مقاله پژوهشی

ارزیابی آزمایشگاهی فعالیت پیش انعقادی ریزذرات بیان کننده فسفاتیدیل سرین مشتق از رده سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 تیمار شده با داروی آدریامایسین (دوکسوروبیسین)

نویسندگان:

رضا رنجبران[1]، اکبر هاشمی طیر[2]*، مریم کامروان[2]، مهسا گرگین[2]

۱- مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.3, Fall 2022

چکیده:

مقدمه: وضعیت ترمبوآمبولیک در بیماران مبتلا به سرطان پستان تحت شیمی درمانی، ۴ تا ۷ برابر بیشتر از بیماران گروه کنترل است. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت پیش انعقادی ریزذرات (MPs) بیان کننده فسفاتیدیل سرین مشتق از رده سلولی سرطان پستان MDA-MB- 231 بیمار تیمار شده با داروی آدریامایسین بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، سلولی‌های سرطان پستان رده MDA-MB-231 با غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار آدریامایسین در ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. ریزذرات موجود در محیط کشت سلولی به روش سانتریفیوژ جدا سازی و برای بررسی فراوانی و فعالیت پیش انعقادی MPs از فلوسیتومتری استفاده شدند. تحلیل آماری داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد.

یافته‌ها: تعداد کل ریزذرات در تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت و دوز ۲ میکرومولار در مقایسه با کنترل به ترتیب ۱۱/۳ و ۱/۸ برابر افزایش داشتند (p<۰/۰۰۱). همچنین مشخص شد که نزدیک به نیمی از کل ریزذرات، از نظر مارکر آنکسین V که شاخص MPs پیش انعقادی است، مثبت اند. در محیط کشت تیمار شده با دوز ۲ میکرومولار، فعالیت پیش انعقادی این ذرات در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۵/۹±۴۲ و ۶/۸±۵۸/۱ نانومولار بود که نسبت به گروه‌های کنترل بیش از ۱۴ برابر افزایش داشتند (p<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: آدریامایسین باعث افزایش فعالیت پیش انعقادی ریزذرات مشتق شده از تومور می شود که می‌تواند از جمله دلایل مهم و موثر در ایجاد وضعیت‌های ترمبوآمبولیک در بیماران تحت شیمی درمانی باشد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، ریزذره، رده سلولی، آدریامایسین

Pars J Med Sci 2022;20(3):1-8

مقدمه:

سرطان پستان شایع ترین نوع سرطان در زنان و دومین یا سومین بدخیمی شایع در کشورهای درحال توسعه و توسعه یافته است [۱]. تخمین زده شده است که تا سال ۲۰۵۰ شیوع این سرطان با سرعتی دو برابر سرعت کنونی گسترش پیدا کند [۲]. در مقایسه با جمعیت نرمال، بیماران سرطانی ۴ تا ۷ برابر شانس بیشتری برای ابتلا به وضعیت‌های ترومبوآمبولیک دارند [۳، ۴]. زمانی که سرطان و حوادث ترومبوآمبولیک به طور هم زمان در بیمار وجود داشته باشند، پیش‌آگهی بیمار بسیار ضعیف تر شده و با افزایش مرگ و میر همراه است [۵]. فراوانی ترومبوآمبولی وریدی در بیماران مبتلا به سرطان پستان تحت شیمی‌درمانی، ۴ تا ۵ برابر بیشتر از سایرین است [۶، ۷]. در سرطان پستان داروهای شیمی درمانی ادجوانت و نئوادجوانت معمول شامل آدریامایسین

* نویسنده مسئول، نشانی: دکتری هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پزشکی– مرکز تحقیقات بیماری های غیر واگیر– دانشگاه علوم پزشکی جهرم ـ جهرم ـ ایران ـ کد پستی: ۷۴۱۴۸۰۴۶۱۹۹.

تلفن تماس:۰۷۱۵۴۳۴۰۴۰۵ پست الکترونیک:a.hashemi@jums.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۵/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸

(دوکسوروبیسین)، سیکلوفسفامید، تاکسان ها و تراستوزومب است که با افزایش میزان پاسخ کامل پاتولوژیک برای زنان مبتلا به سرطان پستان مفید هستند [۶].

ریزذرات به عنوان وزیکول‌های خارج سلولی از سلول‌های سرطانی آزاد شده و اغلب در جریان خون بیماران مبتلا یافت می‌شوند[۸]. چنین وزیکول‌هایی حامل مواد ژنتیکی مشتق شده از سلول‌های توموری و همچنین سایر مولکول‌های بیولوژیکی مشتق از تومور همچون پروتئین‌ها و گلیکوکونژوگه ها هستند که ممکن است به طور سیستماتیک میزبان را تحت تأثیر قرار دهند [۹]. این ذرات به عنوان جوانه های حاصل از غشای پلاسمایی سلول‌ها، در بسیاری از فرایند های بیولوژیکی شامل هموستاز، عملکردهای اندوتلیال عروقی، التهابات و یا ارتباطات داخل سلولی درگیر هستند [۱۰]. در شرایط شیمی درمانی، ریزذرات مشتق شده از تومور (Tumor Derived MicroParticles; TDMPs) ممکن است اثرات ترومبوژنیک و متاستاتیک داشته باشند که می‌تواند به بیان و توزیع فسفاتیدیل سرین (PS) در غشا مرتبط باشد [۱۱]. بیان PS روی غشاها برای بقای سلول‌های تومور، رشد و تکثیر و علائم مرتبط با سرطان مهم است [۱۲]. هنگامی که فسفاتیدیل در سطح سلول و یا در سطح ریزذرات بیان می‌شود، به عنوان جایگاه اتصال کمپلکس‌های انعقادی تناز و پروترومبیناز عمل کرده، شروع فرایند انعقاد خون را تسهیل می‌کند که نتیجه نهایی آن تشکیل ترومبین و شبکه فیبرینی است و این وضعیت فراهم کننده زمینه ایجاد حوادث ترومبوتیک است [۱۳]. در مطالعه هانگ و همکاران [۱۴] ریزذرات مشتق از سلول‌های سرطانی در بیماران مبتلا به سرطان پستان تحت شیمی درمانی با آدریامایسین و سیکلوفسفامید و همچنین مشتق از سل لاین های سرطان پستان تیمار شده با آدریامایسین (MDA-MB-231 and MCF-7 cells) مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج مطالعه مذکور، شیمی درمانی نئوادجوانت‌ها به طور قابل توجهی بیان ریزذرات بیان کننده فسفاتیدیل را در پلاسمای بیمار افزایش داد و با افزایش سریع فعالیت پیش انعقادی همراه بود. تقریباً تمام ریزذرات دارای PS بودند، اما تنها در شرایط پاتولوژیک مقدار ریزذرات مشتق شده از تومور بیان کننده PS به طور قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند، که اگر در این شرایط بدن نتواند TDMPs آزاد شده را حذف کند، انباشت آن منجر به یک حالت انعقادی بیش از حد شده و خطر متاستاز و مرگ را افزایش می‌دهد [۱۴]. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی فعالیت پیش انعقادی ریزذرات بیان کننده فسفاتیدیل سرین تیمار شده با داروی آدریامایسین و مشتق از رده سلولی سرطان پستان با ماهیت تهاجمی بالا (MDA-MB-231) طراحی و انجام شد.

روش کار:

تهیه وکشت رده سلولی:

رده سلولی MDA-MB-231 که نوعی رده سلولی سرطان پستان با تهاجم بالا می‌باشد از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. مواد مورد نیاز کشت سلولی از شرکت Gibco و فلاسک‌ها و میکروپلیت‌ها از شرکت Greiner خریداری شدند. رده‌های سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 با رویکرد بسیار تهاجمی (HTB-26™،ATCC) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، CO2 ۵ درصد، و محیط DMEM (Sigma, Germany) حاوی ۱ درصد پنی سیلین- استرپتومایسین (Sigma, Germany) و ۱۰ درصد FBS (Sigma, Germany) (Phosphate Buffered Saline) در pH=۷/۲ و تحت تیمار با داروی شیمی درمانی آدریامایسین کشت داده شدند [۱۴، ۱۵]. در ادامه، تعداد ۱۰ هزار سلول در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، در معرض دوزهای مختلف داوری آدریامایسین شامل ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار قرار گرفتند. همچنین چاهک های حاوی سلول بدون تیمار به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

جداسازی ریزذرات از محیط کشت سلولی:

به روش سانتریفیوژ، ریزذرات موجود در محیط کشت سلولی جدا سازی شدند. برای این کار، ابتدا سوپرناتانت حاوی این ذرات تهیه و برای حذف خرده های سلولی، محیط کشت به مدت ۱۵دقیقه با دور g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ExoQuick-TC™ (Biosciences, PlaoAlto CA, Cat num: EXOTC10A1) به نسبت ۱ به ۵ به محیط کشت اضافه شده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد. بعد از انکوباسیون، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه با دور g ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. بعد از برداشتن سوپ رویی، رسوب (pellet) بار دیگر به مدت ۵ دقیقه با دور g ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. باقی مانده های سوپ رویی نیز به طور کامل برداشته شده و با اضافه نمودن بافر PBS به پلیت، ریزذرات به حالت سوسپانسیون تبدیل شده و برای انجام سایر آزمایش‌ها استفاده شدند [۱۴].

تحلیل فلوسیتومتری ریزذرات:

در این مطالعه برای شمارش و تعیین فنوتیپ ریزذرات، از دستگاه فلوسیتومتری Cy Flow Space (Partec PAS, Germany) استفاده شد. دستگاه مورد نظر دارای لیزر و فیلتر اپتیکال استاندارد بوده و برای تحلیل سلولی، ولتاژهای فتومولتی پلایر در محدوده مورد نظر تنظیم شدند. در این مطالعه از Annexin V-FITC انسانی برای نشان دار کردن PS بیان شده در سطح ریزذرات پیش انعقادی استفاده شد. همچنین بیدهای یک میکرومتری

برای تعیین کمیت ریزذرات مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، برای افتراق دادن نویزهای سیتومتریک فلوسیتومتری، از ایزوتیپ کنترل PE Mouse IgG2b k به عنوان کنترل منفی استفاده شد که قابلیت واکنش بر علیه آنتی‌ژن‌های انسانی را ندارد. در مطالعه حاضر ۳۰۰ میکرولیتر Binding Buffer (0.1M HEPES/ pH 7.4, 1.4 M NaCl, and 25 mM CaCl2) اضافه شد و سپس با افزودن ۵ میکرولیتر از کونژوگه Annexin V-FITC، مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. قبل از تحلیل نمونه‌ها، میزان ۵ میکرولیتر از رقت ۱/۵۰۰ بیدهای یک میکرومتری که با آب مقطر دوبار تقطیر رقیق شده به هر نمونه افزوده شد. غلظت ریزذرات در مقایسه با غلظت بیدهای یک میکرومتری محاسبه شد. در واقع، تعداد این ذرات در تناسب با شمارش ۱۰۰۰۰ بید به دست آمد. در این مطالعه برای افتراق دادن event های واقعی از نویزهای الکتریکی دستگاه، ریزذرات را با توجه اندازه آن ها (کمتر از یک میکرومتر) و بیان PS (Annexin V Positive) تعریف کرده و در نهایت تعداد مطلق آن ها در هر میکرولیتر پلاسما به صورت زیر محاسبه شد [۱۳].

MPs per µl= N. of events in gating containing MPs×Absolute count of bead per tube / N. of events in bead region×test volume

تعیین فعالیت پیش انعقادی ریزذرات:

در این پژوهش فعالیت پیش انعقادی ریزذرات بر اساس آزمون‌های عملکردی مبتنی بر الایزا و با استفاده از بیان PS ارزیابی شد. اساس آزمایش بدین صورت است که رده‌های سلولی به همراه کلسیم، عامل انعقادی Xa و مهار کننده ترومبین به چاهک‌های میکروپلیتی که با استرپ آویدین و آنکسین V بیوتینیله آغشته شده اضافه شدند. به دنبال یک مرحله شستشو، در ابتدا مخلوط عامل‌های Xa-Va حاوی کلسیم و سپس پروترومبین خالص افزوده شد. در صورت وجود ریزذرات در نمونه، ذرات از طریق PS به آنکسین V متصل شده و ترکیب FXa-FVa در حضور کلسیم، پروترومبین را به ترومبین فعال تبدیل می کند. مقدار ترومبین تشکیل شده از طریق سوبسترای کروموژنیک اختصاصی قابل اندازه گیری بود. غلظت فسفولیپید یک عامل محدود کننده است و یک رابطه مستقیم بین غلظت فسفولیپید و مقدار ترومبین تشکیل شده وجود دارد. واکنش نهایی با اسید سیتریک ۲ درصد متوقف می شود و جذب محلول در طول موج ۴۰۵ نانومتر قابل خوانش است.

تحلیل آماری:

در پایان به منظور نمایش داده های گرد آوری شده از آمار توصیفی و برای تحلیل داده ها از آزمون آماری تی و یا معادل ناپارامتری آن در نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد. در تمامی آزمون ها سطح معناداری کوچکتر مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

نتایج حاصل از تحلیل فلوسیتومتریک ریزذرات:

با تحلیل سوپ رویی محیط‌های کشت سلولی با تکنیک فلوسیتومتریک مشخص شد که تمامی نمونه های مورد آزمایش حاوی ریزذره هستند. در ابتدا، ریزذرات بر حسب اندازه و در مقایسه با بید یک میکرومتری، با توجه به سیگنال های اختصاصی FSC (محور x با مقیاس لگاریتمی) و SSC (محور y با مقیاس لگاریتمی) گیت بندی شدند. همان طور که نشان داده شده است، ریزذرات به عنوان جمعیتی تقریباً کوچکتر و با SSC پایین تر از بید های یک میکرومتری مشخص شده اند (شکل ۱ الف و ب). در مراحل بعد، با نشان دار کردن ریزذرات با استفاده از مارکرهای فلورسانت آنکسین V و تحلیل آن ها شناخت بهتری از ریزذرات پیش انعقادی به دست آمد (شکل ۱ ج).

بررسی اثر داروی آدریامایسین بر تعداد ریزذرات:

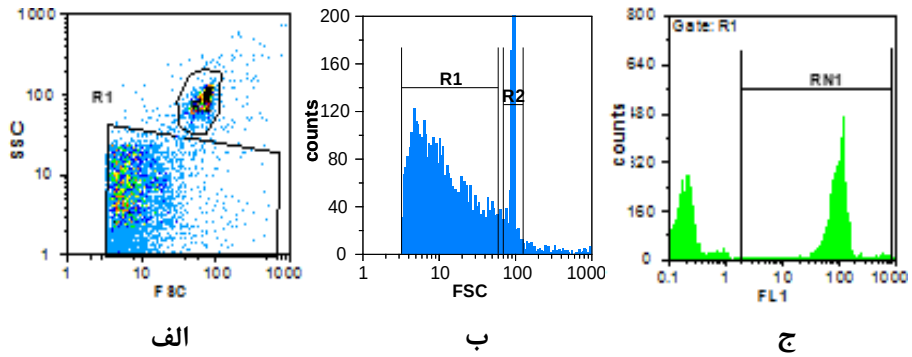
نتایج نشان داد که در محیط کشت سلولی تیمار شده با آدریامایسین در زمان های مختلف، تعداد کل ریزذرات با افزایش زمان کشت و افزایش دوز دارو افزایش پیدا می کنند. تفاوت بین تعداد کل ریزذرات درتیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت و دوز ۲ میکرومولار در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنادار بود و به ترتیب به میزان ۱۱/۳ و ۱۱/۸برابر افزایش پیدا کرده بودند ($p<0/001$) (شکل ۲).

تعیین میزان ریزذرات پیش انعقادی و اثر آدریامایسین بر تعداد آن ها

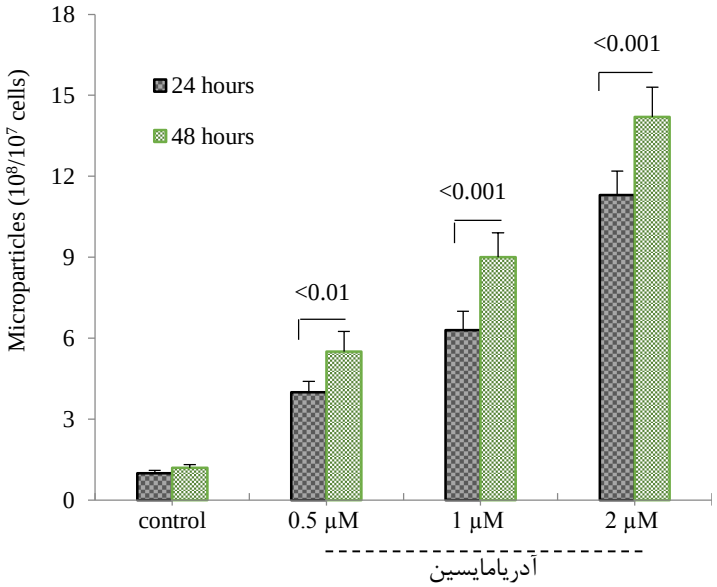
آنکسین V به عنوان مارکری مفید برای تعیین ریزذرات پیش انعقادی می باشد. مشخص شد که تقریباً ۴۹ درصد از کل این ذرات، از نظر مارکر آنکسین V که شاخص ریزذرات پیش انعقادی است مثبت هستند. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، تعداد AnnV+ MPs در محیط های کشت تیمار شده با آدریامایسین با افزایش دوز دارو و زمان انکوباسیون به طور معناداری افزایش پیدا کردند ($p<0/001$).

ارزیابی فعالیت پیش انعقادی ریزذرات بیان کننده فسفاتیدیل سرین

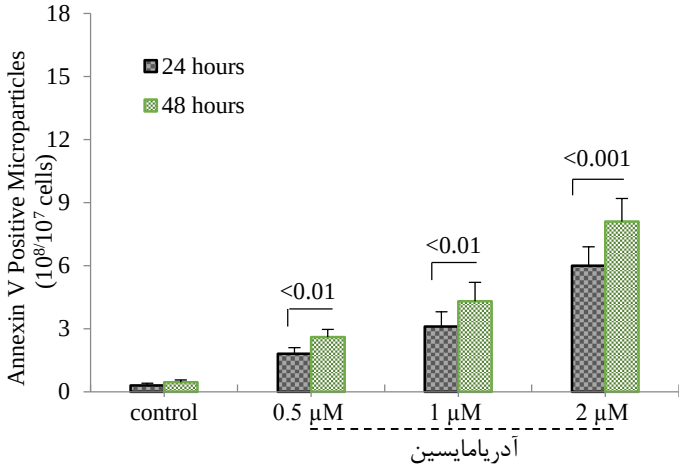
فعالیت پیش انعقادی ریزذرات در مقایسه با منحنی استاندارد تعیین مقدار شد. فعالیت پیش انعقادی این ذرات به طور قابل ملاحظه ای با طولانی تر شدن زمان انکوباسیون و افزایش دوز داروی آدریامایسین نسبت به محیط کنترل افزایش معناداری پیدا کرد (p<۰/۰۰۱)، به طوری که در محیط کشت تیمار شده با دوز ۲ میکرومولار، فعالیت پیش‌انعقادی آن‌ها در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۵/۹± ۴۲ و ۶/۸ ± ۵۸/۱ نانومولار PS بود که نسبت به گروه های کنترل بیش از ۱۴ برابر افزایش داشتند (شکل ۴). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط مثبت و معناداری بین فعالیت پیش انعقادی با تعداد AnnV+ MPs (; Pearson's test ۰/۰۰۱ >p ;۰/۹۴ = r) و همچنین با تعداد کل ریزذرات (۰/۰۰۱ >p ;۰/۹۱ = r) وجود دارد. به طوری که با افزایش AnnV+ MPs در محیط های کشت تیمار شده، فعالیت پیش انعقادی ریزذرات نیز به طور معناداری افزایش می‌یابد.



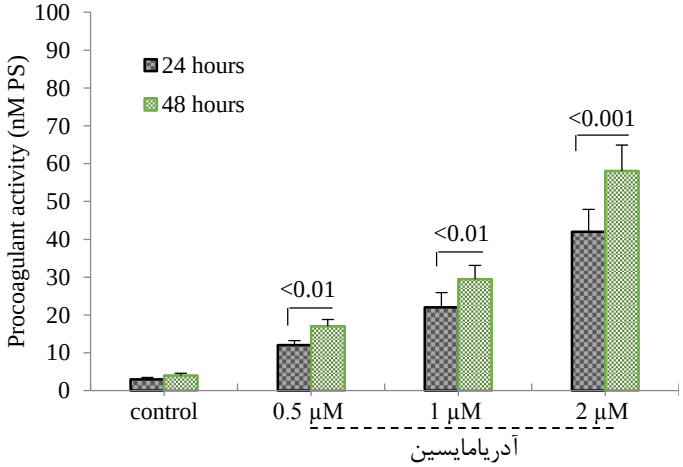
شکل ۱ : گراف های فلوستومتریک ریزذرات: پراکندگی رو به جلو (FSC) و پراکندگی کناری (SSC) به ترتیب بیانگر اندازه و گرانولاریته ریزذرات می باشند. با استفاده از بیدهای یک میکرومتری، محدوده اندازه ریزذرات مشخص شد. الف) دو محدوده مشخص شده تحت عناوین R1 و R2 به ترتیب نمایانگر ریزذرات و بیدهای یک میکرومتری هستند. بر اساس FSC و SSC، موقعیت مکانی ریزذرات پایین تر از بیدها قرار گرفت. ب) هیستوگرام لگاریتمی FSC در مقابل تعداد ریزذرات که نشان دهنده توزیع ریزذرات در مقایسه با بیدها می باشد. ج) ناحیه RN1 بیانگر منطقه گیت شده R1 است که با کونژوگه FITC-AnnV نشان دار شده است و بیانگر ریزذرات مثبت از نظر PS است.



شکل ۲: نمودار تعداد کل ریزذرات در سوپ رویی محیط های کشت سلولی تیمار شده با ادریامایسین در زمان های مختلف انکوباسیون. با افزایش دوز دارو و زمان کشت. تفاوت قابل توجه آماری بین تعداد در محیط کشت تیمار شده در مقایسه با کنترل وجود داشت.



شکل ۳: کمیت AnnV+ MPs در سوپ رویی محیط های کشت سلولی تیمار شده با آدریامایسین در زمان های مختلف انکوباسیون. تعداد ریزذرات پیش انعقادی در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت و با افزایش دوز دارو نسبت محیط بدون تیمار افزایش معنادار داشتند.



شکل ۴: ارزیابی فعالیت پیش انعقادی ریزذرات بیان کننده PS در محیط کشت تیمار شده با آدریامایسین در زمان های مختلف انکوباسیون. در کشت سلولی تیمار شده، میزان فعالیت پیش انعقادی ریزذرات به طور قابل توجهی وابسته به دوز و زمان انکوباسیون افزایش داشت ($p<۰/۰۰۱$).

بحث:

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان و دومین بدخیمی شایع درکشورهای درحال توسعه است [۱]. ریزذرات به عنوان وزیکول‌های خارج سلولی از سلول های سرطانی آزاد شده و اغلب در جریان خون بیماران مبتلا یافت می شوند [۸]. در شرایط شیمی درمانی، ریزذرات مشتق شده از تومور ممکن است اثرات ترومبوژنیک و متاستاتیک داشته باشند که به بیان و توزیع PS در غشا مرتبط باشد [۱۱]. آدریامایسین (دوکسوروبیسین) یکی از داروهای معمول مورد استفاده در شیمی درمانی سرطان پستان است. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد در محیط کشت سلولی تیمار شده با آدریامایسین در زمان‌های مختلف، تعداد کل ریزذرات با افزایش زمان کشت و افزایش دوز دارو افزایش پیدا می‌کنند.

همچنین نتایج نشان داد که تقریباً ۴۹ درصد از کل آن‌ها از نظر مارکر آنکسین V که شاخص ریزذرات پیش انعقادی است مثبت بوده و با افزایش دوز آدریامایسین و زمان انکوباسیون به طور معناداری افزایش پیدا می‌کنند. فعالیت پیش انعقادی ریزذرات به طور قابل ملاحظه‌ای با طولانی‌تر شدن زمان انکوباسیون و افزایش دوز داروی آدریامایسین نسبت به محیط کنترل افزایش معناداری پیدا کرد، به طوری که در محیط کشت تیمار شده با دوز ۲ میکرومولار، فعالیت پیش انعقادی ریزذرات در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به گروه های کنترل بیش از ۱۴ برابر افزایش داشت. همسو با نتایج این مطالعه، در مطالعه ماریجکی و همکاران، تعداد و منشا سلولی ریزذرات در ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان

ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در بیماران میزان آنکسین V بیشتر از گروه نرمال است و الگوی ریزذرات مستعدکننده ترومبوز به دنبال اندوکرین درمانی در بیماران با افزایش بیشتری همراه است [۱۶]. مطالعه هم سو با مطالعه حاضر، مطالعه آهارون و همکاران است که در آن اثرات تجویز شیمی درمانی بر ویژگی‌های وزیکول‌های خارج سلولی بیماران سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه مذکور نشان داد وزیکول‌های گروه بیماران در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور قابل توجهی بالاتر است [۱۷]. در مطالعه دیگر آهارون و همکاران، خواص وزیکول‌های خارج سلولی مشتق شده از سلول‌های سرطان پستان (MCF7, MDA-MB-231) بعد از قرار گرفتن در معرض شیمی درمانی با دوز بالا یا پایین آدریامایسین و پاکلیتاکسل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نیز نشان داد زمانی که سلول‌های MDA-MB-231 در معرض دوزهای بالای هر دو دارو قرار گرفتند، میزان وزیکول‌ها افزایش می‌یابد که مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشد که در آن تعداد کل ریزذرات با افزایش دوز دارو افزایش پیدا کردند [۱۵]. همچنین هانگ و همکاران ریزذرات مشتق از سلول‌های سرطانی در بیماران مبتلا به سرطان پستان تحت شیمی درمانی با آدریامایسین و سیکلوفسامید و همچنین مشتق از سل لاین‌های سرطان پستان تریت شده با آدریامایسین (MDA-MB-231 and MCF-7 cells) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد شیمی درمانی نئوادجوانت ها به طور قابل توجهی بیان ریزذرات بیان کننده PS را در پلاسمای بیمار افزایش می‌دهد و با افزایش سریع فعالیت پیش انعقادی همراه است [۱۴]. نتایج مطالعه مذکور همسو با نتایج مطالعه حاضر است. به بیان دیگر، در محیط کشت تیمار شده با دوز ۲ میکرومولار، فعالیت پیش انعقادی ریزذرات در زمان ۲۴ و ۴۸ نسبت به گروه‌های کنترل بیش از ۱۴ برابر افزایش داشتند. در طی فعال شدن سلولی و فاز آپوپتوزیس، غلظت کلسیم سیتوزولی افزایش یافته که نتیجه این روند شاتل فسفولیپیدها بین دولایه لیپیدی و قرار گرفتن PS در سطح خارجی غشای سلول و آزاد شدن ریزذرات است [۱۳]. هنگامی که PS در سطح سلول و یا در سطح ریزذرات بیان می‌شود، به عنوان جایگاه اتصال کمپلکس‌های انعقادی تناز و پروترومبیناز عمل کرده و شروع فرایند انعقاد خون را تسهیل می‌کند که ممکن است با اختلالات هموستاتیک در بیماران مرتبط باشد [۱۳]. بیان PS روی غشاها برای بقای سلول‌های تومور، رشد و تکثیر و علائم مرتبط با سرطان مهم است [۱۲]. میزان تراکم سطحی PS در ریزذرات‌ها معادل و یا حتی بیشتر از پلاکت های فعال شده می‌باشد. بیان PS با استفاده از مارکرهای آنکسین V و لاکتادهرین نشان دار با مواد فلورسانت قابل شناسایی است [۱۳]. نقش بالقوه ریزذرات مشتق شده از تومور در ایجاد ترومبوز مرتبط با سرطان مدت هاست که پیشنهاد شده است [۱۸، ۱۹]. تعدادی از مطالعات، افزایش میزان پلاسمایی ریزذرات مشتق شده از تومور را در وضعیت‌های پیش ترومبوتیک در هر دو مدل حیوانی [۱۹، ۲۰] و انسانی [۲۱، ۲۲] مرتبط دانسته‌اند. علاوه بر PS، عامل بافتی (Tissue Factor; TF) نیز می‌تواند در ایجاد ترومبوز نقش داشته باشد. تاکنون اطلاعات اندکی در مورد سنتز و نقش TDMPs بیان کننده PS در ترومبوز مرتبط با سرطان به دست آمده است. در مطالعات مختلف، تمرکز ویژه‌ای بر ریزذرات مشتق شده از تومور بیان کننده TF شده است [۲۲، ۲۳]، اما قابل ذکر است که TF بیان شده در غشا معمولاً خاموش بوده و زمانی فعال می باشد که در غشای بیان کننده PS قرار بگیرد. بنابراین، فعالیت TF را می‌توان با مهارکننده‌های PS همچون انکسین V یا لاکتادرین مهار کرد [۲۴]. لازم است برای درک سازوکارهای بیوشیمیایی تاثیر ریزذرات مشتق شده از تومور در ایجاد ترومبوز مرتبط با سرطان پستان با مطالعات گسترده و شرایط کنترل‌شده، توانایی رده‌های مختلف سلول سرطانی در تحریک انعقاد و عملکردهای پلاکتی مورد بررسی قرار گیرد.

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر، محفظه جریان دستگاه فلوسیتومتری بود. معمولاً اکثر دستگاه‌های فلوسیتومتری برای تشخیص سلول‌ها تنظیم و ساخته شده‌اند. در محفظه جریان، سلول‌ها به صورت تکی از مقابل لیزر عبور می‌کنند، اما در مواردی که ذرات با ابعاد کوچکتر مورد شمارش قرار گیرند، پدیده‌ای به نام Swarm Detection رخ می‌دهد. در این حالت چندین ذره کوچک به صورت هم زمان از مقابل لیزر عبور کرده و به عنوان تنها یک event در نظر گرفته می‌شوند. در مواردی که تعیین غلظت ریزذرات مد نظر باشد، این پدیده می‌تواند باعث افزایش تغییر پذیری در تعداد آن‌ها شود [۲۵].

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که داروی آدریامایسین می‌تواند باعث افزایش فعالیت پیش انعقادی ریزذرات مشتق شده از سلول‌های تومور شود که این موضوع می‌تواند از جمله دلایل مهم و موثر در ایجاد وضعیت‌های ترمبوآمبولیک در بیماران تحت شیمی درمانی با داوری آدریامایسین باشد.

ملاحظات اخلاقی:

این پژوهش توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد اخلاق IR.JUMS.REC.1400.11 مصوب شده است.

تشکر و قدردانی:

این طرح با حمایت های دانشگاه علوم پزشکی جهرم انجام شده است. بدین وسیله، از معاونت محترم تحقیقات و فناوری آن

دانشگاه برای تصویب و تامین بودجه این طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1.Acharya UR, Ng EYK, Tan JH, Sree SV. Thermography based breast cancer detection using texture features and support vector machine. J Med Syst. 2012;36(3):1503-10.

2.Haghbeen M, Tayer AH, Kamravan M, Jahromi AS. Derived Procoagulant Microparticles as Blood-Based Biomarker of Breast Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2021;22(5):1573.

3.Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. Blood. 2013;122(10):1712-23.

4.Hisada Y, Geddings J, Ay C, Mackman N. Venous thrombosis and cancer: from mouse models to clinical trials. J Thromb Haemost. 2015;13(8):1372-82.

5. Levitan N, Dowlati A, Remick SC, Tahsildar HI, Sivinski LD, Beyth R, et al. Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. Medicine (Baltimore). 1999;78(5):285-91.

6.Hisada Y, Mackman N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. Blood. 2017;130(13):1499-506.

7.Walker AJ, West J, Card TR, Crooks C, Kirwan CC, Grainge MJ. When are breast cancer patients at highest risk of venous thromboembolism? A cohort study using English health care data. Blood. 2016;127(7):849-57.

8.Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. Trends Mol Med. 2014;20(7):385-93.

9.Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. J Cell Sci. 2010;123(10):1603-11.

10.Berghuis AS, Koffijberg H, Prakash J, Terstappen LW, IJzerman MJ. Detecting blood-based biomarkers in metastatic breast cancer: a systematic review of their current status and clinical utility. Int J Mol Sci. 2017;18(2):363.

11.Welsh J, Smith J, Yates K, Greenman J, Maraveyas A, Madden L. Tissue factor expression determines tumour cell coagulation kinetics. Int J Lab Hematol. 2012;34(4):396-402.

12.Chang W, Fa H, Xiao D, Wang J. Targeting phosphatidylserine for Cancer therapy: prospects and challenges. Theranostics. 2020;10(20):9214.

13.Tayer AH, Amirizadeh N, Ahmadinejad M, Nikougoftar M, Deyhim MR, Zolfaghari S. Procoagulant activity of red blood cell-derived microvesicles during red cell storage. Transfus Med Hemother. 2019;46(4):224-30.

14.Zhang C, Yang Z, Zhou P, Yu M, Li B, Liu Y, et al. Phosphatidylserine-exposing tumor-derived microparticles exacerbate coagulation and cancer cell transendothelial migration in triple-negative breast cancer. Theranostics. 2021;11(13):6445.

15.Aharon A, Sabbah AR, Issman L, Berkovich H, Copty R, Talmon Y, et al. Effects of low-and high-dose chemotherapy agents on thrombogenic properties of extracellular vesicles derived from breast cancer cell lines. J Thromb Haemost. 2018;118(03):480-9.

16.Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Bredewold EO, van Aalderen MC, Spronk HM, Ten Cate H, et al. Elevated numbers and altered subsets of procoagulant microparticles in breast cancer patients using endocrine therapy. Thromb Res. 2011;127(4):363-9.

17.Aharon A, Sabbah A, Ben-Shaul S, Berkovich H, Loven D, Brenner B, et al. Chemotherapy administration to breast cancer patients affects extracellular vesicles thrombogenicity and function. Oncotarget. 2017;8(38):63265.

18. Lima LG, Monteiro RQ. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. Biosci Rep. 2013;33(5):e00064.

19. Rautou PE, Mackman N. Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. Expert Rev Hematol. 2013;6(1):91-101

20.Geddings JE, Hisada Y, Boulaftali Y, Getz TM, Whelihan M, Fuentes R, et al. Tissue factor–positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. J Thromb Haemost. 2016;14(1):153-66.

21.Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, et al. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. J Thromb Haemost. 2007;97(1):119-23.

22.Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al. Tumor-derived tissue factorbearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res. 2009;15(22):6830-40.

23.Bourcy M, Suarez-Carmona M, Lambert J, Francart M-E, Schroeder H, Delierneux C, et al. Tissue Factor Induced by Epithelial–Mesenchymal Transition Triggers a Procoagulant State That Drives Metastasis of Circulating Tumor CellsEMT-Induced TF and Procoagulant Properties of CTCs. Cancer Res. 2016;76(14):4270-82.

24.Yu Y, Böing AN, Hau CM, Hajji N, Ruf W, Sturk A, et al. Tissue factor coagulant activity is regulated by the plasma membrane microenvironment. J Thromb Haemost. 2018;118(06):990-1000.

25. Van der Pol E, Van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, Van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. J Thromb Haemost. 2012;10(5):919-30.

Original Article

In-vitro evaluation of procoagulant activities of microparticles expressing phosphatidylserine derived from breast cancer cell line MDA-MB-231 treated with Adriamycin

Reza Ranjbaran[1], Akbar Hashemi Tayer[2*], Maryam Kamravan[2], Mahsa Gorgin[2]

Received:2022.07.19 Revised:2021.08.03 Accepted: 1401.09.28

1. Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2. Research Center for Noncommunicable Diseases, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.3, Fall 2022

Pars J Med Sci 2022;20(3):1-8

Abstract:

Introduction:
Thromboembolic conditions in cancer patients undergoing chemotherapy are 4 to 7 times higher than in control patients. The aim of this study is to evaluate the procoagulant activity of microparticles (MPs) expressing phosphatidylserine (PS) derived from breast cancer cell line MDA-MB-231 treated with Adriamycin.

Methods & Materials:
In this experimental study, MDA-MB-231 breast cancer cells were treated with concentrations of 0.5, 1, and 2 µM adriamycin for 24 and 48 hours. Using centrifugation technique, the MPs in the cell culture medium were separated from other contents and flow cytometry was used to count and determine the MPs phenotype. At the end, the statistical analysis of the data was done SPSS software version 23 (IBM, USA).

Results:
The total number of MPs increased by 11.3 and 11.8 times in 24 and 48 hours treated and 2 µM dose respectively ($p<0.001$). Almost 49% of all MPs were positive in terms of Annexin V marker, which is an indicator of procoagulant MPs. In the culture medium treated with a dose of 2 µM, the procoagulant activity of MPs at 24 and 48 hours was 42 ± 5.9 nM and 58 ± 6.8 nM PS, respectively, which was more than 14 compared to the control groups. They had an increase ($p<0.001$).

Conclusion:
Adriamycin increases the procoagulant activity of tumor-derived MPs, which can be one of the important and effective reasons for causing thromboembolic conditions in patients undergoing chemotherapy.

Keywords: Breast Cancer, Microparticles, Adriamycin

* Corresponding author Email: a.hashemi@jums.ac.ir