

کار دیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی ترانسفکت‌شده‌ی جنینی موش: مدلی مناسب برای بررسی توکسیسیته‌ی داروها

لیلا دهقانی^۱، دکتر محبوبه فرخ‌پور^۲، دکتر علی حائری روحانی^۳، دکتر الهه پور عزیزی^۴،
دکتر محمد حسین نصر اصفهانی^۵، دکتر حسین بهاروند^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دوکسوروبیسین در درمان انواع سرطان‌ها مصرف می‌گردد. اما سمیت قلبی، مصرف آن را محدود ساخته است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که کورتیکواستروئیدها باعث محافظت قلبی می‌گردند. در این مطالعه با استفاده از کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی ترانس ژنیک موش اثرات دگزامتازون در کاهش توکسیسیته‌ی ناشی از دوکسوروبیسین بررسی شد.

روش‌ها: سلول‌های قلبی خالص‌شده‌ی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی ترانس ژنیک موش (RB1- α MHC) با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند، تا غلظتی که باعث کاهش ۵۰ درصد حیات سلول‌های قلبی می‌شود برای استفاده در مراحل بعدی به دست بیاید. سلول‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند: گروه شاهد، گروه دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت و گروه دگزامتازون ۱۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت قبل از دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت. گروه‌ها از نظر ضربان با میکروسکوپ فاز کنتراست و درصد حیات با MTS Assay و از نظر بیان ژن با استفاده از تکنیک RT-PCR (Real time-polymerase chain reaction) ارزیابی شدند.

یافته‌ها: غلظت ۵ میکرومولار دوکسوروبیسین به عنوان حداقل غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد از این سلول‌ها می‌گردد، به دست آمد. در گروه اول تیمار شده با دوکسوروبیسین و غلظت ۱۰ میکرومولار دگزامتازون اثر محافظت‌کننده بر حیات سلول‌های و بیان ژن‌های قلبی دیده شد. در گروه دوم اثر محافظت‌کنندگی قابل توجهی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: تیمار سلول‌های قلبی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی ترانس ژنیک موش با دگزامتازون ۲۴ ساعت قبل از تیمار با دوکسوروبیسین باعث پیش‌گیری از مرگ سلول‌های قلبی ناشی از دوکسوروبیسین می‌گردد. نتایج این مطالعه مطابق نتایج مطالعه بر روی سلول‌های قلبی موش بود. بنابراین این سلول‌ها می‌توانند به عنوان مدل آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی آثار درمانی و یا سمی داروها مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی ترانس ژنیک، سلول‌های قلبی، دوکسوروبیسین، دگزامتازون، آپوپتوز، سمیت قلبی

ارجاع: دهقانی لیلا، فرخ‌پور محبوبه، حائری روحانی علی، نور عزیزی الهه، نصر اصفهانی محمد حسین، بهاروند حسین. کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی ترانسفکت‌شده‌ی جنینی موش: مدلی مناسب برای بررسی توکسیسیته‌ی داروها. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۹): ۱۷۸۶-۱۷۷۹

- ۱- مری، گروه نورولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
 - ۲- استادیار، گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده‌ی رویان، پایگاه تحقیقاتی اصفهان، اصفهان، ایران
 - ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
 - ۴- استادیار، گروه علوم پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد، اصفهان، ایران
 - ۵- دانشیار، گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده‌ی رویان، تهران، ایران
- نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر محمد حسین نصر اصفهانی
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

مقدمه

دوکسوروبیسین به عنوان یک عامل شیمی‌درمانی بر روی دامنه‌ی وسیعی از تومورهای بدخیم مؤثر می‌باشد. اگر چه سمیت قلبی آن، به ویژه در کاردیومیوپاتی وابسته به دوز، مصرف طولانی مدت آن را محدود ساخته است. این سمیت می‌تواند تغییرات ساختاری گوناگونی را شامل کاهش در ضخامت دیواره‌ی بطن چپ، کوچک شدن عضله‌ی قلب و کاهش کمپلیانس بطنی در قلب به همراه داشته باشد. این تغییرات ممکن است مدت کوتاهی بعد از شروع مصرف دارو و یا بعد از اتمام مصرف رخ دهد. کاهش بیان ژن‌های متفاوت و ویژه‌ی قلبی نظیر کاردیاک تروپونین ۱، زنجیره‌ی سنگین میوزین بتا و پپتید ناتریوریتیک مغزی و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد، نفوذپذیری غشای میتوکندری و القای آپوپتوز بیانگر کاردیومیوپاتی، در بیماران درمان‌شده با دوکسوروبیسین دیده شده است (۱-۲). با توجه به متابولیسم اکسیداتیو بالا و کمبود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سلول‌های قلبی، این بافت در مقایسه با بافت سایر اندام‌ها به آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد حساس‌تر است (۳-۴). گلوکوکورتیکوئیدها در شیمی‌درمانی هم‌زمان با داروهای ضد سرطان تجویز می‌شوند (۵) و آثار محافظت‌کننده‌ی سلولی آن‌ها در سلول‌های مختلف از جمله در قلب نشان داده شده است (۶-۸). گلوکوکورتیکوئیدها باعث افزایش سطح Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) به عنوان یک عامل ضد آپوپتوز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان متالوتیونین‌ها و GST (Glutathione S-transferase)، می‌شوند (۸).

استفاده از سلول‌های بنیادی در سلول‌درمانی و

آثار سمیت ناشی از داروها توجه زیادی را به خود معطوف کرده است (۹-۱۰). مهم‌ترین کاربرد سلول‌های بنیادی استفاده از این سلول‌ها در درمان بیماری‌ها و استفاده از آن‌ها به عنوان ابزاری در مطالعات بیولوژی سلولی و تکاملی و بررسی اثر عوامل مختلف بر مراحل مختلف تکوین جنین پستانداران است (۱۱). یکی از موانع اصلی که استفاده از این سلول‌ها را جهت مقاصد درمانی محدود می‌کند، ناهمگن بودن جمعیت سلول‌هایی است که در آزمایشگاه از سلول‌های بنیادی تمایز می‌یابند. برای ایجاد یک جمعیت همگون از این سلول‌ها می‌توان تکنیک‌های مختلفی از جمله دست‌کاری‌های ژنی سلول‌های بنیادی را نام برد. در این تکنیک سلول‌ها با یک پروموتور خاص و همچنین ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک ترانسفکت می‌شوند تا در زمان تمایز تنها سلول‌های بیان‌کننده‌ی ژن مورد نظر که در برابر آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده‌اند باقی بمانند (۱۲). این مطالعات می‌توانند به آزمایشات بالینی کمتر و طراحی بهتر روش‌های تشخیصی منجر شوند و باعث حذف هزینه‌های ناشی از تهیه و نگهداری تعداد زیاد حیوانات شوند. به علاوه مشکلات اخلاقی مطالعات حیوانی را هم ندارد (۱۳).

هدف این مطالعه آن بود که با استفاده از کاردیومیوسیت‌های خالص مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی جنینی ترانسفکت‌شده از موش، اثر محافظت‌کننده‌ی دگزامتازون بر روی حیات سلول‌های قلبی و بیان ژن‌های قلبی بررسی شود.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر در کمیته‌ی اخلاق پژوهش‌شده‌ی

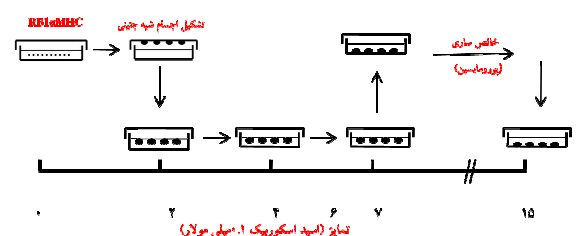
جهت تعیین حداقل دوزی از دوکسوروبیسین که باعث توقف ضربان در ۵۰ درصد از سلول‌های قلبی خالص می‌شوند، داری دوکسوروبیسین در روز پانزدهم در ظروف ۹۶ خانه در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ در سه مرحله به اجسام شبه جنینی افزوده شد و نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تحت اثر MTS((3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide خوانده شد. با توجه به نتایج حاصل از این مرحله دوز ۵ میکرومولار به عنوان دوز مورد نظر تعیین گردید. جهت بررسی اثر دگزامتازون (البرز دارو) بر کاهش مرگ سلول‌های قلبی خالص ناشی از دوکسوروبیسین گروه‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

- ۱- گروه شاهد که هیچ دارویی دریافت نکردند.
 - ۲- گروه دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت
 - ۳- گروه دگزامتازون ۱۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت قبل از دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت
- اثر دگزامتازون بر ضربان سلول‌های قلبی بررسی شد، بدین ترتیب که اجسام شبه جنینی در ظروف ۱۲ خانه کشت داده شد و پس از خالص‌سازی تحت تیمارهای مذکور قرار گرفتند.

در این مطالعه میزان بیان ژن قلبی β -MHC (Beta-myosin heavy chain)، به منظور بررسی توانایی جبران کاهش بیان ژن ناشی از دوکسوروبیسین توسط دگزامتازون، تحت تیمارهای مذکور توسط روش RT-PCR (Real time-polymerase chain reaction) بررسی گردید. مجموعه‌ی واکنش‌ها در این تحقیق به صورت

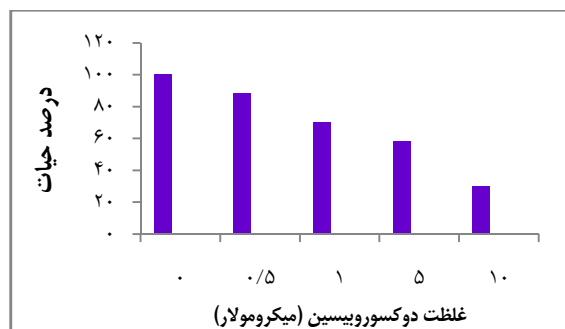
رویان به تصویب رسید و با توجه به استفاده از سلول‌های بنیادی به جای کار بر روی حیوان، از نظر اخلاقی تأیید شد. تعداد $10^5 \times 3$ سلول بنیادی جنینی موش رده‌ی Royan-B1 α -MHC در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۶ درصد CO_2 روی فیروبلاست‌های جنینی موش تیمار شده با میتومایسین (Sigma. M-0503) C در محیط KDMEM (Konoka Dulbecco's modified eagle's medium) ES-FBS (10829-018) حاوی ۱۵ درصد (Embryonic Stem Cell-fetal bovine serum) (Gibco, 16141-079) و ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر عامل مهارکننده‌ی لوسمی (Chemicon. ESG1107) (Leukemia inhibitory factor یا LIF)، کشت داده شدند (۱۴).

پس از جداسازی سلول‌های بنیادی جنینی از سلول‌های فیروبلاستی جهت تهیه‌ی اجسام شبه جنینی به روش قطرات آویزان در حضور اسید اسکوربیک با غلظت 10^{-4} (Sigma, A4403) به روشی که در مطالعات قبلی ذکر شد (۱۶-۱۵) و در شکل ۱ آمده است، کشت داده شد و در روز هفتم پلیت شدند. سپس به منظور غنی‌سازی، سلول‌های قلبی خالص به مدت یک هفته با پورومایسین تیمار شدند.



شکل ۱. تمایز سلول‌های بنیادی جنینی ترانسفکت شده به کاردیومیوسیت به روش قطرات آویزان و خالص‌سازی آن‌ها تحت تیمار با پورومایسین

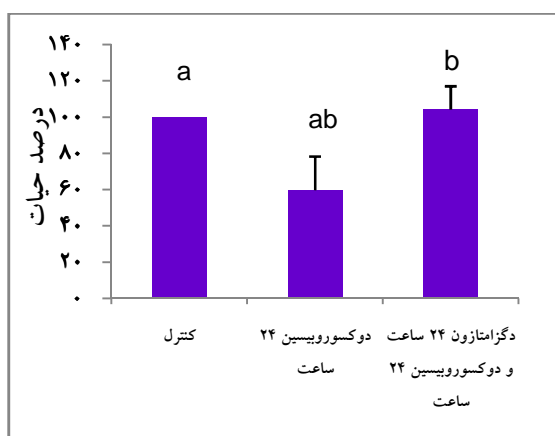
غلظت ۵ میکرومولار دوکسوروبیسین منجر به از دست دادن حیات در بیش از نیمی از سلول‌های قلبی می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲. نقش ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف

دوکسوروبیسین بر روی حیات سلول‌های قلبی پس از تیمار با پورومایسین

تیمار با دگزامتازون ۱۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت قبل از تیمار با دوکسوروبیسین منجر به جلوگیری از مرگ سلول‌های قلبی و همچنین باعث افزایش حیات سلول‌های قلبی شد که این افزایش در سطح معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (شکل ۳).



شکل ۳. نقش دگزامتازون ۱۰ میکرومولار در افزایش حیات سلول‌های قلبی تیمار شده با دوکسوروبیسین. a- اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد و b- اختلاف معنی‌دار با گروه دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار است با استفاده از آزمون One-way ANOVA

دوتایی و با استفاده از رنگ سایبرگرین از شرکت تاکار، پرایمرهای اختصاصی و cDNA (به عنوان الگو) با برنامه‌ریزی دستگاه Corbet Rotor Gene 6000 صورت گرفت. دمای واسرشت اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۴۵ سیکل به ترتیب با دمای واسرشت ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال مناسب برای هر پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طولیل شدن ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه انجام شد. سپس دمای ذوب شدن از ۵۵ درجه تا ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید. پس از کامل شدن هر واکنش بر اساس آستانه‌ی تعیین شده Ct مشخص شد. در انتها از روش $\Delta\Delta Ct$ آنالیز نتایج انجام شد. پرایمر مورد نظر برای β -MHC شامل 5'- Forward; AGACGGAGAACAAGAC-3' و Reverse; 5'- GGCTCATGCAGGAAGGT-3' بود.

نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

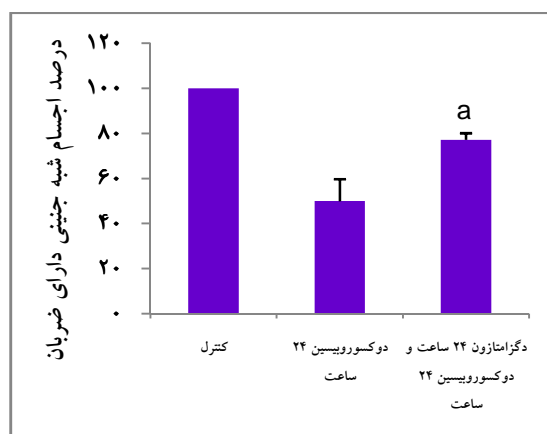
همه‌ی اجسام شبه جنینی مشتق از RB1 α -MHC که برای القا به سلول‌های قلبی در محیط حاوی اسید اسکوربیک کشت شده بودند، بعد از ۴۸ ساعت دارای ضربان شدند و این اثر را حتی تا بعد از تیمار با پورومایسین (شکل ۱) حفظ کردند. نتایج حاصل از تیمار با غلظت‌های متفاوت دوکسوروبیسین به منظور تعیین دوزی که حداقل باعث توقف ضربان در ۵۰ درصد از سلول‌های قلبی می‌شود، نشان داد که

از آن جایی که دوکسوروبیسین باعث کاهش معنی‌داری در بیان ژن‌های ویژه‌ی قلبی از جمله β -MHC در مطالعه‌ی حاضر شده است، نتایج حاصل از بررسی بیان ژن به روش Real time-PCR نشان داد که پیش تیمار دگزامتازون به مدت ۲۴ ساعت می‌تواند از این کاهش به صورت معنی‌داری جلوگیری کند (شکل ۵).

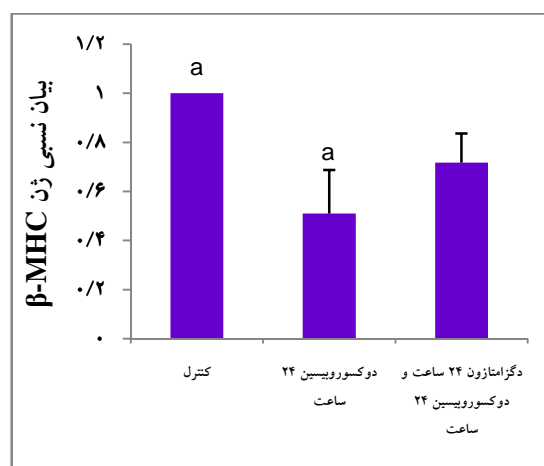
بحث

آنتراسیکلین‌ها از جمله دوکسوروبیسین در درمان بسیاری از بدخیمی‌ها و تومورهای سرطانی مورد استفاده می‌باشند. اما از محدودیت‌های این داروها، اثرات سمی آن‌ها بر روی بافت‌های دیگر از جمله قلب می‌باشد (۱۳). دوکسوروبیسین بیان پروتئین‌های متفاوت ویژه‌ی قلبی (آلفا-آکتینین، زنجیره‌ی سبک و سنگین میوزین، تروپونین، دسمین)، پروتئین‌های شبکه‌ی سارکوپلاسما میک Ca-ATPase ، گیرنده‌ی ریانودین ۲، پروتئین میتوکندریایی، پروتئین سولفور آهن، ATPase ، فسفوفروکتوکیناز و دیگر پروتئین‌ها شامل کراتین کیناز، فسفولامبان، کلسی کواسترین، فسفولیپاز A2 و پپتید ناتریوریک مغزی (BNP) یا Brain natriuretic peptide) را کم می‌کند. کاهش در پروتئین‌های ماهیچه‌ی قلبی می‌تواند در ارتباط با کاهش انقباض در کاردیومیوسیت‌ها باشد (۱۴). از طرفی در مقابل کاردیوتوکسیسیته‌ی دوکسوروبیسین، استفاده از داروهای خانواده‌ی گلوکوکورتیکوئیدی مفید می‌باشند. گلوکوکورتیکوئیدها از جمله دگزامتازون داروی بسیار مهمی در تحریک فعالیت اختصاصی گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی شناخته شده‌اند. شناسایی مکانیسم‌های سمیت سلولی و نیز راه‌های کاهش این

در ارتباط با کاهش یا توقف انقباض در کاردیومیوسیت‌ها که ناشی از تیمار با دوکسوروبیسین بود، نتایج به دست آمده نشان داد که دگزامتازون باعث افزایش معنی‌داری در تعداد اجسام شبه جنینی دارای ضربان در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین تنها شد (شکل ۴).



شکل ۴. نقش دگزامتازون ۱۰ میکرومولار در افزایش بقای ضربان اجسام شبه جنینی تیمار شده با دوکسوروبیسین. a- اختلاف معنی‌دار با گروه دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار است با استفاده از آزمون One-way ANOVA



شکل ۵. نقش دگزامتازون ۱۰ میکرومولار در کاهش اثر منفی دوکسوروبیسین در بیان ژن قلبی β -MHC. a- اختلاف معنی‌دار با گروه دوکسوروبیسین ۵ میکرومولار است (P < ۰/۰۵) با استفاده از آزمون One-way ANOVA

سمیت حائز اهمیت فراوانی می‌باشد.

در این بررسی در ابتدا سلول‌های بنیادی ترانسفکت شده به روش متداول به اجسام شبه جنینی و سپس به سلول‌های قلبی تمایز داده شدند. از مزایای استفاده از این سلول‌ها این بود که به محض بیان ژن α -MHC طی تیمار با پوروماپسین تنها سلول‌هایی که این ژن را بیان نمودند در محیط کشت حفظ می‌شوند. اسید اسکوریک به عنوان القاکننده به سمت سلول‌های قلبی استفاده شد (۱۴).

هدف کلی این مطالعه این بود که با استفاده از سلول‌های قلبی خالص اثر محافظت‌کننده‌ی دگزامتازون در کاهش حیات، ضربان و کاهش بیان ژن قلبی β -MHC ناشی از دوکسورویسین نشان داده شود.

نتایج حاصل از سلول‌های قلبی خالص مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی ترانسفکت شده در مطالعه‌ی حاضر با نتایج به دست آمده از سلول‌های قلبی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی مطابقت داشت. در این بررسی با استناد به مطالعه‌ی قلبی از غلظت‌های ۵ میکرومولار دوکسورویسین و ۱۰ میکرومولار دگزامتازون استفاده شد (۱۵). نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که غلظت ۵ میکرومولار دوکسورویسین همانند مطالعه‌ی قلبی باعث مرگ بیش از ۵۰ درصد از سلول‌های قلبی ش ۱۰ میکرومولار ۲۴ ساعت قبل از تیمار با دوکسورویسین، افزایش معنی‌داری را در میزان حیات سلول‌های قلبی ایجاد کرد. همچنین تداوم ضربان در سلول‌های که با دگزامتازون پیش تیمار شده بودند، ادامه داشت. نتایج حاصل از بیان ژن هم اثر محافظت‌کننده‌ی دگزامتازون را ثابت نمود.

نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات قلبی که به

نقش مفید گلوکوکورتیکوئیدها در آسیب‌های قلبی اشاره کرده‌اند، مطابقت داشت. مطالعات مربوط به کاهش آسیب سلول‌های قلبی به دنبال ضربه‌ی مغزی و در طی نگهداری قلب جداشده‌ی حیوانات، نیز نتایج مشابه داشتند. اثر محافظت‌کننده‌ی قلبی و ضد آپوپتوز گلوکوکورتیکوئیدها در حیوانات آزمایشگاهی و در سلول‌های جداشده از قلب جوندگان تیمار شده با دوکسورویسین نیز نشان داده شده است. به بیان دیگر در قیاس با نتایج قلبی مطالعات دیگر مبنی بر افزایش بیان سیکلواکسیژناز ۲ و القای بیان فاکتور آنتی آپوپتوزی Bcl-xL (۷-۸)، می‌توان این گونه اندیشید که شاید دگزامتازون از طریق افزایش بیان سیکلواکسیژناز ۲ نقش حفاظتی خود را بر روی قلب اعمال می‌کند (۷، ۱۷-۱۹، ۲۰).

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه مطابق با بررسی قلبی نشان داد که سلول‌های بنیادی جنینی هم به صورت خالص و هم خالص نشده می‌توانند به عنوان مدلی مناسب در تحقیقات فارماکولوژی و توکسیکولوژی به کار روند. چه بسا، زمانی که این سلول‌ها به گونه‌ای طراحی شوند که مشابه بررسی حاضر تنها به یک نوع سلول تخصصی (عصبی، قلبی و سایر سلول‌ها) تمایز یابند، می‌توان نتایج دقیق‌تری به دست آورد. اگر این تحقیقات در سلول‌های انسانی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی انجام شود، می‌توانند به کارآزمایی‌های بالینی کمتر منجر شوند (۲۰).

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده‌ی رویان بود و در پژوهشکده‌ی رویان،

از مسؤولین و پرسنل پژوهش‌کده‌ی رویان
اعلام می‌دارند.

پایگاه تحقیقاتی اصفهان اجرا شد. بدین وسیله
نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را

References

1. Akimoto H, Bruno NA, Slate DL, Billingham ME, Torti SV, Torti FM. Effect of verapamil on doxorubicin cardiotoxicity: altered muscle gene expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Cancer Res* 1993; 53(19): 4658-64.
2. Ito H, Miller SC, Billingham ME, Akimoto H, Torti SV, Wade R, et al. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(11): 4275-9.
3. Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5-6): 843-50.
4. Kumar D, Kirshenbaum L, Li T, Danelisen I, Singal P. Apoptosis in isolated adult cardiomyocytes exposed to adriamycin. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 874: 156-68.
5. Schaaf MJ, Cidowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83(1-5): 37-48.
6. Dasmahapatra KS, Vezeridis M, Rao U, Perez-Brett R, Karakousis CP. Prevention of adriamycin (ADR)-induced cardiotoxicity in rats using methylprednisolone (MP). *J Surg Res* 1984; 36(3): 217-22.
7. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7(2): 114-21.
8. Chen QM, Alexander D, Sun H, Xie L, Lin Y, Terrand J, et al. Corticosteroids inhibit cell death induced by doxorubicin in cardiomyocytes: induction of antiapoptosis, antioxidant, and detoxification genes. *Mol Pharmacol* 2005; 67(6): 1861-73.
9. Cezar GG. Can human embryonic stem cells contribute to the discovery of safer and more effective drugs? *Curr Opin Chem Biol* 2007; 11(4): 405-9.
10. McNeish J. Embryonic stem cells in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(1): 70-80.
11. Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects. *Toxicol Lett* 2004; 149(1-3): 361-9.
12. Doss MX, Winkler J, Chen S, Hippler-Altenburg R, Sotiriadou I, Halbach M, et al. Global transcriptome analysis of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Genome Biol* 2007; 8(4): R56.
13. Minotti G, Recalcati S, Menna P, Salvatorelli E, Corna G, Cairo G. Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol* 2004; 378: 340-61.
14. Hisatomi K, Isomura T, Sato T, Hayashida N, Kosuga K, Ohishi K. Beneficial effect of steroid on myocardial preservation in isolated rat hearts. *Jpn Circ J* 1995; 59(12): 815-23.
15. Farokhpour M, Karbalaie K, Tanhaei S, Nematollahi M, Etebari M, Sadeghi HM, et al. Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model system to study cardioprotective effects of dexamethasone in doxorubicin cardiotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2009; 23(7): 1422-8.
16. Dehghani L, Farokhpour M, Karbalaie K, Nematollahi M, Tanhaei S, Hayati-Rodbari N, et al. The influence of dexamethasone administration on the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in purified embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Cell* 2013; 45(2): 101-6.
17. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 2004; 11(Suppl 1): S45-S55.
18. Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, et al. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107(14): 1912-6.
19. Morrissy S, Xu B, Aguilar D, Zhang J, Chen QM. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell* 2010; 9(5): 799-809.
20. Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test—a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 194(3): 257-69.

Genetically Engineered Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Suitable Model on Drugs Toxicity Assessment in Vitro

Leila Dehghani MSc¹, Mahbobeh Farokhpour PhD², Ali Haeri-Rohani PhD³,
Elaheh Poorazizi PhD⁴, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD²,
Hossein Baharvand PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Doxorubicin (DOX) is a powerful chemotherapeutic agent used in the treatment of solid tumors and malignant hematological diseases. However, cardiac toxicity limits the clinical usefulness of this drug. Previous reports have shown that corticosteroids induce a cytoprotective effect on cardiomyocytes. Mouse transgenic embryonic stem cell-derived pure cardiomyocytes may be considered as a model for assessment pharmacological and toxicological effects of drugs in vitro.

Methods: Mouse transgenic embryonic stem cell-derived pure cardiomyocytes were treated by different concentrations of doxorubicin to determine median lethal dose (LD50). Pure cardiomyocytes were evaluated in two groups: treatment by 10 μ M dexamethasone (DEX) 24 hours before or before and in continuation with doxorubicin. The percentage of cardiomyocyte viability by MTS assay, the percentage of beating, and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for cardiac gene expression (β -MHC) were evaluated in each group.

Findings: 5 μ M doxorubicin was determined as drug concentration that leads to 50% cardiomyocyte mortality. Cardiotoxicity on mouse transgenic embryonic stem cell-derived pure cardiomyocytes could be ameliorated by treatment with dexamethasone (DEX) when administrated before doxorubicin. The effect of dexamethasone appeared to be mediated via glucocorticoid receptors. Dexamethasone increased cardiomyocyte gene expression and decreased apoptosis.

Conclusion: Transgenic embryonic stem cell-derived cardiomyocytes are a model for evaluation of doxorubicin toxicity. Additionally, this model provides us with a clinical suggestion, which proposes that the beneficial effect of dexamethasone is obtained when added only before doxorubicin. In addition, the results of present study were consistent with in vivo result in mice.

Keywords: Mouse transgenic embryonic stem cell, Cardiomyocytes, Doxorubicin, Dexamethasone, Apoptosis, Cardiotoxicity

Citation: Dehghani L, Farokhpour M, Haeri-Rohani A, Poorazizi E, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. **Genetically Engineered Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Suitable Model on Drugs Toxicity Assessment in Vitro.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(259): 1779-86

1- Instructor, Department of Neurology, Isfahan Neurosciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Stem Cell and Molecular Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Animal Biotechnology, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Medical Sciences, School of Medicine, Islamic Azad University, Najafabad Branch, Isfahan, Iran

5- Associate Professor, Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

Corresponding Author: Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD, Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org