Horizon of Medical Sciences
Volume 24, Issue 4, Fall 2018
Pages: 270-276
Type: Original Research

Analyzing the Effects of Adipogenic Potential in Hydro-Alcoholic Extract of Marijuana on Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells of Adult Male Rats

Sazmand M.[1,2], Mehrbani D.[*] ,Hosseini S.E.[2], Amini M.[3]
[*] Burn and Wound Healing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[1] Department of Biology, College of Science, Fars Science and Research, Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
[2] Department of Biology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
[3] Laparascopy Research Center, Department of Surgery Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Abstract

Aims: Millions of people consume psychoactives such as marijuana. Mesenchyme cells, which are derived from bone marrow stem cells, have multiple applications in tissue engineering and regenerative medicine. The aim of this study was to analyze the effects of marijuana on differentiation power of bone marrow stem cells of adult male rats in adipose tissues.

Materials and Methods: In this experimental study, the bone marrow stem cells of adult male rats were segregated with flushing method. Then, their mesenchymal identity was confirmed with a morphological study, PCR-RT method, and surface markers of CD45 and CD34 along with the related genes of CD90 and CD73. For analyzing the viability and differentiation power of the cells in adipose tissues in terms of marijuana usage, cell samples were exposed to different dosages of marijuana, such as 30 and 6000 ng/ml and cell survival was evaluated by MTT. The adipogenic differentiation potential of the treated cells were analyzed based on oil red staining. The results were analyzed by ANOVA and Schaffe tests.

Findings:The results indicated that the extracted cells are non-adherent in flasks and, in moving from passage one to the next passage, their duplication speed increased. In passage three, they changed into fusiform cells. Based on RT-PCR, it was revealed that CD90 and CD73 were existent, but CD34 and CD45 are nonexistent. Marijuana treatment caused no change in the form of stem cells. 10days after exposure to adipogenic circumstances, in addition to increase of survival, their cytoplasm was repleted with adipose.

Conclusion: The results of this study revealed that marijuana has positive effects on mesenchymal bone marrow stem cells in differentiating the adipocyte.

Keywords:
Stem Cells (https://meshb-prev.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D013234)
Cannabis (https://meshb-prev.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D002188)
Drug effects (https://meshb-prev.nlm.nih.gov/record/ui?ui=Q000187)
Adipogenesis (https://meshb-prev.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D050156)
Bone Marrow Cells (https://meshb-prev.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D001854)
Rats (https://meshb-prev.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D051381)

[*]Corresponding Author: Davod Mehrbani
Tel: +989171130337
Fax: +987136223418
Address: Burn and Wound Healing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
E-mail: davood_mehrabani@yahoo.com
Received: 25 Feb 2018 Accepted: 22 Sep 2018 ePublished: 10 Oct 2018

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی کانابیس ساتیوا (حشیش) بر تمایز آدیپوژنیکی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش‌های صحرایی نر بالغ

مریم سازمند
گروه آموزشی زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
دکتر داود مهربانی* PhD
مرکز تحقیقات سوختگی و ترمیم زخم ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
دکتر سید ابراهیم حسینی PhD
گروه آموزشی زیست‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
دکتر مسعود امینی PhD
مرکز تحقیقات لاپاروسکوپی، بخش جراحی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

اهداف: میلیون‌ها نفر در جهان از روانگردان‌هایی نظیر حشیش استفاده می‌نمایند. سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان دارای کاربردهای فراوانی در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی می‌باشند. لذا این مطالعه با هدف بررسی تاثیر عصاره‌ی حشیش بر توان تمایزی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش‌های صحرایی نر بالغ به بافت چربی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نر توسط فلاشینگ جداسازی و با بررسی مورفولوژی و روش RT-PCR با بررسی مارکرهای سطحی CD34 و CD45 و ژن‌های مربوط به CD73 و CD90 هویت مزانشیمی آن‌ها تایید و جهت بررسی توان تمایزی آنها به سلول‌های چربی در شرایط تیمار با حشیش نمونه‌های سلولی در معرض مقادیر ۳۰ تا ۶۰۰۰ng,ml حشیش قرار داده شدند و با استفاده از روش MTT دوز ۱۰۰ ng انتخاب و پتانسیل تمایزی آدیپوژنیک سلول‌های تیمار یافته به کمک رنگ‌آمیزی اویل رد مورد بررسی قرار گرفت و نتایج با استفاده از آزمون‌های ANOVA و توکی آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، سلول‌های استخراج شده در فلاسک‌ها غیرچسبنده بودند و از پاساژ یک به بعد تکثیر آنها سرعت بیشتری یافته و در پاساژ سوم سلول‌ها دوکی شکل شدند و با انجام RT-PCR حضور CD73 وCD90 و عدم حضور CD34 و CD45 نمایان گردیدند. تیمار با حشیش، تغییری در شکل سلول‌های بنیادی ایجاد نکرده و بعد از ۱۰ روز قرارگیری در معرض محیط آدیپوژنیک ضمن افزایش زنده‌مانی، سیتوپلاسم آن‌ها از چربی انباشته گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد که حشیش بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های چربی دارای تاثیر مثبت می‌باشد.

کلید واژه‌ها: کانابیس ساتیوا، سلول بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان، تمایز آدیپوژنیک، موش صحرایی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۳۱
*نویسنده مسئول: davood_mehrabani@yahoo.com

مقدمه

گیاه کانابیس ساتیوا گیاهی از طبقه گلداران و خانواده کانابیناسه است. این خانواده از دو جنس تشکیل شده که کانابیس به عنوان تک گونه خانواده کانابیناسه در نظر گرفته می‌شود[1]. بیش از ۱۲۰۰۰ سال از مصرف این گیاه می‌گذرد و هنوز بسیاری در سراسر جهان از قسمت‌های مختلف این گیاه برای مصارف دارویی استفاده می‌کنند[2]. حشیش به عنوان یکی از محتویات گیاه کانابیس به عنوان بیش‌ترین داروی روان‌گردان توسط میلیون‌ها نفر در تمام نقاط دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. کانابیس تقریبا در هر کشوری قابل کشت است و به‌طور چشم‌گیری در کشورهای پیشرفته کشت می‌شود. رزین کانابیس (حشیش) در حدود ٦٥ کشور تولید می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها آفریقای شمالی و کشورهای جنوب‌غربی آسیا به ویژه افغانستان و پاکستان می‌باشند. همچنین در طول زمان مواد موثر فرآورده‌های این گیاه، مورد مطالعه قرار گرفته‌است به طوری که اثر فرآورده‌های این گیاه را به وجود اسانسی که در آن وجود دارد مرتبط دانسته و از این اسانس نیز دو کربور یکی به نام کانابن، مایعی با بوی بسیار قوی و دیگری هیدروکانابن، جسمی فاقد بو به دست آورد اثر فیزیولوژیکی فرآورده‌های گیاه مذکور مربوط به یک ماده رزینی نام کانابین یا حشیش است که بوی قوی و طعم تند دارد و عمدتا بخش مورد استفاده این گیاه از نظر درمانی، سرشاخه‌های گلدار یا میوه‌دار پایه‌های ماده واریته ایندیکا آن می‌باشد[3]. برای عصاره گیاه کانابیس خواصی چون، تسکین درد، بی حس کنندگی، آرام کنندگی، مرهم مسکن، دارای خواص پادزهری، اثرات مقوی، تقویت کننده قوای جنسی مردانه، محرک سیستم اعصاب مرکزی، مدر، قاعده‌آور، خواب‌آور، صفراآور، ملین، ضد کرم های انگلی و توان آنتی‌بیوتیکی برای آن در منابع مختلف آورده شده است. این گیاه هم‌چنین در درمان‌های سنتی برای درمان مواردی چون: آلوپسی، سرطان، تومورها، سرماخوردگی، قولنج، سرفه، بی اشتهایی، یبوست، تهوع، دیس پپسی، افسردگی، صرع، میگرن،التهاب، رماتیسم، اسپاسم، کزاز و زخم مورد استفاده قرار می‌گیرد[4]. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات گذشته نشان داده شده است که عصاره گیاه کانابیس دارای اثرات آپوپتوزی است که می‌تواند در زمان بروز بیماری‌هایی چون سرطان مفید باشد[6,5]. همچنین اثرات موتاژنی و تراتوژنی ترکیبات گیاه کانابیس نظر پژوهشگران را از گذشته تا به‌حال به‌خود جلب نموده به طوری که در زمینه بررسی آسیب‌های کروموزومی افراد مصرف کننده کانابیس، دانشمندان مختلف تحقیقاتی را به انجام رسانده اند[7]. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات نشان داده شده است که سیستم‌های اندوکانابینوئیدی در بدن، سیستم‌های پیام‌رسان، تعدیل‌گر و درون‌زاد لیپیدی هستند که دارای اجزایی نظیر گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع یک و دو[1,2]، پروتئین‌های مسئول تولید، انتقال و تجزیه کانابینوئیدهامی‌باشند[8,9,10].

سلول‌های بنیادی سلول‌های غیر تخصصی هستند که توانایی ساختن هر بافتی را در بدن انسان دارند، از این رو کاندیدهای خوبی برای استفاده درمانی در بازسازی و ترمیم بافت هستند. سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌های اجدادی یا پیشرو و هم‌چنین به عنوان سلول‌های کلوژنیک تعریف می‌شوند که توانایی خودنوزایی و تمایز به انواع بافت‌ها را دارا می‌باشند[11]. انباشت چربی در بدن منجر به نارسایی‌های خودایمنی و گاها آپوپتوز می‌شود[12]. سلول‌های بنیادی با داشتن خواص ضد آپوپتوزی، تسریع رگزایی، میتوز و تمایز به سلول‌های دیگر در مهندسی بافت نقش مهمی دارند[13].اکثر مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که سلول‌های مزانشیمی توانایی گریز از سیستم ایمنی را داشته و پاسخ ایمنی را مهار می‌کنند

که هر دوی این ویژگی‌ها از نکات مهم در پیوند اعضا و سلول درمانی هستند[14]. اگر چه در رابطه با کاربردهای گیاه کانابیس در زمینه درمان بیماری‌های آلرژیک و التهابی و نورودژنرتیو و همچنین اثر آپوپتوتیک آن گزارش‌های متعددی در دست است لیکن در تمام این مطالعات، اثر توکسیک احتمالی این ماده بر سلول‌های بنیادی کمتر مورد توجه قرار گرفته است[15]. لذا با توجه به کاربردهای دارویی این گیاه در زمینه درمان بیماری‌های آلرژیکی التهابی و همچنین اثرات نورودژنرتیو و آپوپتوتیک از یک سو و مضرات ناشی از سوء مصرف آن از سوی دیگر و همچنین اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم و بازسازی اندام‌ها و کاربرد آن در پزشکی پیوند و مهندسی بافت، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر عصاره گیاه کانابیس ساتیوا (حشیش) بر پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش‌های صحرایی به بافت چربی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

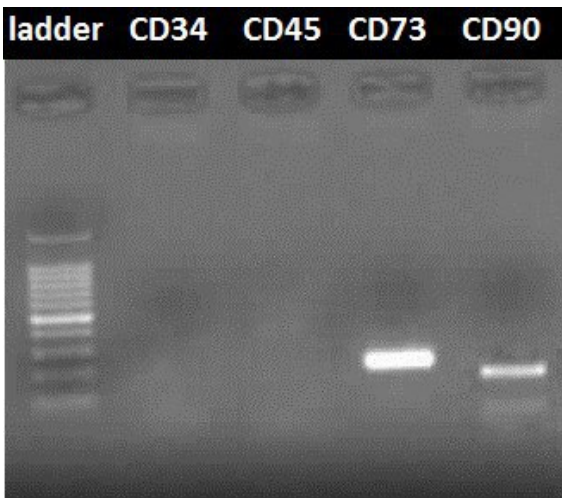
این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه آزاد اسلامی شیراز انجام گردید. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در رابطه با کار با حیوانات تنظیم و در کمیته اخلاق دانشگاه تحت شماره۸۰۷ . 1396 IR.miau. REC. به تصویب رسید. در این بررسی جهت مطالعه چگونگی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش‌های صحرایی به سلول‌های بافت چربی تحت تاثیر گیاه کانابیس، عصاره‌ی هیدروالکلی این گیاه با استفاده از روش پرکولاسیون تهیه گردید. برای این منظور سرشاخه‌های گلدار گیاه کانابیس ساتیوا از مرکز مبارزه با مواد مخدر شیراز تهیه و سپس در محیط تاریک و بدون رطوبت خشک و پودر گردید. آنگاه عصاره‌ی موجود در برگ خشک شده‌ی گیاه کانابیس با استفاده از اتانول۷۰٪ ساخت مرک آلمان به عنوان حلال استخراج شد. سپس به منظور حذف کامل حلال، محلول حاصل در دستگاه روتاری ساخت شرکت IKA کشور آلمان با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد و گردش ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در پایان عصاره با استفاده از پمپ خلاء به طور کامل تغلیظ گردید. همچنین در مطالعه حاضر عصاره‌ی به دست آمده را در ظرف‌های شیشه‌ای ریخته و در دمای یخچال نگهداری گردید. در زمان انجام آزمایشات و به منظور رقیق‌سازی عصاره جهت مواجهه‌ی سلول‌ها از اتانول مطلق مرک آلمان و آب مقطر استفاده گردید.

در این مطالعه جهت تهیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان ۵ سر موش صحرایی نر بالغ دو ماهه با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۸۰ گرم از خانه حیوانات مرکز پزشکی مقایسه ای و تجربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری و به آزمایشگاه کار با حیوانات آزمایشگاهی واقع در برج پژوهشی محمدرسول‌الله (ص) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز انتقال داده شدند. بعد از گذشت دو ساعت با استفاده از روش آرام‌کشی حیوانات به روی سینی تشریح در زیر هود لامینار (JAL TAJHIZ-JTLVC2X-IRAN) منتقل شدند آنگاه استخوان‌های ران و درشت نی آن‌ها جدا گردیده و به فالکون (BD-USA) استریل حاوی سالین بافری فسفاته و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، استرپتومایسین و ضدقارچ آمفوتریسین قرار گرفت. جهت جلوگیری از فساد بافتی فالکون محتوی نمونه روی مقادیری یخ قرار گرفت و با رعایت شرایط کاملا استریل دو انتهای استخوان‌ها قطع گردید. سپس شستشوی مغز استخوان با سرنگ توسط محیط(F12 DMEM (Bio idea, Iran بدون FBS از دو انتهای استخوان صورت گرفت. سانتریفیوژ (Eppendorf Centrifuge 5702R-Germany) سوسپانسیون سلولی داخل فالکون با دور ۱۰۰۰rpm در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. آنگاه توده سلولی ته‌نشین شده کف لوله‌ها با یک میلی‌لیتر محیط کشت F12 DMEM معلق به یک فلاسک ۷۵ (Orange, USA) منتقل و با ۱۵ میلی لیتر محیط کشت F12 DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS (GIBCO, USA)کشت داده شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد Co2 انکوبه شدند. و زمانی‌که تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام و سلول‌ها پس از پاساژ سوم جهت کشت مورد استفاده قرار گرفتند. در این بررسی با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Nikon ECL IPSE TS100; GAPAN)، سلول‌ها از لحاظ ظاهر دوکی و فیبروبلاست مانند مورد بررسی قرار گرفتند و مزانشیمی بودن آنها مورد تایید قرار گرفت. همچنین در این مطالعه برای اندازه گیری میزان سمیت عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه کانابیس و تعیین میزان قابل استفاده در این بررسی از روش تست MTT استفاده گردید. برای این کار ابتدا حدود ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک سه پلیت ۹٦ چاهکه (Invitrogen;USA) حاوی محیط کشت قرار داده شد. بعد گذشت زمان ۲٤ ساعت در مرحله تعویض محیط، محیط کشت با غلظت‌های متفاوتی از عصاره کانابیس دوزهای متفاوتی از عصاره کانابیس شامل ٤، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱٤۰، ۱۳۰، ۱۲۰، ۱۱۰، ۱۰۰، ۹۰، ۸۰، ۷۰، ٦۰، ۵۰، ٤۰، ۳۰، ۵۰۰۰، ٤۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ٦۰۰، ۵۰۰، ۰۰ و ٦۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، به گروه‌های آزمایش افزوده شد و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار داده شد. سپس محیط کشت سلول‌های یکی از پلیت‌ها با ۲۰ میکرو لیتر محلول تازه‌ی رنگ MTT با غلظت 5 mg/ml تعویض شد. پس از ٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد محلول رویی سلول‌ها دور ریخته شد و جهت لیز شدن سلول‌ها به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر محلول DMSO (Sigma-Aldrich, Germany)) اضافه گردید تا بلورهای فورمازون ایجاد شده در اثر واکنش با MTT از بین بروند. و پلیت ۹٦ چاهکی در فویل پیچیده شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه شیک گردید و در انتها جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر (polarstar omega-BMG LABTECH;Germany) در طول موج ۵۷۰ نانومتر محاسبه گردید. جهت دو پلیت دیگر در طی ۷۲ ساعت یکی تعویض محیط با محیط کشت بدون عصاره پس از هر ۲٤ ساعت در همه چاهکها و دیگری تعویض با الگوی افزایش عصاره به محیط طبق روز اول انجام گردید. پس از ۷۲ ساعت هر دو پلیت مورد تست MTT قرار گرفتند. در این مطالعه بر اساس نتایج حاصل از آزمون MTT غلظت مناسب در محدوده ۱۵۰-۳۰ng/ml انتخاب گردید. از بین این

غلظت‌ها، دوز اپتیمم ۱۰۰ ng/ml برای تیمار سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین در این مطالعه بیان برخی ژن های اختصاصی سلول های بنیادی با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی مارکرهای سطحی سلول‌ها، جداسازی mRNA، تولید cDNA با روش PCR و تکثیر ژن‌های مربوط به CD34 و CD45 که مارکر سلول‌های هماتوپویتیک، و ژن‌های مربوط به CD73 و CD90 که از مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی هستند انجام گردید. همچنین جهت تعیین تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های چربی توسط رنگ آمیزی اویل رد، از ظروف کشت ٦ چاهکه استفاده شد، به گونه‌ای که تراکم سلولی در هر چاهک به حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد رسیده باشد. سپس دو چاهک به عنوان کنترل منفی، با محیط کشت DMEM +FBS10 درصد، دو چاهک به عنوان کنترل مثبت با محیط کشت تمایز چربی و دو چاهک به‌عنوان آزمایش با محیط تمایز به به چربی حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۳- فسفات (Merck , Germany)، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون(sigma aldrich,Germany) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین(sigma aldrich,Germany) و عصاره کانابیس انتخاب شدند. این پلیت ها به مدت ۲۱ روز در انکوباتور(CO2 Incubator, MEMMERT GERMANY) نگهداری شدند و هر دو روز یک بار محیط چاهک ها تعویض گردید.جهت بررسی میزان تمایز به سلول های چربی تحت تاثیر محیط القایی عصاره کانابیس ساتیوا، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۲۱ روز پس از تیمار با عصاره گیاه، کلیه چاهک‌ها به‌مدت ٤٥ دقیقه با فرمالین ٤ درصد (Merck, Germany)، تثبیت گردیدند و در ادامه پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد(Merck, Germany)، با محلول اویل رد(Bio Idea, Iran) رنگ آمیزی شدند. پس از طی این زمان، سلول‌ها سه تا چهار مرتبه با الکل ۷۰ درصد شستشو و با میکروسکوپ اینورت (Nikon ECL IPSE TS100- GAPAN)مورد بررسی قرار گرفتند .همچنین در این بررسی با استفاده از نرم افزار آماری SSPS-23 و با استفاده از آزمون‌های آماری تجزیه واریانس یک طرفه و تعقیبی شفه آنالیز و معناداری اختلاف داده‌ها در سطح $p<0.05$ در نظر گرفته شد.

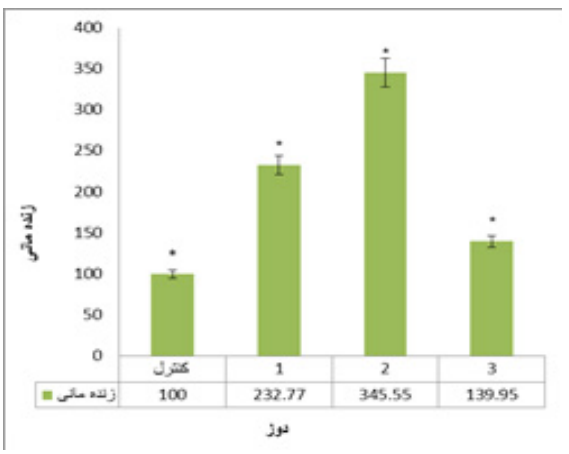
نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد که اغلب سلول‌های استخراج شده در فلاسک‌ها غیرچسبنده بودند و در اولین شستشوی فلاسک و تغییر محیط کشت جدا شدند. برخی از سلول‌های باقی‌مانده به شکل کلونی رشد کرده و بعد از گذشت حدود ۳ تا ٤ روز پس از کشت، یک لایه تک‌سلولی با تراکم ۸۰ تا ۹۰٪ در فلاسک تشکیل گردید. پس از تیمار سلول‌ها با تریپسین، سلول‌ها دوباره به حالت گرد درآمدند و با بازگشت به فلاسک کشت در طی سه روز مجددا بخش عمده‌ای از سطح محیط کشت توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل پر شد. از مرحله پاساژ یک و پاساژهای بعدی رشد و تکثیر سلول‌ها سرعت بیشتری پیدا کرده به نحوی‌که در مدت ٤-۳ روز، ۹۰-۸۰ درصد سطح کشت توسط سلول‌ها پوشش داده شد. در پاساژ سوم اغلب سلول‌ها به شکل فیبروبلاستی و یا دوکی شکل که شکل معمول سلول‌های بنیادی مزانشیمی است در آمدند. هم چنین پس از استخراج RNA، ساخت cDNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز باند اختصاصی مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تشخیص داده شدند. به علاوه باندهای اختصاصی مربوط به سلول های بنیادی خونساز مشاهده نگردیدند. حضور CD90 و CD73 و عدم حضور CD34 و CD45 در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱) عدم حضور CD34 (۲۵۷bp) و CD45 (٤٥٠bp) و حضور CD73 (۲۰۸bp) و CD90 (۱۷۷bp).

همچنین نتایج آزمون MTT در این بررسی نشان داد که تیمار با عصاره گیاه کانابیس، نه تنها باعث ایجاد هیچ گونه تغییر در شکل ظاهری سلول‌های بنیادی مزانشیمی نمی شود. بلکه نتایج این تست حاکی از افزایش زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل می باشد. به علاوه



نمودار۱) مقایسه میانگین زنده‌مانی در گروه‌های مختلف.

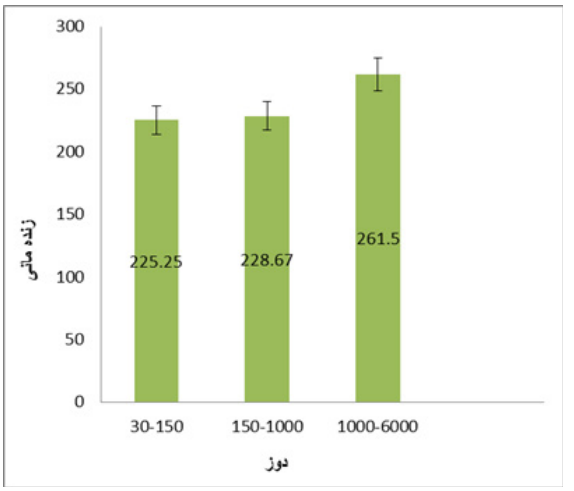
کنترل: سلول‌های بدون مواجهه با عصاره کانابیس

۱- سلول‌های دریافت کننده دوزهای ۱۵۰-۳۰ ng/ml پس از ٢٤ ساعت.

۲- سلول‌های دریافت کننده دوزهای ۱۰۰۰-۱۵۰ ng/ml پس از ۷۲ ساعت.

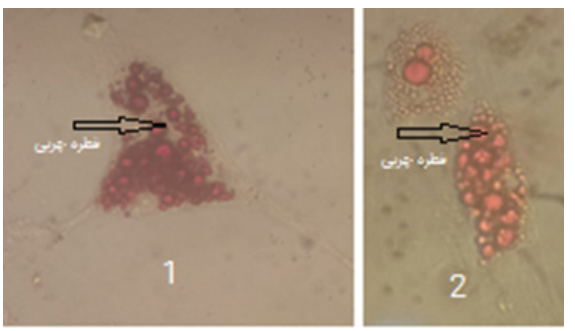
۳- سلول‌های دریافت کننده دوزهای ٦۰۰۰-۱۰۰۰ ng/ml پس از ۷۲ ساعت.

نتایج حاصل آنالیز آماری داده در این مطالعه نشان داد که در بین مقادیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه‌های دریافت کننده دوزهای مختلف عصاره گیاه کانابیس اختلاف معنی داری مشاهده نمی‌شود (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار۲) مقایسه میانگین زنده مانی سلولهای دریافت کننده دوزهای ۳۰ ng/ml تا۱۵۰، ۱۵۰تا۱۰۰۰، ۱۰۰۰تا۶۰۰۰.

به علاوه نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار روزانه با دوز ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه کانابیس به محیط تمایز سلول‌های گروه تجربی و پس از قرارگیری سلول‌ها در معرض محیط آدیپوژنیک اولین قطرات چربی همانند سلول‌های گروه کنترل مشاهده شد به طوری‌که پس از ۱۰ روز تمام سیتوپلاسم برخی از سلول‌ها از چربی انباشته شده بود. بعد از گذشت ۲۱ روز و با استفاده از روش رنگ آمیزی با اویل رد، ماهیت چربی قطرات مشاهده شده در سیتوپلاسم سلول‌های گروه‌های کنترل و تجربی، تایید گردید (شکل۲).



شکل۲) نمایش قطرات چربی در سلول‌ها. ۱- محیط کنترل ۲- محیط تمایز به چربی به همراه عصاره کانابیس ساتیوا.
رنگ قرمز نشان دهنده وجود دانه‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها در گروه‌های کنترل و تجربی می‌باشد.

بحث

بر اساس مشاهدات مورفولوژیک سلول‌های کنترل و تیمار شده با عصاره کانابیس، مزانشیمی بودن آن‌ها بر اساس شکل دوکی و چسبندگی به کف فلاسک تایید و اثبات گردید و نشان داده شد که وجود عصاره کانابیس درغلظت به‌کارگرفته‌شده هیچ تاثیری بر خاصیت چسبندگی به کف فلاسک و یا ظاهر سلول‌ها نداشته است که این نتایج با مطالعات قبلی درباره اثبات مزانشیمی بودن سلولهای بنیادی مشابهت دارد[17,16]. در این پژوهش، به منظور اثبات مزانشینی بودن سلول‌های مذکور، وجود یا عدم وجود مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش رونوشت برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمراز، عدم حضور CD34 و CD45 و حضور CD73 و CD90 در مورد همه گروه‌های سلولی کنترل و آزمایش مورد تایید قرار گرفت که با نتایج حاصل ازتحقیقات انجام شده توسط کاروز در سال ۲۰۱۰، ماکسون در سال ۲۰۱۲ و رحمانی فر در سال ۲۰۱۶ هم سو می‌باشد[18,19,20]. در این پژوهش، توان تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های چربی و اثر عصاره کانابیس نیز در این زمینه مورد بررسی قرار گرفت وسلول‌های بنیادی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر عصاره کانابیس همچون سلول‌های قرار گرفته در محیط تمایز به چربی، قادر به تمایز به سلول‌های چربی بودند نتایج حاکی از آن‌است که وجود عصاره کانابیس ممانعتی جهت تمایز به سلول‌های چربی نیست و نتایج حاصل با کارهای انجام شده درمورد اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی از طریق تمایز آن‌ها به سلول‌های چربی انجام‌شده بود، هم‌سو می‌باشد[21]. آدیپوژنز فرآیندی است‌که فاکتورهای مختلفی در بروز آن نقش دارد. PPARγ یکی از فاکتورهای لازم جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی است زیرا به طیف وسیعی از ژن‌های موثر در تمایز به چربی متصل گردیده و سبب القای بیان آن‌ها می‌شود. اگرچه به مطالعات بیش‌تری در زمینه اثر کانابیس بر بیان ژن PPARγ که برای تمایز سلول‌ها به بافت چربی دارای نقش کلیدی می‌باشد نیاز است[22] اما نشان داده شده است که تتراهیدروکانابینول که یکی از ترکیبات موثر در عصاره گیاه کانابیس می‌باشد به‌عنوان یک لیگاند فعال برای PPARγ بوده و منجر به یک اثر گشادکنندگی وابسته به زمان در جدار شریان‌ها و تحریک آدیپوژنز که یکی از خصوصیات لیگاندهای PPARγ می‌باشد می‌گردد و همچنین باعث تغییر در سطح اندوکانابینوئید و افزایش تمایز به چربی را باعث می‌شود.به‌علاوه می‌توان از کانابینوئیدها جهت درمان استفاده نمود زیرا با اتصال به رسپتورهای PPARγ سبب تمایز سلول‌ها و متابولیسم لیپیدها می‌گردند. از آنجا که درمطالعات قبلی به نقش PPARγ در تنظیم شکل‌گیری آدیپوسیت‌ها و التهاب و حساسیت سلول‌ها به انسولین اشاره شده است[23,24]. لذا احتمالا می توان هم‌سو با نتایج این مطالعات، یافته‌های پژوهش حاضر را نیز در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های چربی را به اثر کانابینوئیدهای موجود در عصاره گیاه کانابیس مورد استفاده بر روی رسپتورهای PPARγ که باعث تمایز سلول‌ها و متابولیسم چربی‌ها می شود نسبت داد. در گذشته پژوهش‌هایی درمورد نقش سیستم اندوکانابینوئیدی در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به گروه‌های دیگر سلولی، چون سلول‌های غضروف و استخوان، انجام شده بود که همگی موید اثر افزاینده در این زمینه است. در این‌باره به ارتباط بین افزایش

فعالیت سیستم کانابینوئیدی و درمان پوکی استخوان اشاره شده است. گیرنده کانابینوئیدی نوع ۱ از طریق تنظیم تمایز سلول‌های استرومایی به سلول‌های استخوان و چربی می‌تواند استخوان را در برابر تخریب استخوان ناشی از افزایش سن محافظت کند[24,26]. دگزامتازون تمایز سلول‌های داربستی مغز استخوان به سمت سلول‌های چربی بالغ را افزایش می دهد که این اثر را می‌توان با نتیجه حاصل از این پژوهش چنین تفسیر کرد که احتمالا به دلیل خاصیت ضدالتهابی عصاره به‌کار گرفته شده و مشابهت اثر آن با دگزامتازون، تمایز به چربی نیز افزایش یافته‌است[27]. ضمنا با توجه داشت که اثر ترکیبات کانابیس در رابطه با تمایز همیشه مثبت نبوده و در ارتباط با سلول‌های فعال سیستم ایمنی منفی است بطوری‌که دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول در مرحله پریناتال سبب اختلالات شدیدی در تمایز و عملکرد سلول T در مراحل جنینی و پس از تولد می‌شود[28]. به علاوه باید توجه داشت که تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به آدیپوسیت‌ها اهمیت زیادی دارد زیرا پوکی استخوان و خطر شکستگی استخوان در پی افزایش سن، با دو عامل افزایش آدیپوسیت‌ها در مغز استخوان و کاهش استئوبلاست‌ها در ارتباط است[29]. بنابراین برای پیشگیری از پوکی و شکستگی استخوان‌ها علاوه بر تحریک استئوژنز نیاز به مهار آدیپوژنز نیز می‌باشد[30]، که این مسئله یکی از دلایل محدودیت استفاده از عصاره های گیاهی نظیر کانابیس است.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاه کانابیس ساتیوا بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های چربی دارای تاثیر مثبت است و از آنجا که برای پیشگیری از پوکی و شکستگی استخوان‌ها علاوه بر تحریک استئوژنز نیاز به مهار آدیپوژنز نیز می‌باشد لذا در زمان درمان افراد معتاد به فرآورده‌های این گیاه و یا افراد درمان شونده با مشتقات آن، به‌خصوص در مورد بیماری‌های مربوط به استخوان نظیر پوکی و شکستگی استخوان بایستی به نقش منفی مشتقات گیاه کانبیس در این مورد توجه ویژه شود.

تشکر و قدردانی: از تلاش‌ها و مساعدت‌های کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که در اجرای این پروژه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزاریم.

تاییدیه اخلاقی: موردی از جانب نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان: مریم سازمند (نویسنده اول) ۲۵ درصد، داوود مهربانی(نویسنده مسئول) ۲۵ درصد، سید ابراهیم حسینی (نویسنده سوم) ۲۵ درصد، مسعود امینی (نویسنده چهارم) ۲۵ درصد.

منابع مالی: هزینه های این مطالعه به صورت شخصی تأمین شده است.

منابع

1- Kidd PM. Multiple sclerosis, an autoimmune inflammatory disease: prospects for its integrative management. Altern Med Rev. 2001;6(6):540-66.

2- Long JZ, Nomura DK, Vann RE, Walentiny DM, Booker L, Jin X, et al. Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(48):20270-20275.

3-Alakbarov FU. Medicinal Properties of Cannabis According to Medieval Manuscripts of Azerbaijan. Journal of Cannabis Therapeutics.2001; 1(2): 3-14.

4-Farquhar-Smith WP. Pain and cannabinoids: science and evidence. Pain Reviews.2002; 9(1): 41.

5- Ruiz L, Miguel A, Díaz-Laviada I. Δ9-Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. FEBS letters.1999; 458(3): 400-404.

6- Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M. Δ9-Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. FEBS letters.1998;436(1): 6-10.

7- Marselos M, Karamanakos P. Mutagenicity, developmental toxicity and carcinogenicity of cannabis. Addiction biology.1999; 4(1): 5-12.

8- Cavuoto P, Wittert GA. The Role of the Endocannabinoid System in the Regulation of Energy Expenditure. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009; 23(1):79-86.

9- Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The Pharmacologic and Clinical Effects of Medical Cannabis. Pharmacothera py.2013;33(2):195-209

10- Svízenská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid Receptors 1 and 2 (CB1 and CB2). Their Distribution, Ligands and Functional Involvement in Nervous System Structures -- A Short Review. Pharmacol Biochem Behav.2008; 90(4):501-511

11- Jesse k, Biehl B. Introduction to stem cell therapy. J Cardiovasc Nurs. 2009; 24(2): 98–105.

12- Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. Experimental biology and

medicine. 2010; 235(10):1185-93.
13- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators.Journal of Cellular Biochemistry.2006 Aug; 98(5): 1076-1084.
14- Pournassarkhakabaz B , Baharvand H. Human Mesenchymal Stem Cells and its therapeutic applications. Anatomical sciences journal,2007;5(19-20):167-215
15- Taheri F, Haji Ghasem Kashani M, Ghorbanian MT, Hosseinpour L. Inductive effect of Deprenyl and Dimethyl sulfoxide on proliferation and survival of the mesenchymal stem cells. J Gorgan Univ Med Sci. 2012; 14 (3) :10-18.
16- Ramezani T, Baharara J, Saghiri N. The Effect of Saffron Aqueous Extract (Crocus sativus L) on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Journal of Birjand University of Medical Sciences.2014; 21(2): 169-178.
17- Polisetti N, Chaitanya VG, Babu PP, Vemuganti GK. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. Neurol India. 2010;58(2):201-8.
18- Karaoz E, Genç ZS, Demircan PÇ, Aksoy A, Duruksu G. Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Cell death & disease. 2010; 1(4):36.
19- Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. Stem cells translational medicine.2012; 1(2):142-149.
20- Rahmanifar F, Tamadon A, Mehrabani D, Zare SH, Abasi S, Keshavarz S, et al. Histomorphometric evaluation of treatment of rat azoosper-mic seminiferous tubules by allotransplantation of bonemarrow-derived mesenchymal stem cells. Iran J Basic Med Sci. 2016; 19(6):653-661.
21- Mahmoudi Z, Soleimani M, Saidi A, Iranshahi M, Azizsoltanli A. Effect of Ferula gummosa ethanolic extract on osteogenesis in human mesenchymal stem cells. Journal of Medicinal Plants.2013; 2(46): 50-59.
22- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJet al. C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ: a unified pathway. Genes & development. 2002 Jan 1;16(1):22-6.
23- O'sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: Evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. British journal of pharmacology. 2007; 152(5):576-582.
24- Frisher M, White S, Varbiro G, Voisey C, Perumal D, Crome I et al. The role of cannabis and cannabinoids in diabetes. The British Journal of Diabetes & Vascular Disease. 2010;10(6):267-273.
25- John M, McPartland. The Endocannabinoid System: An Osteopathic Perspective. JAOA.2008; 108 (10): 286-295.
26- Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Canals M, Milligan G, Baker D, et al. Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. Cell Metabolism.2009; 10(2): 139-147.
27- Nick Bakhte Dastjerdi, M. The Effect of Dexamethasone on the Differentiation of Bone Marrow Scaffold Cells into Fatty Cells. Isfahan Medical School J.2005; 23(77-76): 17-17.
28- Lombard C, Hegde V L, Nagarkatti M, Nagarkatti P S. Perinatal exposure to Δ9-tetrahydrocannabinol triggers profound defects in T cell differentiation and function in fetal and postnatal stages of life, including decreased responsiveness to HIV antigens. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.2009; 339(2): 607-617.
29- Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. Expert opinion on therapeutic targets. 2009; 13(5):593-603.
30- Cao JJ.Effects of obesity on bone metabolism. J Orthop Surg Res. 2011;6(1):30.