مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱٤/هفته چهارم دی ماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۴

بررسی اثرات مقایسه‌ای اکستازی و مت‌آمفتامین بر روی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش رده‌ی Royan-B1 به سلول‌های عصبی

لیلا دهقانی[۱]، دکتر رخساره معمار[۲]

چکیده

مقدمه: متیلن دی اکسی مت‌آمفتامین (اکستازی) و مت‌آمفتامین از دسته‌ی آمفتامین‌ها هستند که سمیت آن به خصوص بر روی سیستم عصبی سروتونرژیک و دوپامینرژیک ثابت شده است. هدف این مطالعه، مقایسه‌ی اثرات اکستازی و مت‌آمفتامین بر روی تمایز عصب و ژن‌های مختص عصبی با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی موش بود.

روش‌ها: غلظت‌های مصرفی اکستازی ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ میکرومول و مت‌آمفتامین ۱۰، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بود که از روز صفر طبق پروتکل توصیفی به محیط‌ها اضافه شد. اثرات سمی داروها بر روی نورون‌ها، در طی تمایز عصبی (گروه اول) و پس از تمایز (گروه دوم) و نیز اثرات دارو بر روی بیان ژن‌های ویژه عصبی در هر دو گروه برای هر دو دارو ارزیابی شد. تمایز سلول عصبی هفت روز پس از کشت اجسام جنینی با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. مهار تمایز عصبی این داروها با توجه به کاهش ۵۰ درصدی تشکیل نورون‌ها در مقایسه با گروه شاهد محاسبه گردید.

یافته‌ها: تمایز عصبی اکستازی در گروه اول ۵۰ میکرومولار و در گروه دوم ۱۲۰ میکرومول بود. تمایز عصبی مت‌آمفتامین در گروه اول ۱۳۰ میکرومولار و در گروه دوم ۴۰۰ میکرومولار به دست آمد. بیان MAP2 بر خلاف بیان Nestin ۷ روز بعد ازکشت اجسام جنینی همراه با داروها در گروه اکستازی در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار دارو در گروه اول و غلظت ۲۰۰ میکرومولار در گروه دوم و در گروه مت‌آمفتامین در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار در گروه اول و ۵۰۰ میکرومولار در گروه دوم کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که اکستازی و مت‌آمفتامین بر روی تمایز عصبی تأثیر داشتند. بیشترین اثرات سمی دارو در طول مرحله‌ی انتقال از سلول‌های پیش‌سازی به سمت سلول‌های عصبی بالغ می‌باشد. بنابراین سلول‌های بنیادی می‌توانند به عنوان مدلی مناسب در درمان بیماری‌ها و مطالعات بیولوژی سلولی و تکاملی و بررسی اثر عوامل مختلف بر مراحل مختلف تکوین جنین پستانداران باشند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی، تراتوژنیسیتی، تمایز عصبی، متیلن دی اکسی مت‌آمفتامین، مت‌آمفتامین

مقدمه

در علوم داروسازی صنعتی و شیمیایی به طور معمول برای بررسی میزان سمیت مواد دارویی جدید از روش‌های غربالگری استفاده می‌شود. در اولین مرحله‌ی غربالگری مشخصات سمی یک ماده‌ی شیمیایی قرار می‌گیرد (۱). یکی دیگر از مراتب غربالگری، بررسی میزان سمیت ترکیب برای جنین (Embryotoxicity) است که عبارت است از توانایی یک ماده در ایجاد جنین‌زایی غیر طبیعی و ناهنجار (۲-۱). مواد جهش‌زا، تراتوژن یا سمی می‌توانند اثرات نامطلوبی بر روی رشد و نمو جنین داشته باشند و یا به صورت غیر مستقیم باعث جهش‌هایی در سطح

[۱] مربی، گروه بیولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد و کارشناس پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

[۲] استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد و عضو هیأت پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده‌ی رویان، پایگاه تحقیقاتی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رخساره معمار
Email: meamar@pharm.mui.ac.ir

DNA و به دنبال آن تغییراتی در تکوین جنینی شوند. به علاوه نقایص تکوینی می‌توانند در نتیجه‌ی تداخل با فرایندهای تنظیمی تکثیر در سطح ژن و تمایز در سطح پروتئین حاصل شوند. اختلال در این فرایندها می‌تواند منجر به جنین‌زایی غیر طبیعی و بد شکلی شود. قدرت تراتوژنیستی یک ترکیب به عنوان خطرناک‌ترین مشخصه‌ی آن محسوب می‌شود و بنابراین بررسی سمیت ترکیبات شیمیایی و مواد دارویی حایز اهمیت می‌باشد (۲).

در این راستا تست‌های ثبت‌شده‌ی فراوانی وجود دارند که از حیوانات آزمایشگاهی برای بررسی سمیت در طی مراحل رشد و نمو استفاده می‌کنند. با توجه به افزایش تولید مواد شیمیایی و دارویی و همچنین محدودیت‌های اخلاقی در استفاده از حیوانات آزمایشگاهی، جایگزینی به شکل استفاده از روش‌های آزمایشگاهی (In vitro) می‌تواند از اهمیت بسزایی برخوردار باشد. یکی از روش‌های آزمایشگاهی استفاده از رده‌های سلولی در علوم سم‌شناسی می‌باشد. اگر چه رده‌های سلولی می‌توانند برای مطالعات زیستی مناسب باشند ولی مدل مناسبی برای بررسی تکوین جنینی نیستند زیرا در این سلول‌ها یا تمایز اتفاق افتاده است و یا قدرت تمایز وجود ندارد (۴-۲). اما سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌هایی پرتوان (Pluripotency) می‌باشند که از توده‌ی داخلی بلاستوسیست موش و یا انسان مشتق می‌شوند و قادر هستند که تحت شرایط مناسب به رده‌های مختلف سلولی تمایز یابند. استفاده از این سلول‌ها در سلول‌درمانی و آثار سمیت ناشی از داروها توجه زیادی را به خود معطوف کرده است (۵).

داروی توهم‌زای MA (Methamphetamine) و MDMA (3,4-Methylenedioxymethamphetamine) از گروه مت‌آمفتامین‌ها هستند که به ترتیب تحت عنوان Ice و Ecstasy شناخته می‌شوند. این داروها از مشکلات رو به پیشرفت دهه‌ی اخیر می‌باشند. ثابت شده است که جایگزین‌های آمفتامین برای سلول‌های عصبی ایجاد سمیت می‌کنند (نوروتوکسیسیتی). این سمیت توسط مت‌آمفتامین‌ها با تخلیه‌ی طولانی مدت دوپامین و سروتونین همراه است. چندین فرضیه در مورد سمیت این گروه دارویی مطرح شده است (۷-۶). با توجه به این که اکستازی و مت‌آمفتامین از جمله داروهایی هستند که در سنین جوانی و به تبع آن در سنین باروری بسیار مورد سوءاستفاده قرار می‌گیرند، لزوم بررسی امبریوتوکسیتی این داروها روشن می‌باشد.

این مطالعه با هدف بررسی اثر داروهای ذکرشده بر روی تمایز سلول‌های عصبی در طی دو مرحله و بیان ژن‌های مختص عصبی با استفاده از سلول‌های عصبی مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی جنینی موش بود.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر در کمیته‌ی اخلاق پژوهشکده‌ی رویان به تصویب رسید و استفاده از سلول‌های بنیادی به جای کار بر روی حیوان، از نظر اخلاقی مورد تأیید قرار گرفت.

برای انجام کشت سلولی و تمایز سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی جنینی موش (Royan-B1 یا RB1) از نژاد C57BL/6 از پژوهشکده‌ی رویان تهیه شدند. تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول بنیادی جنینی موش رده‌ی RB1 در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 شش درصد روی فیبروبلاست‌های جنینی موش با میتومایسین

(Sigma.M0503) تیمار شدند و در محیط KDMEM (۰۱۸–۱۰۸۲۹) حاوی ES-FBS (Gibco 079-16141) ۱۰ درصد و عامل مهارکننده‌ی لوسمی (LIF یا Leukemia inhibitory factor) ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر (Chemicon.ESG 1107) کشت داده شدند. برای تمایز این سلول‌ها به عصب از روش قطرات آویزان (Hanging drops) استفاده شد. در این روش هر قطره حاوی ۱۰۰۰ سلول بود که روز اول کاشت سلول‌ها به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. سلول‌ها به مدت سه روز به صورت قطرات آویزان بودند. به دنبال آن بر طبق پروتکل ۲+/۲/+۲–، بعد از تشکیل اجسام جنینی (۲–) ، رتینوئیک اسید (RA) به اجسام جنینی اضافه و به مدت ۲ روز در محیط (۲+) ES-FCS K-DMEM ۱۰ درصد نگهداری شد و به طور مجدد محیط برای ۲ روز با RA تعویض گردید (۲+). چهار روز پس از سوسپانسیون، اجسام جنینی در ظروف ۲۴ خانه در محیط حاوی ES-FCS۵ ۵ درصد کشت داده شدند (۸).

اثرات اکستازی و مت‌آمفتامین بر روی تمایز عصبی بعد از تعیین منحنی دوز– پاسخ در دو گروه مجزا ارزیابی شدند. در گروه اول اکستازی در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار MDMA (Aldrich, M6403) یک بار در طول تشکیل اجسام جنینی از روز صفر تا روز ۱۰ اضافه گردید. در گروه دوم غلظت‌های مذکور از روز ششم به بعد و بعد از القای RA یا تشکیل پیش‌سازهای عصبی تا روز ۱۰ اضافه گردید. مت‌آمفتامین درگروه اول با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار و در گروه دوم با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار استفاده شد. حداقل برای هر دوزی از داروها ۷۵ تا ۱۰۰ جسم جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت. مراحل تمایز عصبی این اجسام با میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. مهار تمایز عصبی این دارو با توجه به کاهش تشکیل نورون به ۵۰ درصد در هر دو دارو، در گروه‌های یک و دو در مقایسه با گروه شاهد (ID50 N) محاسبه گردید. ID50 N نشان‌دهنده‌ی ۵۰ درصد مهار تمایز عصبی سلول‌های بنیادی در مقایسه با گروه شاهد بود که در گروه اول نشان‌دهنده‌ی افزودن دارو در طول تشکیل اجسام جنینی از روز صفر تا روز ۱۰ و در گروه دوم نشان‌دهنده‌ی افزودن دارو بعد از القای RA یا تشکیل پیش‌سازهای عصبی تا روز ۱۰ بود.

۷ روز پس از کشت اجسام جنینی غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار اکستازی و غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار مت‌آمفتامین و گروه شاهد برای انجام RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction analysis) انتخاب شد. کل RNA سلولی از سلول‌های کشت داده شده با استفاده از RNeasy Mini kit (Qiagen, Spain) استخراج شد. قبل از سنتز cDNA نمونه‌های RNA با DNase I (Fermentas, EN 0521) تیمار شدند تا هر گونه آلودگی RNA به DNA ژنومیک از بین برود. سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم Total RNA و Random hexamer primer revertaid H minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas; K 1622) بر طبق پروتکل انجام شد. تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ۲ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) از نمونه‌های cDNA صورت گرفت.

شرایط PCR به شرح زیر بود: دناتوره (واسرشت) شدن در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و

سپس ۳۵ سیکل شامل دناتوره (واسرشت) شدن در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن پرایمر دما برای پرایمرهای مختلف طبق جدول ۴۵ ثانیه، Extension (گسترش) ۴۵ ثانیه‌ای در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

آزمون PCR در سه نوبت انجام گردید. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با ترانس لومینیناتور عکس‌برداری شد. آنالیز عکس‌ها (باندها) با استفاده از نرم‌افزار Gene tools انجام شد. MAP2 و Nestin (Syn Gene, Korea) به عنوان مارکرهای نورونی و β-tubulin به عنوان ژن خانه‌گردان قبل و بعد از القای عصبی مورد بررسی قرار گرفتند. توالی پرایمرهای فوق به شرح زیر بود:

Nestin (Forward, ۵'-ctctgacctgtcagaagaat-۳') and (Reverse, ۵'-cccactttcttcctcatctg-۳'), and MAP-2 (Forward, ۵'-gccgaaaaccacagcagcaag-۳') and (Reverse, ۵'-ttggaggagtgcggatgatgg-۳') β-tubulin (Forward, ۵'-gttcccacgtctccacttcttc-۳') and (Reverse, ۵'-ccaggtcattcatgttgctctc-۳').

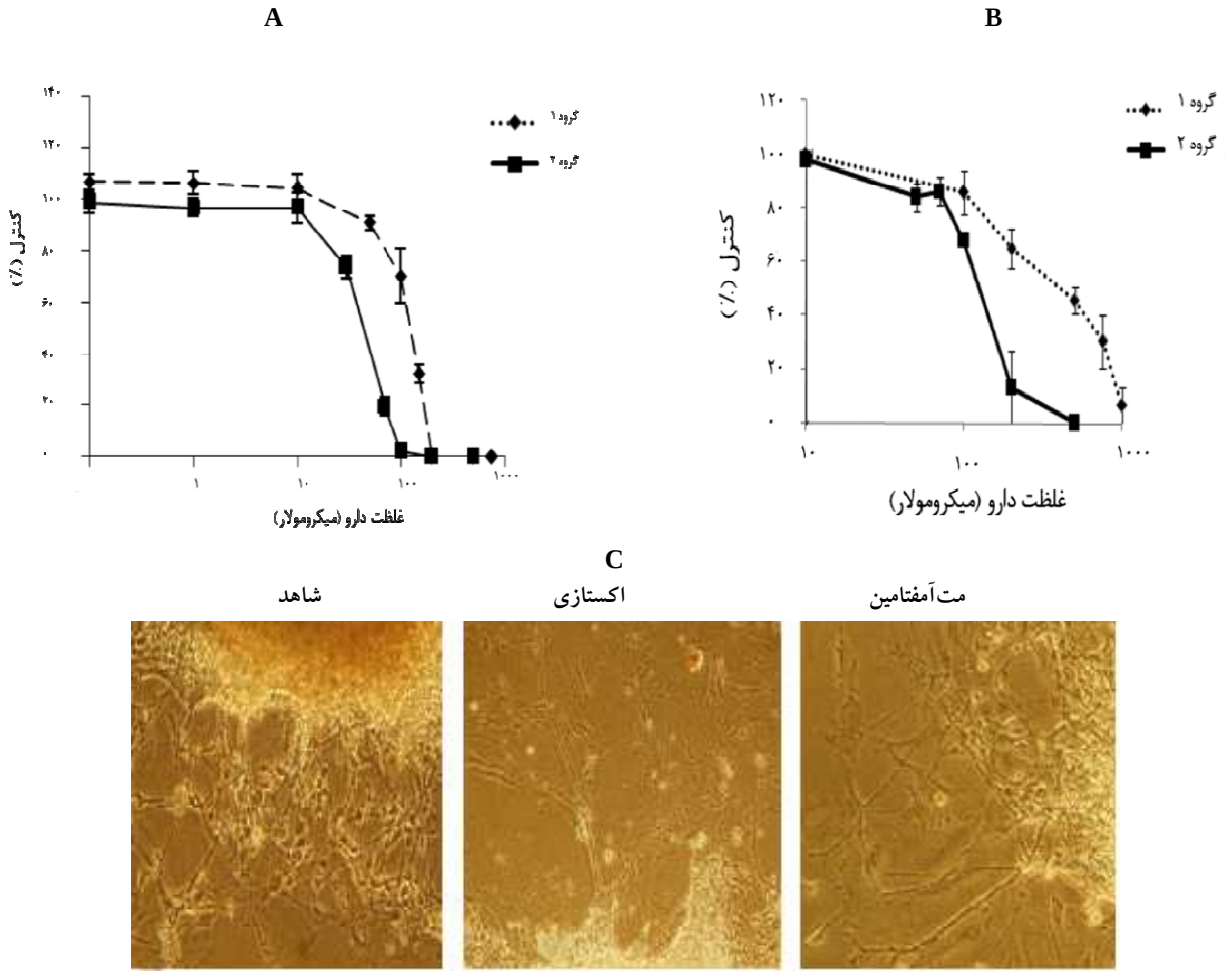
نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

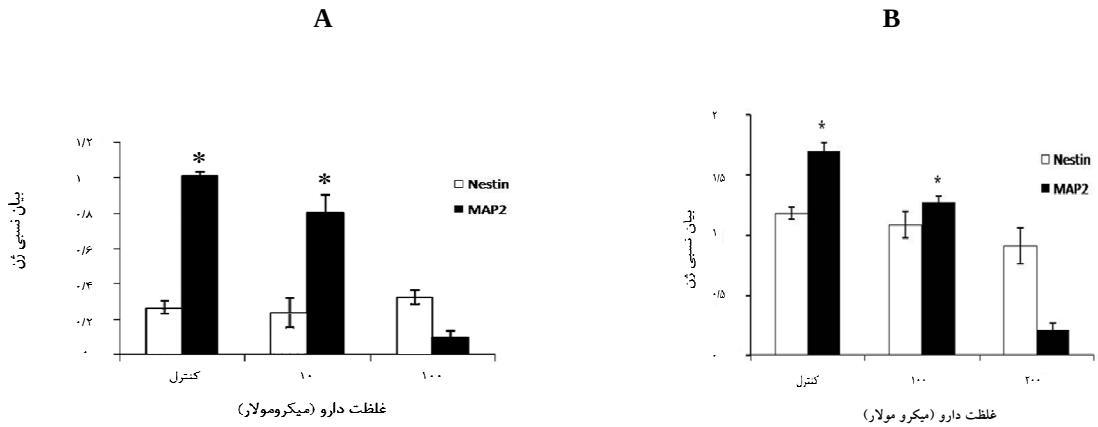
اثر غلظت‌های متفاوتی از اکستازی و مت‌آمفتامین بر روی تمایز در سلول‌های بنیادی آزمایش شد. با توجه به اثرات قوی نوروتوکسیسیتی اکستازی و مت‌آمفتامین، اثرات این دو دارو در طی تمایز نورونی و نیز بر روی نورون‌های مشتق‌شده از اجسام جنینی بررسی گردید. شکل ۱ نمایانگر منحنی دوز پاسخ برای بررسی تمایز گروه ۱ و بقای نورونی در گروه ۲ پس از اضافه کردن دارو و تصاویر فاز کنتراست ID50 دو دارو در گروه ۱ در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. در گروه اکستازی میزان ID50 برای تمایز نورونی ۵۰ میکرومولار بود، در حالی که برای بقای نورونی ۱۲۰ میکرومولار و در گروه مت‌آمفتامین میزان ID50 برای تمایز نورونی ۱۳۰ میکرومولار و برای بقای نورونی ۴۰۰ میکرومولار گزارش شد.

برای تصدیق مشخصات نورونی ایجادشده RT-PCR انجام شد. شکل ۲ نشانگر بیان ژن‌های مختص سلول‌های عصبی در گروه اول که با اکستازی (A) و مت‌آمفتامین (B) تیمار شدند، می‌باشد. آنالیز RT-PCR ۷ روز بعد از کشت اجسام جنینی همراه با دارو نشان داد که در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار دارو، بیان MAP2 بر خلاف بیان Nestin کاهش پیدا کرده است که البته این اختلاف معنی‌دار بود.

شکل ۳ نیز نشانگر بیان ژن‌های مختص سلول‌های عصبی در گروه دوم است که با اکستازی (A) و مت‌آمفتامین (B) تیمار شدند، و بیانگر آن است که طی آنالیز RT-PCR ۷ روز بعد از کشت اجسام جنینی در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار اکستازی بیان MAP2 بر خلاف بیان Nestin در بقای نورونی کاهش پیدا کرد، ولی اختلاف موجود معنی‌دار نبود. برعکس در گروهی که با مت‌آمفتامین تیمار شدند این اختلاف معنی‌دار بود.

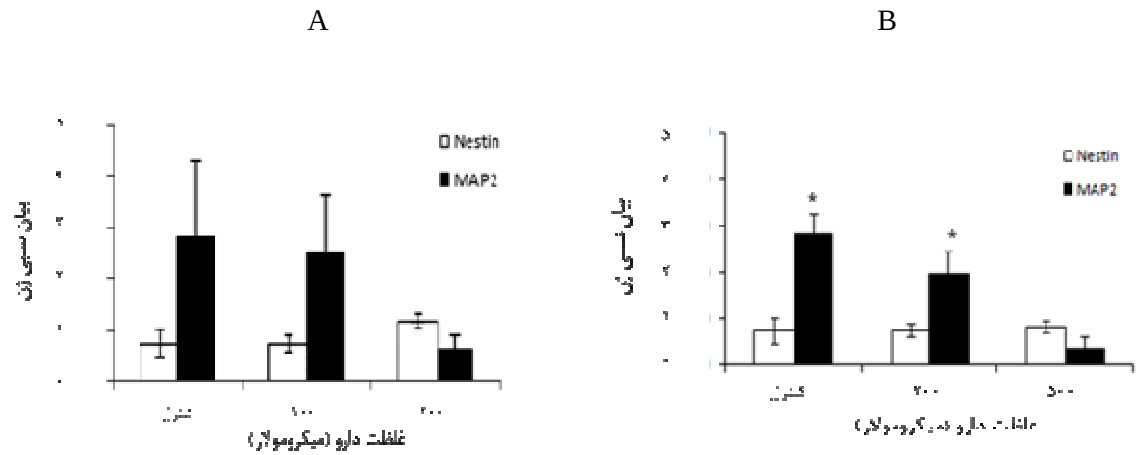


شکل ۱. اثرات غلظت‌های متفاوت اکستازی (A) و مت‌آمفتامین (B) در طول تمایز نورونی (گروه ۱) و بعد از تمایز نورونی (گروه ۲)، شکل C تصاویر فاز کنتراست گروه شاهد و گروه‌های اکستازی و مت‌آمفتامین در غلظت ID50 طی تمایز نورون (بزرگ‌نمایی ۱۰۰ UM)



شکل۲. اثرات اکستازی (A) و مت‌آمفتامین (B) بر روی بیان ژن در طی تمایز نورونی

***: اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) با گروه ۱۰۰ میکرومولار دارو در شکل A و با گروه ۲۰۰ میکرومولار در شکل B**



شکل ۳. اثرات اکستازی (A) و مت‌آمفتامین (B) بر روی بیان ژن در طی بقای نورونی
***: اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) با گروه ۵۰۰ میکرومولار دارو**

بحث

اجسام جنینی مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی، مدل آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی مطالعات تکوینی و انجام آزمایشات بررسی سمیت جنینی می‌باشند. مدل‌های مختلفی جهت بررسی سمیت مواد شیمیایی با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی پیشنهاد شده است که تمامی این مطالعات کوتاه مدت بودند و اطلاعات کافی جهت بررسی مشخصات سمیت دارویی را ارائه نمی‌دادند (۹-۸). در این مطالعه سعی بر آن شد تا میزان اثرات توکسیک اکستازی و مت‌آمفتامین به صورت مقایسه‌ای بر روی تمایز عصبی و بیان ژن‌های ویژه عصبی با استفاده از سلول‌های عصبی مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی جنینی موش ارزیابی شود.

داروی اکستازی و مت‌آمفتامین از دسته‌ی آمفتامین‌ها می‌باشند که به علت وزن مولکولی پایین و قابلیت حل در چربی به راحتی از جفت می‌گذرند (۱۰). بسیاری از افراد مصرف‌کننده در سنین باروری هستند و بنابراین جنین حتی زمانی که مادر از بارداری خود بی‌اطلاع است در معرض خطر می‌باشد و از این رو بررسی اثرات توکسیک این دارو مهم است (۱۲-۱۱).

در مطالعات قبلی نشان داده شد که به دنبال مصرف دارو توسط مادر در مایع آمنیوتیک و بافت‌های جنینی به خصوص در مغز جنین نیز دارو قابل ردیابی است. نتایج مطالعات قبلی حاکی از آن است که این داروها پایانه‌های دوپامینرژیک و سروتونرژیک را در مغز درگیر می‌کنند و عواملی همچون استرس اکسیداتیو، نقص عملکردی میتوکندری و بالاخص نوروتوکسیسیتی را به همراه دارند. بر اساس شواهد پیشین وابستگی به مت‌آمفتامین آسیب‌های عصبی طولانی مدتی را باعث می‌شود (۱۳-۱۰).

همچنین مطالعه‌ای در محیط آزمایشگاه نشان داد که با افزایش دوز دارو استطاله‌های دندریتی و اندازه‌ی اجسام جنینی کاهش می‌یابد (۱۴). بر اساس مطالعات گذشته که نشان دادند که اکستازی و مت‌آمفتامین مسیرهای آپوپتوتیک و کاسپازی را فعال می‌کنند، شاید کاهش این استطاله‌ها مربوط به فعال شدن مسیرهای آپوپتوز باشد (۱۶-۱۴).

مصرف اکستازی و مت‌آمفتامین در مادر علاوه بر

www.mui.ac.ir

ناهنجاری‌های قلبی- عروقی باعث نمو غیر طبیعی نورونی در جنین می‌گردد (۱۰). با در نظر گرفتن این واقعیت که اکستازی و مت‌آمفتامین داروهایی با پتانسیل آسیب عصبی شدید می‌باشند (۱۶، ۱۴)، در این مطالعه اثرات سمی دارو بر روی تمایز نورون‌های مشتق‌شده از اجسام جنینی و بیان ژن‌های مختص عصبی نیز مورد بررسی قرار گرفت. همان طوری که نتایج نشان دادند ID50 عصبی در اکستازی ۵۰ میکرومولار و در مت‌آمفتامین ۱۳۰ میکرومولار بود که نشان‌دهنده‌ی اثرات توکسیک بیشتر اکستازی در مقایسه با مت‌آمفتامین در محیط آزمایشگاه می‌باشد. مطالعات قبلی نیز اثرات سمیت عصبی تجویز اکستازی را هم در In vivo (نوزاد رت) و هم در محیط آزمایشگاه برای نورون‌های دوپامین مغز و سلول‌های نورونی گرانولر مخچه‌ای و نورون‌های نوروکورتیکال رت نشان داده است (۱۸-۱۷، ۱۱، ۹، ۷).

جهت تأیید این یافته‌ها در سطح مولکولی ۷ روز پس از کشت اجسام جنینی همراه با دارو، آنالیز RT-PCR انجام شد که نتایج آن نشان داد که در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار اکستازی و ۲۰۰ میکرومولار مت‌آمفتامین، بیان MAP2 که یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سیتواسکلتال نورون‌های بالغ می‌باشد، کاهش پیدا کرد. این آنالیز برای نورون‌های مشتق‌شده از اجسام جنینی هم انجام گردید و نشان داده شد که در دوزهای بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار اکستازی و ۵۰۰ میکرومولار مت‌آمفتامین دارو چنین اختلافی دیده شد. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که هم در In vivo و هم در محیط آزمایشگاه (Organotypic rat hippocampus cultures) در بیان MAP2 بین گروه شاهد و گروه تیمار با اکستازی بر خلاف مت‌آمفتامین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اختلافی دیده نمی‌شود. به نظر می‌رسد داروی اکستازی عملکرد طبیعی تمایز نورونی را مهار می‌کند و از بالغ شدن و شکل‌گیری نهایی آن‌ها جلوگیری می‌نماید و نتیجه‌ی آن کاهش بیان MAP2 در گروه تیمار با دارو می‌باشد. به دنبال کاهش نورون بالغ، شکل‌گیری نورون‌های نابالغ زیادتر می‌شود و این می‌تواند بیان‌کننده‌ی علت افزایش بیان Nestin که پروتئینی است که در نورون‌های نابالغ بیان می‌شود، در گروه‌های دارویی که در آن میزان بیان MAP2 کاهش پیدا کرده است، باشد (۲۱-۱۹).

مت‌آمفتامین به گونه‌ای انتخابی اثرات نوروتوکسیک خود را بر روی پایانه‌های سروتونرژیک اعمال می‌کند. بر اساس مطالعات قبلی به نظر می‌رسد اکستازی بر خلاف مت‌آمفتامین پایانه‌های دوپامینرژیک و ۵-هیدروکسی تریپتامین را نیز درگیر می‌کند و باعث کاهش محتوای دوپامینی بافتی می‌شود. همچنین نشان داده شده است که مت‌آمفتامین باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود، در حالی که اکستازی باعث افزایش مصرف گلوکز خارج سلولی و کاهش مصرف گلیکوژن می‌شود (۲۲).

میزان سمیت عصبی بستگی به این دارد که جنین در چه مرحله‌ای در مواجهه با دارو قرار گیرد. یکی از علل حساسیت بالای سلول‌های پیش‌ساز عصبی در مقایسه با نورون‌های مشتق‌شده از اجسام جنینی این است که طی تمایز عصبی سلول‌های بنیادی انواع مختلفی از سلول‌های عصبی شکل می‌گیرند و از آن جا که مت‌آمفتامین بیشتر بر روی رشته‌های دوپامینرژیک و اکستازی بر روی رشته‌های سروتونرژیک در مقایسه با سایر رشته‌های عصبی

سمی هستند، ممکن است بر روی سلول‌های دیگر سمیت کمتری ایجاد می‌کنند. از علل دیگر این اختلاف حساسیت می‌توان به این نکته اشاره کرد که ترکیبات مت‌آمفتامین و پرودوپامینرژیک‌ها سیکل سلولی سلول‌های پیش‌ساز را به شکل منفی کنترل می‌کنند و مانع ورود سلول از فاز G به فاز S می‌شوند. این نشان می‌دهد که هر دو دارو بر روی جمعیتی از سلول‌های پیش‌ساز که در حال بسط و توسعه هستند در مقایسه با سلول‌های بالغ بیشتر سمی است و این توجیهی بر اثرات سمی بیشتر داروها در طی دوران تمایز می‌باشد. تماس با داروهای ذکرشده در طی این دوره می‌تواند اختلال در تمایز اکتودرم عصبی به نورال تیوب و به تبع آن مشتقات آن را تحت تأثیر قرار دهد (۲۴-۲۳).

نتایج ما نشان داد که اکستازی و مت‌آمفتامین بر روی تمایز عصبی تأثیر دارد و لازم به ذکر است که اثرات دارو در طی تمایز عصبی بیشتر است و بیشترین اثرات سمی دارو در طول مرحله‌ی انتقال از سلول‌های پیش‌سازی به سمت سلول‌های عصبی بالغ می‌باشد. این امر تأثیر بسیار مهمی در رشد و تکامل جنینی در هفته‌ی سوم و در ایجاد نورواکتودرم و نوروایی‌تلیوم ایفا می‌نماید. در ضمن نورون‌هایی که از سلول‌های بنیادی مشتق می‌شوند نمای نورون طبیعی را دارند و به طور کامل حساسیت به مرگ را بعد از تماس داروها نشان می‌دهند و می‌توانند مدل مناسبی برای بررسی سمیت عصبی باشند (۲۵).

پیشنهاد ما این است که یک مطالعه در جهت تحکیم یافته‌های ما در In vivo و بررسی اثرات دارو در نورال تیوب در مرحله‌ی جنینی صورت گیرد که نشان دهد آیا یافته‌های In vivo با یافته‌های In vitro تطابق دارد یا خیر؟

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۱۳۸۹۱ می‌باشد که در پژوهشگاه رویان اصفهان تصویب شد. از همکاری استادان محترم مرکز تحقیقات علوم اعصاب اصفهان و پژوهشکده‌ی رویان گروه سلول‌های بنیادی قدردانی می‌شود.

References

1. 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.
2. Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. Toxicol In Vitro 2001; 15(6): 741-53.
3. Pouton CW, Haynes JM. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57(13): 1918-34.
4. Gorba T, Allsopp TE. Pharmacological potential of embryonic stem cells. Pharmacol Res 2003; 47(4): 269-78.
5. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17: 435-62.
6. Kita T, Wagner GC, Nakashima T. Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption. J Pharmacol Sci 2003; 92(3): 178-95.
7. Simantov R. Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). Life Sci 2004; 74(7): 803-14.
8. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol 1995; 168(2): 342-57.
9. Scholz G, Pohl I, Genschow E, Klemm M, Spielmann H. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: correlation to in vivo teratogenicity. Cells Tissues Organs 1999; 165(3-4): 203-11.
10. Meyer JS, Grande M, Johnson K, Ali SF.

Neurotoxic effects of MDMA ("ecstasy") administration to neonatal rats. Int J Dev Neurosci 2004; 22(5-6): 261-71.
11. Colado MI, O'Shea E, Granados R, Misra A, Murray TK, Green AR. A study of the neurotoxic effect of MDMA ('ecstasy') on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. Br J Pharmacol 1997; 121(4): 827-33.
12. Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Fukuda M, Kitaichi K, Miyoshi K, et al. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone-formation-related molecules. FASEB J 2006; 20(3): 571-3.
13. Meamar R, Karamali F, Sadeghi HM, Etebari M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. Toxicity of ecstasy (MDMA) towards embryonic stem cell-derived cardiac and neural cells. Toxicol In Vitro 2010; 24(4): 1133-8.
14. Goodwin JS, Larson GA, Swant J, Sen N, Javitch JA, Zahniser NR, et al. Amphetamine and methamphetamine differentially affect dopamine transporters in vitro and in vivo. J Biol Chem 2009; 284(5): 2978-89.
15. Stumm G, Schlegel J, Schafer T, Wurz C, Mennel HD, Krieg JC, et al. Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. FASEB J 1999; 13(9): 1065-72.
16. Meamar R, Dehghani L, Karamali F. Toxicity effects of methamphetamine on embryonic stem cell-derived neuron. J Res Med Sci 2012; 17(5): 470-4.
17. Cui C, Sakata-Haga H, Ohta K, Nishida M, Yashiki M, Sawada K, et al. Histological brain alterations following prenatal methamphetamine exposure in rats. Congenit Anom (Kyoto) 2006; 46(4): 180-7.
18. Frost DO, Cadet JL. Effects of methamphetamine-induced neurotoxicity on the development of neural circuitry: a hypothesis. Brain Res Brain Res Rev 2000; 34(3): 103-18.
19. Sveen ML, Knudsen GM, Aznar S. No effect of MDMA (ecstasy) on cell death and 5-HT2A receptor density in organotypic rat hippocampal cultures. Neurosci Lett 2004; 362(1): 6-9.
20. Putzke J, Spina MG, Buchler J, Kovar KA, Wolf G, Smalla KH. The effects of p-chloroamphetamine, methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) on the gene expression of cytoskeletal proteins in the rat brain. Addict Biol 2007; 12(1): 69-80.
21. Spina MG, Grecksch G, Kovar KA, Wolf G, Putzke J. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) and c-fos expression in the rat prefrontal cortex following subchronic treatment with substituted amphetamines. Ann N Y Acad Sci 2000; 914: 65-70.
22. Quinton MS, Yamamoto BK. Causes and consequences of methamphetamine and MDMA toxicity. AAPS J 2006; 8(2): E337-E347.
23. Hernandez-Rabaza V, Dominguez-Escriba L, Barcia JA, Rosel JF, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM, et al. Binge administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") impairs the survival of neural precursors in adult rat dentate gyrus. Neuropharmacology 2006; 51(5): 967-73.
24. Bento AR, Baptista S, Malva JO, Silva AP, Agasse F. Methamphetamine exerts toxic effects on subventricular zone stem/progenitor cells and inhibits neuronal differentiation. Rejuvenation Res 2011; 14(2): 205-14.
25. Qu Y, Vadivelu S, Choi L, Liu S, Lu A, Lewis B, et al. Neurons derived from embryonic stem (ES) cells resemble normal neurons in their vulnerability to excitotoxic death. Exp Neurol 2003; 184(1): 326-36.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 214, 4th week, January 2013 Received: 1.10.2012 Accepted: 4.12.2012

Comparison of the Effects of Ecstasy and Methamphetamine on the RB1 Mouse Embryonic Stem Cells Differentiation into Neural Cells

Leila Dehghani MSc[1], Rokhsareh Meamar MD, PhD[2]

Abstract

Background: N-Methyl-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methamphetamine (MA) from the amphetamine family, which are respectively known as ecstasy and ice, have well-established neurotoxic effects on the serotonergic and dopaminergic systems. Regarding the fact that MDMA and MA are primarily used as recreational drugs and are commonly used during child bearing period, there is a major concern on the embryonic and fetal toxicity of these drugs. We have used different methods for screening models but recently embryonic stem cells give us new method for easier and faster way in evaluation of potential toxicity of drug.

Methods: We used embryonic stem cells-derived neuronal cells to determine 50% infectious does (ID50) in both groups. ID50C reflects 50% inhibition of embryonic stem cells on neural differentiation. The effect of MDMA and MA on neural differentiation was assessed during two periods: group 1 (throughout the process of neural differentiation), group 2 (during post-plating). Afterwards, the cells were evaluated for neuronal markers by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR). A concentration range of MDMA (0.1, 1, 10, 100, 200, 500, 750, 1000 µM) and of MA (10, 50, 70, 100, 200,500, 750, 1000 µM) was applied to the cells from day 0 onwards throughout the entire culture duration as described.

Findings: Considering the fact that MDMA and MA are potent neurotoxic drugs, we evaluated their effects during neuronal differentiation and on the survival of embryonic derived neurons. The ID50 for neural differentiation was 50 µM and 130 µM, while for neuronal survival was 120 µM and 400 µM, respectively in MDMA and MA groups. At 7 days post-plating, RT-PCR analysis revealed that unlike the nestin, the expression of MAP2 at concentrations higher than 100 and 200 µM of MDMA and 200 and 500 µM of MA in groups 1 and 2, respectively, was significantly reduced.

Conclusion: Our findings have documented that early phase of neural development which coincides with neural tube formation is more sensitive than the later phase when neural precursor cells differentiate into mature neurons. Regarding the embryonic stem cells capabilities such as tissue-specific properties especially in the formation of neuroectodermal and mesodermal cells, they could be served as a system to evaluate inhibiting or inducing effects on differentiation processes in early embryonic stages.

Keywords: Stem cells, Cell differentiation, Toxicity, N-Methyl-3,4-methylenedioxyamphetamine, Methamphetamine

[1] Lecturer, Department of Biology, School of Medical Science, Islamic Azad University, Najafabad Branch AND Neurosciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Pharmacology,School of Medical Science, Islamic Azad University, Najafabad Branch AND Faculty Member, Neurosciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences AND Department of Stem Cells, Cell Science Research Center, Royan Institute, Isfahan Campus, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Rokhsareh Meamar MD, PhD, Email: meamar@pharm.mui.ac.ir