

تأثیر ترانکسامیک اسید بر توانایی مهاجرت و سطح ماتریس متالوپروتئینازهای ۱ و ۲
سلول‌های T98G و HUVEC در شرایط همگشتیهدیه اسمعیلی (MSc)^۱، سمیه نوروززاده (MSc)^۱، بهنام محمدی قلعه بین (PhD)^۲، سید محمد موسوی (MD)^۳،
علی نیاپور (PhD)^{۳*}۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۲- گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۳- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

دریافت: ۹۹/۱/۲۷، اصلاح: ۹۹/۵/۲۰، پذیرش: ۹۹/۶/۲

خلاصه

سابقه و هدف: ارتشاح بالای سلول‌های گلیوما به بافت‌های مغزی اطراف عامل شکست درمان در گلیوبلاستوما است. تعاملات گلیوبلاستوما با سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ترانکسامیک اسید (TXA) در کاهش مهاجرت سلول‌های گلیوبلاستوما و اندوتلیال و سطح متالوپروتئینازهای ۱ و ۲ (MMP-2/9) در شرایط همگشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌ها پس از تهیه از انستیتو پاستور، در شرایط کشت منفرد و همگشتی با غلظت‌های مختلف TXA تیمار شدند. بقای سلولی به روش MTT مشخص شد. میزان مهاجرت از طریق ایجاد شیار در ظروف کشت و مقایسه مساحت شیار در بازه‌های زمانی مختلف در گروه کنترل و تیمار شده با غلظت‌های ۶ و ۲۴ میلی مولار TXA ارزیابی شد. سطح آنزیم‌های MMP-2/9 در گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت ۶ میلی مولار TXA از طریق زیموگرافی بررسی شد.

یافته‌ها: کاهش بقای سلول‌های T98G و HUVECs در کشت منفرد و همگشتی از غلظت ۶۰ میلی مولار TXA به بالا مشاهده شد ($p=0/001$). مساحت شیار در گروه HUVECs تیمار شده با غلظت‌های ۶ و ۲۴ میلی مولار TXA به ترتیب $0/27 \pm 0/05$ و $0/36 \pm 0/04$ مساحت اولیه شیار بودند که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بودند ($p=0/034$ و $p=0/005$). تفاوتی در اندازه شیار در سلول‌های T98G دیده نشد. در گروه همگشتی، اندازه شیار ۳۶ ساعت پس از شروع مطالعه برای گروه کنترل برابر با $0/12 \pm 0/01$ به دست آمد که به طور معنی داری از گروه‌های HUVECs+T98G تیمار شده با دوزهای ۶ ($0/28 \pm 0/06$) و ۲۴ ($0/39 \pm 0/07$) میلی مولار TXA کمتر بود ($p=0/002$ و $p=0/001$). TXA به صورت معنی داری سطح MMP-2 ($p=0/0001$) و MMP-9 ($p=0/0001$) را در شرایط همگشتی کاهش داد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که TXA می‌تواند مهاجرت سلول‌های گلیوبلاستوما و اندوتلیال و همچنین میزان MMP-2/9 را در شرایط همگشتی کاهش دهد. **واژه‌های کلیدی:** گلیوبلاستوما، همگشتی، ترانکسامیک اسید، مهاجرت سلولی، ماتریکس متالوپروتئیناز-۲.

مقدمه

تقسیم می‌شوند؛ بدخیم‌ترین درجه IV، گلیوبلاستوما است که از سلول‌های پیش ساز یا بنیادی دودمان آستروسیتیک منشأ گرفته می‌شود (۳-۵). تاکنون درمان موفقی برای گلیوبلاستوما یافت نشده است و روش‌های معالجه فعلی شامل برداشت حداکثری توده به همراه رادیوتراپی (۶) و شیمی درمانی با تجویز تموزولامید (Temozolomide) است (۷-۱۰). ناهمگونی تومور و محیط اطراف آن، گلیوبلاستوما را به یکی از دشوارترین سرطان‌ها برای درمان تبدیل کرده است (۱۱). قدرت تکثیر سریع، تهاجم بالا به بافت‌های سالم

سرطان یک مشکل عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان است (۱). در این بین تومورهای بدخیم اولیه دستگاه عصبی مرکزی حدود ۲٪ از کل سرطان‌ها را تشکیل می‌دهند ولی به دلیل مرگ و میر بالا از اهمیت خاصی برخوردارند. هر سال حدود ۱۱۰۰۰ مورد جدید گلیوما درجه بالا در ایالات متحده تشخیص داده می‌شوند که از این تعداد، ۹۰۰۰ مورد گلیوبلاستوما (Glioblastoma multiforme= GBM) می‌باشد (۲). گلیوما به دو رده سلولی (آستروسیتیک و لیگودندروسیتیک) و چهار درجه بدخیمی (I تا IV)

این مقاله حاصل پایان نامه سید محمد موسوی دانشجوی رشته پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۴۸ دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر علی نیاپور

آدرس: اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی. تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۰۵۲

2-VEGFR القاء شده توسط **VEGF165** می‌گردد. به عبارت دیگر **TXA** با هدف قرار دادن **VEGFR** در **HUVECs** منجر به مهار آنژیوژنز می‌شود (۲۶). **Suojanen** و همکاران نشان دادند که ترانکسامیک اسید از طریق مهار پلاسمین، می‌تواند از فعال شدن **MMP-9** جلوگیری کند (۲۷).

با توجه به اهمیت بحث مهاجرت در کشندگی بیماری گلیوبلاستوما و ارتباط سلول‌های سرطانی مغز با سلول‌های پیرامونی از جمله سلول‌های اندوتلیال، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر **TXA** بر جلوگری از مهاجرت رده سلولی گلیوبلاستوما مولتی فرم (**T98G**) همکشتی داده شده با سلول‌های اندوتلیال (**HUVECs**) و ارزیابی فعالیت متالوپروتینازهای ۲ و ۹ است.

مواد و روش ها

کشت و بررسی سمیت سلولی: این تحقیق دارای کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1398.390 مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می‌باشد. رده‌های سلولی T98G و HUVECs از بانک سلولی انستیتو پاستور خریداری و در محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS; Gibco:10270)، ۱٪ آنتی بیوتیک (Gibco:15140-122) کشت داده شدند. ارزیابی سمیت سلولی به روش رنگ سنجی MTT (-2,5- 4,5-di-methylthiazol-2-) diphenyl tetrazolium bromide (۳-۷) انجام شد (۲۸ و ۲۹). بدین منظور تعداد 3×10^3 سلول از هر رده سلولی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه وارد گردید. جهت بررسی اثر دارو در حالت هم‌کشتی، تعداد $1/5 \times 10^3$ از هر یک از رده‌های T98G و HUVECs در چاهک‌های ظروف کشت ۹۶ خانه وارد شد. تیمار با ترانکسامیک اسید (19193 Cayman) در غلظت‌های ۰/۰۶، ۰/۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۶۰ و ۱۲۰ میلی مولار به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. سپس محیط کشت روئی دور ریخته شد و به هر خانه محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون گردید. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده و درصد بقا سلول‌ها در غلظت‌های مختلف نسبت به کنترل محاسبه گردید.

Wound healing assay: این تست به منظور ارزیابی میزان مهاجرت سلولی انجام گرفت. تعداد 7×10^4 سلول T98G و HUVECs در صورت جداگانه و جهت همکشتی، 35×10^3 سلول از هر یک از رده‌های سلولی سرطانی و اندوتلیال، درون چاهک‌های پلیت‌های ۲۴ خانه پلیت شدند. روز بعد سلول‌ها در محیط کشت با سرم ۵٪ به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. سپس، از یک نوک سمپلر زرد استریل برای ایجاد شیار در لایه کانفلوئنت سلولی کف چاهک‌ها استفاده شد. تیمار در محیط سرمی ۵٪ حاوی غلظت‌های ۶ و ۲۴ میلی مولار از ترانکسامیک اسید انجام شد. میزان بسته شدن شیار با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Olympus, CKX41) مجهز به دوربین (Olympus, DP27) در ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت بعد مورد پایش قرار گرفت و تصاویر تهیه شد. مساحت شیار با استفاده از نرم افزار ImageJ و پلاگین MRI Wound Healing Tool محاسبه شد. اندازه شیار در طول بازه زمانی مورد بررسی نسبت به مساحت شیار در ساعت صفر آن، در گروه‌های مختلف تبدیل و ارائه شد.

اطراف تومور و تراکم عروقی فراوان در توده سرطانی از ویژگی‌های اصلی گلیوبلاستوماست (۱۲). مهاجرت و تهاجم سلول گلیوبلاستوما توسط تغییرات در سلول مهاجم و ریز محیط (Microenvironment) اطراف تومور تنظیم می‌شود. یکپارچگی ماتریکس خارج سلولی یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی تحرک سلولی است و حرکت سلول نیز نیازمند تنظیم مجدد و تغییرات در رونویسی و اسکلت سلولی است (۵).

متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ (به ترتیب، معروف به ژلانتیناز A و B) جزء آنزیم‌های اندوپپتییداز وابسته به روی (Zinc-dependent endopeptidase) هستند که سوبسترهای مختلفی در ماتریکس خارج سلولی مثل کلاژن تایپ IV و همچنین غیر ماتریکس سلولی دارند (۱۳). در حالیکه بیان متالوپروتئینازها در مغز طبیعی کم است (۵)، فعالیت بیش از حد MMP-2 (Matrix Metalloproteinase) و MMP-9 در گلیوبلاستوما نشان داده شده است (۱۴ و ۱۵). به طوریکه میزان MMP-2/9 با قدرت تهاجم تومور و پیش آگهی ضعیف بیماران گلیوبلاستومایی ارتباط دارد (۵). MMP-2/9 در تکثیر سلولی، تحرک، تهاجم و آنژیوژنز گلیوبلاستوما نقش دارد (۱۶).

همچنین مشخص شده است که کاهش میزان MMP-2/9 موجب کاهش متاستاز سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما می‌شود (۱۷). تعامل سلول‌های گلیوما با سلول‌های مجاور مانند آستروسیت‌ها یا سلول‌های اندوتلیال برای مهاجرت سلول‌های گلیوبلاستوما و آنژیوژنز حائز اهمیت است (۵). سلول‌های اندوتلیال اطراف گلیوبلاستوما از طریق بیان لیگندهای مسیر پیام رسانی ناچ (Notch Signaling)، سبب فعال شدن این مسیر در سلول‌های بنیادی سرطانی و افزایش خودنوسازی (Self-renewal) این سلول‌ها می‌شود (۱۲).

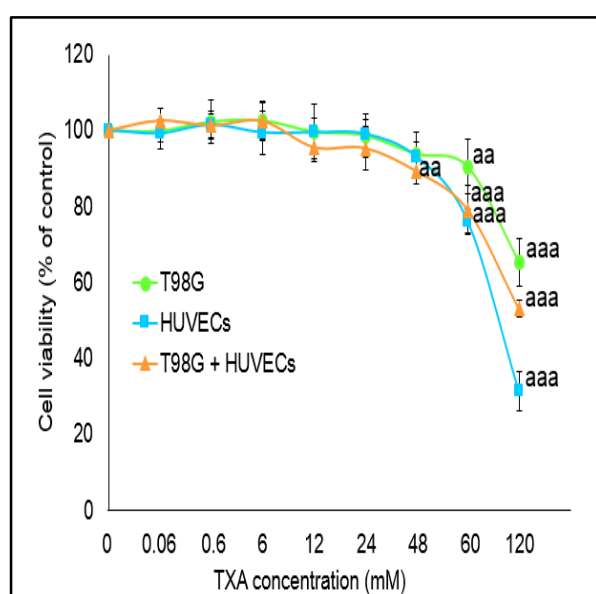
مشخص شده است که PDCD10 (Programmed Cell Death) در سلول های اندوتلیال جداره عروق مربوط به توده سرطان گلیوبلاستوما بیان نمی شود. مهار بیان PDCD10 در سلول های اندوتلیال نرمال همکشتی شده با سلول های سرطانی گلیوبلاستوما، باعث تکثیر و مهاجرت سلول های سرطانی گلیوبلاستوما شده و از آپتوز آنها جلوگیری می شود (۱۸). وجود ارتباط بین سلول های اندوتلیال با سلول های تومورال در سرطان کبد و سینه نیز مورد توجه قرار گرفته است (۱۹).

سلول‌های گلیوبلاستوما توسط مواد جاذب شیمیایی (Chemokine) مانند برادی کینین تولیدی از سلول‌های اندوتلیال، به فضای اطراف عروق خونی جذب می‌شوند (۵). سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما می‌توانند از طریق همکاری با سلول‌های اندوتلیال (Co-opting) عروق مغز مهاجرت داشته باشند (۲۰).

ترانکسامیک اسید (TXA) داروی سنتتیک و آنالوگ لیزین است که اثرات آنتی‌فیبرینولیتیک خود را از طریق مهار جایگاه فعال پلاسمین اعمال می‌کند (۲۳ و ۲۱). ترانکسامیک اسید دارویی پرکاربرد در زمینه‌های کنترل خونریزی طی آسیب‌های شدید، زایمان، جراحی‌ها و کشیدن دندان است (۲۴ و ۲۳). در یک مطالعه مشخص شد که ترانکسامیک اسید می‌تواند آسیب ناشی از سرطان نخمدان را کاهش داده و اثر بخشی داروهای شیمی درمانی را بهبود دهد (۲۵). مطالعه Zhu و همکاران نشان داد که TXA منجر به مهار تکثیر سلولی، مهاجرت، تهاجم و تشکیل لوله‌ای HUVECs از طریق خنثی سازی VEGFR-1 و

مساحت شیار در گروه‌های HUVECs تیمار شده با ترانکسامیک اسید نسبت به گروه کنترل بزرگ تر بود (شکل ۲- قسمت C و D). به طوریکه ۳۶ ساعت از شروع مواجهه، اندازه شیار در غلظت ۶ میلی مولار به $(p=0.034)$ 0.27 ± 0.05 و در غلظت ۲۴ میلی مولار برابر با $(p=0.005)$ 0.36 ± 0.04 ساعت صفر خود بود. تقریباً همین روند در گروه T98G+HUVECs نیز دیده شد. در گروه همگشتی تفاوت آماری معنی دار بین گروه کنترل و غلظت‌های ۶ (0.28 ± 0.06) و ۲۴ میلی مولار ترانکسامیک اسید (0.39 ± 0.07) $(p=0.002)$ در فاصله زمانی ۱۲ الی ۳۶ ساعت بعد از شروع کشت دیده شد (شکل ۲- قسمت E و F).

بررسی فعالیت ژلاتینازی سلول‌های T98G، HUVECs و همگشتی در حضور ترانکسامیک اسید: الگوی فعالیت ژلاتینازی متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ به ترتیب در دو باند ۷۲ و ۹۲ کیلودالتونی مشاهده شد. یافته مهم اینکه میزان MMP-2 در تمام گروه‌ها نسبت به MMP-9 بیشتر بود (شکل ۳- قسمت A). بیشترین میزان MMP-2 در کشت‌های منفرد T98G و کمترین میزان آن در کشت‌های منفرد HUVECs دیده شد (شکل ۳- قسمت A). بررسی‌های دانسیتومتری تفاوت معنی داری در شدت باندها در سلول‌های T98G در حالت مواجهه با ترانکسامیک اسید و عدم مواجهه مشخص نکرد. در حالیکه برای سلول‌های HUVECs کاهش معنی داری در میزان MMP-2 در گروه دریافت کننده ترانکسامیک اسید نسبت به گروه کنترل آن مشاهده شد $(p=0.01)$. در گروه همگشتی، غلظت ۶ میلی مولار ترانکسامیک اسید توانست فعالیت متالوپروتئینازهای ۲ (0.8 ± 0.02) $(p=0.000)$ و ۹ (0.91 ± 0.01) $(p=0.000)$ را نسبت به گروه کنترل خود به صورت معنی داری کاهش دهد (شکل ۳- قسمت B و C).



شکل ۱. مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف ترانکسامیک اسید بر درصد بقای سلول‌های T98G، HUVECs در کشت منفرد و همگشتی توسط تست MTT. $p < 0.01$ ^{aa} نسبت به کنترل و $p < 0.001$ ^{aaa}

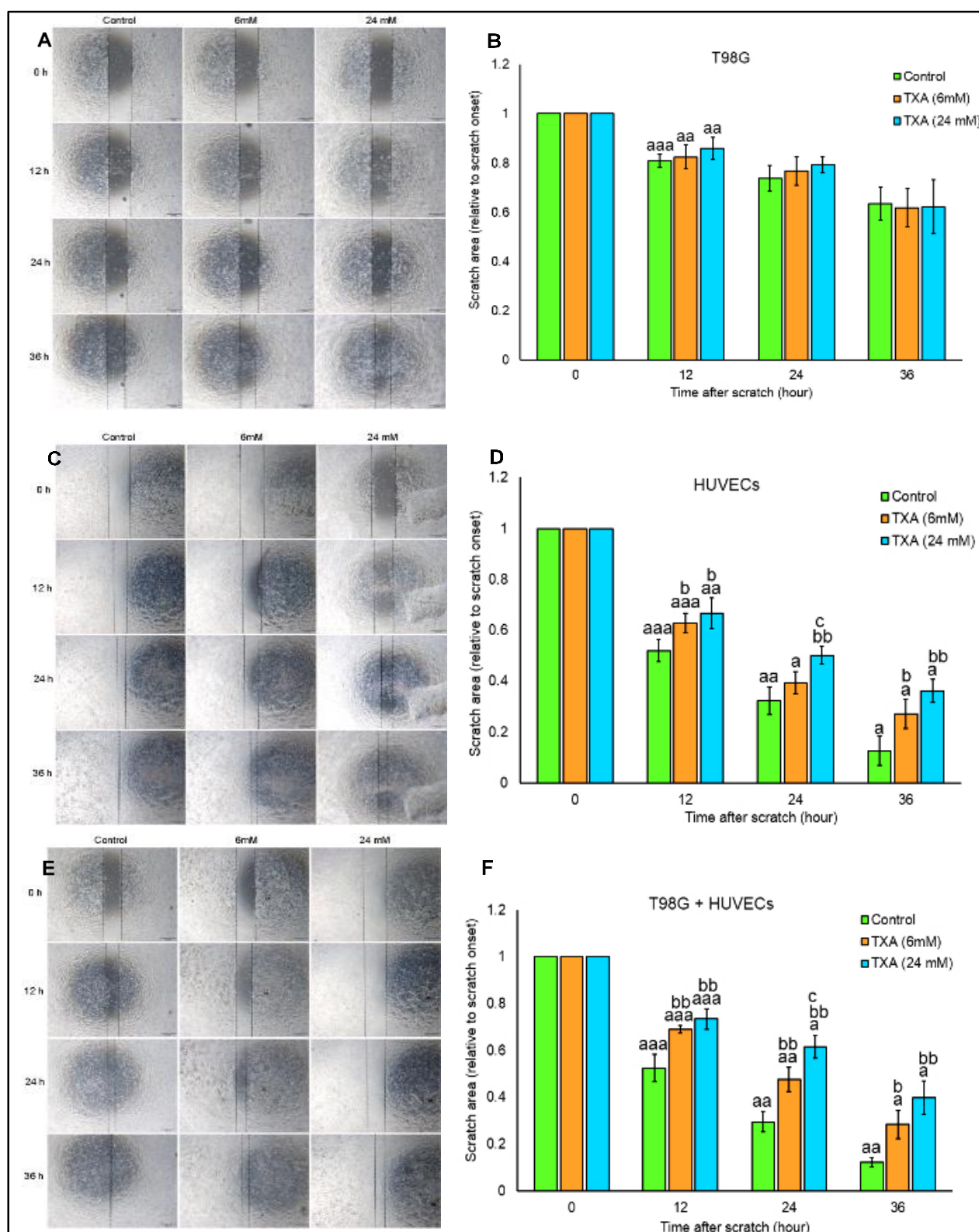
ژلاتین زیموگرافی: برای بررسی میزان فعالیت پروتئولیتیک متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ از روش زیموگرافی استفاده شد. سلول‌های T98G و HUVECs در شرایط کشت منفرد هر سلول و یا در حالت همگشتی در محیط سرمی ۵٪ بدون ترانکسامیک اسید یا حاوی ۶ میلی مولار آن تیمار شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، کاندیشن مدیوم آنها جمع‌آوری و سانتریفیوژ شد. غلظت پروتئین در هر مورد تعیین و مقدار ۵ میکروگرم از هر نمونه به چاهک‌های ژل ۱۰٪ SDS-PAGE حاوی ۱٪ ژلاتین (Sigma: G1890) وارد گردید. الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت شروع و سپس با ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. ژل زیموگرافی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در بافر احیا کننده (Developing buffer) که محتوی CaCl_2 ۵ میلی مولار و ZnCl_2 یک میکرو مولار بود انکوبه شد. در مرحله بعد، ژل‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با محلول کوماسی بلو G-250 رنگ آمیزی شدند. رنگبری از ژل در چند مرحله تا واضح شدن باندهای حاصل از فعالیت متالوپروتئینازها در پس زمینه آبی انجام گرفت. در نهایت تصاویر اسکن شده ژل در نرم افزار ImageJ وارد و از تکنیک دانسیتومتری (31.3) آن جهت کمی سازی باندها استفاده گردید.

بررسی نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

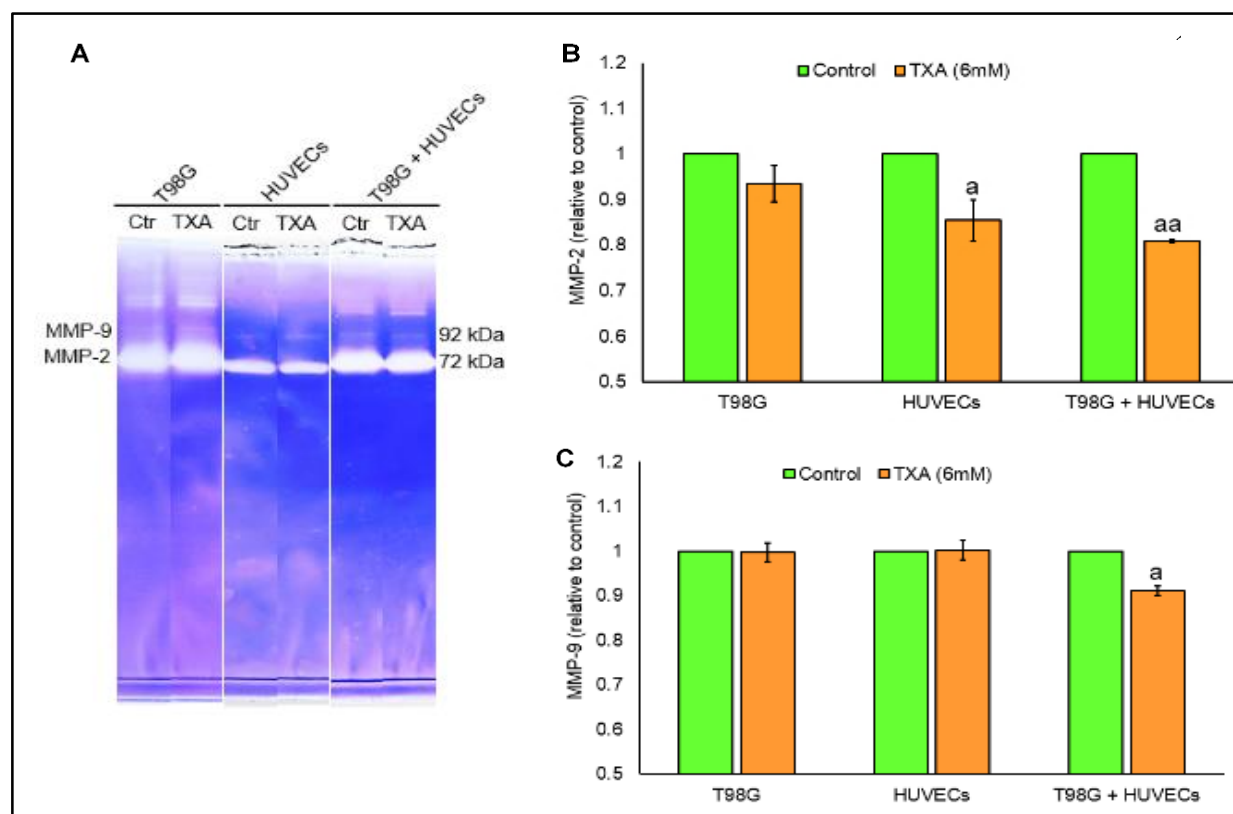
یافته‌ها

اثر داروی ترانکسامیک اسید بر بقای سلول‌های T98G، HUVECs و همگشتی دو نوع سلول: آنالیز نمودار دوز- پاسخ نشان داد که ترانکسامیک اسید تا حدود غلظت ۴۸ میلی مولار تاثیر خاصی در بقا سلول‌های سرطانی و اندوتلیال و یا گروه همگشتی ندارد (شکل ۱). غلظت‌های بالاتر ترانکسامیک اسید به تدریج توان زنده مانی سلول‌ها در گروه‌های مختلف را کاهش داد $(p < 0.05)$. از غلظت ۶۰ میلی مولار به بعد شیب کاهش بقا سلولی چشمگیر بود (شکل ۱). به طوریکه در دوز ۱۲۰ میلی مولار ترانکسامیک اسید بقا سلول‌های T98G به 65.3 ± 6.2 کنترل رسید. قابلیت زنده مانی سلول‌های HUVECs و همچنین گروه T98G+HUVECs در غلظت ۱۲۰ از ترانکسامیک اسید به ترتیب به 31.0 ± 5.2 و 52.9 ± 2.2 کاهش یافت $(p=0.000)$. نتایج MTT وارد نسخه ۱۲ نرم افزار SigmaPlot گردید و میزان IC_{50} محاسبه شد. بر این اساس IC_{50} داروی ترانکسامیک اسید برای سلول‌های T98G، HUVECs و در شرایط همگشتی دو سلول به ترتیب برابر با $30.5/0.3$ ، $66/0.2$ و $179/41$ میلی مولار به دست آمد. با توجه به اینکه غلظت درمانی ترانکسامیک اسید در سرم خون به ۶ میلی مولار می‌رسد (۳۲)، لذا در ادامه مطالعه بر این غلظت تاکید شده است.

تغییرات مهاجرت سلول‌های T98G، HUVECs و همگشتی دو سلول در شرایط مواجهه با داروی ترانکسامیک اسید: نتایج تست Scratch assay تفاوت معنی داری را در تیمار سلول‌های T98G با غلظت‌های ۶ و ۲۴ میلی مولار ترانکسامیک اسید با گروه کنترل آن نشان نداد (شکل ۲- قسمت A و B).



شکل ۲. Scratch assay سلول‌های T98G، HUVECs در شرایط کشت منفرد و همکشتی دو سلول. قسمت A، C و E به ترتیب فتومیکروگراف‌های سلول‌های T98G، HUVECs و T98G+HUVECs را در گروه کنترل و تیمار شده با غلظت‌های ۶ و ۲۴ میلی‌مولار TXA را در بازه‌های زمانی صفر، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعته نشان داده است. قسمت B، D و F حالت کمی شده مساحت شیار نسبت به ساعت صفر شیار در گروه‌های مختلف را به صورت نمودار ستونی نشان داده است. ($p < 0.001$ و aaa $p < 0.01$ و aa $p < 0.05$ مقایسه هر گروه نسبت به نقطه زمانی ماقبل، bb $p < 0.01$ و b $p < 0.05$ مقایسه هر گروه نسبت به کنترل در همان نقطه زمانی مورد بررسی، c مقایسه بین غلظت‌های ۶ و ۲۴ میلی‌مولار TXA در همان نقطه زمانی مورد بررسی)



شکل ۳. زیموگرافی سلول‌های T98G، HUVECs در شرایط کشت منفرد و همکشتی دو سلول. قسمت A الگوی فعالیت ژلاتینازی MMP-2 و MMP-9 سلول‌های T98G، HUVECs در شرایط کشت منفرد و همکشتی دو سلول نشان داده شده است. نمودارهای ستونی در قسمت B و C به ترتیب مقادیر کمی شده سطح/ فعالیت MMP-2 و MMP-9 را برای سلول‌های T98G، HUVECs در شرایط کشت منفرد و همکشتی دو سلول نشان می‌دهد. ($p < 0.05$ ^a نسبت به کنترل) و ($p < 0.01$ ^{aa})

بحث و نتیجه گیری

ترانکسامیک اسید دیده شد (۳۴). در ادامه بررسی مهاجرت سلول‌های T98G، HUVECs در شرایط کشت منفرد سلول‌ها و همکشتی دو سلول با روش Scratch assay انجام شد. بر اساس نتایج این تست تفاوت معنی داری در تیمار سلول‌های T98G با غلظت‌های ۶ و ۲۴ میلی‌مولار ترانکسامیک اسید با گروه کنترل آن مشاهده نشد. در این ارتباط Kaphle و همکاران به عدم تاثیر ترانکسامیک اسید در مهاجرت سلول‌های سرطانی U87 و A172 گلیوبلاستوما در کشت تک لایه‌ای اشاره کرده اند (۱۶). مساحت شیار در سلول‌های HUVECs و همکشتی سلول‌های T98G با سلول‌های HUVECs تیمار شده با ترانکسامیک اسید نسبت به گروه کنترل بزرگ‌تر بود. ارتباط بین سلول‌های گلیوبلاستوما و محیط اطراف آن بویژه سلول‌های میکروگلی و اندوتلیال و اهمیت این ارتباط در افزایش قابلیت تهاجم سلول‌های سرطانی مورد توجه قرار گرفته است. نشان داده شده است پیرو همکشتی سلول‌های گلیوبلاستوما با سلول اندوتلیال، میزان Sphingosine-1 phosphate افزایش می‌یابد. افزایش این ماده با رشد سلول‌های سرطانی و همچنین مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و آنژیوژن ارتباط مستقیم دارد (۳۵). مطالعه دیگری به تعامل بین سلول‌های گلیوبلاستوما و میکروگلی‌ها و اندوتلیال پرداخته است. این مطالعه مشخص کرده است که تعامل سلول‌های گلیوبلاستوما و میکروگلی موجب افزایش بیان اینترلوکین ۶ (IL-6) شده و از طریق فعال سازی مسیر JAK/STAT3، بیان پروتئین‌های اتصالات

نتایج این مطالعه نشان داد که ترانکسامیک اسید می‌تواند از مهاجرت سلول‌ها در شرایط همکشتی بکاهد. همچنین میزان فعالیت متالوپروتئیناز ۲ و ۹ در پی تیمار با ترانکسامیک اسید در شرایط همکشتی کاسته می‌شود. نتایج MTT نشان داد که ترانکسامیک اسید در غلظت‌های پایین تاثیر در بقای سلول‌های سرطانی و اندوتلیالی و یا همکشتی سلول‌ها ندارد. در حالیکه کاهش شدید بقا سلولی از حدود غلظت ۶۰ میلی‌مولار و بالاتر ترانکسامیک اسید دیده شد. این یافته نشان دهنده ایمنی این دارو و کاربرد فارماکولوژیک آن در دوزهای پایین است. مطالعه صورت گرفته توسط Kikuchi و همکاران نشان داد که ترانکسامیک اسید در غلظت ۱۰ mg/ml نقش مهمی بر رشد سلول‌های سرطانی تخمدان داشته و همچنین استفاده از آن همراه با داروی‌های روتین شیمی درمانی سبب کاهش قابل توجه آسیب در موش‌ها شده است (۳۳). مطالعه Cox و همکاران نشان دهنده عدم تاثیر ترانکسامیک اسید اضافه شده به لخته‌های فیبرین سنتتیک (Fibrin Sealant Clots) بر قدرت اتصال اولیه سلول‌های پرولیفراتیو (سلول‌های گلیال و فیبروبلاست) یا سلول‌های غیر پرولیفراتیو (سلول‌های عصبی) در غلظت‌های پایین دارو بود. این در حالیست که غلظت‌های بالای ترانکسامیک اسید (۴۵۰ mM-۳۰۰ mM) که در داخل محیط کشت حل شده‌اند باعث تضعیف اتصال اولیه و یا جدا شدن سلول‌ها از کف پلیت‌های پوشش داده شده، می‌شود. به طوریکه کاهش ۲۰٪ و ۸۰٪ از چسبندگی فیبروبلاست‌ها به ترتیب در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌مولار

و اندوتلیال به تنهایی، چشمگیر بود (۳۲). همچنین تحقیق kaphle و همکاران نشان داد که شرایط کشت می‌تواند در میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی U87 و A172 نقش داشته باشد. به گونه‌ای که در کشت‌های سه بعدی میزان ترشح MMP-2/9، فعال کننده پلاسمینوژن اوروکینازی و بافتی (uPA و tPA) نسبت به حالت کشت روتین تک لایه‌ای افزایش می‌یابد و لذا داروهای مهار کننده پلاسمینوژن مثل ترانکسامیک اسید یا اپروتینین (Aprotinine) در حالت کشت‌های سه بعدی می‌تواند در جلوگیری از مهاجرت سلول‌های گلیوبلاستوما موثر باشد در حالیکه در کشت‌های معمول نتوانسته بود از مهاجرت سلول‌های سرطانی جلوگیری کند (۱۶). همچنین نشان داده شده است که ترانکسامیک اسید می‌تواند منجر به مهار مهاجرت سلول‌های اندوتلیال شود. ترانکسامیک اسید با هدف قرار دادن MMP-9 می‌تواند به طور موثر منجر به مهار سلول‌های سرطانی در شرایط In vitro شود (۲۷).

تلاش برای نزدیک کردن شرایط انجام تست‌های آزمایشگاهی به شرایط فیزیولوژیک بدن و نقش کلیدی تعامل سلول‌های غیر سرطانی مانند سلول‌های اندوتلیال، میکروگلی، پری‌سیت، ماکروفاژ و سرطانی در تنظیم روند مهاجرت سلول‌های توموری (۴۱-۳۸ و ۱۹ و ۱۱) لزوم انجام مطالعه حاضر را ایجاب کرد. هر چند مطالعات تکمیلی زیادی در سطح سلولی و مولکولی نیاز است لیکن نتایج این تحقیق نشان داد که ترانکسامیک اسید می‌تواند از طریق کاهش سطح/ فعالیت متالوپروتیناز ۲ و ۹ از مهاجرت سلول‌های گلیوما و اندوتلیال در شرایط همکشتی جلوگیری کند. از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به عدم امکان تفکیک سلول‌ها در شرایط همکشتی اشاره کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جهت حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

بین سلولی را در سلول‌های اندوتلیال کاهش داده و سبب نفوذپذیری سد خونی-مغزی می‌شود (۳۶). همکشتی سلول‌های U87 با سلول اندوتلیالی HMEC1 سبب افزایش میزان تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود. Kenig و همکاران دریافتند که ترشح MMP-9 از هر دو رده سلولی بیشتر می‌شود. ترشح کاتپسین‌های سیستمی B و S افزایش و میزان NCAM (Neuronal cell adhesion molecule) در سلول‌های سرطانی U87 کاهش پیدا می‌کند. آنها همچنین متوجه شدند که سلول‌های اندوتلیال از طریق ترشح SDF1 (CXCL12) سبب افزایش مقدار MMP-9 در ریز محیط می‌شوند (۳۷). مطالعه Suojanen و همکاران تاثیر این دارو را بر ممانعت از تهاجم سلول‌های سنگفرشی زبان نشان داد (۲۷). مطالعه دیگری نشان دهنده نقش مهاری ترانکسامیک اسید بر تهاجم و شکل گیری ساختار تیوب وار سلول‌های HUVECs و کاهش قابل توجه تکثیر سلولی HUVECs بود (۲۶).

نتایج بررسی فعالیت ژلاتینازی صورت گرفته در این مطالعه به روش ژلاتین زیموگرافی نشان دهنده میزان بیشتر MMP-2 در تمام گروه‌ها نسبت به MMP-9 بود. سلول‌های T98G و HUVECs در حالت همکشتی و کشت منفرد، رفتار متفاوتی در مواجهه با ترانکسامیک اسید نشان دادند؛ به طوریکه مواجهه با غلظت ۶ میلی مولار ترانکسامیک اسید در گروه همکشتی توانست فعالیت متالوپروتینازهای ۲ و ۹ را نسبت به گروه کنترل خود بصورت معنی داری کاهش دهد. مواجهه با این دارو بر سلول‌های T98G تاثیری نداشت ولی تفاوت در میزان MMP-2 بعد از مواجهه سلول‌های HUVECs مشهود بود.

Afsharimani و همکاران در مطالعه خود متوجه شدند که در شرایط همکشتی میزان MMP-2، 9 و TIMP-1، 2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1) افزایش می‌یابند؛ در حالیکه در غلظت مشابه از ترانکسامیک اسید، کاهش نسبت MMP-9/TIMP-1 و کاهش در میزان MMP-2 و افزایش در TIMP-1 در حالت همکشتی نسبت به سلول سرطانی

Effect of Tranexamic Acid on Migration Ability and Level of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 of T98G and HUVEC Cells in Co-Culture Conditions

H. Esmaeili (MSc)¹, S. Noroozadeh (MSc)¹, B. Mohammadi-Ghalehbin (PhD)²,
S.M. Mousavi (MD)³, A. Niapour (PhD)^{*3}

1.Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R.Iran

2.Department of Medical Parasitology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R.Iran

3.Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 22; 2020; PP: 402-411

Received: Apr 15th 2020, Revised: Aug 10th 2020, Accepted: Aug 23rd 2020.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: High infiltration of glioma cells into the surrounding brain tissue is the cause of treatment failure in glioblastoma. Glioblastoma interactions with endothelial cells increase the migration of cancer cells. The aim of this study was to investigate the effect of tranexamic acid (TXA) on reducing the migration of glioblastoma and endothelial cells and the levels of metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2/9) in co-culture conditions.

METHODS: In this experimental study, cells prepared from Pasteur Institute were treated with different concentrations of TXA in mono-culture and co-culture. Cell survival was determined by MTT assay. The rate of migration was assessed by making grooves in the culture dishes and comparing the groove area at different time intervals in the control and treated groups with 6 and 24 mM TXA. The levels of MMP-2/9 enzymes in the control group and cells treated with 6 mM TXA were assessed by zymography.

FINDINGS: Decreased survival of T98G and HUVECs cells was observed in mono- and co-culture from 60 mM TXA and above ($p=0.0001$). Groove area in HUVECs group treated with 6 and 24 mM TXA were 0.27 ± 0.05 and 0.36 ± 0.04 of initial groove area, respectively, which was significant compared to the control group ($p=0.034$, $p=0.005$). No difference in groove size was observed in T98G cells. In co-culture group, the groove size 36 hours after the start of the study in the control group was 0.12 ± 0.01 , which was significantly lower than T98G + HUVECs groups treated with 6 (0.28 ± 0.06) and 24 (0.39 ± 0.07) mM TXA ($p=0.01$ and $p=0.002$). TXA significantly reduced the levels of MMP-2 ($p=0.0001$) and MMP-9 ($p=0.0001$) in co-culture conditions.

CONCLUSION: The results showed that TXA could reduce the migration of glioblastoma and endothelial cells as well as the levels of MMP-2/9 in co-culture conditions.

KEY WORDS: Glioblastoma, Co-Culture, Tranexamic Acid, Cell Migration, Matrix Metalloproteinase-2.

Please cite this article as follows:

Esmaeili H, Noroozadeh S, Mohammadi-Ghalehbin B, Mousavi SM, Niapour A. Effect of Tranexamic Acid on Migration Ability and Level of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 of T98G and HUVEC Cells in Co-Culture Conditions. J Babol Univ Med Sci. 2020; 22: 402-11.

*Corresponding Author: A. Niapour (PhD)

Address: Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R.Iran

Tel: +98 45 33510052

E-mail: ali.niapour@gmail.com

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30.
2. Winn H. Youmans & Winn neurological surgery. 7th ed. Winn HR, editor. Philadelphia: Elsevier; 2017.
3. IWADATE Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett*. 2016 Mar;11(3):1615-20.
4. Farrell CJ, Plotkin SR. Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. *Neurol Clin*. 2007;25(4):925-46.
5. Maher EA, Bachoo RM. Glioblastoma. In: Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease. Elsevier; 2015. p. 909-17.
6. Sharma A, Mrugala MM, Buckner J. Glioblastoma: Biology, Diagnosis, and Treatment. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Third Edit. Elsevier; 2018. p. 154-64.
7. Hardell L, Carlberg M. Mobile phone and cordless phone use and the risk for glioma – Analysis of pooled case-control studies in Sweden, 1997-2003 and 2007-2009. *Pathophysiology*. 2015;22(1):1-13.
8. Lahkola A, Auvinen A, Raitanen J, Schoemaker MJ, Christensen HC, Feychting M, et al. Mobile phone use and risk of glioma in 5 North European countries. *Int J Cancer*. 2007 Apr 15;120(8):1769-75.
9. Roa W, Brasher PMA, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated Course of Radiation Therapy in Older Patients With Glioblastoma Multiforme: A Prospective Randomized Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(9):1583-8.
10. Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 2016;20(5):S2-8.
11. Buchanan CF, Szot CS, Wilson TD, Akman S, Metheny-Barlow LJ, Robertson JL, et al. Cross-talk between endothelial and breast cancer cells regulates reciprocal expression of angiogenic factors in vitro. *J Cell Biochem*. 2012;113(4):1142-51.
12. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, Flack CG, Crowley JG, Hamm LL, et al. Endothelial Cells Create a Stem Cell Niche in Glioblastoma by Providing NOTCH Ligands That Nurture Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells. *Cancer Res*. 2011;71(18):6061-72.
13. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2012;1825(1):29-36.
14. Zhang H, Ma Y, Wang H, Xu L, Yu Y. MMP-2 expression and correlation with pathology and MRI of glioma. *Oncol Lett*. 2019;17(2):1826-32.
15. Xue Q, Cao L, Chen X-Y, Zhao J, Gao L, Li S-Z, et al. High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates. *Oncol Lett*. 2017;13(3):1325-30.
16. Kaphle P, Li Y, Yao L. The mechanical and pharmacological regulation of glioblastoma cell migration in 3D matrices. *J Cell Physiol*. 2019;234(4):3948-60.
17. Roomi MW, Kalinovskiy T, Rath M, Niedzwiecki A. Modulation of MMP-2 and MMP-9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human glioblastoma T-98G cells. *Oncol Rep*. 2017;37(3):1907-13.
18. Zhu Y, Zhao K, Prinz A, Keyvani K, Lambert N, Kreitschmann-Andermahr I, et al. Loss of endothelial programmed cell death 10 activates glioblastoma cells and promotes tumor growth. *Neuro Oncol*. 2016;18(4):538-48.
19. Feng T, Yu H, Xia Q, Ma Y, Yin H, Shen Y, et al. Cross-talk mechanism between endothelial cells and hepatocellular carcinoma cells via growth factors and integrin pathway promotes tumor angiogenesis and cell migration. *Oncotarget*. 2017;8(41).
20. Hardee ME, Zagzag D. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *Am J Pathol*. 2012;181(4):1126-41.
21. Picetti R, Shakur-Still H, Medcalf RL, Standing JF, Roberts I. What concentration of tranexamic acid is needed to inhibit fibrinolysis? A systematic review of pharmacodynamics studies. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2019;30(1):1-10.
22. Ng WCK, Jerath A, Wasowicz M. Tranexamic acid: a clinical review. *Anestezjol Intens Ter*. 2015;47(4):339-50.

23. Diebel ME, Martin J V., Liberati DM, Diebel LN. The temporal response and mechanism of action of tranexamic acid in endothelial glycocalyx degradation. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018;84(1):75-80.
24. Koutsoumpa M, Hatzia Apostolou M, Mikelis C, Koolwijk P, Papadimitriou E. Aprotinin stimulates angiogenesis and human endothelial cell migration through the growth factor pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase β/ζ . *Eur J Pharmacol.* 2009;602(2-3):245-9.
25. Kikuchi Y, Kizawa I, Oomori K, Matsuda M, Kato K. Adjuvant Effects of Tranexamic Acid to Chemotherapy in Ovarian Cancer Patients with Large Amount of Ascites. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1986;65(5):453-6.
26. Zhu J-W, Ni Y-J, Tong X-Y, Guo X, Wu X-P, Lu Z-F. Tranexamic Acid Inhibits Angiogenesis and Melanogenesis in Vitro by Targeting VEGF Receptors. *Int J Med Sci.* 2020;17(7):903-11.
27. Suojanen J, Sorsa T, Salo T. Tranexamic acid can inhibit tongue squamous cell carcinoma invasion in vitro. *Oral Dis.* 2009;15(2):170-5.
28. Patrad E, Niapour A, Farassati F, Amani M. Combination treatment of all-trans retinoic acid (ATRA) and γ -secretase inhibitor (DAPT) cause growth inhibition and apoptosis induction in the human gastric cancer cell line. *Cytotechnology.* 2018;70(2):865-77.
29. Niapour N, Niapour A, Sheikhanloui Milan H, Amani M, Salehi H, Najafzadeh N, et al. All trans retinoic acid modulates peripheral nerve fibroblasts viability and apoptosis. *Tissue Cell.* 2015;47(1):61-5.
30. Niapour A, Ghasemi Hamidabadi H, Niapour N, Mohammadi P, Sharifi Pasandi M, Malekzadeh V. Pharmacological Notch pathway inhibition leads to cell cycle arrest and stimulates ascl1 and neurogenin2 genes expression in dental pulp stem cells-derived neurospheres. *Biotechnol Lett.* 2019;41(6-7):873-87.
31. Sharifi Pasandi M, Hosseini Shirazi F, Gholami MR, Salehi H, Najafzadeh N, Mazani M, et al. Epi/perineural and Schwann Cells as Well as Perineural Sheath Integrity are Affected Following 2,4-D Exposure. *Neurotox Res.* 2017;32(4):624-38.
32. Afsharimani B, Cabot PJ, Parat MO. Effect of lysine antifibrinolytics and cyclooxygenase inhibitors on the proteolytic profile of breast cancer cells interacting with macrophages or endothelial cells. *Br J Anaesth.* 2014;113 Suppl:i22-31.
33. Kikuchi Y, Kizawa I, Oomori K, Miyauchi M, Kita T, Sugita M, et al. Establishment of a human ovarian cancer cell line capable of forming ascites in nude mice and effects of tranexamic acid on cell proliferation and ascites formation. *Cancer Res.* 1987;47(2):592-6.
34. Cox S, Cole M, Mankarious S, Tawil N. Effect of tranexamic acid incorporated in fibrin sealant clots on the cell behavior of neuronal and nonneuronal cells. *J Neurosci Res.* 2003;72(6):734-46.
35. Abdel Hadi L, Anelli V, Guarnaccia L, Navone S, Beretta M, Moccia F, et al. A bidirectional crosstalk between glioblastoma and brain endothelial cells potentiates the angiogenic and proliferative signaling of sphingosine-1-phosphate in the glioblastoma microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(10):1179-92.
36. Couto M, Coelho-Santos V, Santos L, Fontes-Ribeiro C, Silva AP, Gomes CMF. The interplay between glioblastoma and microglia cells leads to endothelial cell monolayer dysfunction via the interleukin-6-induced JAK2/STAT3 pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):19750-60.
37. Kenig S, Alonso MBD, Mueller MM, Lah TT. Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9. *Cancer Lett.* 2010;289(1):53-61.
38. Van Moorst M, Dass CR. Methods for co-culturing tumour and endothelial cells: systems and their applications. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(12):1513-21.
39. Shoval H, Karsch-Bluman A, Brill-Karniely Y, Stern T, Zamir G, Hubert A, et al. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. *Sci Rep.* 2017;7(1):10428.

- 40.DU H, Shi H, Chen D, Zhou Y, Che G. Cross-talk between endothelial and tumor cells via basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor signaling promotes lung cancer growth and angiogenesis. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1089-94.
- 41.Chiu J-H, Chen F-P, Tsai Y-F, Lin M-T, Tseng L-M, Shyr Y-M. Effects of Chinese medicinal herbs on expression of brain-derived Neurotrophic factor (BDNF) and its interaction with human breast cancer MDA-MB-231 cells and endothelial HUVECs. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):401.