Physiology and Pharmacology, 12 (3), 238 - 244
Fall 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Embryonic stem cells derived cardiomyocytes are a suitable model for assessment of cardiotoxic effects of doxorubicin and other drugs.

Mahboobeh Farokhpour [1,2], Khadijeh Karbalaie [2], Mahmood Etebari [1], Hamid Mirmohamad Sadeghi [1], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani [2*], Marzieh Nematolahi [2], Hossein Baharvand [3*]

1- School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2- Dept. Stem Cells, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, Isfahan Campus, ACECR, Isfahan, Iran.
3- Dept. Stem Cells, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran.

Received: 19 Apr 2008 **Revised: 15 Jul 2008** **Accepted: 20 Jul 2008**

Abstract

Introduction: Doxorubicin is frequently used for treatment of several types of cancer, but cardiac toxicity has limited the use of this drug. Corticosteroids may prevent doxorubicin induced cardiotoxicity. Therefore the aim of this study was to evaluate mouse embryonic stem cells derived cardiomyocytes as a model to assess the effects of doxorubicin and dexamethasone.

Methods: Mouse embryonic stem cells derived cardiomyocytes were treated with different concentrations of doxorubicin for 24 hours and the results were compared with control group. In order to examine the effect of dexamethasone on cardiotoxicity, mouse embryonic stem cells derived cardiomyocytes were either exposed to 0.1, 1 or 10 μM dexamethasone 24 hours prior to exposure to doxorubicin or exposed to dexamethasone 24 hours before and during exposure to doxorubicin. Each group was compared with cells that were treated with only doxorubicin or dexamethasone.

Results: 5 μM doxorubicin was selected as the lowest dose that ceased heart beats in more than 50% of mouse embryonic stem cells derived cardiomyocytes. Results revealed that 10 μM dexamethasone for 24 hours before treatment with doxorubicin has protective effect on doxorubicin induced cardiotoxicity.

Conclusion: The overall results obtained in this model are in accordance with previous literature. Thus suggesting that mouse embryonic stem cells derived cardiomyocytes is a suitable model for assessment of cardiotoxic effects of drugs.

Keywords: Stem cell, Cardiomyocyte, Doxorubicin, Dexamethasone

* Corresponding author e- mail: baharvand@royanInstitute.org
mh.nasr-esfahani@royanInstitute.org
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۳)، ۲۳۸ – ۲۴۴
پاییز ۱۳۸۷

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی اثر دگزامتازون در پیشگیری از توقف ضربان سلول‌های قلبی تیمار شده با دوکسوروبیسین با استفاده از سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنین موش

محبوبه فرخ‌پور[۱،۲]، خدیجه کربلایی[۲]، محمود اعتباری[۱]، حمید میرمحمدصادقی[۱]،
مرضیه نعمت‌الهی[۲]، محمدحسین نصر اصفهانی[۲*] و حسین بهاروند[۳*]
۱. دانشکده داروسازی و علوم داروئی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
۲. گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان – پایگاه تحقیقاتی اصفهان، تهران
۳. گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان ، تهران

دریافت: ۳۱فروردین ۸۷ بازبینی: ۲۵تیر ۸۷ پذیرش: ۴شهریور ۸۷

چکیده

مقدمه: دوکسوروبیسین در درمان انواع سرطان‌ها مصرف می‌گردد اما سمیت قلبی مصرف آن را محدود می‌کند. بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که کورتیکو استروییدها باعث محافظت قلبی می‌گردند. سلول‌های قلبی مشتق از سلول های بنیادی جنینی موش می‌توانند ابزار مناسبی برای بررسی سمیت قلبی ناشی از این دارو باشند.

روش‌ها: سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی موش با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند تا حداقل دوزی که باعث توقف ضربان قلب می‌گردد به دست آمده و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد. سپس سلول‌ها در دو گروه مورد بررسی قرار گرفتند، در گروه اول سلول‌ها ۲۴ ساعت قبل از تیمار با دوکسوروبیسین با یکی از غلظت های ۰/۱ ، ۱ و یا ۱۰ میکرومولار دگزامتازون تیمار شدند. در گروه دوم بعد از تیمار ۲۴ ساعته با یکی از غلظت‌های ذکر شده دگزامتازون، این غلظت‌ها هم زمان با دوکسوروبیسین نیز دریافت شدند. طی یک هفته به صورت روزانه تعداد اجسام شبه جنینی دارای ضربان در هر یک از گروه‌ها در مقایسه با گروه تیمار شده با دوکسوروبیسین تنها مورد بررسی قرار گرفته و در روز هفتم نتایج ثبت شدند.

یافته‌ها: غلظت ۵ میکرومولار دوکسوروبیسین به عنوان حداقل دوزی که باعث توقف ضربان در بیش از ۵۰٪ این سلول های قلبی می‌گردد به دست آمد. در گروه اول تیمار شده با دوکسوروبیسین و غلظت‌های مختلف دگزامتازون فقط غلظت ۱۰ میکرومولار دگزامتازون اثر محافظت کننده بر ضربان سلول‌های قلبی داشت و در گروه دوم با تیمار هم زمان دوکسوروبیسین و دگزامتازون هیچیک از غلظت‌ها بر پیشگیری از توقف ضربان سلول‌های قلبی اثر محافظت کننده نداشتند.

نتیجه‌گیری: تیمار سلول‌های قلبی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی موش با دگزامتازون ۲۴ساعت قبل از تیمار با دوکسوروبیسین باعث پیشگیری از توقف ضربان قلب ناشی از دوکسوروبیسین در این سلول‌ها می‌گردد. نتایج به دست آمده در سلول های قلبی حاصل از سلول های بنیادی جنینی موش مطابق با نتایج به دست آمده در سلول های قلبی به دست آمده از موش می باشد و این سلول‌ها می توانند مدل آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی آثار درمانی و یا سمی داروها باشند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، سلول‌های قلبی، دوکسوروبیسین، دگزامتازون

مقدمه

دوکسوروبیسین یکی ازمهمترین داروهای ضد سرطان است که با وجود طیف درمانی گسترده سمیت قلبی تا حدودی مصرف بالینی آن را محدود می کند. این سمیت ممکن است مدت کوتاهی بعد از شروع مصرف دارو ایجاد و با علائمی مثل آریتمی، کاهش فشار خون و کاهش عملکرد قلبی همراه باشد و یا بعد از اتمام مصرف دارو رخ داده و با کاردیومیوپاتی اتساعی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: baharvand@royanInstitute.org
mh.nasr-esfahani@royanInstitute.org
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

همراه باشد. ساختمان شیمیایی دوکسوروبیسین آن را مستعد تولید رادیکال های آزاد می کند. این رادیکال‌ها باعث نفوذ پذیری غشاء میتوکندری و آپوپتوز سلولی می گردند۰ تعداد زیاد سلول‌های آپوپتوزی در بیماران درمان شده با دوکسوروبیسین با کاردیومیوپاتی مرتبط می باشد و مهارکننده های آپوپتوز می‌توانند باعث پیشگیری از کاردیومیوپاتی ناشی از دوکسوروبیسین گردند. سلول‌های قلبی به دلیل متابولیسم اکسیداتیو بالا و مقدار کم آنزیم‌های آنتی اکسیدان که برای خنثی کردن این رادیکال‌ها لازم است نیز در مقایسه با سلول‌های سایر اندام‌ها به آسیب ناشی از این رادیکال‌های آزاد حساس‌ترند [۱].

حداکثر غلظت پلاسمایی دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار و غلظت پلاسمایی معمول آن ۱ تا ۲ میکرومولار است. نیمه عمر دارو حدود ۳۰ ساعت بوده و در صورت نیاز به تکرار مصرف معمولا هر ۲۱ روز یکبار تجویز می شود [۱]. در درمان سرطان دوکسوروبیسین عموماً همراه با سایر داروهایی که با آن‌ها هم افزایی دارد مصرف می شود زیرا باعث بهبود طولانی تری نسبت به مصرف تنهای دارو می شود [۱].

گلوکوکورتیکوییدها در موارد زیادی به صورت توام با داروهای ضد سرطان از جمله دوکسوروبیسین بکار می روند [۲]. آثار محافظت کننده سلولی بوسیله گلوکوکورتیکوئیدها در سلول‌های مختلف از جمله در قلب نیز نشان داده شده است [۳،۴و۵]. در سلول های قلبی کورتیکواستروئیدها باعث افزایش bcl-xL که یک عامل ضد آپوپتوز است شده و همچنین آنزیم‌های آنتی اکسیدان متالوتیونین ها، گلوتاتیون پراکسیداز-۳ و گلوتاتیون-S- ترانسفراز را نیز افزایش می دهند [۳].

تاکنون برای بررسی آثار سمیت سلولی ناشی از داروها از سلول های حیوانات زنده استفاده می شده است که این سلول‌ها طی زمان کشت توانایی تکثیر، بقاء و خصوصیات خاص بافتی خود را از دست می‌دهند. رده‌های سلولی که از سلول‌های توموری به دست می‌آیند نیز از نظر ژنتیکی غیرطبیعی هستند. علوم جدید این امکان را فراهم کرده‌اند تا به طریقی راحت تر، با صرفه‌تر، دقیق‌تر و قدرت ارزیابی بالاتر بتوان در محیط آزمایشگاهی با استفاده از سلول های بنیادی نامیرا سلول‌های قلبی با کاریوتیپ طبیعی را تولید و از آن‌ها استفاده کرد [۶ و۷].

سلول‌های بنیادی جنینی گروهی از سلول‌های بنیادی هستند که در مراحل اولیه جنینی یافت می‌شوند و علاوه بر توانایی خود نوزایی (self renewal) قادرند تا تقریباً به هر نوع سلولی در بدن تبدیل گردند. تولید جمعیت زیاد این سلول‌ها می تواند منبع نامحدودی برای مطالعات دارویی، فهم بهتر مکانیسم های دخیل در عوارض جانبی و توانایی پیش بینی و پرهیز از سمیت داروها ایجاد کند. سلول‌های قلبی مشتق از سلول های بنیادی از نظر شکل و بیان ژن‌های قلبی مشابه سلول‌های بافت قلب بوده و دارای تپش قابل مشاهده با میکروسکوپ فاز کنتراست می باشند که این ویژگی می‌تواند ابزار قدرتمندی در بهره‌مندی از این مدل باشد [۸]. این مطالعات می توانند به آزمایشات بالینی کمتر، کم هزینه‌تر و با طراحی بهتر روش‌های تشخیصی منجر شوند و باعث حذف هزینه‌های ناشی از تهیه، نگهداری، تماس با حیوانات و در نهایت مرگ این حیوانات می‌گردد و همچنین مشکلات اخلاقی مطالعات حیوانی را هم ندارد [۹].

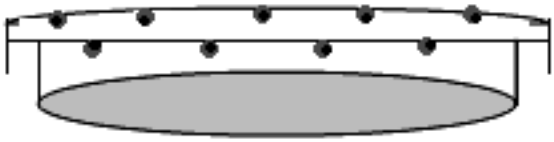
هدف این مطالعه آن است تا نقش محافظت کننده دگزامتازون را به عنوان یک گلوکوکورتیکوییید شاخص در توقف ضربان قلب ناشی از دوکسوروبیسین با استفاده از سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در کمیته اخلاق پژوهشکده رویان به تصویب رسیده و با توجه به اینکه استفاده از سلول های بنیادی کار را بر روی حیوان کاهش می دهد لذا از نظر اخلاقی نیز مورد تایید می باشد. تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول بنیادی جنینی موش رده Royan B1 (C57BL/6 strain) در $۳۷^{\circ}C$ و ۶٪ CO2 روی فیبروبلاست های جنینی موش تیمار شده با میتومایسین C (Sigma, M-0503) در محیط K-DMEM (Gibco, 10829-018) حاوی ۱۵٪ ES-FBS (Gibco, 16141-079) و عامل مهارکننده لوسمی(LIF) (Chemicon, ESG1107) ۱۰۰۰ U/ml کشت داده شدند [۱۰].

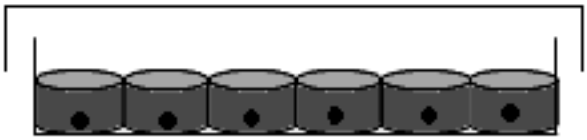
پس از جدا سازی سلول‌های بنیادی جنینی از سلول‌های فیبروبلاستی جهت تهیه اجسام شبه جنینی به روش قطرات آویزان (Hanging drop method)، قطرات ۲۰μL حاوی ۸۰۰ سلول در هر قطره در محیط DMEM (Gibco,10829-018) K- حاوی ۱۵٪ ES-FCS (Gibco, 16141-079) در دو

سلول‌های بنیادی در قطرات آویزان

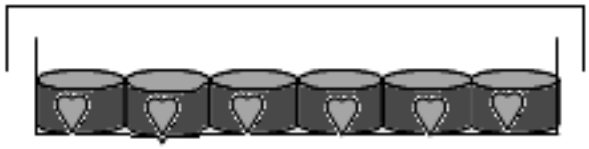


تشکیل اجسام شبه جنینی

اجسام شبه جنینی در سوسپانسیون



اجسام شبه جنینی در ظروف ۲۴ خانه



تشکیل سلول‌های قلبی در ظروف ۲۴ خانه

شکل۱- تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت به روش قطرات آویزان

گروه جداگانه با و بدون اسید آسکوربیک (Sigma, A4403) با غلظت 10^{-4} M داخل درب ظروف کشت باکتریایی حاوی آب مقطر استریل به مدت دو روز در $37^{\circ}C$ و CO_2 ۶٪ کشت داده شدند (مرحله تشکیل اجسام شبه جنینی). اجسام شبه جنینی به مدت ۵ روز در ظروف باکتریایی به صورت سوسپانسیون کشت داده شده و هر ۲ روز یکبار محیط کشت تعویض و در این مدت به گروه دوم همچنان اسید اسکوربیک اضافه شد. سپس اجسام شبه جنینی در ظروف ۲۴ خانه که با ژلاتین ۰/۱٪ پوشش داده شده‌اند در $37^{\circ}C$ و CO_2 ۶٪ کشت داده شدند [۱۰،۱۱و۱۲]. اجسام شبه جنینی کشت داده شده به صورت روزانه بررسی شدند (شکل شماره ۱).

محلول استوک دوکسوروبیسین با غلظت ۱ میلی مولار در آب مقطر تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید[۱۳]. جهت تعیین حداقل دوزی از دوکسوروبیسین (سبحان دارو) که باعث توقف ضربان در۵۰٪ یا بیشتر از ۵۰٪ سلول های قلبی می شود داروی دوکسوروبیسین در روز پنجم کشت در ظروف ۲۴ خانه در سه مرحله به اجسام شبه جنینی افزوده شد:

مرحله اول- غلظت‌های ۵۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت

مرحله دوم- غلظت‌های ۷/۵، ۵ و ۲/۵ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت

مرحله سوم- غلظت‌های ۵، ۴/۵، ۴، ۳/۵ و ۳ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت

اجسام شبه جنینی تیمار شده با غلظت‌های مختلف فوق به مدت یک هفته هر روز به کمک میکروسکپ فاز کنتراست از نظر وجود ضربان قلب مورد بررسی قرار گرفته و در روز هفتم تعداد اجسام شبه جنینی دارای ضربان در گروه‌های تیمار شده با گروه کنترل مقایسه شدند. (لازم به ذکر است که با توجه به نتایج حاصل از این مراحل دوز ۵ میکرومولار به عنوان دوز مورد نظر تعیین گردید).

جهت بررسی تعیین اثر دگزامتازون (البرزدارو) بر توقف ضربان سلول‌های قلبی ناشی از دوکسوروبیسین گروه های زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

۱- گروه کنترل که هیچ دارویی دریافت نکردند.

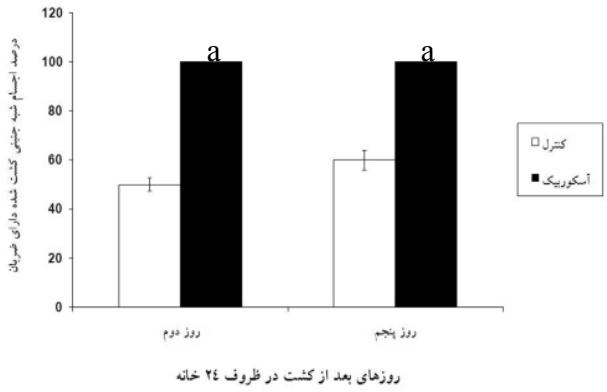
۲- گروه دوکسوروبیسن ۵ میکرومولاربه مدت ۲۴ ساعت

۳- گروه‌های ۰/۱، ۱و۱۰ میکرومولار دگزامتازون به مدت ۲۴ ساعت

۴- گروه‌های ۰/۱، ۱و۱۰ میکرومولار دگزامتازون به مدت ۴۸ ساعت

۵- گروه‌های ۰/۱، ۱و۱۰ میکرومولار دگزامتازون به مدت ۲۴ ساعت و سپس دوکسوروبیسین ۵ میکرومولاربه مدت ۲۴ ساعت

۶- گروه‌های ۰/۱، ۱و۱۰ میکرومولار دگزامتازون به مدت



شکل۲- نقش اسید اسکوربیک در افزایش تمایز اجسام شبه جنینی به سلول‌های قلبی در ۱۸ نمونه از اجسام شبه جنینی. (a تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه اسید آسکوربیک وجود دارد (P<۰/۰۰۱ با استفاده از تست t – student independent).

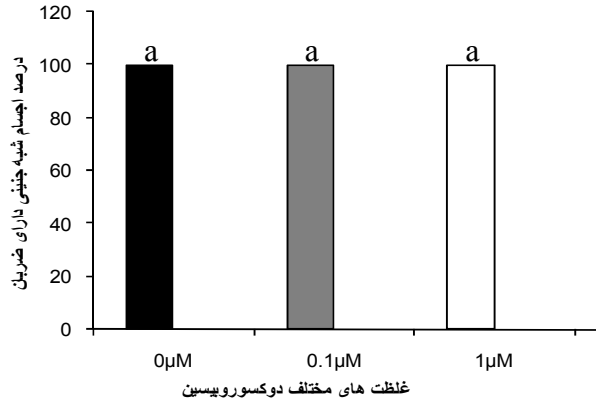
۲۴ ساعت و سپس دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار و دگزامتازون به طور همزمان به میزان ۲۴ ساعت (دگزامتازون ۴۸ ساعت)

گروه‌ها به مدت یک هفته هر روز به کمک میکروسکپ فاز کنتراست از نظر وجود ضربان قلب مورد بررسی قرار گرفتند.

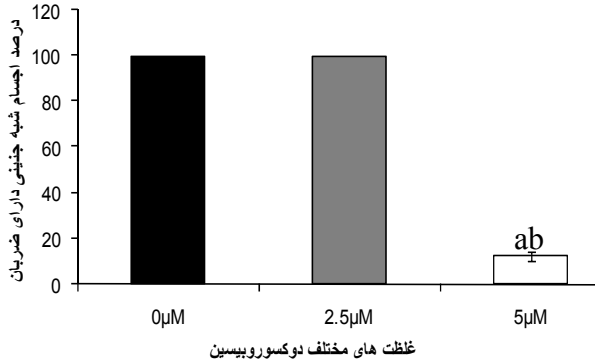
کلیه مراحل این بررسی‌ها ۳ بار تکرار شده و تعداد اجسام شبه جنینی در هر گروه ثابت (۱۸ عدد) بود.

یافته‌ها

همه اجسام شبه جنینی که برای القاء به سلول‌های قلبی در محیط حاوی اسید اسکوربیک کشت شده بودند بعد از ۴۸ ساعت دارای ضربان شدند و این اثر حداقل تا یک هفته بعد هم حفظ



شکل۳- نقش ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین بر ۱۸ جسم شبه جنینی دارای ضربان بعد از یک هفته (مرحله اول- غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار- a اختلاف معنی دار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار است P <۰/۰۰۱ با استفاده از تست one- way ANOVA).



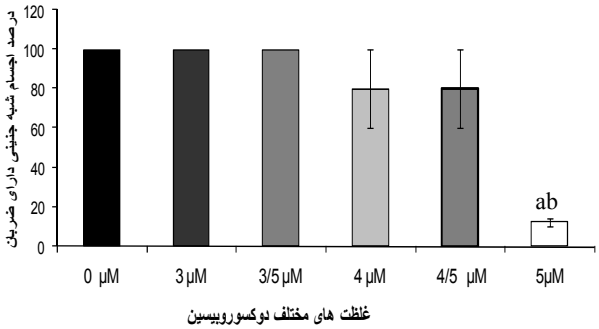
شکل ۴- نقش ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین بر ۱۸ جسم شبه جنینی دارای ضربان بعد از یک هفته (مرحله دوم- غلظت های ۷/۵ ،۵ و ۲/۵ میکرومولار که غلظت ۵ میکرومولار حداقل غلظتی است که در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش بیش از ۵۰٪ در تعداداجسام شبه جنینی ضربان دار شده است، a اختلاف معنی‌دار با گروه‌های ۰ و ۲/۵ میکرومولار مشاهده شده است P <۰/۰۰۱. b اختلاف معنی‌دار با گروه ۷/۵ میکرومولار مشاهده شده است P<۰/۰۰۱ (با استفاده از تست one- way ANOVA).

شد در حالیکه ۵۰ تا ۶۰٪ از اجسام شبه جنینی که در محیط بدون اسید اسکوربیک کشت شده بودند دارای ضربان شدند. بنا بر این برای مراحل بعدی از اسید اسکوربیک به عنوان القاء کننده استفاده گردید (شکل شماره ۲). با استفاده از t – student independent نشان داده شد که بین گروه کنترل و اسید آسکوربیک درسطح P<۰/۰۰۱ از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود دارد.

نتیجه تیمار اجسام شبه جنینی با غلظت‌های۵۰ ،۱۰، ۱و۰/۱ میکرومولار دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ ساعت نشان داد که غلظت های ۵۰ و۱۰ میکرومولار به ترتیب طی ۱ تا ۲ روز از زمان تماس با دارو باعث توقف ضربان در۱۰۰٪ سلول‌های قلبی شد در حالیکه در غلظت‌های ۱ میکرومولار و پایین‌تر بعد از یک هفته ضربان مشابه گروه کنترل بود (شکل شماره ۳).

با استفاده از نتایج مرحله اول غلظت‌های ۷/۵ ، ۵ و ۲/۵ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت برای مرحله دوم انتخاب شدند که در نتیجه غلظت ۷/۵ میکرومولار باعث از بین رفتن ضربان در ۱۰۰٪ سلول‌های قلبی طی ۲ روز در اجسام شبه جنینی شد. در غلظت ۵ میکرومولار نیز بعد از یک هفته در بیش از۵۰٪ اجسام شبه جنینی ضربان قلب به طور کامل از بین رفت در حالیکه در غلظت ۲/۵ میکرومولار تعداد اجسام شبه جنینی دارای ضربان قلب مشابه با گروه کنترل بود (شکل شماره ۴).

با استفاده از نتایج مرحله دوم اجسام شبه جنینی با

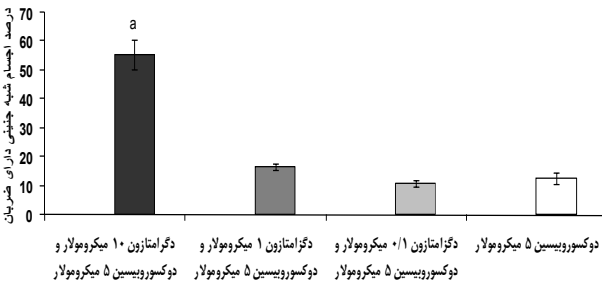


شکل ۵- نقش۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین بر ۱۸ جسم شبه جنینی دارای ضربان بعد از یک هفته (مرحله سوم- غلظت‌های۵، ۴/۵، ۴، ۳/۵ و ۳ میکرومولا (a اختلاف معنی دار غلظت ۵ میکرومولار با گروه‌های ۳/۵ میکرومولارو کمتراست ۰۰۱ /۰>P, b اختلاف معنی دار غلظت ۵ میکرومولار با گروه ۴/۵ و ۴ میکرومولار است ۰۰۱/۰>P- با استفاده از تست one- way ANOVA)

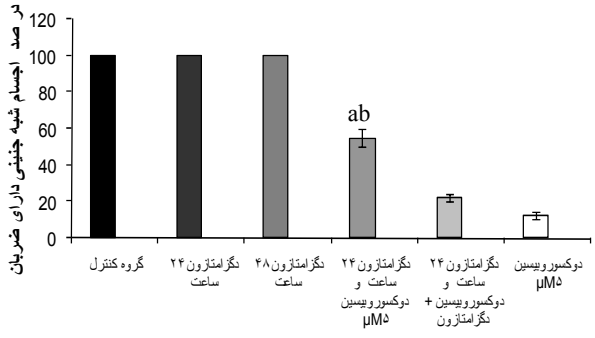
غلظت‌های۵، ۴/۵، ۴، ۳/۵ و۳ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند که بعد از یک هفته در غلظت‌های ۴/۵ و۴ میکرومولار بین ۱۰۰ تا ۸۰٪ سلول‌های قلبی دارای ضربان بودند و در غلظت‌های ۳/۵ میکرومولار وکمتر نتایج ضربان سلول‌های قلبی مشابه با گروه کنترل بود (شکل شماره ۵).

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از ۳ مرحله قبل غلظت ۵ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت به عنوان کمترین غلظتی که قادر است بعد از یک هفته ضربان سلول‌های قلبی اجسام شبه جنینی را از بین ببرد انتخاب و در کلیه مراحل بررسی از این غلظت استفاده گردید.

جهت بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف دگزامتازون بر سمیت سلولی دوکسوروبیسین در یک گروه غلظت‌های ۱۰،۱و ۰/۱ میکرومولار دگزامتازون ۲۴ ساعت قبل از تیمار با دوکسوروبیسین به اجسام شبه جنینی اضافه شدند و نتیجه بعد از



شکل ۶- تیمار با دگزامتازون ۱۰ میکرومولار ۲۴ ساعت قبل از تیمار با دوکسوروبیسین باعث افزایش اجسام شبه جنینی دارای ضربان می‌گردد(a اختلاف معنی‌دار با دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار است۰۰۱/۰>P با استفاده از تست one- way ANOVA).



شکل ۷- نقش دگزامتازون ۱۰ میکرومولار در افزایش اجسام شبه جنینی دارای ضربان تیمار شده با دوکسوروبیسین (a اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ۰۰۱ /۰>P و b اختلاف معنی دار با دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار است ۰۰۱ /۰>P- با استفاده از تست one- way ANOVA).

یک هفته در گروه های مذکور ثبت گردید (شکل شماره ۶).

نتایج به دست آمده نشان داد که فقط غلظت ۱۰ میکرومولار دگزامتازون باعث کاهش معنی داری در تعداد اجسام شبه جنینی دارای ضربان در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین تنها شده است. در گروه دوم بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۰/۱ ، ۱ و۱۰ میکرومولار دگزامتازون، دوکسوروبیسین و دگزامتازون با همان غلظت‌ها به طور هم زمان هم به اجسام شبه جنینی اضافه شدند که در نتیجه در هیچ گروهی در مقایسه با دوکسوروبیسین تنها اختلاف معنی داری در نتایج حاصل نشد.

بحث

یکی از مهمترین عوارض جانبی دوکسوروبیسین سمیت قلبی آن می‌باشد. این سمیت شاخص به عنوان یک مدل آزمایشگاهی در بسیاری از مقالات مورد استفاده قرار گرفته تا مکانیسم‌های سمیت سلولی و نیز راه‌های کاهش این سمیت شناسایی شوند [۱].

در این بررسی در ابتدا سلول‌های بنیادی جنینی به روش متداول به اجسام شبه جنینی و سپس قلب تمایز داده شدند .در این روش همه اجسام شبه جنینی دارای ضربان نمی‌شدند همچنین زمان شروع ضربان در آنها متفاوت بود که این باعث می‌شد دوره تمایز اجسام شبه جنینی با یکدیگر متفاوت شوند. برای فائق آمدن بر این مشکل از اسید آسکوربیک به عنوان القاء کننده استفاده شد [۹ و۱۰] (شکل شماره ۱).

هدف کلی مطالعه این بود که با استفاده از سلول‌های قلبی

تمایز یافته اثر محافظت کننده دگزامتازون در کاهش توقف ضربان سلول‌های قلبی ناشی از دوکسوروبیسین نشان داده شود. در این بررسی توانایی مشاهده ضربان قلب به کمک میکروسکوپ فاز کنتراست وجود داشت پس بر آن شدیم تا از این راه ساده غلظت مورد نظر دوکسوروبیسین را به دست آوریم .به این منظور در سه مرحله متوالی اجسام شبه جنینی را با غلظت های مختلفی از دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ ساعت تیمار کردیم به گونه ای که با استفاده از نتایج حاصل از هر مرحله غلظت های مرحله بعد را انتخاب کردیم. نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که غلظت های بالاتر از ۵ میکرومولار باعث از بین رفتن ضربان در ۱۰۰٪ سلول های قلبی می شود در حالیکه در غلظت های کمتر از ۵ میکرومولار بین ۸۰ تا ۱۰۰٪ ضربان در سلول های قلبی حفظ می‌گردید. بنا براین غلظت ۵ میکرومولار به عنوان حداقل دوزی که باعث از بین رفتن ضربان در بیش از ۵۰٪ سلول‌های قلبی می‌گردد مشخص و در بقیه مراحل بررسی از آن استفاده گردید. در مرحله بعد غلظت های مختلف (۰/۱ ، ۱ و ۱۰ میکرومولار) دگزامتازون را ۲۴ ساعت قبل از تیمار با دوکسوروبیسین به محیط اضافه و سپس درصد سلول های قلبی دارای ضربان در این گروه‌ها با گروهی که فقط با دوکسوروبیسین تیمار شده بودند مقایسه گردید. نتایج حاصله نشان داد که در این مدل آزمایشگاهی فقط غلظت ۱۰ میکرومولار دگزامتازون به مدت ۲۴ ساعت باعث پیشگیری از سمیت قلبی دوکسوروبیسین می گردد و غلظت‌های کمتر قادر نیستند تا اثر محافظت کننده ایجاد کنند. همچنین برای اینکه تاثیر مصرف همزمان دوکسوروبیسین و دگزامتازون را در این سمیت قلبی بررسی کنیم گروهی از اجسام شبه جنینی را بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ذکر شده دگزامتازون، به مدت ۲۴ ساعت دیگر با دوکسوروبیسین و دگزامتازون به طور هم زمان هم تیمار کردیم (۴۸ ساعت تیمار با دگزامتازون).نتایج به دست آمده نشان داد که مصرف هم زمان این دو دارو حتی آثار مفید حاصل از پیش درمانی با دگزامتازون را نیز از بین می برد که در هیچیک از مطالعات قبلی به این مسئله اشاره نشده است و شاید یکی از علل آن رقابت در خروج دو دارو از سلول و در نتیجه افزایش غلظت داخل سلولی دوکسوروبیسین باشد ولی این نتیجه گیری نیاز به بررسی دارد.

نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات قبلی که به نقش مفید گلوکوکورتیکوییدها در آسیب‌های قلبی اشاره کرده‌اند مطابقت دارد که از جمله آنها می‌توان به کاهش آسیب سلول‌های قلبی به دنبال ضربه مغزی و در طی نگهداری قلب جدا شده حیوانات اشاره کرد. اثر محافظت کننده قلبی و ضد آپوپتوز گلوکوکورتیکوییدها در حیوانات آزمایشگاهی و در سلول‌های جدا شده از قلب جوندگان تیمار شده با دوکسوروبیسین نیز نشان داده شده است [۳، ۴، ۵، ۱۴ و ۱۵].

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های تمایز یافته حاصل از آنها می‌توانند به عنوان مدلی مناسب در تحقیقات فارماکولوژی و توکسیکولوژی بکار برده شوند و اگر این تحقیقات در سلول های انسانی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی انجام شود می‌توانند به کارآزمایی‌های بالینی کمتر منجر شوند [۱۶].

قابل ذکر است که این اولین مدل آزمایشگاهی است که سمیت یک دارو را با استفاده از سلول های بنیادی جنینی تمایز یافته به سلول‌های قلبی مورد بررسی قرار داده است.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان بوده و در پژوهشکده رویان پایگاه تحقیقاتی اصفهان اجرا شد.لذا بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین و پرسنل پژوهشکده رویان اعلام می‌دارند.

منابع

[1] Amesterdam A, Tajima K, Sasson R, Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids. ***Biochem Pharmacol*** 64 (2002) 843-850.

[2] Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Kazemi Ashtiani S, The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell- derived cardiomyocytes. ***J Mol Cell Cardiol*** 38 (2005) 494-503.

[3] Chen M, Alexander D , Sun H, Xie L, Lin Y , Terrand J,Morrissy S, Purdom S,

[4] Corticosteroids Inhibit Cell Death Induced by Doxorubicin in Cardiomyocytes: Induction of Anti apoptosis, Antioxidant, and Detoxification Genes. ***Mol Pharmacol*** 67 (2005) 1861–1873.

[5] Dasmahapatra K, Vezeridis M , Rao U , Perez-Brett R, Karakousis C, Prevention of adriamycin induced cardiotoxicity in rats using methylprednisolone. ***J Surg Res*** 36 (1984) 217-222.

[6] Emir M, Ozisik K, Cagli K,Ozisik P,Tuncer S, Bakuy V, Beneficial effect of methyl prednisolone on cardiac in rat model of severe brain injery; ***Tohoku J Exp Med*** 207 (2005) 119-124.

[7] GorbaT, Allsopp T, Pharmacological potential of embryonic stem cells. ***Pharmacol Res*** 47 (2003) 269-278.

[8] Hong W, Juhasz O, Li J, Tarasova Y, Boheler K, Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation:Phenotypic and molecular analyses. ***J Cell Mol Med*** 29 (2005) 804-817.

[9] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L,Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in anti tumor activity and cardiotoxicity. ***Pharmacol Rev*** 56 (2004) 185-229.

[10] Nieden N, Kempka G, Ahr H,Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test- a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds. ***Toxicol Appl Pharmacol*** 194 (2004) 257-269.

[11] Pouton C, Haynes J, Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. ***Adv Drug Deliv Rev*** 57 (2005) 1918-1934.

[12] Rolletschek A, Blyczck P, Wobus A, Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model system to study toxicological effects; ***Toxicol Lett*** 149 (2004) 361-369.

[13] Sato H, Takahashe M, Ise H , Yamada A, Hirose S, TagawaY, Collagen synthesis is required for ascorbic acid enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. ***Biochem Biophys Res Commun*** 342 (2006) 107-112.

[14] Schmidt JS, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R, Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. ***Cell Death Differ*** 11 (2004) 45-55.

[15] Takahashi T, Lord B, Schulze P, Fryer R, Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. ***Circulation*** 107 (2003) 1912-1916.

[16] Thisatomi K, Isomura T, Sato T, Hayashida N, Kosuga K, Ohishi KBeneficial effect of steroid on myocardial preservation in isolated rat hearts. ***Jpn Circ J*** 59 (1995) 815-123.

[17] Tokarska M, Zaugg M, Silva R,Luchinetti E,Schaub M,Williman T,Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply.***AM J Physiol Heart Circ Physiol*** 289(2005)37-47.