

# The effect of tranilast on *MMP-2* and *MMP-9* mRNA levels in normal and keloid fibroblasts

## Wpływ tranilastu na poziom mRNA *MMP-2* i *MMP-9* w fibroblastach prawidłowych i keloidowych

Paweł P. Antończak<sup>1</sup>, Katarzyna Adamczyk<sup>1</sup>, Agnieszka Garnarczyk<sup>1</sup>, Magdalena Jurzak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmetology in Sosnowiec, Silesian Medical University in Katowice, Poland

<sup>1</sup>Department of Biology of Cell, Silesian Medical University, Katowice, Poland

<sup>1</sup>Zakład Kosmetologii Katedry Kosmetologii w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Polska

<sup>2</sup>Zakład Biologii Komórki Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Polska

Dermatol Rev/Przeegl Dermatol 2018, 105, 384–396

DOI: <https://doi.org/10.5114/dr.2018.77109>

### ABSTRACT

CORRESPONDING AUTHOR/  
ADRES DO KORESPONDENCJI:  
Paweł P. Antończak  
Zakład Kosmetologii  
Katedry Kosmetologii  
Śląski Uniwersytet Medyczny  
ul. Kasztanowa 3  
41-200 Sosnowiec  
tel.: +48 32 269 98 35  
e-mail: [pantonczak@sum.edu.pl](mailto:pantonczak@sum.edu.pl)

**Introduction.** Tranilast (*N*-(3',4'-demethoxycinnamoyl)-anthranilic acid) is an anti-allergic drug. Its mechanism of action is based on the inhibition of antigen-induced release of chemical mediators from mast cells and basophils. It exerts antifibroproliferative activity as well. These properties of tranilast are used in the treatment of hypertrophic scars and keloids. Keloid fibroblasts exhibit overproduction of collagen type I and decreased degradation of extracellular matrix in comparison with normal fibroblasts. Matrix metalloproteinases play the key role in extracellular matrix turnover.

**Objective.** Quantitatively evaluate *MMP-2* (gelatinase A) and *MMP-9* (gelatinase B) gene expression in normal human skin fibroblasts and fibroblasts derived from keloids exposed to tranilast *in vitro*.

**Material and methods.** The experimental material constituted two cell lines: normal human dermal fibroblasts (NHDF) and keloid fibroblasts (KEL FIB). In the first stage of the study, the influence of tranilast on cell viability was estimated. The second stage of the study involved the quantitative evaluation of *MMP-2* and *MMP-9* gene expression in RNA extracts from fibroblasts treated with tranilast. Real-time QRT-PCR was used to validate the transcription level of *MMP-2* and *MMP-9* genes in NHDF and KEL FIB cells after tranilast treatment.

**Results.** Tranilast reduces the viability of the fibroblasts of both cell lines in 300  $\mu$ M. The performed analysis indicates a stimulating effect of tranilast at 3  $\mu$ M and 30  $\mu$ M on the expression of *MMP-2* in normal fibroblasts and at 3  $\mu$ M on keloid fibroblasts. Tranilast did not influence the expression of *MMP-9* mRNA, either in normal fibroblasts or in keloid fibroblasts.

**Conclusions.** Tranilast reduces the viability of normal and keloid fibroblast and modulated expression of *MMP-2*. However its activity is dose dependent. It is necessary to continue the study to evaluate full antiproliferative activity of tranilast.

### STRESZCZENIE

**Wprowadzenie.** Tranilast (kwas *N*-(3',4'-demetoksycynamoilo)-antranilowy) należy do leków przeciwalergicznyc. Jego mechanizm działania polega na hamowaniu indukowanego antygenowo uwalniania me-

diatorów chemicznych przez mastocyty i bazofile. Ma także działanie antyfibroproliferacyjne. Te właściwości tranilastu są wykorzystywane w leczeniu blizn przerostowych i keloidów. Fibroblasty pochodzące z keloidów charakteryzują się nadmiernym wytwarzaniem kolagenu typu I oraz ograniczonym rozkładem macierzy pozakomórkowej w porównaniu z fibroblastami prawidłowymi. Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę w przemianach macierzy pozakomórkowej.

**Cel pracy.** Ilościowa ocena ekspresji genów *MMP-2* (żelatynazy A) i *MMP-9* (żelatynazy B) w prawidłowych ludzkich fibroblastach skóry oraz fibroblastach pochodzących z keloidów poddanych działaniu tranilastu w warunkach *in vitro*.

**Materiał i metodyka.** Materiał eksperymentalny stanowiły dwie linie komórkowe: prawidłowe fibroblasty skóry ludzkiej (NHDF) oraz fibroblasty keloidowe (KEL FIB). W pierwszym etapie oceniano wpływ tranilastu na żywotność komórek. Drugi etap badań obejmował ilościową ocenę ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* w ekstraktach RNA z fibroblastów poddanych działaniu tranilastu. Do oceny poziomu transkrypcji genów *MMP-2* i *MMP-9* w komórkach linii NHDF i KEL FIB po zastosowaniu tranilastu wykorzystano metodę *real-time* QRT-PCR.

**Wyniki.** Tranilast w stężeniu 300  $\mu$ M zmniejsza żywotność fibroblastów obu linii komórkowych. Wykonana analiza wskazuje na stymulujący wpływ tranilastu w stężeniach 3  $\mu$ M i 30  $\mu$ M na ekspresję *MMP-2* w fibroblastach prawidłowych, a w stężeniu 3  $\mu$ M w fibroblastach keloidowych. Tranilast nie wpływał natomiast na ekspresję mRNA *MMP-9* ani w fibroblastach prawidłowych, ani keloidowych.

**Wnioski.** Tranilast hamuje przeżywalność fibroblastów prawidłowych i keloidowych oraz wpływa na ekspresję *MMP-2*. Aktywność leku zależy od zastosowanego stężenia. Konieczne są dalsze badania w celu poznania mechanizmu działania antyproliferacyjnego tranilastu.

**Key words:** keloids, *MMP-9*, *MMP-2*, tranilast, gelatinases.

**Słowa kluczowe:** keloidy, *MMP-9*, *MMP-2*, tranilast, żelatynazy.

## INTRODUCTION

Tranilast, a derivative of anthranilic acid (N-(3',4'-demethoxycinnamoyl)-anthranilic acid) is an anti-allergic drug. It blocks degranulation of mast cells and basophils [1] and inhibits the release of inflammatory mediators such as histamine, leukotrienes, prostaglandins and platelet-activating factor which are produced by mast cells and basophils during the antigen-antibody reaction [2].

Moreover, tranilast exhibits antifibroproliferative activities. The mechanisms of the antifibrotic effect of the drug are not fully understood. Previous studies suggest that the major antifibrotic effect of tranilast is the inhibition of both transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) expression and TGF- $\beta$  action. Transforming growth factor- $\beta$  is responsible for the activation of fibroblasts. In addition, tranilast inhibits prolyl hydroxylase activity – a key enzyme of collagen biosyn-

## WPROWADZENIE

Tranilast, pochodna kwasu antranilowego (kwasu N-(3',4'-demetoksycynamoilo)-antranilowego), należy do leków przeciwalergiczných. Blokuje degranulację mastocytów i bazofilów [1] oraz hamuje wydzielanie mediatorów zapalnych, m.in. histaminy, leukotrienów, prostaglandyn oraz czynnika aktywującego płytki krwi, które są wytwarzane przez mastocyty i bazofile w reakcji antygeny z przeciwciałem [2].

Tranilast ma także właściwości antyfibroproliferacyjne. Mechanizm działania antyfibrotycznego leku nie jest w pełni poznany. Dotychczasowe badania wskazują, że zasadniczy efekt antyfibrotyczny tranilastu polega na hamowaniu zarówno ekspresji, jak i aktywności transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$  – TGF- $\beta$ ). Czynniki ten odpowiada za aktywację fibroblastów. Tranilast hamuje ponadto aktywność hydroksylazy prolylowej – ważnego enzymu uczestniczącego w biosyn-

thesis. The antifibrotic effects of the drug have been demonstrated in cell culture of fibroblasts derived from keloids. Tranilast is used in the treatment of hypertrophic scars and keloids [1, 3–6].

Keloids arise most often as a result of abnormal wound healing and are classified as benign growths of connective tissue tumor [7]. One of the causes of keloid formation is abnormal extracellular matrix (ECM) turnover (biosynthesis and degradation) during complex and multifactorial healing of wounds [8]. Keloids do not exhibit the characteristics of malignant tumors, but they often grow beyond the original location [9].

Both the formation and growth of keloid require the participation of proteolytic enzymes involved in the remodeling of ECM [7, 9]. To date, 24 different vertebrate matrix metalloproteinases (MMP) have been identified, of which 23 are found in humans [7]. The enzymes can be divided into seven groups based on the substrate preference and domain organization: collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, metalloelastases, membrane-type MMPs (MT-MMPs) and other MMPs. Most of them play an essential role in wound healing. Gelatinases compass MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B). The substrates of gelatinases are gelatin, collagen type I, IV, V, VII and aggrecan. MMP-2 additionally cleaves collagen type X, laminin, fibronectin and tenascin, whereas MMP-9 additionally cleaves collagen type III, elastin and fibrillin [10–15].

## OBJECTIVE

The influence of tranilast on proteolytic enzyme expression in keloids is still unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression of gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) in normal human fibroblasts and fibroblasts derived from keloids treated with tranilast *in vitro*.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell culture

A normal human dermal fibroblast cell line (NHDF; Clonetics™) and fibroblasts derived from a keloid cell line (KEL FIB; ATCC) were routinely cultured in Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with L-glutamine (Sigma Aldrich; St. Louis, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL; Rockville, MD, USA), 100 U/ml penicillin and streptomycin (Sigma Aldrich; St. Louis, USA). Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. At confluence, cells were routinely passaged using 1% trypsin with

tezie kolagenu. Właściwości antyfibrotyczne leku wykazano w hodowli komórkowej fibroblastów uzyskanych z keloidów. Tranilast jest wykorzystywany w leczeniu blizn przerostowych i keloidów [1, 3–6].

Powstawanie keloidów jest najczęściej skutkiem nieprawidłowego procesu gojenia rany. Keloidy są sklasyfikowane jako łagodne nowotwory skóry wywodzące się z tkanki łącznej [7]. Jedną z przyczyn powstawania tych zmian są nieprawidłowe przemiany macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix* – ECM) (biosynteza i rozkład) podczas złożonego i wieloczynnikowego procesu gojenia rany [8]. Keloidy nie mają właściwości nowotworów złośliwych, choć często wykraczają poza pierwotną lokalizację [9].

Zarówno powstawanie, jak i rozrost keloidów wymagają udziału enzymów proteolitycznych wpływających na przebudowę ECM [7, 9]. Według aktualnego stanu wiedzy u kręgowców zidentyfikowano 24 metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (*matrix metalloproteinases* – MMP), z których 23 występują u ludzi [7]. Na podstawie powinowactwa do określonych substratów oraz organizacji domeny enzymy te można podzielić na siedem grup: kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny, matrylizyny, metaloelastazy, metaloproteiny typu błonowego (MT-MMP) oraz pozostałe MMP. Wiele z nich odgrywa zasadniczą rolę w procesie gojenia ran. Grupa żelatynaz obejmuje MMP-2 (żelatynazę A) i MMP-9 (żelatynazę B). Substratami żelatynazy są: żelatyna, kolagen typu I, IV, V, VII oraz agrekan. MMP-2 dodatkowo rozcina kolagen typu X, lamininę, fibronektynę i tenascynę, a MMP-9 – kolagen typu III, elastynę i fibrylinę [10–15].

## CEL PRACY

Wpływ tranilastu na ekspresję enzymów proteolitycznych w keloidach jest nadal nieznan. Z tego względu celem niniejszego badania była ocena ekspresji żelatynazy A (MMP-2) i żelatynazy B (MMP-9) w prawidłowych fibroblastach skóry ludzkiej oraz fibroblastach pozyskanych z keloidów poddanych działaniu tranilastu w warunkach *in vitro*.

## MATERIAŁ I METODY

### Hodowla komórkowa

Linie komórkową prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej (NHDF; Clonetics™) oraz linie komórkową fibroblastów pozyskanych z keloidów (KEL FIB; ATCC) poddano rutynowej hodowli na modyfikowanym podłożu Eagle'a (DMEM) z dodatkiem L-glutaminy (Sigma Aldrich; St. Louis, USA), 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, GibcoBRL; Rockville, MD, USA) oraz 100 U/ml penicyliny i streptomycyny (Sigma Aldrich; St. Louis, USA). Komórki hodowano w temperaturze 37°C, 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>. Po osiągnięciu konfluencji komór-

EDTA (Sigma Aldrich; St. Louis, USA). In the study cells from passages 4 to 6 were used. Both normal and keloid fibroblasts were treated with tranilast (Sigma Aldrich; St. Louis, USA) at 300  $\mu$ M, 30  $\mu$ M and 3  $\mu$ M. Control cells were normal fibroblasts (NHDF) and keloid fibroblasts (KEL FIB) not treated with tranilast.

#### Viability analysis of cells treated with tranilast

To evaluate the percentage of viable and non-viable cells in cultures designed for viability tests of cells treated with tranilast, trypan blue staining was assayed. The results obtained on the basis of this test showed that living cells constituted on average 90% of cultured fibroblasts, both the NHDF cell line and KEL FIB. To conduct the experiment cells were seeded in well microplates at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well.

The Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany) was used for quantification of cell proliferation, growth, viability and chemosensitivity in cell populations treated and not treated with tranilast. Cells were cultured in 96-well microplates at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well in 300  $\mu$ l of culture medium. After 24 hours when cells adhered to the bottom of dishes, the medium was replaced with medium supplemented with tranilast. Cells were incubated with the drug for 72 hours under standard culture condition (37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity), after the time the medium was replaced with fresh medium to perform the viability test. The WST-1 test was performed according to the manufacturer's protocol. The absorbance was measured ( $\lambda = 440$  nm) using a UVM340 microplate reader (Biogenet). Viability of keloid and normal fibroblasts treated with tranilast was compared with viability of control cells. The effect of tranilast on the viability of the treated cells was evaluated relative to the controls considered as 100% viability.

#### Analysis of gene expression

The analysis of gene expression in NHDF and KEL FIB cells treated with tranilast and control cells (not treated with drug) involved *MMP-2* and *MMP-9* and *18S rRNA*.

The cells were seeded at  $10^5$  cells per 9 cm<sup>2</sup> Petri dish. After 24 hours incubation under standard culture conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity), the culture medium was replaced with medium supplemented with 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M or 300  $\mu$ M concentration of tranilast in culture medium with supplements. The medium of control cells was replaced with standard medium (DMEM). Gene expression

ki poddano standardowemu pasażowaniu przy wykorzystaniu 1% trypsyny z dodatkiem EDTA (Sigma Aldrich; St. Louis, USA). W eksperymencie wykorzystano komórki z pasaży nr 4–6. Fibroblasty prawidłowe oraz keloidowe poddano działaniu tranilastu (Sigma Aldrich; St. Louis, USA) w stężeniach 300  $\mu$ M, 30  $\mu$ M i 3  $\mu$ M. Jako komórki kontrolne wykorzystano fibroblasty prawidłowe (NHDF) i keloidowe, które nie zostały poddane działaniu leku.

#### Analiza żywotności komórek poddanych działaniu tranilastu

Procentowy stosunek komórek żywych do nieżywych w hodowlach przeznaczonych do eksperymentu oceniono, stosując barwienie błękitem trypanu. Wyniki wykazały, że komórki żywe stanowią średnio 90% hodowanych fibroblastów zarówno w linii komórkowej NHDF, jak i KEL FIB. W celu przeprowadzenia eksperymentu komórki wysiano do naczyń wielodołkowych z gęstością  $5 \times 10^3$  komórek na dołek.

Do ilościowej oceny proliferacji, wzrostu, żywotności i chemoczułości populacji komórek, które poddano działaniu tranilastu, oraz komórek, które nie miały styczności z lekiem, wykorzystano odczynnik Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Niemcy). Komórki hodowano w mikropłytkach 96-dołkowych z gęstością  $5 \times 10^3$  komórek na dołek w 300  $\mu$ l. Po upływie 24 godzin, gdy stwierdzono przyleganie komórek do dna naczyń, podłoże wymieniono na wzbogacone tranilastem. Komórki poddano inkubacji z lekiem przez 72 godziny w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wilgotność 95%). Po upływie tego czasu podłoże wymieniono na świeże i przeprowadzono analizę żywotności. Test WST-1 wykonano zgodnie z protokołem producenta. Pomiar absorbancji ( $\lambda = 440$  nm) przeprowadzono przy wykorzystaniu czytnika mikropłytek UVM340 (Biogenet). Żywotność keloidowych i prawidłowych fibroblastów poddanych działaniu tranilastu porównano z żywotnością komórek kontrolnych. Wpływ tranilastu na żywotność komórek poddanych działaniu leku oszacowano w odniesieniu do komórek kontrolnych, dla których przyjęto 100% żywotności.

#### Analiza ekspresji genów

Analiza ekspresji genów w komórkach NHDF i KEL FIB poddanych działaniu tranilastu i komórkach kontrolnych (bez styczności z lekiem) obejmowała *MMP-2*, *MMP-9* i *18S rRNA*.

Komórki wysiano na szalki Petriego z gęstością  $10^5$  komórek na 9 cm<sup>2</sup>. Po 24 godzinach inkubacji w standardowych warunkach hodowli (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wilgotność 95%) pożywkę wymieniono na wzbogacone tranilastem w stężeniu 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M lub 300  $\mu$ M w podłożu hodowlanym z suplementami. Podłoże komórek kontrolnych

**Table 1.** Characteristics of primers used for amplification**Tabela 1.** Charakterystyka starterów użytych przy amplifikacji

Gene/Gen	Name of primer/ Nazwa startera	Sequence of primers/ Sekwencja starterów	Length of amplicon [bp]/ Długość ampliconu [pz]
<i>MMP-2</i> (matrix metalloproteinase 2)/ <i>MMP-2</i> (metaloproteinaza macierzy 2)	MMP2F	5'-TCCACTGTTGGTGGGAAGCACTCA-3'	121
	MMP2R	5'-TGGTCGCACACCACATCTTT-3'	
<i>MMP-9</i> (matrix metalloproteinase 9)/ <i>MMP-9</i> (metaloproteinaza macierzy 9)	MMP9F	5'-TTCTGCCCCAGCGAGAGA-3'	101
	MMP9R	5'-GTGCAGGCGGAGTAGGATTG-3'	
<i>18S rRNA</i> (18S ribosomal/rybosomalny RNA)	18SrRNAF	5'-CAGTTATGGTTCCTTTGGTCGCTC-3'	260
	18SrRNAR	5'-GTTGATAGGGCAGACGTTCAATG-3'	

bp – base pairs.

pz – pary zasad.

analysis was performed after 72 hours of cell incubation with the drug.

Total RNA was extracted from cells using TRIZOL<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The RNA extracts were qualitatively checked by electrophoresis in 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide. RNA concentration was determined spectrophotometrically using a Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, USA). All RNA extracts were treated with DNase I (MBI Fermentas) according to the manufacturer's instructions.

### Primers

Primers specific for *18S rRNA* (GenBank accession no. NR\_003286) were designed using Primer Expresso v.2.0 software (PE Applied Biosystems, USA) (table 1). Sequences of *MMP-2* (GenBank accession no. NM\_004530) and *MMP-9* (GenBank accession no. NM\_004994) were derived from the published data [16].

### RT-QPCR assay

Transcriptional activity of *MMP-2*, *MMP-9* and *18S rRNA* genes was evaluated as the copy number of RNA per 1 µg of total RNA using the real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-QPCR) technique with SYBR Green I chemistry (SYBR Green Quantitect RT-PCR Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA). Analysis was carried out using the DNA Engine Opticon Sequence Detector (MJ Research, USA). The RT-QPCR assay was performed in triplicate for each sample.

The RT-QPCR reaction was conducted in a one-step manner and included the performance of reverse transcription, polymerase activation, 45 two-step cycles that included denaturation and annealing and final elongation. Each stage was performed in specific thermal conditions and time.

wymieniono na podłoże standardowe (DMEM). Analizę ekspresji genów przeprowadzono po 72-godzinnej inkubacji komórek z lekiem.

Ekstrakcję całkowitego RNA z komórek przeprowadzono przy użyciu odczynnika TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zgodnie z protokołem producenta. Ekstrakty RNA zostały poddane ocenie jakościowej metodą elektroforezy w 1,0% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Stężenie RNA oznaczono metodą spektrofotometryczną za pomocą kalkulatora Gene Quant II RNA/DNA (Pharmacia Biotech, USA). Wszystkie ekstrakty RNA poddano działaniu DNazy I (MBI Fermentas) zgodnie z zaleceniami producenta.

### Startery

Startery swoiste dla *18S rRNA* (numer akcesyjny GenBank: NR\_003286) opracowano przy wykorzystaniu oprogramowania Primer Expresso v.2.0 (PE Applied Biosystems, USA) (tab. 1). Sekwencje *MMP-2* (numer akcesyjny GenBank: NM\_004530) i *MMP-9* (numer akcesyjny GenBank: NM\_004994) opracowano na podstawie danych z piśmiennictwa [16].

### Analiza metodą RT-QPCR

Aktywność transkrypcyjną genów *MMP-2*, *MMP-9* i *18S rRNA* oceniono na podstawie liczby kopii RNA na 1 µg całkowitego RNA metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-QPCR) z wykorzystaniem barwnika SYBR Green I (SYBR Green Quantitect RT-PCR Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA). Analizę przeprowadzono za pomocą detektora sekwencji DNA Engine Opticon Sequence Detector (MJ Research, USA). Oznaczenie metodą RT-QPCR wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej z próbek.

Reakcję RT-QPCR przeprowadzono jednoetapowo. Reakcja obejmowała odwrotną transkrypcję, aktywację polimerazy, 45 dwuetapowych cykli denaturacji i przyłączania starterów oraz ostateczne wydłużanie. Każdy

A commercially available fragment of the  $\beta$ -actin gene (TaqMan Template Reagent, Applied Biosystems) was used as an external standard necessary to determine absolute gene expression. A fragment of the  $\beta$ -actin gene was amplified simultaneously with the samples in five concentrations, i.e. 0.6; 1.2; 3.0; 6.0; 12.0 ng/ $\mu$ l (1 ng of DNA parallels 333 equivalents of genome), and a standard curve (plot of  $C_T$  values/crossing points of different standard dilutions against log of amount of standard) was generated. Comparing the  $C_T$  of unknown amounts of the targets with a standard curve allowed calculation of the initial amount of the targets used in RT-PCR.

Specificity of RT-PCR reaction was confirmed by determining characteristic temperature of melting for each amplicon.

### Statistical analysis

The results were subjected to routine statistical analysis using the computer program Statistica PL 8.0. (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) with the significance level set at  $p < 0.05$ . Student's  $t$ -test, ANOVA and Dunnett tests were applied. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.

## RESULTS

### Cell viability

In the study the cell viability was assayed by the spectrophotometric method after 72 hours of incubation with the drug and was presented as a value of absorbance.

z etapów przeprowadzono w zdefiniowanych warunkach termicznych i w określonym czasie.

Komercyjnie dostępny fragment genu  $\beta$ -aktyny (TaqMan Template Reagent, Applied Biosystems) wykorzystano jako wzorzec zewnętrzny niezbędny do oznaczenia bezwzględnej ekspresji genów. Fragment genu  $\beta$ -aktyny poddano jednoczesnej amplifikacji z próbkami w pięciu stężeniach: 0,6; 1,2; 3,0; 6,0 i 12,0 ng/ $\mu$ l (1 ng of DNA odpowiada 333 ekwiwalentom genomu). Następnie wykreślono krzywą wzorcową (nanosząc wartości  $C_T$ /punkty przecięcia poszczególnych rozcieńczeń wzorcowych w odniesieniu do log ilości wzorca). Porównanie  $C_T$  nieznanych ilości genów docelowych z krzywą wzorcową umożliwiło obliczenie początkowej ilości genów docelowych w RT-PCR.

Swoistość reakcji RT-PCR potwierdzono, oznaczając temperaturę topnienia dla każdego ampliconu.

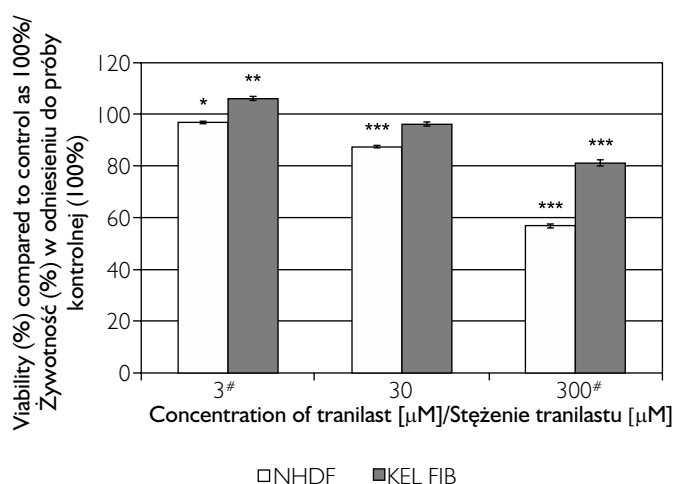
### Analiza statystyczna

Wyniki poddano rutynowej analizie statystycznej za pomocą programu komputerowego Statistica PL 8.0. (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA). Przyjęto poziom istotności statystycznej  $p < 0,05$ . Zastosowano test  $t$  Studenta, ANOVA i test Dunnetta. Wyniki wyrażono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe.

## WYNIKI

### Żywotność komórek

Żywotność komórek analizowano metodą spektrofotometryczną po 72 godzinach inkubacji z lekiem i wyrażono jako wartość absorbancji.



**Figure 1.** Comparison of normal fibroblast (NHDF cell line) and keloid fibroblast (KEL FIB cell line) viability after 72-hour incubation with tranilast. Statistically significant differences: <sup>#</sup> $p < 0.05$  Student's  $t$ -test; \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , Dunnett's test

**Rycina 1.** Porównanie żywotności fibroblastów prawidłowych (linia komórkowa NHDF) i fibroblastów keloidowych (linia komórkowa KEL FIB) po 72 godzinach inkubacji z tranilastem. Różnice istotne statystycznie: <sup>#</sup> $p < 0,05$  test  $t$  Studenta; \*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; test Dunnetta

Viability of keloid and normal fibroblasts treated with tranilast was compared with viability of control keloid and control normal fibroblasts as 100% respectively (fig. 1). Viability of keloid fibroblasts and normal fibroblasts treated with tranilast in 3  $\mu\text{M}$  and 300  $\mu\text{M}$  concentrations showed significant differences between cell lines,  $p = 0.0267$  and  $p = 0.0022$ , respectively, Student's *t*-test (fig. 1).

Viability of keloid fibroblasts showed significant differences between control cells and cells treated with tranilast in 3  $\mu\text{M}$  and 300  $\mu\text{M}$  concentrations of tranilast ( $p = 0.0079$  and  $p < 0.0001$ , respectively; Dunnett's test).

Viability of normal fibroblasts showed significant differences between control cells and cells treated with tranilast in 3  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.0167$ ; Dunnett's test), 30  $\mu\text{M}$  and 300  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.0001$ ; Dunnett's test) concentrations of tranilast (fig. 1).

Viability of normal fibroblasts and keloid fibroblasts treated with tranilast were compared with viability of control normal and keloid fibroblasts (100%), respectively (fig. 1). Viability of normal fibroblasts and keloid fibroblasts treated with the drug at 3  $\mu\text{M}$  and 30  $\mu\text{M}$  showed significant differences between cell lines,  $p = 0.0001$  and  $p = 0.0087$ , respectively; Student's *t*-test (fig. 1).

## Gene expression

Expression of mRNAs of *MMP-2*, *MMP-9* and *18S rRNA* in NHDF and KEL FIB cells treated with tranilast using real-time QRT-PCR technique was determined after 72 hours incubation with the drug at concentrations of 3  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  and 300  $\mu\text{M}$ . The mRNAs for *MMP-2* and *MMP-9* and *18S rRNA* were detected in all tested samples.

Specificity of RT-PCR for the target genes was confirmed by the amplicon melting temperatures analysis. For each RT-PCR product of *MMP-2*, *MMP-9* and *18S rRNA* a single peak in melting curve analysis was obtained at the expected temperatures: 82.6°C for *MMP-2* and 81.4°C for *MMP-9*.

The expression of *18S rRNA* in control normal and keloid fibroblasts did not show a significant difference ( $p = 0.8359$ , Student's *t*-test); however, the expression of *18S rRNA* in normal fibroblasts and keloid fibroblasts treated with tranilast in all tested samples showed significant differences between cell lines (3  $\mu\text{M}$ :  $p = 0.0019$ , 30  $\mu\text{M}$ :  $p < 0.0001$ , 300  $\mu\text{M}$ :  $p = 0.0023$ ; Student's *t*-test). The expression of *18S rRNA* could not be used for the normalization of results because it was very high (over  $10^7$ ). The results of transcriptomic analysis of gene expression of *MMP-2* and *MMP-9* were presented as the copy number of examined gene mRNA per 1  $\mu\text{g}$  of total RNA.

Żywotność fibroblastów keloidowych i prawidłowych poddanych działaniu tranilastu porównano odpowiednio z żywotnością keloidowych i prawidłowych fibroblastów kontrolnych (100%) (ryc. 1). Stwierdzono istotne różnice w żywotności fibroblastów keloidowych i prawidłowych poddanych działaniu tranilastu w stężeniach 3  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  (odpowiednio  $p = 0,0267$  i  $p = 0,0022$ , test *t* Studenta) (ryc. 1).

W analizie żywotności fibroblastów keloidowych stwierdzono istotne różnice między komórkami kontrolnymi a komórkami poddanymi działaniu tranilastu w stężeniach 3  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  (odpowiednio  $p = 0,0079$  i  $p < 0,0001$ ; test Dunnetta).

Analiza żywotności fibroblastów prawidłowych wykazała istotne różnice między komórkami kontrolnymi a komórkami poddanymi działaniu tranilastu w stężeniach 3  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,0167$ ; test Dunnetta), 30  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ; test Dunnetta) (ryc. 1).

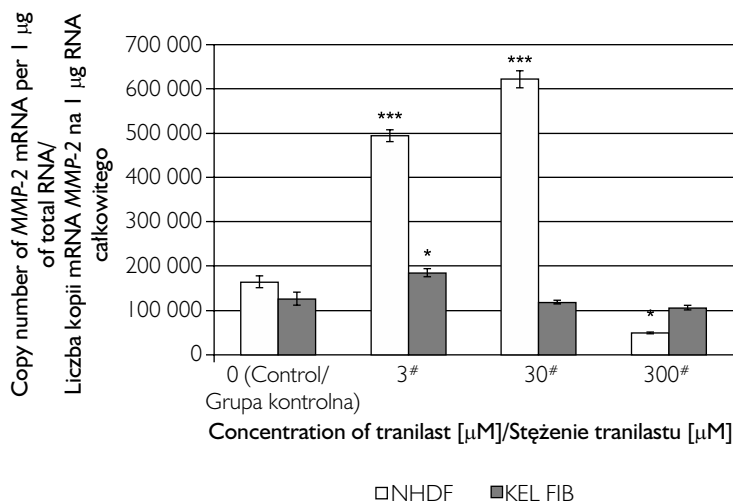
Żywotność prawidłowych i keloidowych fibroblastów poddanych działaniu tranilastu porównano odpowiednio z żywotnością prawidłowych i keloidowych fibroblastów kontrolnych (100%) (ryc. 1). Stwierdzono istotne różnice pod względem żywotności (odpowiednio  $p = 0,0001$  i  $p = 0,0087$ , test *t* Studenta) fibroblastów prawidłowych i keloidowych poddanych działaniu tranilastu w stężeniach 3  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$  (ryc. 1).

## Ekspresja genów

Ekspresję mRNA *MMP-2*, *MMP-9* i *18S rRNA* w komórkach NHDF i KEL FIB poddanych działaniu tranilastu oceniono metodą *real-time* QRT-PCR po 72 godzinach inkubacji z lekiem w stężeniach 3  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$ . We wszystkich badanych próbkach stwierdzono mRNA *MMP-2*, *MMP-9* oraz *18S rRNA*.

Swoistość metody RT-PCR względem genów docelowych potwierdzono na podstawie analizy temperatur topnienia amplicimerów. Dla każdego produktu RT-PCR *MMP-2*, *MMP-9* i *18S rRNA* analiza krzywej topnienia wykazała pojedynczy pik w oczekiwanej temperaturze: 82,6°C dla *MMP-2* i 81,4°C dla *MMP-9*.

Pod względem ekspresji *18S rRNA* w kontrolnych fibroblastach prawidłowych i keloidowych nie stwierdzono istotnych różnic ( $p = 0,8359$ , test *t* Studenta), jednak ekspresja *18S rRNA* w fibroblastach prawidłowych i keloidowych poddanych działaniu tranilastu we wszystkich badanych próbkach różniła się (3  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,0019$ ; 30  $\mu\text{M}$ :  $p < 0,0001$ ; 300  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,0023$ ; test *t* Studenta). Ekspresja *18S rRNA* nie mogła zostać wykorzystana do normalizacji wyników, ponieważ uzyskana wartość była bardzo wysoka (powyżej  $10^7$ ). Wyniki analizy transkryptomicznej ekspresji genowej *MMP-2* i *MMP-9* wyrażono jako liczbę kopii badanego mRNA genu na 1  $\mu\text{g}$  całkowitego RNA.



**Figure 2.** Results of MMP-2 expression in normal and keloid fibroblast culture cells treated with tranilast. Statistically significant differences: # $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test; \*\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.01$ , post-hoc Dunnett's test

**Rycina 2.** Wyniki ekspresji MMP-2 w hodowanych fibroblastach prawidłowych i fibroblastach pochodzących z keloidów poddanych działaniu tranilastu. Różnice istotne statystycznie: # $p < 0,05$ ; test  $t$  Studenta; \*\*\* $p < 0,0001$ ; \* $p < 0,01$ , test *post-hoc* Dunnetta

### Gelatinase type A (MMP-2)

The expression of MMP-2 mRNA did not show a significant difference between normal human fibroblasts and keloid fibroblasts not treated with the drug ( $p = 0.1686$ ; Student's  $t$ -test). The expression of MMP-2 mRNA showed significant differences ( $p < 0.0001$ ; ANOVA) between control normal fibroblasts and normal fibroblasts treated with tranilast at 3  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.0001$ ; Dunnett test), 30  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.0001$ ; Dunnett test) and 300  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.0018$ ; Dunnett test). The expression of MMP-2 mRNA showed significant differences ( $p = 0.0040$ ; ANOVA) between control keloid fibroblasts and keloid fibroblasts treated with tranilast at 3  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.0126$ ; Dunnett test) (fig. 2).

### Gelatinase type B (MMP-9)

The expression of MMP-9 mRNA showed a significant difference between normal fibroblasts and keloid fibroblasts not treated with the drug ( $p = 0.0183$ ; Student's  $t$ -test). The expression of MMP-9 mRNA in keloid fibroblasts was less than half ( $3.79 \times 10^2 \pm 0.11 \times 10^3$ ) of that in normal fibroblasts ( $9.10 \times 10^2 \pm 0.21 \times 10^3$ ). Tranilast did not influence the expression of MMP-9 mRNA either in normal fibroblasts ( $p = 0.3819$ ; ANOVA) or in keloid fibroblasts ( $p = 0.7537$ ; ANOVA) (fig. 3).

## DISCUSSION

Tranilast is considered as a selective collagen biosynthesis inhibitor and is used as an anti-fibroproliferative medicament. Suzawa *et al.* reported that it has no effect on cell proliferation at 3  $\mu\text{M}$  and 30  $\mu\text{M}$ ,

### Żelatynaza typu A (MMP-2)

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem ekspresji mRNA MMP-2 między prawidłowymi fibroblastami skóry ludzkiej a fibroblastami keloidowymi niepoddanymi działaniu tranilastu ( $p < 0,1686$ ; test  $t$  Studenta). Pod względem ekspresji mRNA MMP-2 wykazano istotne różnice ( $p < 0,0001$ ; ANOVA) pomiędzy prawidłowymi fibroblastami kontrolnymi a prawidłowymi fibroblastami poddanymi działaniu tranilastu w stężeniach 3  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ; test Dunnetta), 30  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ; test Dunnetta) i 300  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,0018$ ; test Dunnetta). Istotne różnice pod względem ekspresji mRNA MMP-2 ( $p = 0,0040$ ; ANOVA) stwierdzono między kontrolnymi fibroblastami keloidowymi a fibroblastami keloidowymi poddanymi działaniu tranilastu w stężeniu 3  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,0126$ ; test Dunnetta) (ryc. 2).

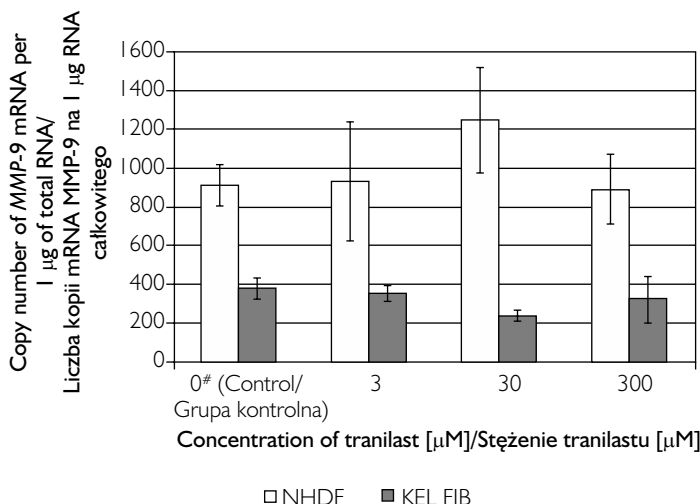
### Żelatynaza typu B (MMP-9)

Wykazano istotne różnice w ekspresji mRNA MMP-9 między fibroblastami prawidłowymi a fibroblastami keloidowymi niepoddanymi działaniu tranilastu ( $p = 0,0183$ ; test  $t$  Studenta). Ekspresja mRNA MMP-9 w fibroblastach keloidowych była ponaddwukrotnie niższa ( $3,79 \times 10^2 \pm 0,11 \times 10^3$ ) niż w fibroblastach prawidłowych ( $9,10 \times 10^2 \pm 0,21 \times 10^3$ ). Tranilast nie wpłynął na ekspresję mRNA MMP-9 ani w fibroblastach prawidłowych ( $p = 0,3819$ ; ANOVA), ani keloidowych ( $p = 0,7537$ ; ANOVA) (ryc. 3).

## OMÓWIENIE

Tranilast jest uznawany za selektywny inhibitor biosyntezy kolagenu i wykorzystywany jako





**Figure 3.** Results of *MMP-9* expression in normal and keloid fibroblast culture cells treated with tranilast. Statistically significant differences:  $^{\#}p < 0.05$ , Student's *t* test

**Rycina 3.** Wyniki ekspresji *MMP-9* w hodowanych fibroblastach prawidłowych i fibroblastach pochodzących z keloidów poddanych działaniu tranilastu. Różnice istotne statystycznie:  $^{\#}p < 0,05$ ; test *t* Studenta

whereas at 300 μM it inhibits fibroblast proliferation (normal, keloid and derived from hypertrophic scars). The evaluation was performed by means of cell staining method with trypan blue [4].

In the conditions of our experiment, tranilast at the highest concentration (300 μM) significantly decreased survival of both keloid (81.04 ± 1.05%) and normal fibroblasts (56.68 ± 0.63%) in relation to control cells, not treated with the drug. The final outcome (lower cell number) may be similar to the cytotoxic effect; nevertheless, the antiproliferative effect is not exactly the same as the cytotoxic one (fig. 1). Maybe in the future additional survival tests should be used, for example propidium iodide, simple trypan blue staining or the even more precise CyQUANT cell proliferation assay kit for cells in culture.

Selective inhibition of collagen biosynthesis (types I and III) involves inhibition of TGF-β1 secretion to 55% and inhibition of prolyl hydroxylase activity in a tranilast concentration-dependent manner [4]. Tranilast at 300 μM inhibits prolyl hydroxylase activity [4] and TGF-β1 secretion to up to 55% [3].

A crucial aspect of healing responsible for wound clinical picture is the remodeling of ECM with the involvement of proteolytic enzymes (collagenase, gelatinase, among others) [17, 18]. Loss of regular MMP expression and activity may lead to either too much or too little ECM degradation followed by abnormal remodeling throughout the different stages of repair. In contrast to chronic wounds, where excessive activity of MMPs is seen, in keloids proteolytic enzyme activity is disturbed [19]. On the other hand, because keloids continue to grow, it is thought that some pro-

lek o działaniu antyfibroproliferacyjnym. Suzawa i wsp. wykazali, że tranilast nie wpływa na proliferację komórek w stężeniach 3 μM i 30 μM, natomiast w stężeniu 300 μM hamuje proliferację fibroblastów (prawidłowych, keloidowych i pochodzących z blizn przerostowych). Ocena przeprowadzono metodą barwienia komórek błękitem trypanu [4].

W warunkach naszego eksperymentu tranilast w najwyższym stężeniu 300 μM istotnie obniżał żywotność fibroblastów zarówno keloidowych (81,04 ± 1,05%), jak i prawidłowych (56,68 ± 0,63%). Zmniejszenie liczby komórek pod wpływem tranilastu może być zbliżone do działania cytotoksycznego, jednak efekt antyproliferacyjny nie jest dokładnie taki sam jak cytotoksyczny (ryc. 1). Być może należy przeprowadzić dodatkowe badania żywotności, np. przy wykorzystaniu jodku propidyny, prostego barwienia błękitem trypanu lub jeszcze bardziej precyzyjnego zestawu CyQUANT do oznaczania proliferacji komórek w hodowli.

Selektywne hamowanie biosyntezy kolagenu (typu I i III) polega na hamowaniu wydzielania TGF-β1 i ograniczaniu aktywności hydroksylazy proliłowej w zależności od stężenia tranilastu [4]. Tranilast w stężeniu 300 μM ogranicza aktywność hydroksylazy proliłowej [4] i wydzielanie TGF-β1 do 55% [3].

Istotnym elementem procesu leczenia odpowiadającym za obraz kliniczny rany jest przebudowa ECM przy udziale enzymów proteolitycznych (m.in. kolagenazy i żelatynazy) [17, 18]. Utrata regularnej ekspresji i aktywności MMPs może prowadzić do nasilenia lub niewystarczającego rozkładu ECM, a także nieprawidłowej przebudowy na poszczególnych etapach naprawy. W przeciwieństwie do przewlekłych ran, w których stwierdza się nadmierną aktywność

teolytic enzymes activity might be increased in this lesion [20].

Until now, the effect of tranilast on expression of proteolytic enzymes involved in ECM remodeling in keloid and fibroproliferative processes has not been investigated. Therefore, the aim of this study was to evaluate *MMP-2* and *MMP-9* expression.

Keloids are classified as benign tumors of the connective tissue [8]. Their formation is a consequence of cutaneous injury and irritation including trauma, insect bite, surgery, vaccination, skin piercing and acne. Notably, superficial injuries that do not reach the reticular dermis never cause keloids, so this pathology is due to injury of the deeper skin layer [21]. Neoplastic proliferation requires the involvement of proteolytic enzymes, degrading ECM components [11–13]. *MMP-9* is an enzyme that mainly plays a role in re-epithelialization. This metalloproteinase is expressed by keratinocytes at the leading edge of the wound. The enzyme promotes cell migration and re-epithelialization. Although fibroblast expression of the gelatinase *MMP-9* is low, during wound healing the enzyme plays an essential role in the remodeling of the basic clot to form scar tissue and in microvessel formation, remodeling and maturation. The enzyme acts not only by cleaving ECM components but also through the activation/degradation of chemokines and cytokines involved in wound healing [15, 19, 22].

Tanriverdi-Akhisaroglu *et al.* reported that the *MMP-9* protein level in supernatants from homogenized keloid tissue was higher than in normal skin, but *MMP-9* levels were under the detection limit for gelatin zymography analysis [19]. Our study, conducted on a fibroblast *in vitro* monoculture, showed that the expression of *MMP-9* mRNA in keloid fibroblasts was less than half that in normal fibroblasts. Analysis of protein expression in normal skin fibroblasts and in keloid fibroblasts not treated with xenobiotic may indicate differences between the physiological state of the dermis and pathology in the keloid formation process, and is a reference for the results of protein expression in cell cultures treated with xenobiotics. Differences may result from the methodology and research on the expression of a protein directly derived from scars as opposed to the concentration of the tested protein in monolayer cell cultures. Tranilast did not affect gene expression of this enzyme, either in normal or keloid fibroblasts in any of the concentrations (3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 300  $\mu$ M).

*MMP-2* plays a significant role in wound healing by degrading denatured collagen and accelerating cell migration. Similarly to *MMP-9*, it also plays a role in angiogenesis during wound healing through the activation of proangiogenic cytokines and generation of antiangiogenic peptides [10, 15, 19]. The expression of *MMP-2* is characteristic for activated, migrating

*MMPs*, w przebiegu keloidów następuje zaburzenie aktywności enzymów proteolitycznych [19]. Ze względu na stały wzrost keloidów uważa się jednak, że aktywność niektórych enzymów proteolitycznych w obrębie zmiany może być podwyższona [20].

Do tej pory nie badano wpływu tranilastu na ekspresję enzymów proteolitycznych uczestniczących w przebudowie ECM w przebiegu procesów keloidowych i fibroproliferacyjnych. Z tego względu celem badania była ocena ekspresji *MMP-2* i *MMP-9*.

Keloidy są klasyfikowane jako łagodne nowotwory tkanki łącznej [8]. Powstają w miejscu przerwania ciągłości skóry lub podrażnienia, np. wskutek urazu, ukąszenia owada, zabiegu chirurgicznego, szczepienia, nakłucia skóry, i w przebiegu trądziku. Warto odnotować, że urazy powierzchniowe, które nie obejmują warstwy siateczkowej skóry, nigdy nie wywołują keloidów, a więc schorzenie to jest efektem uszkodzenia głębszej warstwy skóry właściwej [21]. Proliferacja w przebiegu nowotworzenia wymaga udziału enzymów proteolitycznych powodujących rozkład komponentów ECM [11–13]. *MMP-9* jest enzymem odgrywającym istotną rolę głównie w procesie reepitelizacji. Ekspresję tej metalloproteinazy stwierdza się na krawędziach zamykającej się rany. Enzym sprzyja migracji komórek i reepitelizacji. Chociaż ekspresja w fibroblastach żelatynazy *MMP-9* wykazuje raczej niski poziom, w procesie gojenia rany enzym ten pełni zasadniczą funkcję w rozkładaniu skrzepu, tworzeniu mikronaczyń, procesie przebudowy i dojrzewania ECM oraz ostatecznym formowaniu się blizny. Enzym działa nie tylko poprzez rozcinanie komponentów ECM, lecz także poprzez aktywację lub rozkład chemokin i cytokin uczestniczących w procesie gojenia rany [15, 19, 22].

Tanriverdi-Akhisaroglu i wsp. stwierdzili, że poziom białka *MMP-9* w supernatantach z homogenizowanej tkanki keloidowej jest wyższy niż w zdrowej skórze, jednak oznaczone poziomy *MMP-9* były poniżej granicy wykrywalności dla analizy metodą zymografii żelatynowej [19]. Nasze badanie przeprowadzone w monokulturze fibroblastów w warunkach *in vitro* wykazało, że ekspresja mRNA *MMP-9* w fibroblastach keloidowych była ponad 2-krotnie niższa niż w fibroblastach prawidłowych. Analiza ekspresji białka w prawidłowych fibroblastach skóry oraz fibroblastach keloidowych niepoddanych działaniu ksenobiotyku może wskazywać na różnice między stanem fizjologicznym a chorobowym skóry właściwej w procesie rozwoju keloidów i stanowi punkt odniesienia dla wyników ekspresji białka uzyskanych w hodowlach komórkowych poddanych działaniu ksenobiotyku. Różnice mogą wynikać z metodologii oraz prowadzenia badań nad ekspresją białka pochodzącego bezpośrednio z blizn w przeciwieństwie do stężenia badanego białka w hodowlach komórkowych w postaci monowarstwy. Tranilast nie wpłynął

fibroblasts. During proper wound healing this fibroblast should undergo transition to myofibroblasts involved in scar contraction. Changes in MMP-2 levels are inversely related to a contractile marker, smooth muscle  $\alpha$ -actin [23]. Analysis of MMP-2 protein level in supernatants from homogenized keloid tissue and normal skin shows that in keloids the MMP-2 level is much higher than in normal skin. Zymography analysis additionally revealed that the active/pro-MMP-2 is higher in the keloid group [19]. The results obtained by Tanriverdi-Akhisaroglu *et al.* are consistent with the other data [24]. In our study, we found that in cell cultures the expression of MMP-2 mRNA did not show significant differences between normal human fibroblasts and keloid fibroblasts, whereas MMP-2 protein level and its activity were higher in keloid fibroblasts than in normal fibroblasts cultured *in vitro*. Increased production of both collagen and MMPs including MMP-2 compared with that of normal fibroblasts contributes to migration activity of keloid fibroblasts resulting in the expansion of keloid [20].

In our study, we demonstrated that the drug at 3  $\mu$ M and 30  $\mu$ M significantly stimulates MMP-2 expression in normal fibroblasts. At the highest concentration (300  $\mu$ M), tranilast decreases MMP-2 expression in normal fibroblasts. In keloid fibroblasts, higher expression of MMP-2 was observed only in cultures treated with the lowest concentration (3  $\mu$ M) of tranilast, whereas at 30  $\mu$ M and 300  $\mu$ M concentrations tranilast did not modulate MMP-2 expression. The examinations showed that tranilast affects survival of both normal and keloid fibroblasts. The performed analysis indicates a stimulating effect of tranilast at 3  $\mu$ M and 30  $\mu$ M on the expression of MMP-2. The observed decrease of the examined gene expression in cells exposed to tranilast at 300  $\mu$ M may be related to the high cytotoxic dose of the drug (fig. 2).

The presented data show that tranilast antifibrotic action does not depend on down-regulation of gelatinase expression. Our earlier study revealed that tranilast does not influence FAP- $\alpha$  (another enzyme involved in keloid formation) expression in keloid fibroblasts [25]. Examinations conducted so far and discussed in our earlier publication [25] indicate that tranilast, apart from collagen synthesis and TGF- $\beta$  inhibition, also inhibits secretion of multiple cytokines involved in the wound healing process (IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , monocyte chemoattractant protein-1, PGE2, VEGF) and might influence epithelial-mesenchymal interactions [2, 25–28]. It is well known that these proinflammatory factors are up-regulated in keloid tissue [21].

However, it needs to be remembered that the effects of tranilast on regulation of the expression of

na ekspresję genu tego enzymu ani w fibroblastach prawidłowych, ani keloidowych – w żadnym z badanych stężeń (3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 300  $\mu$ M).

MMP-2 odgrywa istotną rolę w procesie gojenia ran; powoduje rozkład zdenaturowanego kolagenu i przyspiesza migrację komórek. Podobnie jak MMP-9 ma również znaczenie w angiogenezie podczas procesu gojenia ran poprzez aktywację cytokin proangiogennych i wytwarzanie antyangiogennych peptydów [10, 15, 19]. Ekspresja MMP-2 jest charakterystyczna dla aktywowanych, migrujących fibroblastów. W prawidłowym procesie gojenia rany fibroblasty te powinny przejść przemianę w miofibroblasty uczestniczące w obkurczaniu się blizny. Zmiany poziomu MMP-2 wykazują odwrotną zależność z markerem kurczliwości  $\alpha$ -aktyną [23]. Analiza poziomu białka MMP-2 w supernatantach z homogenizowanej tkanki keloidowej oraz zdrowej skóry pokazuje, że w keloidach poziom MMP-2 jest znacznie wyższy niż w zdrowej skórze. Analiza zymograficzna wykazała ponadto, że poziom aktywne/pro-MMP-2 jest wyższy w keloidach [19]. Wyniki uzyskane przez Tanriverdi-Akhisaroglu i wsp. są spójne z innymi dostępnymi danymi [24]. W naszym badaniu zaobserwowaliśmy, że w hodowlach komórkowych ekspresja mRNA MMP-2 nie wykazuje istotnych różnic między prawidłowymi fibroblastami ludzkimi a fibroblastami keloidowymi. Poziom białka MMP-2 i jego aktywność są wyższe w fibroblastach keloidowych niż w prawidłowych fibroblastach hodowanych w warunkach *in vitro*. Wzmózone wytwarzanie zarówno kolagenu, jak i MMPs (w tym MMP-2), w porównaniu z prawidłowymi fibroblastami, przyczynia się do aktywności migracyjnej fibroblastów keloidowych, co skutkuje rozrostem keloidu [20].

W naszym badaniu wykazaliśmy, że lek w stężeniu 3  $\mu$ M i 30  $\mu$ M istotnie pobudza ekspresję MMP-2 w prawidłowych fibroblastach. W najwyższym stężeniu (300  $\mu$ M) tranilast zmniejsza ekspresję MMP-2 w prawidłowych fibroblastach. W fibroblastach keloidowych wzmózoną ekspresję MMP-2 obserwowano wyłącznie w hodowlach poddanych działaniu tranilastu w najniższym stężeniu 3  $\mu$ M, natomiast w stężeniach 30  $\mu$ M i 300  $\mu$ M tranilast nie modulował ekspresji MMP-2. W badaniach wykazano, że tranilast wpływa na żywotność fibroblastów zarówno prawidłowych, jak i keloidowych. Przeprowadzona analiza wskazuje na stymulujący wpływ tranilastu w stężeniach 3  $\mu$ M i 30  $\mu$ M na ekspresję MMP-2. Obserwowane obniżenie ekspresji badanych genów w komórkach poddanych działaniu tranilastu w stężeniu 300  $\mu$ M może być związane z wysoką cytotoksycznością leku (ryc. 2).

Przedstawione dane pokazują, że działanie antyfibrotyczne tranilastu nie zależy od osłabiania ekspresji żelatynaz. Nasze poprzednie badanie wykazało, że tranilast nie wpływa na ekspresję FAP- $\alpha$  (innego enzymu uczestniczącego w powstawaniu keloidów) w fibrobla-

proteolytic enzymes may be multi-level and multifactorial. Thus, the next stage of the study should include ELISA and Western blot research methods to analyze the expression of transcription products of examined genes. Shimizu *et al.* demonstrated that tranilast downregulates production of some MMPs and TIMP-1 (tissue inhibitors of metalloproteinases) from activated neutrophils [29]. Also Keneda *et al.* observed in murine pancreatic cancer cells that tranilast may inhibit MMP-2 activation through attenuating TIMP-2 expression [30]. Ulrich *et al.* found in their study that in keloid tissue the relative expression of TIMP-1 and TIMP-2 is significantly higher than in regular skin. Increased TIMPs expression might directly contribute to the accumulation of ECM through inhibition of its degradation [15, 20]. Additional research should be conducted to evaluate tranilast's influence on TIMPs expression and activity in keloids.

## CONCLUSIONS

Keloids present a difficult medical and therapeutic problem. Currently there is no effective treatment of keloids. One of the cause of keloids is abnormal EMC turnover (synthesis/degradation). Proteolytic enzymes have been shown to be involved in the disease. Tranilast is a drug with proven antifibroproliferative activity. Apart from collagen synthesis and TGF- $\beta$  inhibition, it inhibits secretion of multiple cytokines involved in wound healing and diminishes cell proliferation but it does not inhibit the expression of gelatinases in keloids. It is necessary to continue the study to evaluate the full antiproliferative activity of the drug.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Medical University of Silesia grant KNW-2-022/N/5/K.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

stach keloidowych [25]. Dotychczasowe badania opisane w naszej wcześniejszej publikacji [25] wskazują, że oprócz syntezy kolagenu i hamowania TGF- $\beta$  tranilast blokuje również wydzielanie licznych cytokin uczestniczących w procesie gojenia ran (IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , białka chemotaktycznego monocytów 1, PGE2, VEGF) i może oddziaływać na interakcje nabłonkowo-mezenchymalne [2, 25–28]. Potwierdzono, że te czynniki prozapalne ulegają wzmożonej regulacji w tkance keloidowej [21].

Należy jednak pamiętać, że wpływ tranilastu na regulację ekspresji enzymów proteolitycznych może być wielopłaszczyznowy i wieloczynnikowy. Dlatego też kolejny etap badania powinien obejmować analizę ekspresji produktów transkrypcji badanych genów przy wykorzystaniu metod badawczych ELISA i Western Blot. Shimizu i wsp. zaobserwowali, że tranilast osłabia wytwarzanie niektórych MMP i TIMP 1 (tkankowych inhibitorów metaloproteinaz) przez aktywowane neutrofile [29]. Podobnie Keneda i wsp. wykazali w komórkach raka trzustki u myszy, że tranilast może hamować aktywację MMP-2 poprzez osłabianie ekspresji TIMP-2 [30]. Z kolei Ulrich i wsp. stwierdzili, że względna ekspresja TIMP 1 i TIMP 2 w tkance keloidowej jest znacznie wyższa niż w niezmięnionej skórze. Wzmoczona ekspresja TIMP może bezpośrednio przyczyniać się do gromadzenia ECM poprzez hamowanie jej rozkładu [15, 20]. Niezbędne są dodatkowe badania, aby ocenić wpływ tranilastu na ekspresję TIMP i aktywność w keloidach.

## WNIOSKI

Keloidy stanowią istotne wyzwanie medyczne i terapeutyczne. Aktualnie nie ma skutecznej metody leczenia tego schorzenia. Jedną z przyczyn powstawania keloidów są nieprawidłowe przemiany EMC (synteza/rozkład). Wykazano, że w rozwoju keloidów pewną rolę odgrywają enzymy proteolityczne. Tranilast jest lekiem o potwierdzonej aktywności antyfibroproliferacyjnej. Oprócz syntezy kolagenu i hamowania TGF- $\beta$  tranilast hamuje wydzielanie licznych cytokin uczestniczących w procesie gojenia ran i zmniejsza proliferację komórek, choć nie blokuje ekspresji żelatynaz w keloidach. Niezbędne jest prowadzenie dalszych badań, aby ocenić pełne spektrum działania antyproliferacyjnego tego leku.

## PODZIĘKOWANIA

Badanie zrealizowano przy wsparciu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (grant KNW-2-022/N/5/K).

## KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

## References

### Piśmiennictwo

1. **Konneh M.**: Tranilast, Kissei Pharmaceuticals. *Idrugs* 1998, 1, 141-146.
2. **Yamada H., Tajima S., Nishikawa T., Murad S., Pinnel S.R.**: Tranilast, a selective inhibitor of collagen synthesis in human skin fibroblasts. *J Biochem* 1994, 116, 892-897.
3. **Suzawa H., Kikuchi S., Ichikawa K., Koda A.**: Inhibitory action of tranilast, an anti-allergic drug, on the release of cytokines and PGE2 from human monocytes and macrophages. *Jpn J Pharmacol* 1992, 60, 85-90.
4. **Suzawa H., Kikuchi S., Ichikawa K., Arai N., Tazawa S., Tsuchiya O., et al.**: Effect of tranilast, an antiallergic drug, on the human keloid tissues. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1992, 99, 231-239.
5. **Davidson S., Aziz N., Rashid R.M., Khachemoune A.**: A primary care perspective on keloids. *Medscape J Med* 2009, 11, 18.
6. **Darakhshan S., Pour A.B.**: Tranilast: A review of its therapeutic applications. *Pharmacol Res* 2015, 91, 15-28.
7. **Ulrich D., Ulrich F., Unglaub F., Piatkowski A., Pallua N.**: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010, 63, 1015-1021.
8. **Robles D.T., Moore E., Draznin M., Berg D.**: Keloids: Pathophysiology and management. *Dermatol Online J* 2007, 13, 9.
9. **Gauglitz G.G., Korting H.C., Pavicic T., Ruzicka T., Jeschke M.G.**: Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med* 2011, 17, 113-125.
10. **Hrabec E., Naduk J., Stręk M., Hrabec Z.**: Kolagenazy typu IV (MMP- 2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy pozakomórkowej, hormony, cytokiny, chemokiny i ich receptory. *Post Biochem* 2007, 53, 37-45.
11. **Lipka D., Boratyński J.**: Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postepy Hig Med Dosw* 2008, 62, 328-336.
12. **O'Brien P., O'Connor B.F.**: Sepsis: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1784, 1130-1145.
13. **Dienus K., Bayat A., Gilmore B.F., Seifert O.**: Increased expression of fibroblast activation protein-alpha in keloid fibroblasts: implications for development of a novel treatment option. *Arch Dermatol Res* 2010, 302, 725-731.
14. **Amálinei C., Cáruntu I.D., Bălan R.A.**: Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* 2007, 48, 323-334.
15. **Caley M.P., Martins V.L.C., O'Toole E.A.**: Metalloproteinases and wound healing. *Adv Wound Care* 2015, 4, 225-234.
16. **Kapral M., Wawrzczyk J., Jurzak M., Dymitruk D., Węglarz L.**: Evaluation of the expression of metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors in colon cancer cells treated with phytic acid. *Acta Pol Pharm* 2010, 67, 625-629.
17. **Monsky W.L., Lin C.Y., Aoyama A., Kelly T., Akiyama S.K., Mueller S.C., et al.**: A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 1994, 54, 5702-5710.
18. **Antończak P., Jurzak M., Adamczyk K., Garnarczyk A.**: Wybrane molekularne aspekty procesu fibroproliferacyjnego w przebiegu keloidów. *Przegl Dermatol* 2015, 102, 253-262.
19. **Tanriverdi-Akhisaroglu S., Menderes A., Oktay G.**: Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities in human keloids, hypertrophic and atrophic scars: a pilot study. *Cell Biochem Funct* 2009, 27, 81-87.
20. **Fujiwara M., Muragaki Y., Ooshima A.**: Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol* 2005, 153, 295-300.
21. **Ogawa R.**: Keloid and hypertrophic scars are the results of the chronic inflammation in the reticular dermis. *Int J Mol Sci* 2017, 18, 606.
22. **Lindner D., Zietsch C., Becher P.M., Shulze K., Schultheiss H.P., Tschöpe C., et al.**: Differential expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int* 2012, 2012, 875742.
23. **Howard E.W., Crider B.J., Updike D.L., Bullen E.C., Parks E.E., Haaksma C.J., et al.**: MMP-2 expression by fibroblasts is suppressed by the myofibroblast phenotype. *Exp Cell Res* 2012, 318, 1542-1553.
24. **Neely A.N., Clendening C.E., Gardner J., Greenhalgh D.G., Warden G.D.**: Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair Regen* 1999, 7, 166-171.
25. **Antończak P.P., Jurzak M., Adamczyk K., Garnarczyk A., Hartman-Petrycka M.**: The effect of tranilast on fibroblast activation protein  $\alpha$  (FAP- $\alpha$ ) expression in normal and keloid fibroblasts in vitro. *Dermatol Rev/Przegl Dermatol* 2017, 104, 300-313.
26. **Chikaraishi A., Hirahashi J., Takase O., Marumo T., Hishikawa K., Hayashi M., et al.**: Tranilast inhibits interleukin-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 2001, 427, 151-158.
27. **Isaji M., Miyata H., Ajisawa Y., Yoshimura N.**: Inhibition by tranilast of vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF)- induced increase in vascular permeability in rats. *Life Sci* 1998, 63, 71-74.
28. **Platten M., Wild-Bode C., Wick W., Leitlein J., Dichgans J., Weller M.**: N-[3,4-dimethoxycinnamoyl]-anthranilic acid (tranilast) inhibits transforming growth factor-beta release and reduces migration and invasiveness of human malignant glioma cells. *Int J Cancer* 2001, 193, 53-61.
29. **Shimizu T., Kanai K., Kyo Y., Asano K., Hisamitsu T., Suzuki H.**: Effect of tranilast on matrix metalloproteinase production from neutrophils in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2006, 58, 91-99.
30. **Keneda M., Obara H., Suzuki K., Takeuchi O., Takizawa A., Osaku M., et al.**: Evaluation of suppressive effects of tranilast on the invasion/metastasis mechanism in a Marine pancreatic cancer cell line. *Pancreas* 2017, 46, 567-574.

Received: 6.11.2017

Accepted: 27.02.2018

Otrzymano: 6.11.2017 r.

Zaakceptowano: 27.02.2018 r.

---

### How to cite this article

Antończak P.P., Adamczyk K., Garnarczyk A., Jurzak M.: The effect of tranilast on MMP-2 and MMP-9 mRNA levels in normal and keloid fibroblasts. *Dermatol Rev/Przegl Dermatol* 2018, 105, 384-396. DOI: <https://doi.org/10.5114/dr.2018.77109>.