Archive of SID

Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 20, No. 2, Summer 2020, Pages 232-241

The Effect of Cannabis Extract on SH-SY5Y Nerve Cell

Parsa F[1], Hosseini SE*[1], Mehrabani D[2], Hashemi SS[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.

**** Corresponding author.*** Tel: +987136392346, Fax: +987136392346, E-mail: ebrahhim.hossini@yahoo.com

Received: May 27, 2020 Accepted: Nov 20, 2020

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

ABSTRACT

Introduction & objectives: Cannabis extract is an important psychoactive substance that have used by people around the world. Due to the diverse effects of cannabis on brain cells, this study was conducted to investigate the effect of cannabis extract on the growth of SH-SY5Y neurons.

Methods*:* In this experimental study, SH-SY5Y cells were prepared from Pasteur Institute of Iran and then incubated in DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum ,embryo-L glutamine, penicillin and streptomycin at 37^{oC} and 5% CO_2. following cell proliferation, the cells in the fourth passage were divided into control and experimental groups which were treated with cannabis at concentrations of 100 and1000 ng/ml. during 1 to 9 days, SH-SY5Y cells growth was calculated by flow cytometry using PDT= $T\times\frac{ln2}{ln\frac{Xe}{Xt}}$ formula.

Results*:* SH-SY5Y cells adhered to the bottom of the flask 24 hours after transfer to the cell culture flask. These cells were initially spherical and after 24 hours become spindle. The results of cell count test on days 1 to 6 showed the growth of cannabis-treated cells similar to the control group, but from the sixth day, in the cannabis extract treated groups, a significant reduction in cell growth was observed at the level of $p<0.05$ compared to the control group.

Conclusion: The results showed that SH-SY5Y cells in the culture medium were spherically shaped, similar to fibroblast cells, and the based on the results of cell count, it was determined that cannabis inhibits the growth of these cells.

Keywords: Cannabis; SH-SY5Y; Cell Growth

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر عصاره گیاه کانابیس (شاهدانه) بر سلول‌های عصبی SH-SY5Y

فرشید پارسا[۱]، سیدابراهیم حسینی[۱*]، داود مهربانی[۲]، سیده سارا هاشمی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲. مرکز تحقیقات سوختگی و زخم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۷۱۳۶۳۹۲۳۴۶ فاکس: ۰۷۱۳۶۳۹۲۳۴۶ پست الکترونیک: ebrahim.hossini@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: حشیش یا عصاره شاهدانه، از مواد مهم روانگردانی است که میلیون‌ها نفر در سراسر دنیا از آن استفاده می‌نمایند. با توجه به اثرات متنوع حشیش در سلول‌های مغزی، این مطالعه با هدف بررسی اثر حشیش بر رشد سلول‌های عصبی رده SH-SY5Yانجام گردید.

روش کار: در این مطالعه تجربی سلول‌های رده SH-SY5Y از انیستیتو پاستور ایران تهیه و سپس در محیط DMEM بعلاوه ۱۰٪ سرم جنین گاوی L-گلوتامین، پنی سیلین و استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه و CO_2 ۵٪ انکوبه شدند. پس از اطمینان از تکثیر سلول‌ها و رسیدن به تراکم لازم، سلول‌ها در پاساژ چهارم، به گروه های کنترل و تجربی تحت تیمار با حشیش در غلظت‌های ng/ml ۱۰۰۰ و ۱۰۰ تقسیم شدند و در طول مدت ۱ الی ۹ روز رشد سلول‌های SH-SY5Yبه روش فلوسایتومتری و توسط فرمول $PDT= T\times\frac{ln2}{ln\frac{Xe}{Xb}}$ محاسبه گردید.

یافته‌ها: سلول‌های SH-SY5Y، ۲٤ ساعت بعد از انتقال به فلاسک کشت سلولی، به کف فلاسک چسبیدند. این سلول‌ها در ابتدا کروی بوده و بعد از ۲٤ ساعت دوکی شکل شدند. نتایج آزمون شمارش سلولی در روزهای ۱ تا ۶ حاکی از رشد سلول‌های تیمارشده با حشیش مشابه با گروه کنترل بود اما از روز ششم به بعد در گروه های تحت تیمار با (عصاره شاهدانه) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار رشد سلولی در سطح ($p<۰/۰۵$) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد سلول‌های SH-SY5Y در محیط کشت از حالت کروی، مشابه سلول‌های فیبروبلاستی، دوکی‌شکل شده و بر اساس نتایج حاصل از شمارش سلولی مشخص گردید که حشیش مانع رشد این سلول‌ها می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کانابیس، SH-SY5Y، رشد سلولی

دریافت: ۱۳۹۹/۳/۷ **پذیرش:** ۱۳۹۹/۸/۳۰

مقدمه

شاهدانه گیاهی گلدار و با نام علمی *Cannabis sativa* از خانواده *Cannabaceae* می‌باشد که از حدود ۵۰۰۰ سال قبل تاکنون به عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم شناخته شده و در حال حاضر از عصاره سرشاخه‌های گلدار آن به اسامی ماری‌جوانا، گل و یا حشیش به عنوان یک داروی توهم‌زا و یک ماده مخدر غیرقانونی در سراسر جهان توسط میلیون‌ها نفر استفاده می‌شود [۲،۱]. مطالعات اخیر در نوجوانان مصرف‌کننده نشان داده است که داروهای توهم‌زایی همچون ماری‌جوانا با داشتن ترکیبات کانابینوئیدی و با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی خود در بخش‌هایی از سیستم عصبی مرکزی نظیر آمیگدال، قشر جلوی مغز، هیپوکامپ، تالاموس و

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

هیپوتالاموس منجر به بروز درجاتی از اختلالات رفتاری و عاطفی می‌گردد [۳]. کانابینوئیدها بر سیستم قلبی- عروقی دارای اثرات منفی بوده و اندوکانابینوئیدها به طور بالقوه در پیشگیری از انسداد عروق مغزی و خونرسانی مجدد، آسیب مغزی، و اختلالات عصبی مانند پارکینسون، هانتینگتون و آلزایمر مفید هستند و همچنین می‌توانند عملکرد محافظت‌کننده عصبی مانند جلوگیری از سمیت‌زایی انجام دهند [۵،٤]. دلتا تترا هیدروکانبینول[1] به‌عنوان ترکیب اصلی کانابیس به گیرنده‌های ویژه‌ای در مغز که به گیرنده‌های کانابینوئیدی مشهور هستند، متصل شده و به طور موقت باعث احساس نشاط، راحتی و تسکین می‌شود و نیز بر اعمال شناختی، حافظه و یادگیری، تمرکز و هماهنگی بدن دارای نقش می‌باشد [۷،۶]. اثرات بیولوژیکی کانابینوئیدها به‌طور عمده توسط دو عضو خانواده گیرنده‌های همراه با پروتئین G، یعنی گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 انجام می‌شود [۸]. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات گیرنده‌های CB2، نقش مهمی در محافظت از سیستم عصبی داشته و به عنوان یک استراتژی درمانی جدید برای درمان بیماری‌های عصبی و روانی در نظر گرفته می‌شود [۹]. نشان داده شده است که THC به‌طور موثری از سد خونی جفت و مغز عبور می‌کند و در روند رشد و نمو مغز تاثیر می‌گذارد [۱۰]. کانابینوئیدها به طور مستقیم در بدن از طریق سیستم‌های اندوکانابینوئیدی و از طریق اتصال به گیرنده‌های CB1 و CB2 و با تنظیم متابولیسم، ارتباط بین سلولی، اشتها و حافظه، ایمنی و درد به حفظ شرایط هموستازی بدن کمک می‌نمایند [۱۱]. نشان داده شده است در موش‌هایی که فاقد گیرنده‌های CB1 می‌باشند، شدت آثار آناتومیک و عملکردی سکته‌های مغزی ایسکمیک نسبت به موش‌های دارای این گیرنده‌ها افزایش می‌یابد [۱۲]. میزان اندوکانابینوئیدها در بافت‌های مغزی آسیب دیده و همچنین در حیوانات که تحت تحریک شدید مغزی با اسیدکاینئیک قرار دارند افزایش می‌یابد [۱۳]. نشان داده شده است که عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه با داشتن ترکیبات کانابینوییدی آزادسازی دوپامین را افزایش داده و تولید ایمپالس‌های مهاری می‌کند و از این طریق باعث تخریب نورونی شده به نحوی که باعث کاهش دانسیته نورونی می‌شود [۱٤].

سلول‌های بنیادی دسته‌ای از سلول‌های تمایز نیافته می‌باشند که قابلیت تمایز به انواع سلول‌های تخصص یافته را دارند. کشف این سلول‌ها در سیستم عصبی مرکزی پستانداران که تا مدتها پیش تصور می‌شد فاقد هرگونه قدرت ترمیم و بازسازی می‌باشد، امیدهای تازه‌ای را برای درمان بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مرکزی نظیر سکته مغزی، بیماری پارکینسون، آلزایمر و ضایعات نخاعی ایجاد نموده است [۱۵].

SH-SY5Y رده سلولی استخراج شده از انسان در سال ۱۹۷۰ است که با روش بیوپسی و از فرد واجد نوروبلاستوما به منظور انجام تحقیقات علمی و به عنوان مدلی از عملکرد نورونی و تمایز یافتگی نورون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۶]. SY5Y-SH قادر است با قرارگرفتن در شرایط مختلف، آلل‌های گوناگونی را بروز داده و در برابر موادی مانند رتینوئیک اسید و یا BDNF[2] به سلول‌های عصبی تمایز یابند و با حمایت از سلول‌های عصبی از بیماری‌های تحلیل برنده دستگاه عصبی جلوگیری نمایند [۱۷]. یکی از مهمترین سلول‌های بنیادی عصبی، رده سلول SH-SY5Y می‌باشند که نه تنها جهت تحقیقات و درک عملکرد و تکامل مغز، بلکه در زمینه شناخت بیماری‌های نورولوژیکی، مسمومیت عصبی، اختلالاتی مانند افسردگی و همچنین پارکینسون و آلزایمر نیز استفاده می‌شود. این سلول‌ها علاوه بر

[1] Tetra Hydro Cannabinol

[2] Brain- Derived Neurotrophic Factor

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

پتانسیل تکثیری یک خط سلولی سرطانی نامیرا، دارای توان تفکیک شدن به سلول‌های شبه نورونی نیز می‌باشند [۱۸،۱۰]. رده سلول‌های عصبی SH-SY5Y قادرند با قرارگرفتن در شرایط مختلف آل‌های گوناگونی را بروز و در برابر ترکیباتی همچون رتینوئیک اسید و فاکتور نورون‌زایی مشتق شده از مغز (BDNF) به سلول‌های عصبی تبدیل شوند [۱۹]. در یک بررسی نشان داده شد که رده‌های سلولی SH-SY5Y و BE(2)-M17 برای مطالعات فیزیولوژیک و پاتولوژیک عصبی مناسب می‌باشند [۲۰]. مغز پستانداران بالغ می‌تواند در فرآیندی به نام نوروژنزیس، سلول‌های عصبی جدید تولید کند که عمدتاً در ناحیه ساب ونتریکولار و ژیروس دندانه‌ای هیپوکامپ رخ می‌دهد و مدارک علمی موید وجود تداخل عمل بین BDNF و آندوکانابینوئیدها می‌باشد [۲۱].

با عنایت به این که بخش وسیعی از دستگاه عصبی پستانداران فاقد قدرت خودترمیمی است و از این رو بیماری‌های دستگاه عصبی مرکزی و محیطی از مهمترین مشکلات سلامت انسان‌ها است و دانش بشری همچنان از ترمیم و بهبود کامل آن ناتوان است و با توجه به آن که اعتیاد به مواد مخدر یک معضل جهانی است [۲۲] و میلیون‌ها نفر در سراسر دنیا از عصاره گیاه شاهدانه به اسامی ماری‌جوانا و یا حشیش به عنوان یک ماده مخدر روانگردان استفاده می‌نمایند، لذا تحقیق در رابطه با تاثیر عصاره کانابیس بر روی سلول‌های عصبی می‌تواند در جهت درک بهتر اثرات این ترکیب بر سیستم عصبی بسیار مهم باشد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره شاهدانه بر رشد سلول‌های عصبی رده SH-SY5Y انجام گرفت.

روش کار

در این مطالعه تجربی که در کمیته اخلاق دانشگاه تحت شماره IR.IAU.M.REC.1396.371 به تصویب رسیده است، عصاره هیدروالکلی گیاه شاهدانه به روش پرکولاسیون تهیه گردید. بدین‌منظور به میزان کافی سرشاخه‌های گلدار گیاه شاهدانه با هماهنگی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و مرکز مبارزه با مواد مخدر تهیه و در یک محیط بدون رطوبت و به دور از نور خشک وارد گردید. سپس عصاره موجود در سرشاخه‌های گلدار خشک‌شده گیاه شاهدانه با استفاده از اتانول ۷۰٪ تولیدشده توسط شرکت مرک آلمان به عنوان حلال استخراج گردید. به منظور حذف کامل حلال از عصاره، محلول در دستگاه روتاری ساخت شرکت ایکار، کشور آلمان در دمای ٤٥ درجه و گردش ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس عصاره با استفاده از پمپ خلأ کاملاً تغلیظ گردید. عصاره تهیه شده در ظروف شیشه‌ای ریخته شده و برای انجام مراحل بعدی در یخچال نگهداری شد. رقیق‌سازی عصاره جهت مواجهه سلول‌ها با استفاده از اتانول و آب مقطر صورت پذیرفت [۲۳].

در مطالعه حاضر پس از تهیه رده سلولی عصبی SH-SY5Y از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، سلول‌ها با استفاده از محلول بافر فسفات سالین (PBS) شستشو داده شدند. سپس به محیط مغذی رشد حاوی DMEM[1] به همراه ۱۰ درصد سرم گاو (FBS)[2] تهیه شده از شرکت Biowest به همراه ۱٪ پنی سیلین- استرپتومایسین (پنی سیلین 100U/ml و استرپتومایسین 100µg/ml) و L گلوتامین انتقال داده شدند. آنگاه جهت مخلوط شدن آنزیم با محیط، محتویات فالکون پیپتاژ گردید و سوسپانسیون سلولی درون فالکون، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس محیط رویی دور ریخته شد و به سلول‌ها ۶ میلی لیتر محیط کشت کامل اضافه گردید و سوسپانسیون سلولی به فلاسک T25 منتقل و

[1] Dulbecco's-Modified Eagle Medium
[2] Fetal Bovine Serum (FBS)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در حضور CO_2 ۵٪ و در رطوبت ۹۰٪ در انکوباتور کشت داده شدند.

محیط کشت فلاسک‌ها در هر هفته سه مرتبه تعویض و به صورت روزانه میزان رشد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت و پس از اطمینان از تکثیر سلول‌ها و این که سلول‌ها به تراکم لازم برای مرحله پاساژ رسیده اند، محیط کشت موجود در هر فلاسک تخلیه و رسوب سلولی باقی‌مانده با ۳ میلی لیتر PBS شستشو داده شد. آنگاه جهت از بین‌بردن ماتریکس سلولی و جدا شدن سلول-ها از کف فلاسک، ۳ میلی لیتر آنزیم تریپسین به نمونه‌ها اضافه گردید و جهت افزایش اثر مطلوب آنزیم، به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه گردیدند، سپس در زیر میکروسکوپ معکوس فلاسک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و پس از اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف پلیت و به صورت معلق در آمدن آنها، به منظور توقف عمل آنزیم ۵ میلی لیتر محیط کشت کامل حاوی FBS ۱۰٪ اضافه و سوسپانسیون حاصل در دمای ٤ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت جدید مخلوط گردید و سوسپانسیون سلولی به فلاسک T25 انتقال داده شد، سپس در ۳۷ درجه سانتیگراد، در حضور دی اکسید کربن ۵٪ به‌مدت ۲٤ ساعت و در رطوبت ۹۰٪ انکوبه شدند.

پاساژ اول سلول‌ها پس از ۸ روز انجام و بعد از گذشت ۸ روز، پاساژ دوم و پس از گذشت ۶ روز نیز پاساژ سوم نمونه‌ها انجام و سپس شمارش سلولی فلاسک‌ها آغاز گردید. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فیکس‌کننده فرمالین ۱٪ اضافه شد و با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز شدند و به منظور پایش سرعت رشد سلولی ۶ پلیت ۲٤ حفره‌ای حاوی سلول‌های SH-SY5Y دو پلیت به ازای هر سه گروه کنترل و گروه‌های تیمارشده با دوزهای ng/ml ۱۰۰و ۱۰۰۰ حشیش در پاساژ چهارم تهیه گردید (هر حفره ۱۰۰۰۰ سلول در یک میلی لیتر محیط کشت کامل) [۱]؛ هر ۶ پلیت در انکوباتور قرار داده شدند. از روز بعد از انکوبه‌شدن سلول‌ها، سه حفره از هر پلیت در نظر گرفته شده، 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 میلی‌لیتر محیط کشت کامل افزوده و با پیپت‌کردن 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 [۲٤]. تعداد سلول‌های موجود در ٤ مربع اطراف شمارش و طبق فرمول زیر تعداد سلول‌ها در هر میلی لیتر محاسبه گردید:

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

شمارش سلول‌ها به ترتیب فوق تا هشت روز متوالی تکرار شد. جهت ارزیابی روند رشد سلولی در آزمایشگاه، زمان مورد نیاز برای دو برابرشدن جمعیت سلول‌ها نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و سپس منحنی رشد سلولی در گروه‌های تجربی و کنترل با هم 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 این بررسی در پایان روز نهم و پس از آخرین شمارش، داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-20 و از طریق آزمون‌های آماری ANOVA و توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و اختلاف داده‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

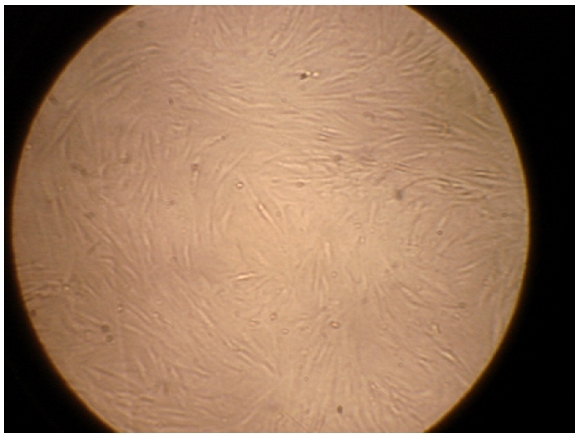
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

در سطح $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد و سپس نمودار رشد سلول‌ها با توجه به داده‌های بدست‌آمده از شمارش سلول‌های پلیت‌های کنترل و تحت تیمار با عصاره شاهدانه با توجه به داده‌های بدست آمده از شمارش پلیت‌ها رسم گردید.

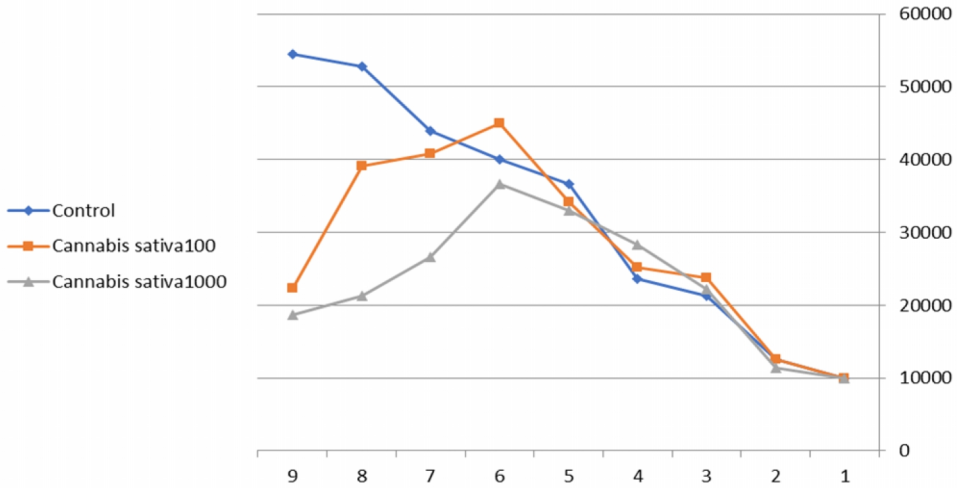
یافته‌ها

نتایج حاصل ازکشت سلول‌های عصبی رده SH-SY5Y نشان داد که این سلول‌ها دارای خاصیت چسبندگی به کف فلاسک بوده و این سلول‌ها در ابتدا دارای شکل کروی بودند که ۲٤ ساعت بعد از کشت مورفولوژی شبیه به فیبروبلاست یا دوکی شکل را نشان دادند. همچنین مشاهدات نشان داد که ۳ تا ٤ روز پس از کشت، یک لایه تک‌سلولی با تراکم ۸۰ تا ۹۰٪ در کف فلاسک تشکیل می‌گردد (شکل ۱).

به علاوه بر اساس نمودار ۱، منحنی رشد مشخص گردید که سلول‌ها در گروه‌های کنترل و تحت تیمار با عصاره شاهدانه در روز اول وارد فاز خفتگی شدند تا بتوانند خود را با محیط سازگارکرده و رشد نمایند آنگاه نشان داده شد که در اثر تیمار با ماده مخدر شاهدانه در دوزهای ۱۰۰ ng/ml و ۱۰۰۰، از روز اول تا روز ششم روند رشد سلول‌ها در هر دو گروه تیمارشده با دوزهای ۱۰۰ ng/ml و ۱۰۰۰ روند افزایشی داشته و وارد فاز تصاعدی شدند و حداکثر تعداد سلول‌ها مربوط به روز ششم بود اما از بعد از روز ششم در روند رشد و تکثیر سلولی در گروه‌های تحت تیمار با حشیش سیر نزولی مشاهده گردید و همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، این روند کاهشی در دوز ۱۰۰۰ ng/ml نسبت به دوز ۱۰۰ ng/ml سرعت بیشتری نشان داد.



شکل ۱. سلول‌های جدا شده SH-SY5Y در پاساژ اول با بزرگنمایی X10



نمودار ۱. نمودار رشد سلول‌های عصبی رده SH-SY5Y در گروه کنترل (بدون مواجهه با کانابیس ساتیوا) و گروه‌های تحت تیمار با کانابیس ساتیوا با دوزهای ۱۰۰ ng/ml و ۱۰۰۰ (محور عمودی تعداد سلول‌ها و محور افقی تعداد روزهای تیمار) نشان می‌دهد که از روز ششم تیمار، رشد سلولی گروه‌های تحت تیمار با عصاره شاه دانه نسبت به گروه کنترل در سطح $p<۰/۰۵$ کاهش می‌یابد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های عصبی رده SH-SY5Y در محیط کشت به کف فلاسک می‌چسبند و بعد از ٢٤ ساعت در محیط کشت شکل کروی آنها همانند سلول‌های فیبربلاست دوکی شکل می‌شود و شروع به رشد می‌نمایند و تیمار با عصاره شاهدانه از روز ششم به بعد باعث کاهش شدید رشد در این سلول‌ها می‌شود. بر اساس شواهد موجود سلول‌های بنیادی با سلول‌های فیبروبلاست که از نظر بیولوژیکی پویا و از نظرمورفولوژی ناهمگن و عمدتاً دوکی شکل بوده و فراوان‌ترین سلول‌های بافت همبند هستند دارای اشتراکات بسیار زیادی می‌باشند و قادرند به رده‌های مختلف سلولی تمایز یابند [۲۶]. در پژوهش حاضر نیز دوکی‌شدن رده سلولی مورد مطالعه نشان از بنیادی بودن آنها می‌باشد.

نتایج حاصل از داده‌های یک بررسی نشان داد که احتمال می‌رود عصاره الکلی برگ گیاه شاهدانه موجب تخریب نورونی در ناحیه CA1 شده، در حالی‌که در بعضی مناطق دوز پایین این ماده باعث نوعی نورون‌زائی می‌گردد [۲۷]. نشان داده شده است که THC موجود در عصاره گیاه شاهدانه در دوزهای پایین با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش بقاء و تقویت تکثیر سلولی می‌شود و این در حالی‌است که در دوزهای بالا به ویژه از طریق گیرنده‌های CB1 کانابینوئیدی و با ایجاد سمیت سلولی و از طریق افزایش مرگ و میر سلول‌ها و تحریک روند آپوپتوز، باعث کاهش روند رشد سلولی در رده‌های سلولی عصبی و غیرعصبی می‌شود [۲۸]. نشان داده شده که THC باعث اختلال در کمپلکس ۱، ۲ و ۳ زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود و همچنین باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در مغز و نشت این ترکیبات از میتوکندری‌ها می‌شود، به علاوه مشخص شده است که THC، باعث عدم تعادل قابل توجه در وضعیت اکسیداتیو شده و سطح پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو، کربونیلاسیون پروتئین و آسیب DNA را افزایش می‌دهد و باعث دژنره و نکروزه‌شدن بافت‌هایی نظیر بافت چربی می‌گردد [۳۰،۲۹]. بنابراین در پژوهش حاضر کاهش روند رشد سلولی در شرایط تحت تیمار با عصاره شاهدانه را می‌توان به اثرات اکسیداتیو این ترکیب به ویژه در دوزهای بالا و همچنین آسیب به DNA و احتمالاً به دژنره و نکروزه‌شدن سلول‌ها نسبت داد.

ترکیب THCبه طور موثری از سد خونی جفت و مغز عبور می‌کند و در روند رشد مغز به ویژه در قشر پیشانی مغز و در ناحیه هیپوکامپ از طریق افزایش پروتئین‌های پیش آپوپتوزی نظیر پروتئین Bax، باعث ایجاد آپوپتوز و اختلال در روند رشد سلول‌های عصبی در موش‌های صحرایی می‌شود [۳۱]. مطالعات گزارش کرده‌اند که ترکیب THC قدرتمندانه دارای اثرات ضدتومورهای رده سلولی مبتنی بر گلیوما U87MG بوده و همچنین باعث افزایش اتوفاژی می‌گردد [۳۲]. همچنین نشان داده شده است که در افراد سوءِ مصرف‌کننده عصاره شاهدانه، طیف گسترده ای از تغییرات در سیستم عصبی مرکزی نظیر انفارکتوس، خونریزی داخل مغزی و خونریزی ساب آراکنوییید، لکوانسفالوپاتی هیپوکسیک- ایسکمیک، مرگ نورون‌ها، نکروز لامینار مغزی و تغییرات رگی مشاهده می‌شود [۳۳].

در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده شد که آگونیست‌های گیرنده‌های کانابینوئیدی باعث ایجاد فسفاتاز و آپوپتوز وابسته به دوز می‌شوند [۳٤]. در یک بررسی نشان داده شد که ترکیب کانابیدیول CBD که یک ترکیب کانابینوئیدی غیرروان‌گردان می‌باشد با داشتن خواص آپوپتوزی، دارای اثرات ضدتکثیری در رده‌های سلولی گلیومای انسانی U87 و U373 می‌باشد [۳۵]. نتایج حاصل از یک بررسی نشان داده است که کانابینوئیدها دارای فعالیت ضد تکثیری قوی بوده و با فعال نمودن مکانیسم‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

آپوپتوزی در نهایت منجر به مرگ سلولی در رده‌های سلولی توموری می‌شوند [۳۶]. بنابراین در پژوهش حاضر نیز احتمالاً عصاره گیاه شاهدانه با داشتن ترکیبات کانابینوئیدی و به صورت وابسته به دوز و از طریق تحریک مسیرهای آپوپتوزی و با افزایش مرگ سلولی باعث کاهش رشد سلول‌های عصبی رده SH-SY5Y شده است.

برخلاف نتایج این بررسی در یک مطالعه دیگر نشان داده شد که کانابینوئیدهای داخلی و خارجی باعث رشد سلول‌های عصبی، حفاظت مغزی در مقابل سموم مختلف و ضربات فیزیکی و بلوغ مغزی می‌شوند [۳۷]، که علت این اختلاف احتمالاً یا به خاطر تفاوت رده سلولی مورد مطالعه و یا به دلیل اختلاف دوز مورد استفاده دارو می‌باشد.

نشان داده شده است که THC با ممانعت از پلیمریزاسیون توبولین، مانع شکل‌گیری میکروتوبول‌ها جهت شکل‌گیری دوک‌های تقسیم میتوزی می‌شود [۳۸]. در پژوهش حاضر نیز کاهش رشد سلول‌های رده SH-SY5Y را احتمالاً می‌توان به این تاثیر عصاره شاهدانه نسبت داد.

از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به عدم آنالیز ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گیاه شاهدانه اشاره نمود، بنابراین پیشنهاد می‌گردد برای تعیین فاکتور شیمیایی موثر موجود در عصاره کانابیس بر رشد سلول‌های عصبی با تجزیه عصاره شاهدانه نسبت به تعیین دقیق فاکتور شیمیایی موثر در رشد و نمو رده‌های مختلف سلول‌های عصبی اقدام گردد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید که سلول‌های عصبی رده SH-SY5Y در محیط کشت نظیر سلول‌های فیبربلاستی دوکی شکل شده و با سرعت شروع به تکثیر و رشد می‌نمایند و عصاره گیاه کانابیس به صورت وابسته به دوز باعث کاهش رشد این رده از سلول‌های عصبی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از رساله دوره دکتری تخصصی از گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز می‌باشد. 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 عمل آورند.

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 Summer; 21(2):50–58. [Full text in Persian]

2- 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.

3- Walker OS, Holloway AC, Raha S. The role of the endocannabinoid system in female reproductive tissues. J Ovarian Res. 2019 Jan 15;12(1):3.

4- Amouzeshi A, Pourbagher-Shahri AM. Effects of endocannabinoid system, synthetic and nonsynthetic cannabinoid drugs on traumatic brain injury outcome: a narrative review. J Surg Trauma. 2019 Spring; 7(1):3-14.

5- Ghosh M, Naderi S. Cannabis and cardiovascular disease. Curr Atheroscler Rep. 2019 April; 21: 21.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

6- Skelton KR, Hecht AA, Benjamin-Neelon SE. Recreational cannabis legalization in the use and maternal use during the preconception, prenatal, and postpartum periods. IJERPH.2020 Feb;17(3): E909.
7- Mishima K, Irie K. Central effect of components of cannabis: utility and risk. J Pharmaceutical Society Japan. 2020 Jan;140(2):193-04. [Full text in Japanian].
8- Richter JS, Quenardelle V, Rouyer O , Raul JS, Beaujeux R , Gény B , et al. A systematic review of the complex effects of cannabinoids on cerebral and peripheral circulation in animal models. Front Physiol. 2018 May;9:622.
9- Wu J. Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: yesterday, today, and tomorrow. Acta Pharmacologica Sinica.2019 Mar; 40(3):297-99.
10- Philippot G, Forsberg E, Tahan C, Viberg H, Fredriksson R. A single δ^9-tetrahydrocannabinol (THC) dose during brain development affects markers of neurotrophy, oxidative stress. Front Pharmacol. 2019 Oct; 10:1156.
11- Zou S, Kumar U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. Int J Mol Sci. 2018 Mar 13;19(3): E833.
12- Russo EB. Cannabis therapeutics and the future of neurology. Front Integr Neurosci. 2018 Oct; 12: 51.
13- Zhou J, Noori H, Burkovskiy I, Lafreniere JD, Kelly MEM, Lehmann C. Modulation of the Endocannabinoid System Following Central nervous system injury. Int J Mol Sci. 2019 Jan;20(2): E388.
14- Tehranipour M, Kehtarpour M, Javadmoosavi B, Mahdavi-Shahri N. Evaluation of *Cannabis sativa* leaves aquatic extract effect on triple regions of hippocampus neuronal density in male rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012 Apr,May; 14 (1) :20-27. [Full text in Persian].
15- Golmohammadi M G, Sagha M, Azari H, Najafzadeh N. Isolation of neural stem and progenitor cells from the adult mouse brain using the neurosphere assay. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11 (3): 246-58. [Full text in Persian]
16- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res.1973 May; 33(11):2643-52.
17- Tiller G. Brain-derived neurotrophic factor; BDNF. 9. Available from: https://www.omim.org/entry/113505?search=bdnf&hig hlight=bdnf
18- Liu Y, Eaton ED, Wills TE, McCann SK, Antonic A, Howells DW. Human ischaemic cascade studies using SH-SY5Y cells: a systematic review and meta-analysis. Transl Stroke Res. 2018 Dec;9(6):564-74.
19- Bamdad K, Dadfar F, Eshraghi S. Bioinformatics study of the effect of brain-derived neurogenic factor (BDNF) on gene expression in SH-SY5Y cell line. J biomed health inform. 2019 Spring; 6 (1):59-67.
20- Filograna R, Civiero L, Ferrari V, Codolo G, Greggio E, Bubacco L, et al. Analysis of the catecholaminergic phenotype in human SH-SY5Y and BE(2)-M17 neuroblastoma cell lines upon differentiation. PLoS ONE.2015 Agu; 10(8): e0136769.
21- Ferreira FF, Ribeiro FF, Rodrigues RS, Sebastião AM, Xapelli S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) role in cannabinoid-mediated neurogenesis. Front Cell Neurosci. 2018 Nov; 12: 441.
22- Amani F, Sadegie Ahari S, Mohammadi S, Azami A. The trend in substance abuse among addicts referred to withdrawal centers, 1998-2003. J Ardabil Univ Med Sci. 2005 Autumn; 5 (3): 220-24. [Full text in Persian]
23- Sazmand M, Mehrabani D, Hosseini 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):em32
24- Goudarzi Z ,Hosseini SE , Mehrabani D, Hashemi S. Evaluation of the effects of methamphetamine drug on cell growth of stem cells derived from uterine endometrial tissue of rats. J Anim Biol.2020;12(4):71-80. [Full text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

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 Oct;69(2):342-7.
26- Chang Y, Li H, Guo Z. Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblast. Cell Physiol Biochem. 2014 Aug;34(3):703-14.
27- Tehranipour M, Kehtarpour M. Effect of alcoholic extract of Cannabis sativa leave on neuronal density of CA1, CA2 and CA3 regions of rat hippocampus. Feyz. 2012; 16 (4):297-03. [Full text in Persian]
28- Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh L. Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. J Mol Med (Berl). 2001Des;78(11):613-25.
29- Parolini M , Binelli A. Oxidative and genetic responses induced by Δ-9-tetrahydrocannabinol (Δ-9-THC) to dreissena polymorpha. Sci Total Environ. 2014 Jan 15; 468-69:68-76. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.024.
30- Kamali-Sarvestani A, Hoseini SE, Mehrabani D,Hashemi SS, Derakhshanfar A. Effects in rats of adolescent exposure to Cannabis sativa on emotional behavior and adipose tissue. Bratisl Med J. 2020Jan; 121 (4):297-01.
31- Philippot G, Forsberg E, Tahan C, Viberg H, Fredriksson R. A single δ^9-tetrahydrocannabinol (THC) dose during Brain development affects markers of neurotrophy, oxidative stress, and apoptosis. Front Pharmacol. 2019Oct; 10: 1156.
32- Torres S , Lorente M, Rodríguez-Fornés F, Hernández-Tiedra S, Salazar M, García-Taboada E, et al. A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. Mol Cancer Ther. 2011 Jan;10 (1):90-103.
33- Wei D , Allsop S, Tye K, Piomelli D. Endocannabinoid signaling in the control of social behavior.Trends Neurosci. 2017 Jul; 40(7):385-96.
34- Sreevalsan S , Joseph S, Jutooru I, Chadalapaka G, Safe SH. Induction of apoptosis by cannabinoids in prostate and colon cancer cells is phosphatase dependent. Anticancer Res. 2011 Nov;31(11):3799-807
35- Solinas M, Massi P, Cinquina V, Valenti M, Bolognini D, Marzia Gariboldi M,et al . Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid compound, inhibits proliferation and invasion in U87-MG and T98G glioma cells through a multitarget effect. PLoS One. 2013 Oct; 8(10): e76918.
36- Rock EM, Parker L A. Cannabinoids as potential treatment for chemotherapy-induced nausea and vomiting. Front Pharmacol. 2016 Jul; 7:221.
37- Messina F, Rosati O, Curini M, M. Marcotullio C. Cannabis and bioactive cannabinoids. Stud Natural Prod Chem. 2015; 45(2):17-57.
38- Reece AS, Kenneth Hulse G. Chromothripsis and epigenomics complete causality criteria for cannabis- and addiction-connected carcinogenicity, congenital toxicity and heritable genotoxicity. Mutat Res. 2016 Jul;789:15-25.

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 9:36 IRDT on Saturday April 3rd 2021

www.SID.ir