تاثیر ایزوسورباید دی‌نیترات بر میزان تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروق توسط رده‌های سلولی لوسمیک در شرایط in vitro

فاطمه حاجی قاسمی[*۱]
عباس میرشفیعی[۲و۳]

۱- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت
۳- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول، تهران، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، بلوار کشاورز، خیابان شهید برادران عبداله زاده کدپستی ۱۴۱۵۶۳۵۱۱۱ تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲
email: resoome@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۹/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: فاکتور رشد اندوتلیال عروق، نقش میتوژنیک برای سلول‌های اندوتلیال داشته و یک واسطه مهم آنژیوژنز در In vivo می‌باشد. ایزوسورباید، یک دهنده نیتریک اکساید بوده و علاوه بر اینکه یک داروی ایده‌ال و متداول برای درمان بیماری‌های قلبی است، در مدل‌های حیوانی موجب مهار آنژیوژنز، رشد و متاستاز تومور می‌گردد. پدیده آنژیوژنز در بیماران لوسمیک نقش بسیار مهمی دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ایزوسورباید بر تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروق توسط چند رده سلولی لوسمیک می‌باشد. ***روش بررسی:*** رده‌های سلولی لوسمیک MOLT-4 و JURKAT (T-Cells) و U937 (منوسیت)، در محیط کشت حاوی RPMI 1640 و ۱۰٪ FCS کشت و تکثیر داده شدند. سپس سلول‌ها در شرایط رشد ابتیمم به گروه‌های کنترل و تست تقسیم شده و در مجاورت غلظت‌های ۴×۱۰^{-۷} - ۴×۱۰^{-۴} مولار از داروی ایزوسورباید دی‌نیترات در حضور یا عدم حضور PMA (۲۵ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری و غلظت فاکتور رشد اندوتلیال عروق، با استفاده از کیت تجاری آنزیم- ایمونواسی مربوط به کمپانی R&D به روش الیزا اندازه‌گیری شد. ***یافته‌ها:*** میزان فاکتور رشد اندوتلیال عروق تولید شده توسط رده‌های سلولی لوسمیک مورد مطالعه، در حضور غلظت‌های مختلف ایزوسورباید تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد. ***نتیجه‌گیری:*** در این مطالعه ایزوسورباید تاثیر معنی‌داری بر میزان تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروق در رده‌های سلولی لوسمیک نشان نداد. به نظر می‌رسد مکانیسم مهار آنژیوژنز توسط ایزوسور باید غیر وابسته به فاکتور رشد اندوتلیال عروق بوده و احتمالا مکانیسم یا مکانیسم‌های دیگری در این مسئله دخالت دارند.

کلمات کلیدی: دهنده نیتریک اکساید، فاکتور رشد اندوتلیال عروق، رده سلولی لوسمیک، ایزوسورباید دی‌نیترات

مقدمه

فاکتور رشد اندوتلیال عروق Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)، یک گلیکوپروتیین هومودایمر با وزن مولکولی ۴۲-۳۴ کیلودالتون بوده که دارای خواص آنژیوژنیک، میتوژنیک و افزایش‌دهنده نفوذپذیری عروق اختصاصی سلول‌های اندوتلیال می‌باشد.[۱] VEGF توسط انواعی از سلول‌های سرطانی در انسان و جوندگان، مشتمل بر آدنوکارسینومای ریه انسان، سرطان مثانه، فیبروسارکوما، لوسمی پرومیلوسیتیک HL60 و رده سلولی لنفومایی U937 بیان می‌شود.[۲-۴] نقش VEGF به عنوان فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های سرطانی، در شرایط In vitro نشان داده شده است.[۵و۶] VEGF با القاء پروتئین‌های ضدآپپتوتیک در سلول‌های اندوتلیال نرمال و برخی از سلول‌های سرطانی، موجب مهار آپپتوز شده و همانند یک فاکتور رشد عمل می‌کند.[۷و۸] VEGF به عنوان یک میتوژن برای سلول‌های اندوتلیال، واسطه مهم آنژیوژنز در In vivo می‌باشد.[۹و۱] مطالعات به‌عمل آمده توسط Kay و همکاران در سال ۲۰۰۱، همچنین Loges و همکارانش در سال ۲۰۰۶ ، نشان داده‌اند که پدیده آنژیوژنز در بیماران لوسمیک نقش بسیار مهمی دارد.[۱۰و۱۱] بنابراین ممکن است داروهای مهارکننده آنژیوژنز، نقش مفیدی در درمان این نوع سرطان داشته باشند. ایزوسورباید دی‌نیترات (Isosorbide dinitrate)، یک دهنده نیتریک اکساید (nitric oxide donor) و یک داروی ایده‌ال و متداول برای درمان بیماری‌های قلبی است.[۱۲و۱۳] مطالعات به‌عمل آمده توسط Pipili-Synetos در سال

۱۹۹۵ نشان دادند که ایزوسورباید در مدل‌های حیوانی موجب مهار آنژیوژنز، رشد و متاستاز تومور می‌گردد.[۱۴] همچنین مهار آنژیوژنز توسط ترکیبات دهنده نیتریک اکساید از جمله ایزوسورباید گزارش شده است.[۱۵و۱۶] Robin و همکارانش در سال ۲۰۰۸ گزارش کرده‌اند که مصرف ترکیبات مهارکننده آنژیوژنز موجب بهبودی دو بیمار مبتلا به میلوم مولتیپل که نارسایی قلبی نیز داشته اند شده است.[۱۷] با توجه به اثرات آنتی- آنژیوژنز ایزوسورباید و نقش مهم VEGF در فرآیند آنژیوژنز، در این مطالعه اثر ایزوسورباید را بر میزان تولید VEGF توسط چند رده سلولی لوسمیک (دو رده T-Cell و یک رده منوسیتی)، مورد بررسی قرار داده‌ایم.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات علوم پایه (Experimental) بود که در شرایط In vitro و در مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۶ انجام شد.

مواد: محیط کشت RPMI، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، فوربول میریستات استات (PMA)، Dimethyl sulfoxide (DMSO) و تریپان بلو از شرکت سیگما (USA) تهیه شد. سرم جنین گوساله (FCS) از شرکت Gibco (USA) خریداری گردید. کیت سنجش آنزیمی VEGF از شرکت R&D (USA) تهیه گردید. داروی خالص ایزوسورباید دی نیترات (ISDN) توسط شرکت داروسازی SOHA HELAL (تهران- ایران) به ما هدیه شد. پلیت‌های کشت ۹۶ و ۲۴ خانه، فلاسک‌های کشت و لوله‌های درب دار استریل از شرکت NUNC (Falcon, USA) خریداری گردید.

تهیه غلظت‌های مختلف از داروی ایزوسورباید دی‌نیترات: ابتدا دارو در DMSO حل شده و تا زمان استفاده در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- نگهداری شد. سپس در هنگام تیمار سلول‌ها، غلظت‌های ۴×۱۰^{-۴} - ۴×۱۰^{-۷} مولار از دارو در محیط کشت RPMI 1640 تهیه گردید.

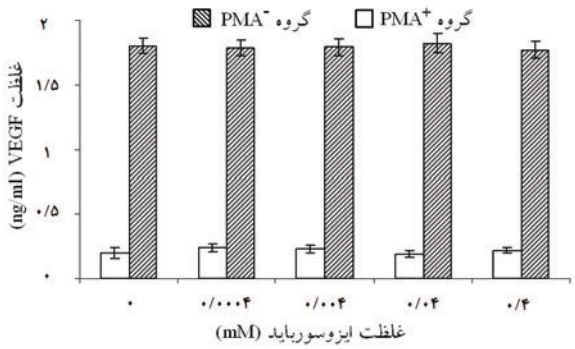
رده‌های سلولی: رده‌های سلولی لوسمیک انسانی MOLT-4 و (T-Cell) JURKAT و U937 (منوسیت) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در شرایط In vitro، در محیط کشت حاوی RPMI 1640 و ۱۰٪ FCS در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ و (۵٪)CO2، کشت و تکثیر داده شدند.

تیمار سلول‌ها: سلول‌ها در شرایط رشد ابتیمم به گروه‌های سه چاهکی تقسیم شده و به تعداد $۱۰^{۶}$/ml در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪FCS کشت داده شدند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شده و گروه‌های دیگر در مجاورت غلظت‌های مختلف از ایزوسورباید (۴×۱۰^{-۴}- ۴×۱۰^{-۷} مولار) در حضور یا عدم حضور PMA (۲۵ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از انقضای زمان انکوباسیون، مقداری از سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری و جهت انجام آزمایشات مربوطه در $^{\circ}C$ ۸۰- نگهداری گردید.

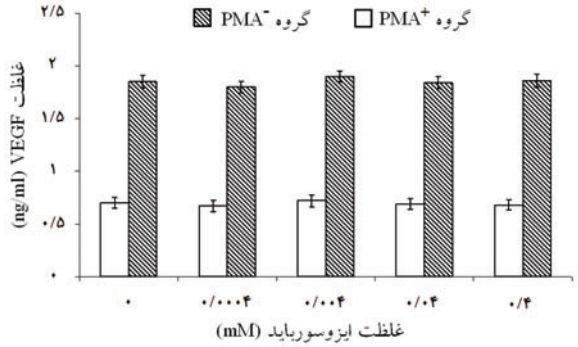
اندازه‌گیری سطح VEGF به روش آنزیم- ایمونواسی: سطح VEGF موجود در سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها با استفاده از کیت سنجش آنزیمی تهیه شده از شرکت R&D، اندازه‌گیری شد. روش‌کار بر اساس تست‌الیزای ساندویچی کمی بوده و به این شرح می‌باشد: در لایه اول یک آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی VEGF به کف حفرات میکروپلیت‌های الیزا متصل می‌شود. سپس استانداردها و نمونه‌ها به حفرات اضافه شده و انکوباسیون صورت می‌گیرد. پس از انقضای زمان انکوباسیون، شستشو انجام شده و متعاقباً کونژوگه آنزیمی یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی VEGF به حفرات اضافه شده و مجددا پس از انقضای زمان انکوباسیون، شستشو انجام شده و بعد محلول سوبسترا به حفرات افزوده می‌شود که موجب تغییر رنگ متناسب با میزان VEGF اتصال یافته می‌گردد. سپس واکنش متوقف و شدت رنگ توسط دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری می‌شود. غلظت VEGF ترشح شده در محیط کشت با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. ابتدا میانگین و انحراف معیار سطح VEGF تولید شده توسط هر یک از رده‌های سلولی مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف داروی ایزوسورباید، تعیین شده و سپس با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه Analysis of variance (ANOVA) ، مورد مقایسه قرار گرفتند. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

یافته‌ها

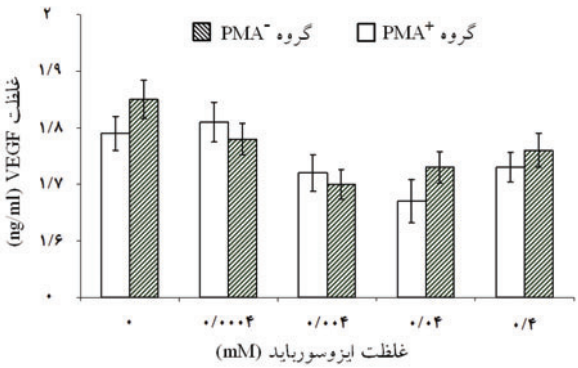
سلول‌های لوسمیایی انسانی MOLT-4 و JURKAT (T-Cell) و U937 (منوسیت) در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسورباید (در حضور یا عدم‌حضور محرک PMA) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. دو رده سلولی لوسمیک MOLT-4 و JURKAT، در غیاب محرک (PMA)، مقادیر نسبتاً کمی از VEGF را تولید می‌کنند اما در حضور محرک PMA در غلظت به کار رفته در این تحقیق (۲۵ng/ml)، میزان



نمودار- ۱: اثرایزوسورباید بر تولید Vascular endothelial growth factor (VEGF) در رده سلولی لوسمیک MOLT-4. سلول‌های لوسمیک MOLT-4 در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسورباید (۴×۱۰^{-۷}-۴×۱۰^{-۴} مولار) در حضور یا عدم حضور PMA (۲۵ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سطح VEGF موجود در سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها به روش الیزای ساندویچی اندازه‌گیری شد. غلظت VEGF ترشح شده در محیط کشت با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب ng/ml محاسبه گردید. داده‌ها، میانگین± انحراف‌معیار به‌دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.



نمودار- ۲: اثرایزوسورباید بر تولید Vascular endothelial growth factor (VEGF) در رده سلولی لوسمیک JURKAT. سلول‌های لوسمیک JURKAT در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسورباید (۴×۱۰^{-۷}-۴×۱۰^{-۴} مولار) در حضور یا عدم حضور PMA (۲۵ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سطح VEGF موجود در سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها به روش الیزای ساندویچی اندازه‌گیری شد. غلظت VEGF ترشح شده در محیط کشت با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب ng/ml محاسبه گردید. داده‌ها، میانگین± انحراف‌معیار به‌دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.



نمودار- ۳: اثرایزوسورباید بر تولید Vascular endothelial growth factor (VEGF) در رده سلولی لوسمیک U937. سلول‌های لوسمیک U937 در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسورباید (۴×۱۰^{-۷}- ۴×۱۰^{-۴} مولار) در حضور یا عدم حضور PMA(۲۵ng/ml) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سطح VEGF موجود در سوپرناتانت محیط کشت سلول‌ها به روش الیزای ساندویچی اندازه‌گیری شد. غلظت VEGF ترشح شده در محیط کشت با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب ng/ml محاسبه گردید. داده‌ها، میانگین± انحراف‌معیار به‌دست آمده از ۳ آزمایش مختلف هستند. p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

تولید VEGF در سلول‌های MOLT-4 و JURKAT به‌ترتیب به میزان تقریبی ۹ و ۲/۶ برابر افزایش یافت (نمودارهای ۲ و ۱)، اما در رده سلولی لوسمیک U937 (بر خلاف دو رده‌سلولی لوسمیک MOLT-4 و JURKAT)، محرک PMA هیچگونه تاثیر معنی‌داری بر تولید VEGF نداشت (نمودار ۳). با توجه به نمودار ۱ ملاحظه می‌شود که اگر چه میزان تولید VEGF در رده سلولی MOLT-4 در حضور PMA بالاتر از عدم حضور PMA است، لیکن سطوح VEGF تولید شده در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسورباید، چه در شرایط تحریک سلول و چه در شرایط عدم تحریک سلول با PMA، هیچ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و با گروه کنترل نشان نمی‌دهند. نتایج منعکس شده در نمودار ۲ نشان می‌دهند که در رده سلولی JURKAT نیز میزان تولید VEGF در حضور PMA بالاتر از عدم حضور PMA است اما در غلظت‌های مختلف ایزوسورباید، سطوح VEGF تولید شده در حضور یا عدم حضور PMA، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و با گروه کنترل نشان نمی‌دهند. میزان تولید VEGF در رده سلولی U937 بدون هیچگونه تحریکی بالاست و همچنین سطوح VEGF تولید شده توسط این رده سلولی، در مجاورت غلظت‌های مختلف ایزوسورباید هیچگونه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و با گروه کنترل نشان نمی دهند (نمودار ۳). در مجموع ایزوسورباید (در حضور یا عدم‌حضور محرک PMA) هیچگونه تاثیر معنی‌داری بر تولید VEGF توسط رده‌های سلولی لوسمیک مورد مطالعه در این پژوهش نشان نداد.

بحث

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان دادند که در هر سه رده سلولی مورد مطالعه (دو رده T-Cell و یک رده منوسیت)، بین میزان تولید VEGF در غلظت‌های مختلف ایزوسورباید دی‌نیترات با یکدیگر و همچنین بین هر غلظت با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. اطلاعات موجود حاکی از این است که تاکنون تاثیر ایزوسورباید بر میزان تولید VEGF مورد مطالعه قرار نگرفته است. معهذا در مطالعات به‌عمل آمده توسط Pipili-Synetos در سال ۱۹۹۵ [۱۴] و Näslund سال ۲۰۰۰، مهار آنژیوژنز، رشد و متاستاز تومور در شرایط in vivo توسط ایزوسورباید گزارش شده است.[۱۵] Parinandi نیز در سال ۲۰۰۷ مهار آنژیوژنز به صورت وابسته به دوز (در غلظت ۰/۴mM) توسط نیتروآسپیرین (یک ترکیب‌دهنده نیتریک اکساید) را گزارش کرد.[۱۶] در مطالعه فوق فعالیت آنتی‌آنژیوژنیک نیتروآسپیرین از طریق سنجش مقاومت الکتریکی اندوتلیالی مورد بررسی قرار گرفته است. آنژیوژنز یک فرایند پیچیده ایست که عوامل متعددی از جمله سایتوکاین‌های التهابی، کموکاین‌ها و رسپتورهای آنها، مولکول‌های چسبندگی سلولی، انتگرین‌ها، فاکتورهای رشد، ماتریکس ماکرو مولکول‌ها، ماتریکس متالوپروتئینازها و غیره در آن نقش دارند.[۱۸-۲۵] به عنوان مثال VEGF[۹و۱] و فاکتور رشد هپاتوسیت (Hepatocyte growth factor)،[۲۵] از القاکنندگان قوی آنژیوژنز هستند. با توجه به اینکه VEGF، یک واسطه مهم آنژیوژنز می‌باشد[۹و۱] و با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر که عدم تاثیر معنی‌دار ایزوسورباید بر میزان تولید VEGF توسط رده‌های سلولی لوسمیک را پیشنهاد می‌کند، به نظر می‌رسد که مکانیسم مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید غیر وابسته به VEGF بوده و مکانیسم‌های احتمالی دیگری دخالت دارند. مطالعات Näslund این موضوع را تایید کرده که ایزوسورباید منونیترات بر فعالیت آنژیوژنز VEGF 165 تلقیح شده در داخل صفاق تاثیری نداشته است اما پاسخ آنژیوژنز به bFGF تلقیح شده به‌صورت داخل صفاقی را مهار کرده است.[۱۵] بنابراین ممکن است یک مکانیسم احتمالی اثر ضدآنژیوژنز ایزوسورباید، مهار آنژیوژنز وابسته به bFGF باشد. Norrby گزارش کرده است که نیتریک اکساید در بافت‌های واجد عروق در پستانداران، فعالیت آنژیوژنز ناشی از bFGF و IL-1-alpha را مهار می‌کند اما تاثیری بر فعالیت آنژیوژنز ناشی از VEGF-165 ندارد[۲۶] و Martelletti، کاهش بیان ICAM-1 را متعاقب مصرف ایزوسورباید گزارش کرد.[۲۷] با توجه به اینکه مولکول‌های چسبنده (از جمله ICAM-1) نیز نقش مهمی در پدیده آنژیوژنز دارند،[۲۴] یک مکانیسم احتمالی دیگر اثر ضدآنژیوژنز ایزوسورباید، می‌تواند کاهش بیان مولکول‌های چسبنده باشد. قابل توجه است، مطالعاتی که در آنها مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید گزارش شده است، در شرایط in vivo و در مدل‌های حیوانی انجام شده‌اند. به علاوه در مطالعات فوق‌الذکر سطح VEGF اندازه‌گیری نشده است.[۱۵و۱۴] اما پژوهش حاضر در شرایط in vitro و روی رده‌های سلولی لوسمیایی صورت پذیرفته‌است. با در نظر گرفتن این مساله مهم که پدیده آنژیوژنز توسط شبکه‌ای از عوامل مختلف تنظیم می‌شود و مدیاتورهای متفاوتی در مراحل مختلف آن نقش دارند[۲۸] و با توجه به نقش مهم آنژیوژنز در پیشرفت و متاستاز تومور و همچنین در بیماری‌های قلبی- عروقی[۳۱-۲۹] و از طرفی اثرات آنتی‌آنژیوژنز ایزوسورباید،[۱۴و۱۵] لازم است اثر این دارو بر تولید VEGF توسط سایر رده‌های سلولی سرطانی و نیز سلول‌های نرمال در فواصل زمانی طولانی‌تر در شرایط in vivo و in vitro مطالعه شود. ثانیاً تاثیر آن بر سایر عوامل موثر بر آنژیوژنز از جمله FGF، HGF، ماتریکس متالوپروتئینازها و مولکول‌های چسبندگی سلولی نیز مورد بررسی قرار گیرد. درک بهتر مکانیسم‌های مهار آنژیوژنز توسط ایزوسورباید، ممکن است در استفاده مناسب از این دارو در مواقع نیاز به درمان‌های آنتی‌آنژیوژنیک مفید باشد.

سپاسگزاری: این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران و در مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

References

1. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 15-35; discussion 35-6.
2. Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 1991; 47: 219-23.
3. Hlatky L, Tsionou C, Hahnfeldt P, Coleman CN. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res* 1994; 54: 6083-6.

4. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 303-24.
5. Strizzi L, Catalano A, Vianale G, Orecchia S, Casalini A, Tassi G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol* 2001; 193: 468-75.
6. Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 5736-40.
7. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 2001; 85: 273-8.
8. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336-43.
9. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-57.
10. Kay NE, Jelinek DF, Peterson L. Angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2001; 25: 709-10.
11. Loges S, Tinnefeld H, Metzner A, Jücker M, Butzal M, Bruweleit M, et al. Downregulation of VEGF-A, STAT5 and AKT in acute myeloid leukemia blasts of patients treated with SU5416. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 2601-9.
12. Straka RJ, Fish JT, Benson SR, Suh JT. Magnitude and nature of noncompliance with treatment using isosorbide dinitrate in patients with ischemic heart disease. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 587-94.
13. Chen J, Jiang XG, Cai L, Lu W, Gao KP, Shi ZQ, et al. Pharmacokinetics of three organic nitrates in Chinese healthy male volunteers. *Arzneimittelforschung* 2004; 54: 203-6.
14. 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: 1829-34.
15. 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: 29-37.
16. 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: 1837-49.
17. Robin J, Fintel B, Pikovskaya O, Davidson C, Cilley J, Flaherty J. Multiple myeloma presenting with high-output heart failure and improving with anti-angiogenesis therapy: two case reports and a review of the literature. *J Med Case Reports* 2008; 2: 229.
18. Shojaei F, Ferrara N. Refractoriness to antivascular endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells. *Cancer Res* 2008; 68: 5501-4.
19. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 2008; 58: 88-111.
20. Heinzman JM, Brower SL, Bush JE. Comparison of angiogenesis-related factor expression in primary tumor cultures under normal and hypoxic growth conditions. *Cancer Cell Int* 2008; 8: 11.
21. Atluri P, Woo YJ. Pro-angiogenic cytokines as cardiovascular therapeutics: assessing the potential. *BioDrugs* 2008; 22: 209-22.
22. Giannopoulos G, Pavlakis K, Parasi A, Kavatzas N, Tiniakos D, Karakosta A, et al. The expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 2008; 28: 1875-81.
23. Szekanecz Z, Koch AE. Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3: 635-43.
24. Chidlow JH Jr, Shukla D, Grisham MB, Kevil CG. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G5-18.
25. Justinger C, Schlüter C, Oliviera-Frick V, Kopp B, Rubie C, Schilling MK. Increased growth factor expression after hepatic and pancreatic resection. *Oncol Rep* 2008; 20: 1527-31.
26. Norrby K. Nitric oxide suppresses bFGF- and IL-1-alpha-mediated but not VEGF165-mediated angiogenesis in natively vascularized mammalian tissue. *APMIS* 1998; 106: 1142-8.
27. 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* 1997; 75: 448-53.
28. Murohara T, Asahara T. Nitric oxide and angiogenesis in cardiovascular disease.. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 825-31.
29. Qu Z, Van Ginkel S, Roy AM, Westbrook L, Nasrin M, Maxuitenko Y, et al. Vascular endothelial growth factor reduces tamoxifen efficacy and promotes metastatic colonization and desmoplasia in breast tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 6232-40.
30. Go RS, Jobe DA, Asp KE, Callister SM, Mathiason MA, Meyer LA, et al. Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2008; 87: 369-73.
31. Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Plasma membrane microparticles in angiogenesis: role in ischemic diseases and in cancer. *Physiol Res* 2008; 57: 311-20.

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 12, March 2009: 872-877

The effect of Isosorbide Dinitrate on vascular endothelial growth factor production by human leukemic cell lines in vitro

Hajighasemi F.[1*]
Mirshafiey A.[2,3]

1- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University
2- Department of Pathobiology, School of Public Health
3- Immunology, Asthma and Allergy Research Institute

Tehran University of Medical Sciences

*Corresponding author: Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, 1415635111
Tel: +98-21-88964792
email: resoome@yahoo.com

Received: August 23, 2008 Accepted: January 20, 2008

Abstract

***Background*:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) has mitogenic effect for endothelial cells and is an important mediator of tumor expansion, metastasis and angiogenesis in vivo. Isosorbide dinitrate, as a nitric oxide donor, has been widely used in treatment of many cardiovascular diseases such as congestive heart failure and acute coronary syndromes. Furthermore this drug was found to have inhibitory effect on angiogenesis, tumor growth and metastasis in vivo. In the present study we evaluated the isosorbide effect on the VEGF production using some human leukemic cell lines.

***Methods*:** Human leukemic MOLT-4, JURKAT and U937 cells were cultured in complete RPMI medium. The cells at the exponential growth phase were then incubated with different concentrations of Isosorbide (4×10^{-7} -4×10^{-4} M) in the presence or absence of PMA (25ng/ml) for 24 hours. The VEGF concentrations in the culture supernatants were measured by enzyme immunoassay kits (R&D systems) according to the manufacturer's instructions.

***Results*:** The level of VEGF produced by the human leukemic cell lines which was treated with different concentrations of isosorbide, did not show any significant difference with untreated control cells.

Conclusions: The results of this study showed that isosorbide had no significant effect on VEGF production. Our findings suggest that anti-angiogenesis effect of isosorbide could be mediated through VEGF-independent mechanism(s). Further studies are warranted to determine definite isosorbide effect on VEGF and other angiogenic factors production in patients as well as animal models.

Keywords: Nitric oxide, donor, vascular endothelial growth factor, leukemic cell lines, isosorbide dinitrate.