پیچیده‌ای است که طی آن رگ‌های جدید از شبکه رگی موجود تولید می‌شوند[۱۸] و نقش مهمی در گسترش و متاستاز تومور دارد.[۱۸] مولکول‌های متعددی از جمله فاکتورهای رشد، سایتوکین‌های التهابی، مولکول‌های چسبنده سلولی، ماتریکس متالوپروتیینازها و غیره در آنژیوژنز نقش دارند.[۱۹و۲۰] در مطالعه Näslund، فعالیت آنتی آنژیوژنز ایزوسورباید مونونیترات از طریق اثر مهاری آن بر Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) در In vivo گزارش شده است.[۱۴]

هم‌چنین Martelletti، کاهش بیان مولکول چسبنده ICAM-1 به‌دنبال مصرف ایزوسورباید را گزارش کرد.[۵] مولکول‌های چسبنده نقش مهمی در آنژیوژنز دارند.[۱۹] بنابراین یک مکانیسم احتمالی اثر ضد توموری ایزوسورباید ممکن است مهار آنژیوژنز از طریق کاهش مولکول‌های چسبنده باشد. در مطالعات به‌عمل آمده توسط Vallance، اثرات ضد التهابی ایزوسورباید به‌دلیل ویژگی دهندگی نیتریک اکساید در این دارو گزارش شده است.[۴] با توجه به نقش مهم التهاب در ایجاد و رشد تومور،[۲۱] اثرات ضد توموری ایزوسورباید می‌تواند ناشی از اثرات ضد التهابی آن باشد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، ایزوسورباید دی‌نیترات در غلظت‌ها و زمان‌های مورد استفاده در این مطالعه هیچ‌گونه اثر توکسیکی بر سلول‌های فیبروساکومایی Wehi-164 و هم‌چنین PBMCs نشان نداد. هم‌چنین در مطالعه اخیر با طولانی شدن زمان انکوباسیون دارو از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت، هیچ‌گونه اثر سمی بر سلول‌های فیبروسارکومایی Wehi-164 و هم‌چنین PBMCs مشاهده نشد. با توجه به این‌که بعضی از غلظت‌های مورد استفاده ایزوسورباید در این مطالعه، بالاتر از دوز معادل مصرفی در بیماران هستند، لازم است که اثرات ایزوسورباید بر سایر سلول‌ها (نرمال و سرطانی) در شرایط In vivo و In vitro مورد بررسی قرار گیرند. نتایج حاصل از این مطالعات می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد نحوه تجویز دارو و دوز بی‌خطر آن برای بیماران به‌دست دهد. عدم توکسیسیته ایزوسورباید دی‌نیترات برای سلول‌های PBMCs می‌تواند نشان‌دهنده ایمنی و بی‌خطر بودن مصرف دارو در زمان‌های طولانی و یا حتی دوزهای بالاتر از دوزهای مصرفی کنونی دارو باشد. اما ضروری است که این فرضیه در مطالعات In vivo مورد بررسی قرار گیرد.

به‌نظر می‌رسد اثرات ضد توموری ایزوسورباید دی‌نیترات که در مطالعات دیگران گزارش شده است،[۳و۱۵] ناشی از اثرات مهاری دارو بر سایر فعالیت‌های سلول‌های توموری (غیر از فعالیت تکثیری) باشد. به‌علاوه احتمال دارد که فاکتورهای مهارکننده‌ای در In vivo نقش داشته باشند که در مطالعات In vitro قابل بررسی نیستند. با توجه به این‌که اخیرا برای برخی از داروهای متداول در درمان بیماری‌های قلبی اثرات دیگری علاوه بر تاثیرات شناخته شده قبلی گزارش شده است.[۲۲و۲۳] بررسی دقیق‌تر مکانیسم‌های اثر ضد توموری ایزوسورباید دی‌نیترات حایز اهمیت بوده و نیاز به مطالعات بیش‌تری در مورد سلول‌های سرطانی و نرمال در شرایط In vivo و In vitro دارد.

*سپاسگزاری*: بخشی از این مقاله حاصل کار پایان‌نامه تحت عنوان: "بررسی تأثیر ایزوسورباید بر فعالیت تکثیری سلول فیبروسارکومایی Wehi-164" در مقطع دکتری پزشکی در سال ۹۰-۱۳۸۹ (کد ۳۷۱/۸۲- پ) می‌باشد که در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد اجرا شده است.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07 ]

## References


1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Hung MJ, Cherng WJ, Cheng CW, Yang NI. Effect of antispastic agents (calcium antagonists and/or isosorbide dinitrate) on high-sensitivity C-reactive protein in patients with coronary vasospastic angina pectoris and no hemodynamically significant coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005;95(1):84-7.
7. Peng GW, Tingwei BC, Naoyoki T, editors. Nitric Oxide Donor: For Pharmaceutical and Biological Applications. Germany, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA; 2005.
8. Liou JY, Hong HJ, Sung LC, Chao HH, Chen PY, Cheng TH, et al. Nicorandil inhibits angiotensin-II-induced proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts. *Pharmacology* 2011;87(3-4):144-51.
9. Wedgwood S, Black SM. Molecular mechanisms of nitric oxide-induced growth arrest and apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells. *Nitric Oxide* 2003;9(4):201-10.
10. Perrotta C, Bizzozero L, Falcone S, Rovere-Querini P, Prinetti A, Schuchman EH, et al. Nitric oxide boosts chemoimmunotherapy via inhibition of acid sphingomyelinase in a mouse model of melanoma. *Cancer Res* 2007;67(16):7559-64.
11. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:7.
12. Moldéus P, Högberg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* 1978;52:60-71.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Sang JR, Chen YC, Shao GB, Huang XJ. Effect of nitric oxide on the proliferation of AGS gastric cancer cells. *Chin J Cancer* 2010;29(2):158-62.
18. Sucak GT, Aki SZ, Yüzbaşioğlu B, Akyürek N, Yağci M, Bağriaçik U, et al. Prognostic value of bone marrow microvessel density and angiogenic cytokines in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* 2011;52(7):1281-9.
19. Simon-Assmann P, Orend G, Mammadova-Bach E, Spenlé C, Lefebvre O. Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011;55(4-5):455-65.
20. Carnevale D, Cifelli G, Mascio G, Madonna M, Sbroggiò M, Perrino C, et al. Placental growth factor regulates cardiac inflammation through the tissue inhibitor of metalloproteinases-3/tumor necrosis factor-α-converting enzyme axis: crucial role for adaptive cardiac remodeling during cardiac pressure overload. *Circulation* 2011;124(12):1337-50.
21. Matkar SS, Durham A, Brice A, Wang TC, Rustgi AK, Hua X. Systemic activation of K-ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice. *Am J Cancer Res* 2011;1(4):432-445.
22. 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.
23. Hajighasemi F, Mirshafiey A. Propranolol effect on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion in human immunocompetent cells. *J Clin Immun Immunopathol Res* 2010;2:22-7.




[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07 ]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 11, February 2012: 671-677

# The effects of isosorbide dinitrate on *in vitro* proliferation of WEHI-164 cells and peripheral blood mononuclear cells

Fatemeh Hajighasemi Ph.D.*
Fatemeh Zahra Resvan Madani M.D.

*Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.*

Received: October 15, 2011 Accepted: November 12, 2011

## Abstract

***Background:*** Isosorbide dinitrate has been broadly used in the treatment of various ischemic heart diseases. Isosorbide is a nitric oxide donor which increases blood flow to tumors through vasodilatation and consequently accelerates the access of chemo-drugs to them. Furthermore, this drug has inhibitory effects on angiogenesis, tumor growth and metastasis *in vivo*. Moreover, its ant-inflammatory effects have also been reported. In the present study we evaluated the effects of isosorbide on the proliferative activity of fibrosarcoma WEHI-164 cell line and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

***Methods:*** WEHI-164 fibrosarcoma cells and human PBMCs were cultured in complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with 10% fetal bovine serum and 2×104 cells/mL for WEHI-164 and 2×105 cells/mL for PBMCs. The cells were then incubated at the exponential growth phase with different concentrations of isosorbide ($4\times10^{-6}$–$1.6\times10^{-3}$ M) for 24, 48 and 72 hours. Subsequently, isosorbide effects on proliferation of the cells were evaluated by trypan blue dye exclusion (TB) test and MTT assay. Statistical comparisons between groups were made by analysis of variance.

***Results:*** The proliferative activity of WEHI-164 fibrosarcoma cells and human PBMCs treated with different concentrations of isosorbide, did not show any significant difference with untreated control cells.

***Conclusion:*** The results of this study showed that isosorbide neither had any significant effects on the proliferative activity of fibrosarcoma WEHI-164 cells nor on human PBMCs. Our findings suggest that anti-tumoral effects of isosorbide reported by other investigators may be mediated through non-cytotoxic mechanisms.

***Keywords:*** Isosorbide, mononuclear cell, proliferative, wehi-164.

* Corresponding author: Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Shahid Abdollahzadeh St., Keshavarz Blvd., 1415635111
Tel: +98-21-88964792
E-mail: resoome@yahoo.com



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07 ]