مقاله پژوهشی

بررسی اثر سمیت متامفتامین بر سلول‌های بنیادین مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی موش‌های صحرایی

فریبا جعفری شیبانی[۱]، سید ابراهیم حسینی[۱*]، داود مهربانی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲. مرکز تحقیقات سوختگی و زخم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: متامفتامین به‌عنوان یک ماده توهم‌زا و اعتیادآور بوده که سو مصرف آن یک مشکل فراگیر جهانی است. ایجاد سمیت سلولی در سلول‌های مختلف به‌ویژه در سلول‌های عصبی از اثرات گزارش‌شده از این ماده روان‌گردان است لذا این مطالعه باهدف بررسی اثر سیتوکسیسیتی متامفتامین بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ استخراج‌شده از بافت چربی موش‌های صحرایی نر انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی موش‌های صحرایی بالغ نر استخراج شد و پس از کشت آن‌ها، مزانشیمی بودن آن‌ها با روش فلوسایتومتری و به‌واسطه آنتی‌بادی‌های کونژگه CD34- RPE، CD90-RPE و CD105-RPE تائید گردید، در پاساژ سوم کشت سلولی، اثر سمیت متامفتامین در غلظت ۰/۶ میلی‌مولار در طول مدت ۱ الی ۷ روز بر روند رشد این سلول‌ها توسط تست MTT بررسی گردید.

نتایج: سلول‌های جداشده از بافت چربی، ۲۴ ساعت بعد از انتقال به فلاسک کشت سلولی، کاملاً به کف فلاسک چسبیدند. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بیان نشانگر سطحی اندوتلیالی (CD34) منفی و بیان نشانگرهای سلول‌های مزانشیمی (CD90, CD105) مثبت بود که نشان‌دهنده هویت بنیادی سلول‌های استخراج‌شده بود. نتایج آزمون MTT نیز حاکی از کاهش معنادار رشد سلول‌های تیمار شده با ۰/۶ میلی‌مولار متامفتامین در مقایسه با گروه کنترل در سطح $p<۰/۰۵$ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد که متامفتامین با داشتن اثرات سمیت سلولی، باعث مهار رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی می‌گردد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، متامفتامین، موش صحرایی

مقدمه

متامفتامین (METH) یکی از داروهای روان‌گردان بسیار اعتیادآور است که به گروه داروهای محرک آمفتامینی تعلق دارد. متامفتامین تحت عناوین N- متیل آمفتامین، متیل آمفتامین و دزوکسی افدرین شناخته می‌شود (۱). متامفتامین به اشکال پودر یا کریستال وجود دارد (۲). سوءاستفاده از این ماده مخدر و توهم‌زای ارزان‌قیمت به دلیل تولید و دسترسی آسان یک مشکل جهانی برای سلامت انسان‌ها است. سوءاستفاده از متامفتامین به‌ویژه در مناطق شرق و جنوب شرقی آسیا و همچنین در آمریکای شمالی بیش از سایر نقاط دنیا است (۳). استفاده طولانی‌مدت از METH علاوه بر علائم و سندروم‌های روانی، باعث بیمارهای قلبی عروقی و حتی مرگ ناگهانی می‌شود (۴، ۵). مصرف METH می‌تواند باعث تحلیل برخی از اندام‌های حیاتی ازجمله مغز، قلب و کبد شود، همچنین منجر به سخت شدن دیواره عروق کرونری، فیبروزی شدن ریه و انسداد مجاری کبدی می‌گردد (۶، ۷). در صورت استفاده روزانه از METH،

*نویسنده مسئول: **سید ابراهیم حسینی**، گروه زیست‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
Email: ebrahhim.hossini@yahoo.com
http://orcid.org/0000-0003-0548-0114

بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادین کاهش می‌یابد و باعث تأخیر درروند پیشرفت چرخه سلولی می‌شود. مطالعات متعددی با استفاده از مدل‌های حیوانی، ایجاد استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی تولیدشده توسط METH را نشان داده است (۸). اگرچه مکانیسم‌های فارماکولوژیکی که این عملکردهای متنوع را تحت تأثیر قرار می‌دهد به‌خوبی شناخته‌نشده است، اما متامفتامین به‌طور عمده و متمرکز بر سیستم عصبی مرکزی تأثیر می‌گذارد و باز جذب دوپامین و دیگر نوروترانسمیترهای تک آمین را قطع می‌کند، همچنین باعث تسهیل رهاسازی این نوروترانسمیترها به درون فضای سیناپسی می‌گردد (۹). به‌طورکلی متامفتامین باعث تخلیه طولانی‌مدت و شدید نوروترانسمیترهای کاتکول آمینی نظیر دوپامین می‌شود و با داشتن خواص نوروتوکسیسیتی در سلول‌های عصبی ایجاد سمیت می‌کند (۱۰). نتایج حاصل از یک بررسی نشان داد که متامفتامین باعث تغییر بیان ژن‌های مؤثر در تکوین سیستم عصبی می‌گردد و باعث تغییر در پاسخ-های رفتاری، مرگ سلولی، رشد، مورفولوژی، تکثیر سلول‌های بنیادی یا پیش سازهای عصبی می‌شود (۱۱). سلول‌های بنیادی، سلول‌های سوماتیک تمایز نیافته‌ای هستند که دارای ویژگی‌های چندتوانی و خود نوسازی می‌باشند. این سلول‌ها، تحت شرایط خاص به سلول‌های بالغ کاملاً تمایزیافته تبدیل می‌شوند (۱۲). عملکرد ویژه سلول‌های بنیادی، در بازیابی و ترمیم بافت‌های بدن و در فرایند سلول درمانی است زیرا که این سلول‌ها با خودنوزایی تکثیر می‌شوند و ضمن حفظ نسل خویش، توانایی تولید سلول‌های تمایزیافته و بالغ یک بافت خاص را نیز دارند (۱۳). ظرفیت تمایز سلول‌های بنیادی به منشأ شکل‌گیری آن‌ها بستگی داشته و با یکدیگر متفاوت است (۱۴). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، قادر هستند به رده‌های مزانشیمی و غیرمزانشیمی تمایز یابند (۱۵). یکی از منابع استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ، بافت چربی است. دسترسی راحت و کم‌خطر به منابع بافت چربی، درصد بالای سلول‌های بنیادی موجود در این بافت، توان تکثیری بالا و امکان تأمین سلول‌های اتولوگ موردتوجه مقاصد درمانی نسبت به سایر منابع، ازجمله مزیت‌های این بافت است (۱۶). با توجه به آن‌که سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی، قادرند به رده‌های مختلف سلولی تمایز یابند (۱۷، ۱۸) لذا با عنایت به مصرف زیاد و روزافزون METH به‌ویژه در بین جوانان و نوجوانان، مطالعه حاضر باهدف بررسی اثرات متامفتامین بر رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی موش‌های صحرایی نر بالغ انجام گردید.

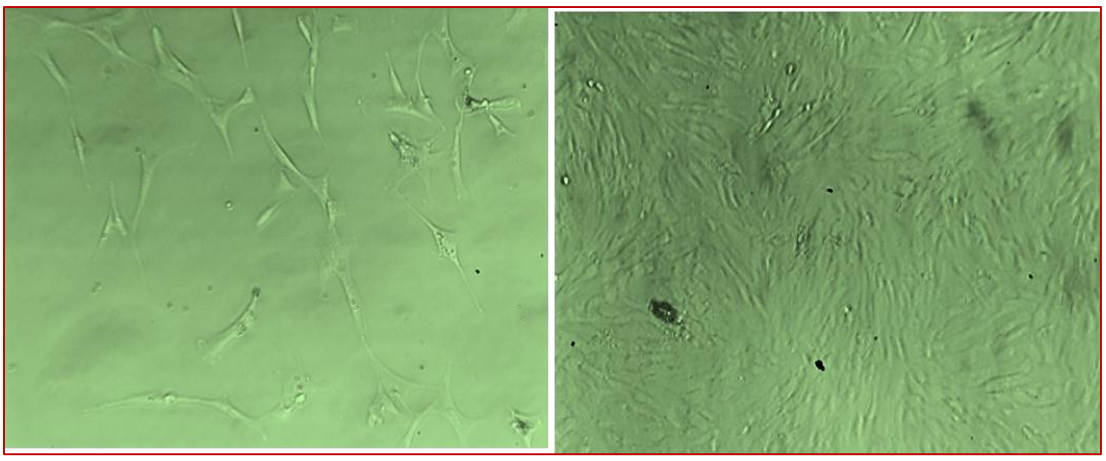
مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۵ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با میانگین سنی ۶ الی ۸ هفته و وزنی حدود ۲۰۰ الی ۲۲۰ گرم استفاده شد. در این پژوهش ابتدا بعد از بی‌هوش نمودن موش‌های صحرایی توسط کلروفرم و کشتن آن‌ها و پس از ضدعفونی نمودن ناحیه کشاله ران و شکم حیوانات با محلول الکل ۷۰ درصد، بافت‌های چربی استخراج‌شده از نواحی زیر جلدی پایین شکم و اطراف کلیه‌ها و کشاله ران و در شرایط کاملاً استریل، در فالکون (BD-USA) استریل حاوی سالین بافری فسفاته (PBS) و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین و ضدقارچ آمفوتریسین قرار داده شدند و جهت جلوگیری از فساد بافتی فالکون‌های محتوی نمونه‌ها روی مقادیری یخ قرار گرفتند و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز انتقال داده شدند. نمونه‌های چربی تهیه‌شده در زیر هود لامینار به قطعات ریز تبدیل گردیدند و جهت حذف سلول‌های خونی، نمونه‌ها، توسط محلول PBS(USA-Gibco) شستشو داده شدند و در هر بار محلول رویی دور ریخته شد. سپس نمونه‌ها بعد از اضافه کردن حدود ۶ میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز ۲ درصد نوع ۱، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای۳۷°C در حمام آب گرم قرار داده شدند. پس از مرحله‌ی تجزیه‌ی آنزیمی، فالکون حاوی نمونه‌ها از حمام آب گرم خارج و برای مخلوط شدن آنزیم با محیط، پیپتاژ صورت گرفت (۱۹). سوپانسیون سلولی حاصل با دور ۱۲۰۰rpm به مدت پنج دقیقه و به تعداد ۲ تا ۳ بار در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. سپس روغن و بافت چربی رویی به‌آرامی حذف گردید. رسوب ته فالکون که حاوی سلول‌های ته‌نشین شده‌ی چربی بود به فلاسک ۷۵ (orang-USA) مخصوص کشت سلولی حاوی DMEM و ۱۰٪FBS (Biowest-USA) منتقل گردید. درنهایت فلاسک داخل انکوباتور (CO_2 Incubator-MEMMERT GERMANY) ۳۷°C و حاوی ۵٪CO_2 برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (۱۹). به‌منظور حذف سموم متابولیسمی و اضافه نمودن مواد غذایی موردنیاز سلول‌ها، محیط کشت سلول‌ها هر ۲ روز یک‌بار تعویض گردید. بدین منظور محلول رویی فلاسک دور ریخته شد و محیط

کشت تازه جایگزین گردید و مجدداً درون انکوباتور قرار داده شد. در این مراحل رشد سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس مدل Primo Vert ساخت کشور آلمان بررسی گردید. بعدازاینکه به تراکم حدود ۹۰٪ رسیدند، اقدام به پاساژ دادن نمونه‌ها گردید تا در پاساژ چهار مواجهه با دوز ۰/۶ میلی‌مولار متامفتامین انجام شود (۲۰). در این بررسی برای تائید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از تکنیک‌های فلوسایتومتری استفاده گردید. در این تکنیک از آنتی‌بادی‌های Anti-CD90 (۳µl)، Anti-CD34(۴µl)، Anti-CD44 (۴µl)، Anti-CD73 (۳µl) استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۰۰۰۰ سلول پاساژ سوم در ۵ میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و یک میلی‌لیتر محلول PBS به آن اضافه گردید. به یکی از نمونه‌ها (کنترل منفی) هیچ آنتی‌بادی اضافه نشد. پس از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و شستشو با PBS، فلوسایتومتری توسط FACSort انجام شد. جهت سنجش بیان مارکرهای ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی، مارکرهای CD73 و CD45 مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۹). در این بررسی جهت سنجش میزان سمیت متامفتامین از روش MTT استفاده شد. در این روش در هر چاهک حاوی محیط کشت پلیت ۹۶ چاه که (Invitrogen-USA) تعداد ۱۰۰۰۰ سلول موردمطالعه قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی تعویض گردید و به محیط کشت جدید دوز ۰/۶ میلی‌مولار Methamphetamine Hydrochloride,)METH Sigma, M8750) اضافه گردید. سپس نمونه‌ها، به مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور (دمای ۳۷°C و ۵٪CO_2) قرار داده شد. سپس محیط کشت سلول‌ها با ۲۰۱ µ محلول تازه‌ی MTT با غلظت 5mg/ml تعویض گردید. پس از چهار ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C محلول رویی سلول‌ها تخلیه و به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر محلول (DMSOSigma-Aldrich-Germany) اضافه گردید تا کریستال‌های فورمازون تشکیل‌شده در اثر واکنش با MTT از بین بروند. درنهایت جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر (polarstar omega-BMG LABTECH-Germany) در طول‌موج ۵۷۰nm محاسبه گردید (۲۰) در پایان داده‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SPSS-21 و توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد آنالیز قرار گرفتند و معناداری اختلاف داده‌ها در سطح p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌های این مطالعه نشان داد که سلول‌های جداشده از بافت چربی، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان کشت، دوکی‌شکل گردیدند و به‌طور کامل به کف فلاسک کشت سلولی چسبیدند و ازنظر مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاست بودند که نشان‌دهنده ماهیت مزانشیمی بودن این سلول‌ها است. بعد از پنج روز که سلول‌ها در حدود ۹۰ درصد کف ظرف کشت را پر نمودند، در اولین پاساژ، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با سرعت زیادی تقسیم گردیدند، به‌طوری‌که بعد از اولین پاساژ سلولی زمان دو برابر شدن سلول‌ها تقریباً دو روز بود. این سلول‌ها پس از پاساژ سوم (حدود ده روز پس از کشت اولیه) دارای ظاهری یکنواخت و هموژن بودند و قابلیت استفاده برای انجام مراحل بعدی مطالعه را داشتند (شکل ۱).



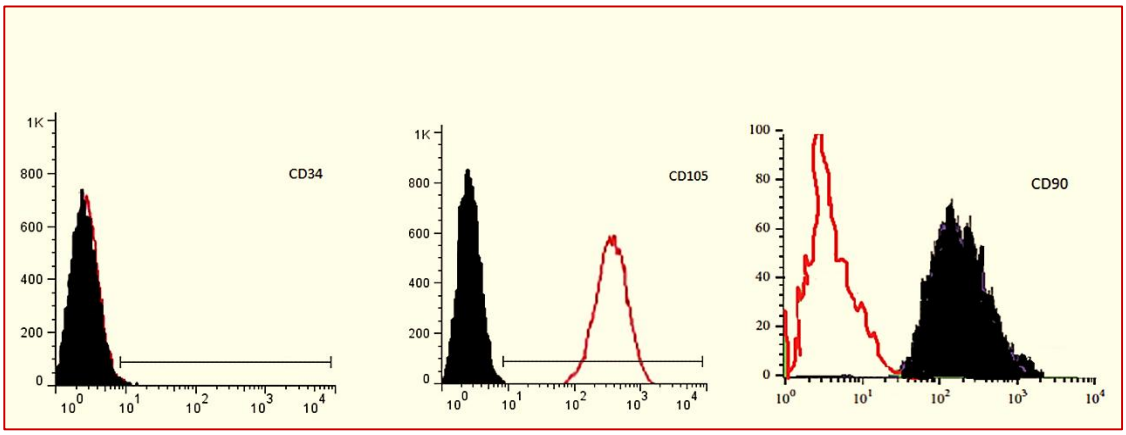
شکل ۱. تصویر میکروسکوپی سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده از بافت چربی موش صحرایی (X200)

به‌علاوه در این مطالعه نتایج حاصل نشان داد که در این سلول‌ها بیان نشانگر سطحی سلول‌های اندوتلیالی (CD34) منفی و بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD90, CD105) مثبت بود که تائید کننده خصوصیات بنیادی نبودن سلول‌های استخراج‌شده از بافت چربی است (شکل ۲).

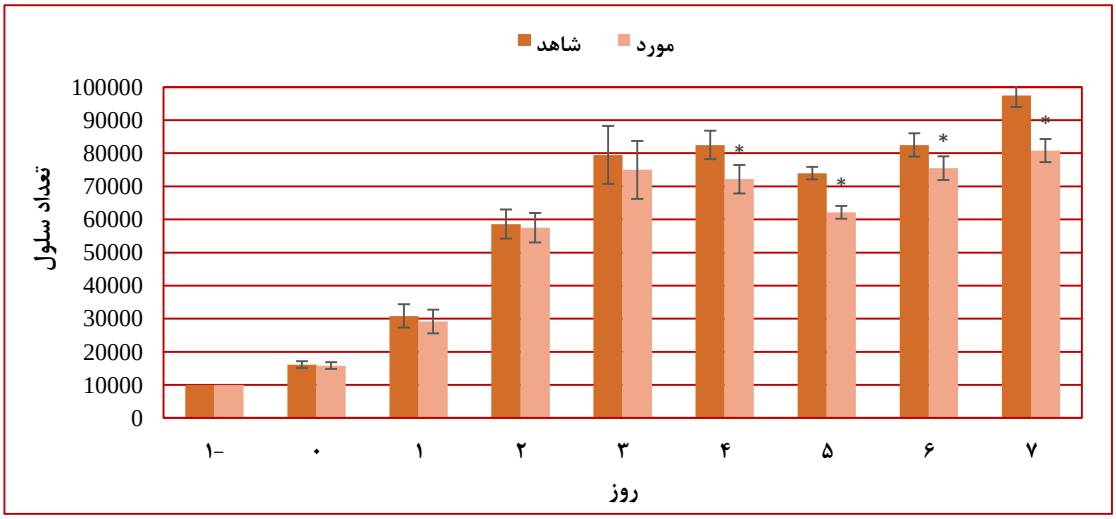
به‌علاوه در این مطالعه بر اساس نتایج آزمون MTT با کشت ده هزار سلول و تیمار آن‌ها با METH در روزهای اول تا هفتم بعد از تیمار، به‌ویژه از روز چهارم به بعد میزان زنده ماندن سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد (عدم تیمار با METH)، کاهش معناداری در سطح $p<0/05$ نشان داد. با افزایش زمان تیمار، معناداری اختلاف بین دو گروه نیز افزایش یافت که این امر حاکی از اثر وابسته به زمان بودن داروی METH بر رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی است (نمودار ۱).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی در محیط کشت، ظاهری دوکی‌شکل داشتند. به‌علاوه قادر به بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD90, CD105 بودند درحالی‌که قادر به بیان مارکر شناسایی سطحی سلول‌های اندوتلیالی CD34 نبودند. نمودار رشد این سلول‌ها در حضور متامفتامین کاهش شدیدی نشان داد. امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان منبع مناسب سلول درمانی بسیار



شکل ۲. نتایج فلوسایتومتری مارکرهای مثبت CD90, CD105 و مارکر منفی CD34 در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی



نمودار ۱. رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در گروه تجربی تحت تیمار با متامفتامین در مقایسه با گروه شاهد (فاقد تیمار با متامفتامین) طی مدت‌زمان هفت روز تیمار سلول‌ها؛
(روز ۱-: روز قبل از تیمار دارویی، روز ۰: روز تیمار دارویی، روز ۱: یک روز پس از تیمار)
*: وجود اختلاف معنادار گروه شاهد و مورد با سطح معناداری $p<0/05$.

موردتوجه هستند. این سلول‌ها در بافت‌های جنینی و در اکثر بافت‌های تمایزیافته نیز حضور دارند و با داشتن خصوصیات خود تجدیدی و پرتوانی قادرند قدرت تقسیم خود را برای مدت‌زمان طولانی حفظ کنند و به دیگر رده‌های سلولی تمایز یابند (۲۱ و ۲۲). مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی همانند سایر سلول‌های مزانشیمی دارای ظاهر دوکی‌شکل، قابلیت اتصال به کف ظروف پلاستیکی کشت، قدرت تمایز به سایر رده‌های مزانشیمی، بیان نشانگرهای سطحی مشابه با سلول‌های بنیادی مشتق از استخوان هستند (۲۳). در یک بررسی دیگر نشان داده شد که اتصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی به ظرف کشت در کمتر از ۱۲ساعت صورت می‌گیرد (۲۴)، که هم سو با نتایج این مطالعه است. در مطالعه حاضر کاهش بیان نشانگر سطحی سلول‌های اندوتلیالی CD34 و افزایش بیان نشانگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD90 و CD105، خصوصیات بنیادین بودن سلول‌های استخراج‌شده از بافت چربی را تأیید نمود که با نتایج به‌دست‌آمده در برخی از مطالعات دیگر هم سو است (۱۹). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در محیط کشت تمایز به بافت چربی، به کمک رنگ‌آمیزی اویل رد قطرات چربی را به نمایش می‌گذارند که نشان‌دهنده تمایز آن‌ها به بافت چربی است و در رنگ‌آمیزی الیزارین رد وجود رسوبات کلسیم را نشان می‌دهند که بیانگر تمایز آن‌ها به سلول‌های استخوانی است (۲۵). در پژوهش حاضر نتایج تست MTT حاکی از آن بود که METH دارای اثر سیتوتوکسیسیتی بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی است که با نتایج برخی از مطالعات دیگر هم سو است (۲۶). در یک مطالعه دیگر نیز نشان داده شد که METH باعث کاهش خصوصیت خود نوسازی سلول‌های بنیادی شکنج دندانه‌دار و تغییر تمایز به سمت سلول عصبی شد (۱۱). نتایج حاصل از یک بررسی نشان داد که METH رشد سلول‌های عصبی و گلیالی را مختل نمود (۲۷). به‌علاوه در یک پژوهش دیگر نیز نشان داده شد که METH باعث کاهش رشد رده سلولی آستروسیت انسانی می‌شود (۲۸). در بررسی اثرات سمی METH بر نورون‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی نشان داده شد که METH به‌صورت وابسته به دوز باعث کاهش رشد سلولی گردید (۲۹). به‌علاوه در یک پژوهش نشان داده شد که مصرف مزمن متامفتامین باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و بیان فاکتورهای التهابی می‌گردد و روند آپوپتوزیس و دژنراسیون سلولی را نیز تحریک نمود (۳۰). بنابراین در مطالعه حاضر نیز احتمالاً از این طریق باعث کاهش روند رشد سلولی در سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی شده است. در محیط کشت سلولی داروی METH موجب آسیب معنادار میتوکندری‌ها و افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو، نظیر لیپید پراکسیداسیون، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و اکسیدشدن گلوتاتیون می‌گردد (۳۱). بنابراین احتمالاً در مطالعه حاضر نیز کاهش رشد سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی موش‌های صحرایی تحت تیمار با داروی METH را می‌توان به اثرات این ماده در آسیب به میتوکندری‌ها و همچنین ایجاد استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها نسبت داد. همچنین سمیت سلولی METH می‌تواند به فرآیندهای بیوشیمیایی ازجمله استرس اکسیداتیو، برانگیختگی و یا سیتوکین‌ها و یا کموکین های التهابی وابسته باشد (۳۲). در یک بررسی نشان داده شد که به دنبال مصرف متامفتامین میزان ۸-هیدروکسی -داکسی ژنوزین که یک مارکر مهم آسیب به مولکول‌های DNA به‌حساب می‌آید افزایش می‌یابد (۳۳). بنابراین کاهش رشد سلولی در این مطالعه را نیز می‌توان به اثر متامفتامین به افزایش این ماده مخرب مولکول‌های DNA نسبت داد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر می‌توان گفت METH احتمالاً از طریق آسیب به میتوکندری‌ها و ایجاد استرس اکسیداتیو و تخریب DNA دارای اثرات سمیت سلولی وابسته به زمان بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از تلاش‌ها و مساعدت‌های کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز که در اجرای این پروژه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزاری به عمل‌آورند. این بررسی در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تحت شماره IR.IAU.M.REC.1396.371 **به** تصویب رسید.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعرض منافع توسط نویسندگان بیان‌نشده است.

References

1. Lud Cadet J, Jayanthi S, T McCoy M, Beauvais G, Sheng Cai N. Dopamine D1 Receptors, Regulation of Gene Expression in the Brain, and Neurodegeneration.CNS Neurol Disord Drug Targets. 2010; 9(5): 526–538. doi: 10.2174/187152710793361496.
2. Cruickshank CC, Dyer KR. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. Addiction. 2009;104(7):1085-1099. DOI: 10.1111/j.1360-0443.2009.02564.x
3. Akhgari M, Mobaraki H, Etemadi-Aleagha A. Histopathological study of cardiac lesions in methamphetamine poisoning-related deaths. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017;25(1):5. doi: 10.1186/s40199-017-0170-4
4. Carvalho M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F ,et al. Toxicity of amphetamines: an update. Archives of toxicology. 2012;86(8):1167-1231. doi: 10.1007/s00204-012-0815-5.
5. Alghamdi M, Alqahtani B, Alhowti S. Cardiovascular complications among individuals with amphetamine-positive urine drug screening admitted to a tertiary care hospital in Riyadh. Journal of the Saudi Heart Association. 2016;28(3):129-135. doi:10.1016/j.jsha.2015.12.009
6. Astarita G, Avanesian A, Grimaldi B, Realini N, Justinova Z, Panlilio LV, et al. Methamphetamine accelerates cellular senescence through stimulation of de novo ceramide biosynthesis. PLoS One. 2015;10(2):e0116961. doi: 10.1371/journal.pone.0116961.
7. Shen Y, Wu L, Wang J, Wu X, Zhang X. The roleof mitochondria in methamphetamine-induced inhibitory effects on osteogenesis of mesenchymal stem cells. European journal of pharmacology. 2018;826:56-65.doi: 10.1016/j.ejphar.2018.02.049. Epub 2018 Mar 2.
8. Wang Q, Wei L-W, Xiao H-Q, Xue Y, Du S-H, Liu Y-G, et al. Methamphetamine induces hepatotoxicity via inhibiting cell division, arresting cell cycle and activating apoptosis: in vivo and in vitro studies. Food and Chemical Toxicology. 2017;105:61-72. DOI: 10.1016/j.fct.2017.03.030 PMID: 28341135 .
9. Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:681-698. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105140.
10. Simantov R. Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). Life sciences. 2004;74(7):803-14. doi: 10.1016/j.lfs.2003.08.002.
11. Baptista S, Lasgi C, Benstaali C, Milhazes N, Borges F, Fontes-Ribeiro C, et al. Methamphetamine decreases dentate gyrus stem cell self-renewal and shifts the differentiation towards neuronal fate. Stem cell research. 2014;13(2):329-341.doi: 10.1016/j.scr.2014.08.003.
12. Filip S, Mokrý J, Hruska I. Adult stem cells and their importance in cell therapy. Folia biologica. 2003;49(1):9-14. PMID: 12630663
13. Javier Catón M, Pierfrancesco Pagella M, Orsini G, Jimenez-Rojo L. Monitoring Notch Signaling-Associated Activation of Stem Cell Niches within Injured Dental Pulp.Front Physiol. 2017; 8: 372. doi: 10.3389/fphys.2017.00372
14. Ghobadi F, Rahmanifar F, Mehrabani D, Tamadon A, Dianatpour M, Zare S, et al.Endometrial mesenchymal stem stromal cells in mature and immature sheep: An in vitro study.Int J Reprod Biomed (Yazd). 2018;16(2):83-92. PMCID: PMC5899822.
15. Lotfi AS, Khoshdel A, Soleimani M, Daliri M, Razban V, Adibi B. High yield generation of hepatocyte like cells from adipose derived stem cells. SRE. 2012;7(10):1141-1147. DOI:10.5897/SRE11.1437.
16. Woo D-H, Hwang HS, Shim JH. Comparison of adult stem cells derived from multiple stem cell niches. Biotechnology letters. 2016;38(5):751-759. doi: 10.1007/s10529-016-2050-2.
17. Thiede H, Jenkins RA, Carey JW, Hutcheson R, Thomas KK, Stall RD, et al. Determinants of recent HIV infection among Seattle-area men who have sex with men. American Journal of Public Health. 2009;99(S1):S157-S164. doi: 10.2105/AJPH.2006.098582.
18. Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galié M, Sbarbati A. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. Stem cells and development. 2008;17(5):909-916. doi: 10.1089/scd.2007.0197.

19. Jamshidi M, Hosseini SE, Mehrabani D, Amini M .Effect of hydroalcoholic extract of Cannabis (Cannabis sativa L.) on morphology and the process of human adipose-drived mesenchymal stem cell growth. Electron J Gen Med 2018;15(3):em31./doi.org/10.29333/ejgm/86194
20. Shah A, Kumar A. Methamphetamine-mediated endoplasmic reticulum (ER) stress induces type-1 programmed cell death in astrocytes via ATF6, IRE1α and PERK pathways. Oncotarget. 2016;7(29):46100-
46119. doi: 10.18632/oncotarget.10025
21. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood reviews. 2006;20(3):161-171.doi: 10.1016/j.blre.2005.11.002. Epub 2005 Dec 20.
22. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. Archives of surgery. 2004;139(1):93-99. doi: 10.1001/archsurg.139.1.93.
23. Cakici C. Buyrukcu B. Duruksu G. Haliloglu A.H. Aksoy A. Isık A. et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue derived mesenchymal stem cells: The sperm generation. BioMed Res Int. 2013;1: 529589. doi.org/10.1155/2013/529589
24. Lai K, Zeng K, Zeng F, Wei J, Tan G. Allogeneic adipose-derived stem cells suppress Th17 lymphocytes in patients with active lupus in vitro. Acta Biochim Biophys Sin. 2011;43(10):805-812. doi: 10.1093/abbs/gmr077.
25. Solali S, Kaviani S, Soleimani M, Zonoubi Z. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. Koomesh. 2015; 16(4): 505-511.
26. Jang S, Cho H-H, Cho Y-B, Park J-S, Jeong H-S. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. BMC cell biology. 2010;11(1):25. doi: 10.1186/1471-2121-11-25.
27. Loftis JM, Janowsky A. Neuroimmune basis of methamphetamine toxicity. Int Rev Neurobiol. 2014;118:165-197.doi: 10.1016/B978-0-12-801284-0.00007-5.
28. Muneer PA, Alikunju S, Szlachetka AM, Haorah J. Methamphetamine inhibits the glucose uptake by human neurons and astrocytes: stabilization by acetyl-L-carnitine. PLoS One. 2011 Apr 27;6(4):e19258.doi: 10.1371/journal.pone.0019258.
29. Meamar R, Dehghani L, Karamali F. Toxicity effects of methamphetamine on embryonic stem cell-derived neuron. J Res Med Sci. 2012 May;17(5):470-474. PMCID: PMC3634275
30. Mozaffaria S, Ramezany Yasujb S, Motaghinejadb M, Motevalianc M, Kheiri R. Crocin Acting as a Neuroprotective Agent against Methamphetamineinduced Neurodegeneration via CREB-BDNF Signaling Pathway. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2019; 18 (2): 745-758. dOI: 10.22037/ijpr.2019.2393
31. Shokrzadeh M, Zamani E, Mollahasani J, Shaki F. Captopril inhibited metamphetamine - induced cardiac mitochondrial damage in hyperthermic condition via modulation of biochemical markers. koomesh. 2016; 18 (1):128-137
32. Moratalla R, Khairnar A, Simola N, Granado N, García-Montes JR, Porceddu PF, et al. Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: main mechanisms. Progress in neurobiology. 2017;155:149-170. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.011.
33. Tokunaga I1, Kubo S, Ishigami A, Gotohda T, Kitamura O. Changes in renal function and oxidative damage in methamphetamine-treated rat. Leg 2006; 8(1): 16-21. dOI: 10.1016/j.legalmed.2005.07.003

Original Article

Investigating the Effect of Methamphetamine Toxicity on Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue in Rats

Jaafary-sheybani F[1], Hosseini SE[1*],Mehrabani D[2]

1. Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2. Burn and Wound Healing Research Center,Shiraz University of Medical Sciences,Shiraz,Iran

Received: 21 Sep 2020 Accepted: 18 Nov 2020

Abstract

Background & Objective: Methamphetamine is a hallucinogenic and addictive substance that is widely used worldwide. Cellular toxicity in various cells, especially in nerve cells, is one of the reported effects of this psychoactive substance. Therefore, this study aimed to investigate the effect of methamphetamine cytotoxicity on adult mesenchymal stem cells

Materials & Methods: In this experimental study, mesenchymal stem cells were extracted from the adipose tissue of adult male rats of the Wistar breed and after culturing, their being mesenchymal was confirmed by flowcytometry method using CD34-RPE, CD90-RPE and CD105-RPE conjugate antibodies. In the third passage of cell culture, the effect of methamphetamine toxicity at a concentration of 0.6 mmol during 1 to 7 days on the growth process of these cells was investigated by MTT test.

Results: The cells detached from the adipose tissue were completely adhered to the floor of the flask 24 hours after being transferred to the cell culture flask. The results of flowcytometry showed that the expression of negative endothelial surface marker (CD34) and the expression of mesenchymal cell markers (CD90, CD105) were positive, which confirmed the basic identity of the extracted cells. The results of the MTT test also showed a significant reduction in the growth of cells treated with 0.6 mmol methamphetamine compared with the control group at $p < 0.05$.

Conclusion: Cells isolated from adipose tissue are the basic mesenchymal type in which methamphetamine can induce the effects of cell toxicity and inhibit growth.

Keywords: Mesenchymal stem cells, adipose tissue, methamphetamine, rat

***Corresponding Author: Hosseini Seyyed Ebrahim**, Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
Email: ebrahhim.hossini@yahoo.com
http://orcid.org/0000-0003-0548-0114