مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره گیاه Cannabis (حشیش) بر میزان رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی موش‌های صحرایی نر بالغ

آرمان کمالی سروستانی[۱]، داوود مهربانی[۲*]، سیدابراهیم حسینی[۱]، سیده ساره هاشمی[۲]

۱- گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، موسسه آموزش عالی زند شیراز، شیراز،ایران
۲- مرکز تحقیقات و فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: کانابیس به‌عنوان ماده اعتیادآوری است که سو مصرف آن یک مشکل فراگیر جهانی است. حشیش یا ترشحات رزینی گیاه، دارای خواص دارویی و روان‌گردانی فراوانی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در مهندسی بافت و پیوند اعضاء دارای کاربرد وسیعی می‌باشند. لذا مطالعه حاضر باهدف بررسی اثر عصاره‌ی گیاه کانابیس بر رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی موش‌های صحرایی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی موش‌های صحرایی نر بالغ استخراج و پس از کشت آن‌ها، مزانشیمی بودن سلول‌ها با روش فلوسایتومتری و به‌واسطه آنتی‌بادی‌های کونژگه CD34- RPE، CD90-RPE و CD105-RPE تائید گردید. در پاساژ چهارم کشت سلولی، اثر سمیت کانابیس در غلظت‌های ng/ml ۱۰۰ و ۱۰۰۰ در طول مدت ۱ الی ۷ روز بر روند رشد این سلول‌ها توسط تست MTT بررسی گردید.

نتایج: سلول‌های مشتق از بافت چربی، ۲۴ ساعت بعد از انتقال به فلاسک کشت سلولی، کاملاً به کف فلاسک چسبیدند. بر اساس نتایج فلوسایتومتری هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی بابیان مارکرهای مزانشیمی و عدم بیان مارکرهای هماتوپویتیک تائید شد. نتایج آزمون MTT نیز حاکی از افزایش معنادار رشد سلول‌ها تا روز سوم و سپس کاهش معنادار رشد سلول‌های تحت تیمار با کانابیس تا روز ششم در مقایسه با گروه کنترل در سطح $p< ۰/۰۵$ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد که کانابیس به‌صورت وابسته به مدت‌زمان مصرف دارای اثرات تحریکی و یا مهاری بر میزان رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی می‌گردد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی، بافت چربی، کانابیس، موش صحرایی

مقدمه

شاهدانه یا کانابیس گیاهی علفی و گل‌دار از خانواده *Cannabaceae* است که دارای سه گونه sativa، indica و ruderalis است. صمغ یا ترشحات رزینی گونه *Cannabis sativa* به‌عنوان حشیش و یا مارجوانا مشهور است که دارای خواص دارویی و روان‌گردانی است (۱). تاکنون بیش از ۷۰۰ ترکیب طبیعی کانابینوئیدی و غیر کانابینوئیدی نظیر ترپنوئیدها، هیدروکربن‌ها، ترکیبات نیتروژن‌دار، کربوهیدرات‌ها، فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، فنول‌های غیر کانابینوئیدی، الکل‌های ساده، آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدها، استرها، لاکتون‌ها در گیاه کانابیس شناسایی‌شده است (۲). در عصاره گیاه کانابیس بیش از ۱۰۴ نوع ترکیب کانابینوئیدی شناسایی‌شده است (۳). مهم‌ترین ماده روان‌گردان کانابینوئیدی موجود در عصاره گیاه کانابیس ترکیب THC (دلتا- ۹- تتراهیدروکانابینول) است که قادر به تحریک گیرنده‌های کانابینوئیدی موجود در بدن است (۴). در بدن انسان ۲ نوع گیرنده کانابینوئیدیCB1 و CB2 شناسایی‌شده است که در ارتباط با G پروتئین‌ها عمل می‌کنند (۵). در یک بررسی نشان داده شد که کانابینوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و

*نویسنده مسئول: **داوود مهربانی**، مرکز تحقیقات و فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
Email: mehrabad@sums.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-5738-1719

حفاظت شیمیایی از بدن حیوان را افزایش می‌دهند (۶). مطالعات نشان داده‌اند که عصاره گیاه کانابیس دارای ترکیباتی با ویژگی‌های ضدالتهابی و آپوپتوتیک است که قادر به ایجاد اختلال درروند رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند (۷، ۸). شاهدانه یا کانبیس باعث تغییر در تعادل بیو شیمیایی بدن می‌شود و تعدادی از سیستم‌ها و اندام‌های بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث وابسته شدن فرد مصرف‌کننده خصوصاً جوانان می‌گردد و به دلیل قابلیت حل شدن بالا در چربی، در افراد مصرف‌کننده دارای ماندگاری نسبتاً طولانی است (۹). با توجه به خواص آنتی‌نئوپلاستیک و ضدتوموری کانابینوئیدها، از آنالوگ-های صناعی THC در درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان استفاده-های زیادی می‌شود (۱۰). مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که تزریق موضعی THC منجر به کاهش اندازه‌ی تومورهای مغزی و افزایش مدت‌زمان زنده‌مانی حیوان می‌شود (۱۱). سلول‌های بنیادی سلول‌های غیر تخصص‌یافته‌ای هستند که به‌عنوان سلول‌های اجدادی یا پیشرو نامیده می‌شوند و با داشتن قدرت خودنوزایی و تمایز به سایر سلول‌ها، توانایی ساخت بافت‌های مختلفی را در بدن دارا می‌باشند (۱۲). سلول‌های بنیادی با داشتن ویژگی‌های ضدآپوپتوتیک، تسریع در فرایند رگ زایی و قدرت میتوز بالا و همچنین توانایی زیاد در جهت تمایز یافتن به سایر سلول‌ها در مهندسی بافت دارای نقش کلیدی هستند (۱۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت شرایط مناسب کشت سلولی و با استفاده از محرک‌های مناسب، می‌توانند به دودمان‌های سلول‌های با منشأ مزودرمی ازجمله استخوان، غضروف، چربی، ماهیچه و تاندون و سلول‌های آندودرمی مانند سلول‌های کبدی و سلول‌های اکتودرمی نظیر نورون‌ها متمایز شوند (۱۴). سلول‌های مزانشیمی به‌دست‌آمده از بافت چربی همانند سایر سلول‌های با ماهیت مزانشیمی دارای ظاهری دوکی‌شکل بوده که قادر هستند ضمن اتصال به کف ظروف پلاستیکی و بیان نشانگرهای سطحی مشابه با سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان به انواعی از رده‌های سلولی تمایز یابند (۱۵، ۱۶).

مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی بعد از پاساژ چهارم سلولی جمعیتی هموژن با ظاهری فیبروپلاستی پیدا می‌کنند (۱۷). سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی در مقایسه با سلول‌های مغز استخوان دارای توان تکثیر بالاتری هستند و کمتر دچار پیری، تغییر فنوتیپ و تمایز خود به خودی می‌شوند (۱۸) و به دلیل داشتن مزایایی مانند مقاومت بیشتر نسبت به مغز استخوان، نداشتن محدودیت تعداد نمونه و قدرت تکثیر و دسترسی آسان به حجم بزرگی از چربی طی روند لیپوساکشن، جهت کارهای درمانی بسیار مناسب‌تر از سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌باشند (۲۰،۱۹). ویژگی-هایی همچون درصد بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در بافت چربی، قدرت تکثیری بالا در این سلول‌ها، حداقل تهاجم برای دستیابی به بافت چربی و امکان تأمین سلول‌های اتولوگوس باعث شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، منبع ایده‌الی جهت کاربردهای کلینیکی و سلول درمانی باشند (۲۱). با توجه به آنکه امروزه سوءمصرف مواد روان‌گردان از ناگوارترین آسیب‌های اجتماعی، جسمانی و یکی از مهم‌ترین معضلات پزشکی است و با عنایت به آنکه در سال‌های اخیر، متأسفانه مصرف این مواد حتی در بین دانش آموزان مدارس و دانشجویان دانشگاه‌ها رو به افزایش است (۲۲). لذا بررسی اثرات این ماده روان‌گردان بر ساختارهای مختلف بدن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و بر همین اساس مطالعه حاضر باهدف بررسی اثر عصاره گیاه کانابیس بر رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی موش‌های صحرایی نر بالغ انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، به‌منظور تهیه سلول‌های بنیادی مشتق‌شده از بافت چربی ضمن رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی از ۵ سر موش صحرایی نر بالغ با میانگین وزنی در حدود ۲۰۰ الی ۲۲۰ گرم و با میانگین سنی ۷ تا ۸ هفته استفاده شد.

در این بررسی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه کانابیس به روش پرکولاسیون تهیه گردید. بدین منظور برگ‌های گیاه کانابیس با هماهنگی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و مرکز مبارزه با مواد مخدر تهیه و در محیط تاریک و بدون رطوبت خشک گردید. عصاره‌ی موجود در برگ خشک‌شده‌ی گیاه کانابیس با استفاده از اتانول ۷۰٪ (Merck-Germany) به‌عنوان حلال استخراج شد. جهت حذف کامل حلال از عصاره به‌دست‌آمده، محلول در دستگاه روتاری (IKA- Germany) با دمای ۴۵ درجه و گردش ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در پایان عصاره با استفاده از پمپ خلأ کاملاً تغلیظ گردید. عصاره‌ی تهیه‌شده در ظروف شیشه‌ای

ریخته و برای انجام مراحل بعدی در یخچال نگهداری شد. رقیق-سازی عصاره جهت مواجهه‌ی سلول‌ها با استفاده از اتانول و آب مقطر صورت پذیرفت. جهت سنجش میزان سمیت عصاره‌ی هیدروالکلی و تعیین دوز قابل‌استفاده در این پژوهش از روش MTT استفاده شد (۲۳).

در این مطالعه جت تهیه بافت چربی ابتدا بعد از بی‌هوش نمودن حیوانات توسط کلروفرم و کشتن آن‌ها و پس از ضدعفونی نمودن ناحیه شکم با محلول الکل ۷۰٪، بافت‌های چربی استخراج‌شده از نواحی زیر جلدی پایین شکم و اطراف کلیه‌ها و در شرایط کاملاً استریل، در فالکون (BD-USA) استریل محتوی سالین بافری فسفاته (PBS) و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین و ضد قارچ آمفوتریسین قرار داده شدند و به‌منظور پیشگیری از فساد بافتی، فالکون‌های محتوی نمونه‌ها بر روی مقادیری از یخ قرار داده شدند و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز انتقال داده شدند. سپس نمونه‌های چربی تهیه‌شده در زیر هود لامینار به قطعات ریزتری تبدیل شدند و برای حذف سلول‌های خونی، چندین بار توسط محلول PBS (USA-Gibco) شستشو داده شدند و در هر بار محلول رویی دور ریخته شد. آنگاه بعد از اضافه نمودن حدود ۶ میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز ۰/۲ در صد نوع ۱ به نمونه‌ها، آن‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷°C قرار داده شدند. بعد از مرحله‌ی تجزیه‌ی آنزیمی، فالکون محتوی نمونه‌ها از حمام آب گرم خارج و برای مخلوط شدن بهتر آنزیم با محیط، پیپتاژ انجام گرفت. محلول سلولی حاصل به مدت پنج دقیقه با دور ۱۲۰۰rpm و به تعداد ۲ تا ۳ بار در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. سپس روغن و بافت چربی رویی به‌آرامی حذف گردید. رسوب ته فالکون که حاوی سلول-های ته‌نشین شده‌ی چربی بود به فلاسک‌های ۷۵ (orang-USA) مخصوص کشت سلولی حاوی DMEM و ۱۰٪FBS (Biowest-USA) انتقال داده شدند و در آخر فلاسک‌ها در درون انکوباتور (CO₂ Incubator-MEMMERT GERMANY) ۳۷°C و حاوی ۵٪ CO_2 برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. محیط کشت سلول‌ها در هر ۲ روز یک‌بار تعویض گردید. زمانی‌که تراکم سلولی به میزان ۹۰ درصد حجم فلاسک کشت رسید با استفاده از آنزیم Trypsin-EDTA، سلول‌های چسبیده به کف ظرف جدا شدند و به نسبت ۱ به ۳ در محیط کشت DMEM حاوی FBS رقیق گردیدند. سپس با توجه به تعداد سلول‌های جداشده آن‌ها به فلاسک‌های کشت جدید با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین) انتقال داده شدند و مجدداً به‌داخل انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن بازگردانده شدند. در این مراحل رشد سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. در این مطالعه پاساژ اول تقریباً پس از ۸ روز از نمونه‌گیری انجام و پس از گذشت ۸ روز از پاساژ دوم، شمارش سلولی فلاسک‌ها آغاز شد و پاساژ سوم نمونه‌ها نیز پس از گذشت ۶ روز نیز انجام گردید. بعدازاینکه سلول‌ها به تراکم حدود ۹۰٪ رسیدند، پاساژ دادن نمونه‌ها انجام گردید تا در پاساژ چهارم مواجهه با دوزهای mg/kg ۱۰۰ و ۱۰۰۰ عصاره کانابیس انجام گردید (۲۴).

در این مطالعه به‌منظور تائید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. در این روش از آنتی‌بادی‌های Anti-CD90 (۳µl)، Anti-CD34(۴µl)، Anti-CD44 (۴µl)، Anti-CD73 (۳µl) استفاده گردید. بدین ترتیب که ۱۰۰۰۰ سلول پاساژ چهارم در ۵ میکروتیوب یک ونیم میلی-لیتری 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 توسطFACSort انجام شد. در مطالعه حاضر برای سنجش میزان سمیت کانابیس از روش MTT و به‌منظور سنجش میزان بیان مارکرهای ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی، مارکرهای CD73, CD45 موردبررسی و ارزیابی قرار گرفتند (۱). به‌علاوه در این مطالعه جهت انجام مراحل RT-PCR پس از استخراج RNA از نمونه‌های مختلف سلولی، طبق پروتکل کیت استخراج RNA (یکتا تجهیز آزما) غلظت RNAی به‌دست‌آمده توسط اسپکتروفوتومتر تعیین گردید. ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت فرمنتاز انجام شد. cDNA با دیگر مواد واکنش شامل PCR buffer، $MgCl_2$، H_2O، dNTPmix، Taq DNA Polymerase و پرایمرهای F و R (برای CD45 و CD73) مخلوط گردید. سپس میکروتیوب در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵°C (دناتوراسیون)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴°C (اتصال پرایمر)، ۳۰ ثانیه نیز در دمای ۷۲°C و نهایتاً ۲ دقیقه در دمای ۹۵°C جهت دناتوراسیون اولیه و ۵ دقیقه در ۷۲°C جهت طویل سازی نهایی چرخه تکثیر انجام شد. محصولات PCR جهت حضور باندهای موردنظر به کمک سایبرگرین (DNA safe stain)

به روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد برده شد و باندهای تولیدشده تحت تابش فرابنفش (UV) با کمک سیستم ژل‌داکت موردبررسی قرار گرفت و به‌منظور پایش سرعت رشد سلولی ۶ پلیت ۲۴ حفره‌ای حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی دو پلیت به ازای هر سه گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۱۰۰۰ mg/kg حشیش در پاساژ چهارم تهیه گردید (هر حفره ۱۰۰۰۰ سلول در یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل). هر ۶ پلیت در انکوباتور قرار داده شدند. از روز بعد، سه حفره از هر پلیت در نظر گرفته‌شده، محیط کشت آن‌ها خارج، سلول‌ها با PBS شسته و با Trypsin/EDTA از کف فلاسک کشت جدا شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را دور ریخته و به رسوب سلولی حاصله، حدود یک میلی محیط کشت کامل افزوده و با پیپت کردن سلول‌ها کاملاً معلق شدند. سپس ۷ میکرولیتر از این مخلوط سلولی با ۷ میکرولیتر رنگ تریپان بلو مخلوط کرده و این مخلوط بین لامل و لام نئوبار قرار داده شد. تعداد سلول‌های موجود در ۴ مربع اطراف شمارش و طبق فرمول زیر تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید:

$$N = \frac{n1 + n2 + n3 + n4}{4} \times 2 \times v^{1} \times 10000$$

شمارش سلول‌ها به ترتیب فوق تا هشت روز متوالی تکرار شد. جهت ارزیابی روند رشد سلولی در آزمایشگاه، زمان موردنیاز برای دو برابر شدن جمعیت سلول‌ها نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و سپس منحنی رشد سلولی در گروه‌های تجربی و کنترل باهم مقایسه گردید (۲۵).

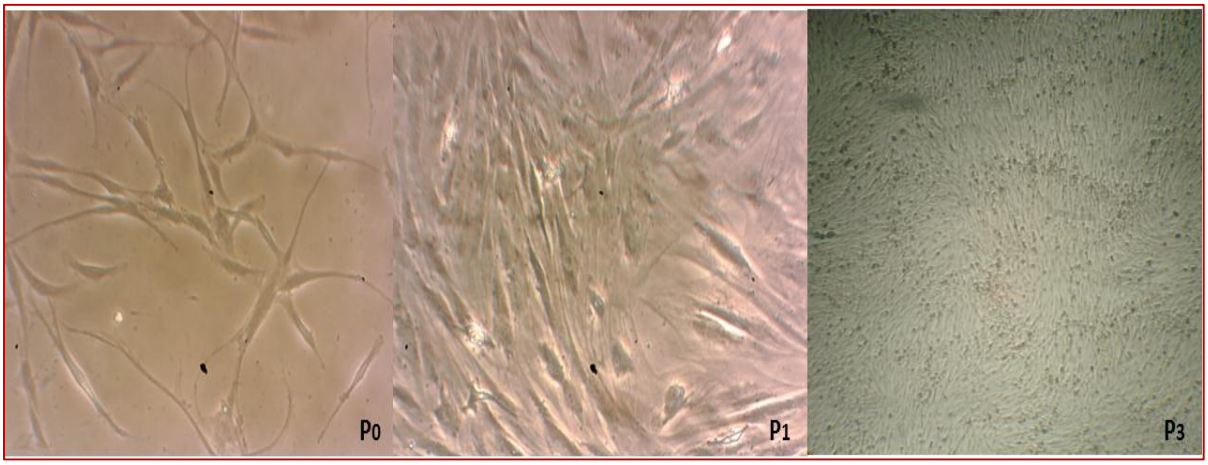
$$PDT = T \times \frac{ln2}{ln\frac{Xe}{Xb}}$$

Ln = $\log_e$ e = neperian number
T: incubation time in hours
Xb: cell number at the beginning of the incubation time
Xe: cell number at the end of the incubation time

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 مشتق شده از بافت چربی، بعد از سپری شدن ۱۲ ساعت از انتقال به فلاسک کشت سلولی، به کف فلاسک چسبیدند و طی ۶ ساعت اول کشت، سلول‌ها کروی شکل بودند اما بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان کشت، این سلول‌ها به‌طور کامل چسبیده و دوکی‌شکل گردیدند که از نشانه‌های مهم سلول‌های مزانشیمی به‌حساب می‌آید و ازنظر ویژگی‌های مورفولوژیک همانند سلول‌های فیبروبلاست بودند. بعد از ۴ روز که سلول‌ها در حدود ۹۰ درصد کف ظرف کشت را پر کرده بودند و در اولین پاساژ، سلول‌های بنیادی جداشده از بافت چربی با سرعت زیادی شروع به تکثیر نمودند، به‌طوری‌که پس از اولین پاساژ سلولی، زمان دو برابر شدن سلول‌ها تقریباً دو روز بود. این



شکل ۱- تصویر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی در پاساژهای ۰، ۱ و ۳
* دوکی‌شکل بودن آن‌ها مؤید ویژگی مزانشیمی این سلول‌ها است.

[1] volume

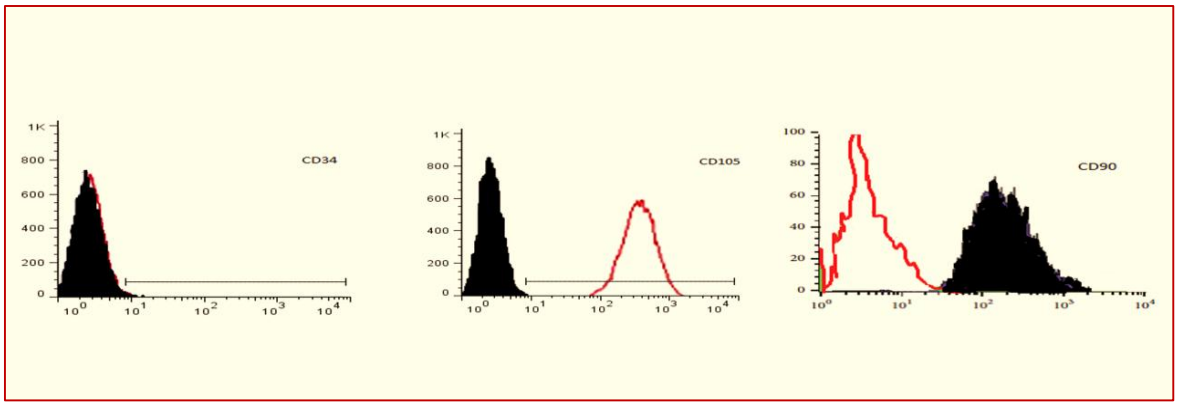
سلول‌ها پس از پاساژ سوم (حدود ده روز پس از کشت اولیه) دارای ظاهری یکنواخت و هموژن بودند و قابلیت استفاده برای انجام مراحل بعدی مطالعه را داشتند (شکل ۱).

جهت تائید مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی پس از انجام فلوسیتومتری نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که این سلول‌ها ازنظر بیان مارکرهای سطحی غیر هماتوپویتیک CD105 و CD90 مثبت و ازنظر بیان مارکر هماتوپویتیک CD34 منفی می‌باشند که مؤید ویژگی‌های بنیادین بودن سلول‌های استخراج‌شده از بافت چربی است (شکل ۲).

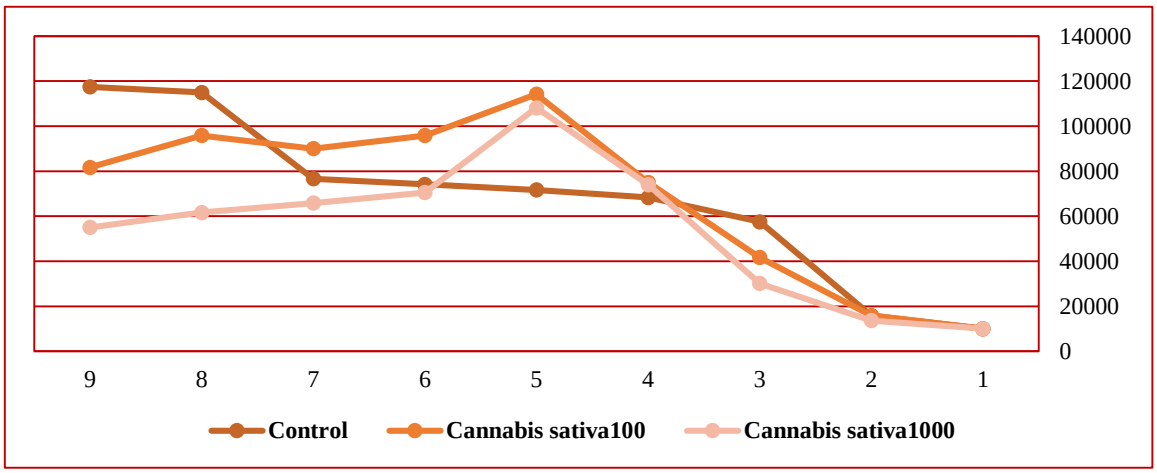
۱۰۰ng/ml و ۱۰۰۰ ng/ml عصاره کانابیس بوده‌اند از روز صفر تا روز سوم، رشد تصاعدی داشته و بعدازآن تا روز ششم روند رشد رو به کاهش بوده که این روند کاهش رشد سلولی در سلول‌های تحت تیمار با دوز ۱۰۰۰ ng/ml شدیدتر از سلول‌های تحت تیمار با دوز ۱۰۰ ng/ml است و از آن به بعد روند رشد سلولی در هر دو گروه تقریباً ثابت مانده است (نمودار ۱).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های مزانشیمی جداشده



شکل۲- بیان مارکرهای سطحی غیر هماتوپویتیک (CD105, CD90) مثبت و هماتوپویتیک (CD34) منفی می‌باشند که نشان‌دهنده ویژگی مزانشیمی بودن این سلول‌ها است.



نمودار Error! No text of specified style in document.- نمودار رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی در گروه کنترل (فاقد تیمار) و گروه‌های تحت تیمار با کانابیس ساتیوا با دوزهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ ng/kg

همچنین بر اساس نمودار منحنی رشد سلولی، در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌های بنیادی جداشده از بافت چربی، در اثر مواجهه با عصاره گیاه کانابیس در دوزهای ۱۰۰ng/ml و ۱۰۰۰، در ابتدا افزایش رشد و تعداد سلول‌ها را نشان می‌دهند. به‌طوری‌که در مورد سلول‌هایی که تحت تیمار با دوزهای

از بافت چربی در محیط کشت دارای ظاهری دوکی‌شکل بوده و ازنظر بیان نشانگر شناسایی سطحی سلول‌های آندوتلیالی CD34 منفی و ازنظر بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD90 و CD105 مثبت بود و نمودار رشد آن‌ها در حضور عصاره کانابیس در ابتدا افزایش و بعدازآن کاهش شدید می‌یابد.

مطالعه دیگر ما نشان داد که عصاره گیاه کانابیس باعث التهاب، تحلیل و نکروزه شدن بافت چربی می‌شود (۲۶). در یک مطالعه نشان داده شد که دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول که یکی از ترکیبات مهم عصاره گیاه کانابیس است بر کدگذاری ژنی برای رشد و آپوپتوز تأثیر می‌گذارد (۲۷). در یک بررسی نشان داده شد که گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع ۱ در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نقش پیش بقایی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزیافته در طی استرس حاد دارند و در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی میزان این گیرنده‌ها افزایش می‌یابد. همچنین فیتوکانابینوئیدهای اگزوژن تتراهیدروکانابینول باعث کاهش بقاء و توانایی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود (۲۸). نشان داده‌شده است که کانابینوئیدها دارای اثرات ضدتکثیری بر تومورهای نواحی مختلف بدن هستند و از مهاجرت و تهاجم سلول‌های موجود در توده سرطانی جلوگیری می‌کنند و اجازه متاستاز به مناطق دورتر را نمی‌دهند. کانابینوئیدها سایر مراحل بیوشیمیایی بدن ازجمله متابولیسم انرژی و التهاب را نیز تعدیل می‌کنند (۲۹). مطالعات نشان داده‌اند که گیرنده‌های CB1 توسط ژن NCR1 در سراسر مغز و در بسیاری از بافت‌های دیگر ازجمله سلول‌های بافت چربی کدگذاری و بیان می‌شود (۳۰)؛ بنابراین احتمالاً عصاره گیاه کانابیس با داشتن ترکیبات کانابینوئیدی و از طریق اتصال به گیرنده‌های CB1 بر رشد و تکثیر سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی تأثیر گذاشته است.

کانابینوئیدها که در عصاره گیاه کانابیس نیز به‌وفور یافت می‌شوند همچنین در متابولیسم انرژی و افزایش توده چربی در بدن نقش مهمی دارند (۳۱). نشان داده‌شده است که THC موجود در عصاره گیاه کانابیس در دوزهای پایین با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش بقاء و تقویت تکثیر سلولی می‌شود و این در حالی است که در دوزهای بالا به‌ویژه از طریق گیرنده‌های CB1 کانابینوئیدی و با ایجاد سمیت سلولی و از طریق افزایش مرگ‌ومیر سلول‌ها و تحریک روند آپوپتوز، باعث کاهش روند رشد سلولی در رده‌های سلولی عصبی و غیرعصبی می‌شود (۳۲)؛ بنابراین در پژوهش حاضر نیز احتمالاً افزایش رشد سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی در روزهای اول تیمار و سپس کاهش شدید رشد و تکثیر این سلول‌ها از روز چهارم به بعد را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی آن در روزهای اول و تحریک روند آپوپتوز از روز چهارم به بعد نسبت داد. نشان داده‌شده است THC که یکی از ترکیبات مهم موجود در عصاره گیاه کانابیس و یکی از آگونیست‌های گیرنده‌های کانابینوئیدی است، باعث اختلال در کمپلکس I، II و III زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود و همچنین منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و نشت آن‌ها از میتوکندری‌ها می‌شود و باعث عدم تعادل قابل‌توجه در وضعیت اکسیداتیو شده و سطح پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو، کربونیلاسیون پروتئین‌ها و آسیب DNA را افزایش می‌دهد (۳۳). در یک بررسی دیگر نیز نشان داده شد که مصرف کانابیس منجر به اختلال در تعادل اکسیداتیو و افزایش سطح فاکتورهای التهابی IL-1β، IL-6، IL-8 و TNF-α می‌گردد که نشان‌دهنده افزایش التهاب و اختلال در تعادل اکسیداتیو است (۳۴)؛ بنابراین در پژوهش حاضر نیز احتمالاً کاهش رشد سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی تحت تیمار با عصاره گیاه کانابیس به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو و تخریب ساختار DNA است.

ترکیبات کانابینوئیدی اندوژن و اگزوژن به‌صورت وابسته به دوز قادر به کنترل تولید سلول در بالغین می‌باشند. به‌این‌ترتیب که القاء کوتاه‌مدت کانابینوئیدها تأثیری بر تکثیر سلولی نداشته، درحالی‌که القاء درازمدت کانابینوئیدهای اگزوژن این مراحل رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۵). میکروپارتیکل‌های محتوی THC باعث افزایش آپوپتوز، کاهش تکثیر سلولی و کاهش رگ‌زایی تومورها می‌شود (۳۶). همچنین در یک مطالعه نشان داده شد که مصرف عصاره گیاه کانابیس باعث افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک BAX می‌شود (۳۷). لذا در پژوهش حاضر کاهش رشد سلول‌های مزانشیمی چربی تحت تیمار با کانابیس را می‌توان به اثر این ترکیب در افزایش بیان ژن فوق و تحریک روند آپوپتوز در این سلول‌ها نسبت داد. با توجه به این‌که در این مقاله آنالیز ترکیبات سازنده عصاره کانبیس صورت نگرفته است پیشنهاد می‌گردد در مطالعه دیگر به این مهم توجه گردد تا دقیقاً ماده مؤثر موجود در عصاره مشخص گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی همانند سایر سلول بنیادی مزانشیمی دارای ظاهری دوکی‌شکل بود و ازنظر بیان مارکرهای سطحی غیر هماتوپویتیک CD105 و CD90 مثبت و ازنظر بیان مارکر هماتوپویتیک CD34 منفی می‌باشند و اگرچه حشیش یا عصاره کانابیس در روزهای

اول تیمار باعث تحریک رشد این سلول‌ها می‌شود ولی از روز چهارم تیمار باعث کاهش شدید رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دوره دکترای تخصصی آقای آرمان کمالی سروستانی است که در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز در سال ۱۳۹۷ تحت شماره 7-E-IR-۷ MIAU.REC.80-B-139 به تصویب رسیده و در مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گردیده است. بدین‌وسیله از تمامی افرادی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

تمامی نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام ننموده‌اند.

References

1. Jamshidi M, Hosseini SE, Mehrabani D, Amini M. Effect of hydroalcoholic extract of Cannabis sativa on cell survival and differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue to osteoblast-like cells. J Gorgan Univ Med Sci.2019;21(2):50-8. [In persian]
2. Radwan MM, ElSohly MA, El-Alfy AT, Ahmed SA, Slade D, Husni AS, et al. Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency Cannabis sativa. J Nat Prod.2015; 78(6): 1271-6. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00065
3. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. Trends Pharmacol Sci. 2009; 30(10): 515-27. doi: 10.1016/j.tips.2009.07.006
4. Hartman RL, Brown TL, Milavetz G, Spurgin A, Gorelick DA, Gaffney G, et al. Controlled vaporized cannabis, with and without alcohol: subjective effects and oral fluid-blood cannabinoid relationships. Drug Test Anal. 2016; 8(7): 690-01. doi: 10.1002/dta.1839
5. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. Pharmacotherapy. 2013; 33(2): 195-09. doi: 10.1002/phar.1187
6. Aviello G, Romano B, Borrelli F, Capasso R, Gallo L, Piscitelli F, et al. Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. J Mol Med (Berl). 2012; 90(8): 925-34. doi: 10.1007/s00109-011- 0856-x
7. Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. Immunobiology. 2010; 215(8): 598-05. doi: 0.1016/j.imbio.2009.04.001
8. Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. Oncotarget. 2014; 5(15): 5852-72. doi: 10.18632/oncotarget.2233.
9. Iversen L. Cannabis and the brain. Brain. 2003; 126: 1252–72.https://doi.org/10.1093/brain/awg143
10. Nasser MW, Qamri Z, Deol YS, Smith D, Shilo K, Zou X, et al. Crosstalk between Chemokine Receptor CXCR4 and Cannabinoid Receptor CB_2 in Modulating Breast Cancer Growth and Invasion. PLoS One. 2011; 6(9): e23901. doi: 10.1371/journal.pone.0023901
11. Hashemi F, Hashemi M, Zali AR. Cannabinoids as a Promising Therapeutic Approach for the Treatment of Glioblastoma Multiforme: A Literature Review. International Clinical Neuroscience Journal.2016; 3(3): 138-43. https://doi.org/10.22037/icnj.v3i3.13655
12. Collins John M, Russell B. Introduction to Stem Cell Therapy. Journal of Cardiovascular Nursing.2009; 24(2):98-5. doi: 10.1097/JCN.0b013e318197a6a5
13. Caplan A, Dennis J.Mesenchymal stem cells as trophic mediators.Journal of Cellular and Biochemistry.2006; 98(5):1076-84 https://doi.org/10.1002/jcb.20886
14. Maleki M, Ghanbarvand F, Behvarz RM, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. International Journal of Stem Cells.2014; 7(2): 118–26. doi: 10.15283/ijsc.2014.7.2.118.

15. Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, 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 Research International. 2013; Article ID 52958. Doi: 10.1155/2013/529589.
16. Bluguermann C,Wu L, Petrigliano F, Mcallister D, Miriuka S, Evseenko DA. Novel aspects of parenchymal–mesenchymal interactions: from cell types to molecules and beyond. CellBiochemistry and Function. 2013; 31(4): 271-80. doi: 10.1002/cbf.295.
17. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue:an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends in Biotechnology.2006; 24(4):150-4. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.01.010
18. Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. Stem Cells Dev.2005; 14(1): 92-02. doi: 10.1089/scd.2005.14.92.
19. Brayfield C, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells for soft tissue regeneration. Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie (Stuttgart).2010; 42(2): 124-8. doi: 10.1055/s-0030-1248269
20. Mehrabani D,Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. J Hum Reprod Sci. 2015; 8(2):103-10. doi: 10.4103/0974-1208.158618.
21. Mohammadi MH, Nabiuni M, Parivar K, Yari S, Sahebi A. Isolation, Culture and characterization of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) by Explant-Enzymatic Methods. Journal of Cell & Tissue (JCT). 2018; 8(4):303-13. [In Persian]
22. Moshki M, Aslinejad M A. The Life Skills Training and Preventive behaviors of Substances Abuse among University Students: a Longitudinal Study. J Fasa Univ Med Sci. 2013; 3 (3):194-01. [In Persian]
23. Sazmand M, Mehrabani D, Hosaini SE, Amini M .The effect of hydroalcoholic extract of Cannabis Sativa on morphology and growth of bone marrow mesenchymal stem cells in rat. Electron J Gen Med 2018;15(3):e m32 .
24. Jamshidi M, Hosseini SE, Mehrabani D, Amini M. Effect of hydroalcoholic extract of cannabis (Cannabis sativa) on morphology and the process of human adipose-derived mesenchymal stem cell growth. Electron J Gen Med. 2018 Jun; 15(3): em31.
25. Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, Shelton RM, Scheven BA. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. Cryobiology. 2014; 69(2):342-7. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.08.003.
26. Kamali-Sarvestani A, Hoseini SE, Mehrabani D, Hashemi SS, Derakhshanfar. Effects in rats of adolescent exposure to Cannabis sativa on emotional behavior and adipose tissue. Bratisl Med J.2020; 121 (4):297-01. DOI: 10.4149/BLL_2020_047
27. Khare M, Taylor AH, Konje JC, Bell SC. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cytotrophoblast cell proliferation and modulates gene transcription. Mol Hum Reprod.2006; 12(5):321-33. doi: 10.1093/molehr/gal036.
28. Gowran A, McKayed K, Campbell VA. The Cannabinoid Receptor Type 1 Is Essential for Mesenchymal Stem Cell Survival and Differentiation: Implications for Bone Health. Stem Cells International.2013;2013: Article ID 796715. doi: 10.1155/2013/796715
29. Chakravarti B, Ravi J, Ganju JK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. Oncotarget.2014; 15(5): 5852-72. doi: 10.18632/oncotarget.2233
30. Xiong W, Cheng K, Cui T, Godlewski G, Rice K, Xu Y, et al. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. Nat Chem Biol.2011; 7:295–03. doi: 10.1038/nchembio.552.
31. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. Cell Metab.2006; 4(5): 341-8. doi: 10.1016/j.cmet.2006.10.008.
32. Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I. Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. Journal of Molecular Medicine.2001; 78(11), 613-25. doi: 10.1007/s001090000177.

33. Parolini M, Binelli A. Oxidative and genetic responses induced by Δ-9-tetrahydrocannabinol (Δ-9-THC) to Dreissena polymorpha. Science of the total environment.2014; 468, 68-6. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.024.
34. Bayazit H, Selek S, Karababa IF, Cicek E, Aksoy N. Evaluation of oxidant/antioxidant status and cytokine levels in patients with cannabis use

disorder. Clinical Psychopharmacology and Neuroscience.2017; 15(3):237-42. doi: 10.9758/cpn.2017.15.3.237
35. Kochman LJ, dos Santos AA, Fornal CA, Jacobs BL. Despite strong behavioral disruption, Delta9-tetrahydrocannabinol does not affect cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. Brain Res.2006; 1113: 86–3. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.07.080
36. Ossa D, Lorente M, Gil-Alegre ME, Torres S, Taboada EG, Aberturas M, et al. Local Delivery of Cannabinoid-Loaded Microparticles Inhibits Tumor Growth in a Murine Xenograft Model of Glioblastoma Multiforme. PLOS ONE.2013; 8 (1): 1-8. doi: 10.1371/journal.pone.0054795
37. Philippot G, Forsberg E, Tahan C, Viberg H, Fredriksson R. A Single δ9-Tetrahydrocannabinol (THC) Dose During Brain Development Affects Markers of Neurotrophy, Oxidative Stress, and Apoptosis. Front Pharmacol.2019; 10:1156. doi: 10.3389/fphar.2019.01156.

Original Article

The Effect of Cannabis Extract on The Growth of Adipose-Derived Stem Cells in Adult Male Rats

Kamali Sarvestani A[1], Mehrabani D[2*], Hoseini SE[1], Hashemi SS[2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran
2. Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 01 Nov 2020 Accepted: 11 Dec 2020

Abstract

Background & Objective: Cannabis is an addictive substance that is a pervasive global problem. Cannabis has many medicinal and psychoactive properties. Adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are widely used in tissue engineering and organ transplantation. The aim of this study was to investigate the effect of cannabis on the growth and proliferation of adipose tissue MSCs in rats.

Materials & Methods: In this experimental study, MSCs were extracted from the adipose tissue of adult male rats and after culturing and confirming that they are mesenchymal by flow cytometry method by CD34-RPE, CD90-RPE and CD105-RPE conjugated antibodies, in the fourth passage of cell culture, the effect of cannabis toxicity at concentrations of 100 and1000 ng/mL during1to7 days on the growth process of these cells was investigated using MTT.

Results: The cells detached from the adipose tissue could completely adhere to the floor of the flask, 24 hours after being transferred to the cell culture flasks. The results of flow cytometry showed that the expression of endothelial surface marker was negative and the expression of MSC markers was positive, which confirmed the basic identity of the extracted cells. The results of MTT also showed a significant increase in cell growth up to the third day and then a significant decrease in the growth of cannabis-treated cells up to the sixth day compared to the control group at $P<0.05$.

Conclusion: The results showed that cannabis has a stimulatory or inhibitory effect on the growth rate of adipose tissue-derived MSCs depending on the duration of use.

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

***Corresponding Author: Mehrabani Davoud,** Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Email: mehrabad@sums.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-5738-1719