



مقاله پژوهشی

اثرات تیمارهای نیکوتین و کافئین بر روی قابلیت‌های حیاتی و میزان قدرت ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمال

زهرآزینالی، سید میثم ابطحی فروشانی*

گروه میکروپزشناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۸/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات گذشته نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) دارای برخی از تحت واحدهای گیرنده‌های نیکوتینی و گیرنده‌های آدنوزین است؛ بنابراین ممکن است عملکرد این سلول‌ها تحت تأثیر دو عامل محیطی پرمصرف یعنی نیکوتین (آگونیست گیرنده‌ی نیکوتینی) و کافئین (آنتاگونیست گیرنده‌ی آدنوزینی) قرار گیرد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات این دو ماده بر برخی از عملکردهای سلول‌های MSC طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان‌های تیا و فمور موش سوری به روش آسپیراسیون جدا شده و با غلظت‌های ۰/۱ mM کافئین و ۰/۱ μm نیکوتین به مدت ۴۸ ساعت تیمار گردیدند. در یک سری از آزمایش‌ها، سلول‌ها با استفاده از ترپسین از کف فلاسک جدا شدند و میزان زنده‌مانی، عملکرد غشایی و فعالیت میتوکندری آن‌ها ارزیابی شد. به کمک نوک سمپلر یک خراش در کف فلاسک کشت ایجاد شد و سرعت ترمیم به وسیله یک دوربین اپتیکی ارزیابی گردید.

نتایج: به طور معنی‌داری تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با نیکوتین موجب افزایش میزان مطلق سلول‌های بنیادی مزانشیمال هم‌زمان با افزایش قابلیت عملکرد میتوکندریایی گردید. در کنار کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌ها، کافئین همچنین موجب کاهش فعالیت میتوکندریایی باقیمانده سلول‌های زنده نیز شد. نیکوتین موجب کاهش عملکردهای غشایی سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده گردید، البته سلول‌های تحت تیمار با کافئین میزان برداشت نوترال رد بیشتری را نسبت به گروه شاهد نشان داده‌اند. تست قابلیت نوزایی حاکی از افزایش قابل توجه قدرت نوزایی سلول‌های بنیادی تیمار شده با نیکوتین بوده درحالی‌که در مورد کافئین قابلیت نوزایی سلول‌های بنیادی مزانشیمال به نحو قابل توجهی کاهش یافته بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که نیکوتین در دوز استفاده‌شده موجب بهبود عملکرد بازسازی‌کننده سلول‌های بنیادی مزانشیمال شده است درحالی‌که کافئین دارای اثرات معکوس است.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمال، کافئین، نیکوتین

مقدمه

ایمنی و التهاب را دارا می‌باشند و می‌توانند مکانیسم‌های حفاظتی و بازسازی بافتی را ایفا کنند (۸).

یکی از مزیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال عدم بروز مولکول‌های MHC کلاس II در سطح آن‌ها است که به این دلیل امکان استفاده آلونژیک از آن‌ها را بدون امکان خطر دفع پیوند فراهم آورده است (۹). MSCها از طریق تولید فاکتورهای محلول یا وابسته به غشا و یا از طریق تولید سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و فاکتورهای رشد تأثیر خود را اعمال می‌کنند (۱۰). از این سلول‌ها جهت تخفیف علائم بیماری‌های ناشی از پاسخ‌های

سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) سلول‌های چند توانه با قابلیت خود تجدیدشوندگی هستند (۱). این سلول‌ها قابلیت تمایز به بافت‌های مختلف از جمله استخوان، تاندون، چربی و غضروف را دارند (۲-۴). MSCها در اکثر بافت‌ها قابل‌ردیابی هستند ولی جداسازی این سلول‌ها عموماً از مغز استخوان (۵) صورت می‌گیرد (۶، ۷). به نحو قابل توجهی MSCها قدرت تنظیم

*نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی، گروه میکروپزشناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
E-mail: sm.abtahi@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2579-6618

نیکوتین یک آلکالوئید قوی لیپوفیل (۲۰) است که دارای اثرات کولینرژیک است و در برگ‌های خانواده سولاناسه (Solanaceae) از قبیل تنباکو یافت می‌شود. هر نخ سیگار دارای ۱۰-۱۴ میلی گرم نیکوتین است که یک فرد سیگاری پس از استعمال هر نخ یک میلی گرم نیکوتین دریافت می‌کند (۲۱). نیکوتین از جمله عواملی است که باعث وابستگی افراد به سیگار می‌شود. نشان داده شده است گیرنده‌های نیکوتینی روی سلول‌های MSC، عصبی و ایمنی حضور دارد (۲۲).

با توجه به حضور گیرنده‌های آدنوزینی بر روی MSCها و همچنین گیرنده‌های کولینرژیک در سطح این سلول‌ها، در این مطالعه بر آن شدیم که اثر دو ماده فوق را بر برخی از جنبه‌های عملکردی MSC ارزیابی نماییم.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال

MSCها به وسیله فلاشینگ مغز استخوان‌های تیا و فمور موش سوری جداسازی گردید. مایع فلاشینگ به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۲۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی به فلاسک کشت سلولی منتقل گردید و با محیط کشت DMEM (Biowest) با گلوکز پایین و ۱۵ درصد FBS (Biowest) در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO₂ کشت داده شد. پاساژ سوم سلول‌ها به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمال در نظر گرفته شد (۱۱).

به منظور ایمونوفنوتایپ سلول‌های پاساژ سوم با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال کنژوگه با فلورسنت خریداری شده از شرکت Becton Dickinson علیه آنتی‌ژن‌های سطحی MSCs، CD44 (کنژوگه با PE)، CD90 (کنژوگه با PCY5) و مارکر سلول‌های خون ساز CD45 (کنژوگه با FITC) مشابه با شیوه پورطیب و ابطحی روشانی (۲۰۱۷) رنگ‌آمیزی گردید (۱۱). سلول‌ها با دستگاه فلوسیتومتری DAKO (شرکت Partec، آلمان) مورد آنالیز قرار گرفتند. داده‌ها با نرم‌افزار Cyflogic نسخه ۱-۲-۱ مورد آنالیز قرار گرفت (۱۱).

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال

پاساژ سوم سلول‌ها به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمال جهت ادامه کار مورد استفاده قرار گرفت (۲۳). در این هنگام، به طور مجزا با کافئین ۰/۱ میلی مولار و نیکوتین ۰/۱ میلی مولار

التهابی و بیماری‌هایی از قبیل دیابت نوع ۱، آرتریت روماتوئید و اسکروز متعدد بهره می‌جویند (۱۱). همچنین در درمان بیماری‌های قلبی، عصبی، بیماری‌های مزمن انسداد ریوی و بیماری‌های گوارشی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳).

عملکرد MSCها در محیط درون تنی تحت تأثیر سیگنال‌های متعددی از قبیل میانجی‌های تولید شده توسط سایر سلول‌های بدن و همچنین مواد دارویی قرار می‌گیرد (۱۱-۱۴). به طور مثال نشان داده شده است که MSCها موجب افزایش زنده‌مانی نوتروفیل‌ها در بافت می‌گردد (۱۴). همچنین نشان داده شده است که سلول‌های MSC دارای گیرنده‌های Toll like از قبیل TLR3,4 هستند. MSC در شرایط تحریک نشدن توسط این لیگاندها از ایجاد شرایط ضدالتهابی و شرایط مساعد جهت عملکرد طبیعی بافت حمایت می‌کند؛ درحالی که در عفونت‌ها تحریک گیرنده‌های TLR توسط LPS باکتری منجر به تغییر فنوتیپ MSC و تبدیل آن‌ها به سلول‌های حامی پیشبرد و فراخوانی التهاب می‌گردد (۱۵). همچنین مشخص شده است که ترکیبات فارماکولوژیک بر روی عملکرد متقابل سلول‌های MSC و سلول‌های التهابی از قبیل نوتروفیل و ماکروفاژ در شرایط عادی یا التهابی مؤثر هستند. به طور مثال نشان داده شده است که MSCهای تحت تیمار با کلسی تریول موجب افزایش قابلیت‌های فاگوسیتوز هم‌زمان با کاهش میزان انفجار تنفسی در سلول‌های نوتروفیل و ماکروفاژهای صفاقی می‌گردد (۱۲، ۱۶). همچنین نشان داده شده است که تیمار MSCها با استروژن موجب افزایش توأمان فاگوسیتوز و انفجار تنفسی در نوتروفیل‌های مجاور شده با آن‌ها می‌گردد (۱۷).

نیکوتین و بالأخص کافئین از جمله پرمصرف‌ترین مواد باقابلیت فارماکولوژیک در انسان هستند. کافئین یک آلکالوئید گزانتوئین طبیعی است که در قهوه، چای، شکلات و برخی از آجیل‌ها یافت می‌شود (۱۸). نوشیدنی‌های حاوی کافئین در سراسر جهان مصرف می‌شود و علی‌رغم طعم تلخ آن طرفداران بسیاری دارد (۱۹). کافئین قابلیت انحلال در چربی و آب را دارا است؛ بنابراین قابلیت انتشار خوبی در بدن دارد. کافئین به عنوان آنتاگونیست رقابتی آدنوزین عمل می‌کند (۱۳).

واسطه‌های کولینرژیک به عنوان مولکول‌های انتقال‌دهنده پیام در طیف بسیار گسترده‌ای از موجودات زنده از قبیل باکتری-ها، گیاهان، حشرات و پستانداران عمل می‌کنند (۱۱، ۱۵).

محیط لیز کننده حاوی اسید استیک ۱ درصد در اتانول ۵۰ درصد اضافه شد. در طول موج ۴۹۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا خوان، خوانده شد.

بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها با تریپان بلو

تست تریپان بلو به این صورت انجام گرفت که ۴۸ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها ترپسینه شده و از کف فلاسک جدا شد. به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتیفریوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی شناور گردید. ۲۰ میکرولیتر از رسوب سلولی با ۲۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو (Merck) مخلوط شد و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ تعداد سلول‌های زنده و مرده شمارش گردید.

روش آماری

کلیه داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون ANOVA و تست توکی در محیط نرم‌افزاری SPSS (ویراست ۱۸) استفاده شد. سطح $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

به تدریج سلول‌های چسبنده جدا شده از مغز استخوان موش‌های سوری از حالت گرد به شکل کشیده و با مورفولوژی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمال در آمدند (شکل ۱). یافته‌های فلوسیتومتری نشان داد که جمعیت سلول‌های پاساژ سوم از نظر بیان شاخص هماتوپوئیتیک CD45 در سطح بسیار پایینی ($12/09 \pm 1/0$ درصد) قرار دارند، در حالی که شاخص‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال رت یعنی CD44 ($99/12 \pm 98/0$)

مجاور شدند. انتخاب دوز کافئین و نیکوتین بر اساس مطالعات قبلی در محیط آزمایشگاهی صورت گرفته است (۱۱، ۲۴) گروه شاهد هیچ تیماری دریافت نکرد.

بررسی ترمیم خراش

به وسیله نوک سمپلر یک خراش کوچک در کف فلاسک‌ها ایجاد شد بعد از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان ترمیم زخم پایش گردید و با استفاده از نرم‌افزار AxioVision (ویراست ۴۰) آنالیز گردید (شکل ۲).

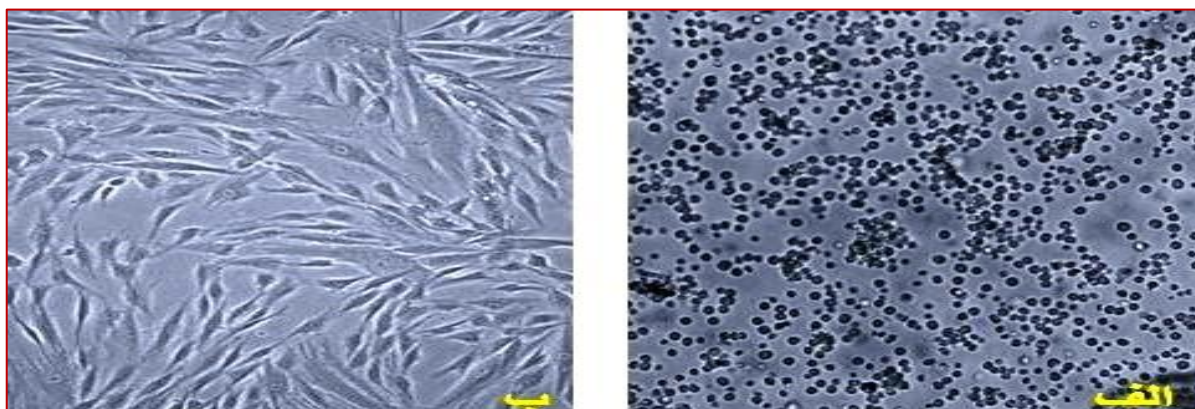
بررسی میزان قدرت حیاتی میتوکندری با استفاده

MTT

در پایان ۴۸ ساعت پس از تیمار با استفاده از تست MTT میزان قدرت حیاتی سلول‌ها بررسی شد. به نحوی که سلول‌ها با ترپسین از کف فلاسک جدا شده و هر نمونه به تعداد حدوداً ده هزار سلول به ۱۰ چاهک از پلیت ۹۶ خانه منتقل گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT، (Sigma) با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد و به انکوباتور ۳۷ درجه منتقل گردید. ۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. ۱۵۰ میکرولیتر DMSO (Sigma) به هر چاهک اضافه شد. به وسیله سمپلر خوب پیپتاژ گردید. به وسیله دستگاه الایزا خوان در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی میزان قدرت غشایی با استفاده از نوترال رد

برای تست نوترال رد همانند MTT بعد از ترپسینه کردن به پلیت ۹۶ خانه منتقل گردید. ۲۰ میکرولیتر محلول نوترال رد (Sigma) به هر خانه اضافه شد. بعد از دو ساعت انکوباسیون مایع رویی خارج شده و به محیط کشت اضافه شد. چند بار پیپتاژ آرام انجام گردید و محیط کشت خالی شده سپس ۱۰۰ میکرولیتر

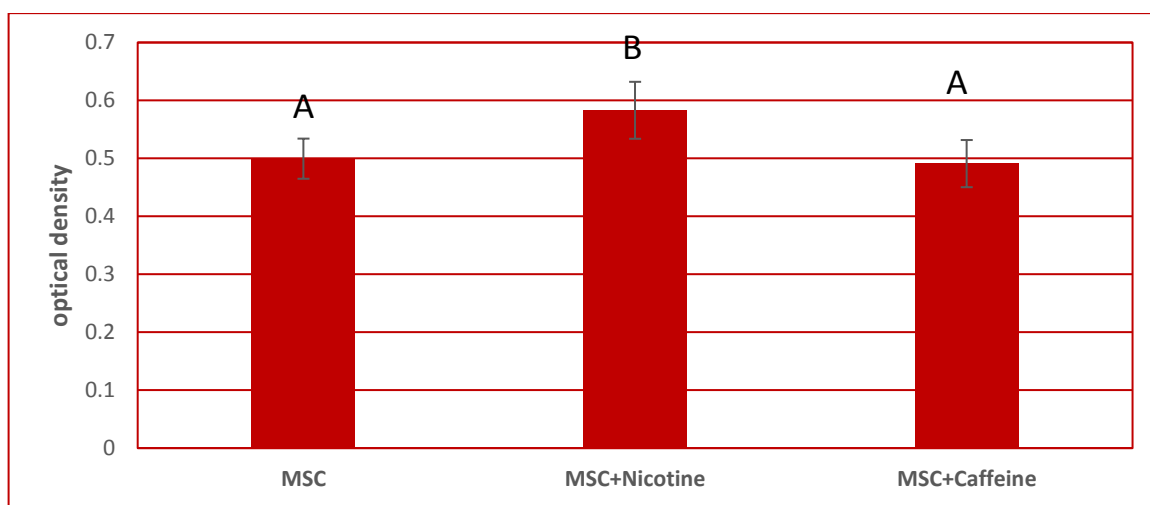


شکل ۱. ارزیابی سلول‌های استحصال شده از مغز استخوان. الف: سلول‌های آسپیره شدن از مغز استخوان موش سوری در روز اول. ب: سلول‌های آسپیره شده در سومین پاساژ. درشت‌نمایی X ۴۰۰.

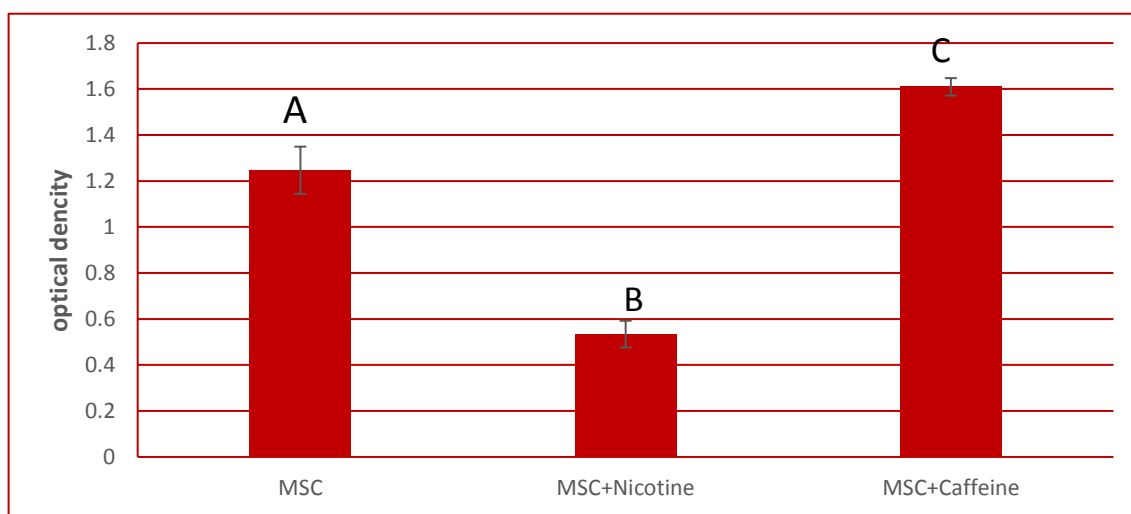
از اختلاف معنی‌دار بودند ($p < 0.05$)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نیکوتین موجب محافظت بیشتر سلول‌ها از آپوپتوز شده است.

در ادامه تست‌ها از تعداد برابر سلول‌های زنده استفاده شد. ارزیابی نتایج حاصل از تست احیای MTT حاکی از آن است که کافئین تأثیر معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان نمی‌دهد، درحالی‌که نیکوتین باعث افزایش قدرت احیای MTT توسط میتوکندری MSC‌ها نسبت به گروه تیمار نشده گردیده است (نمودار ۱).

درصد و $CD90 \pm 45/24$ (۹۷/۱ درصد) افزایش معنی‌داری یافت. از این سلول‌ها جهت آزمایش‌های بعدی استفاده شد. به‌منظور ارزیابی میزان زنده‌مانی مطلق MSC‌ها از رنگ حیاتی تریپان بلو استفاده شد. بر این اساس بعد از ۴۸ ساعت تیمار، میزان استحصال MSC‌های زنده در گروه شاهد (تیمار نشده) $74 \pm 3/56$ درصد بود. این در حالی است که میزان مطلق سلول‌های استحصالی پس از تریپسینه کردن به ترتیب $4 \pm 90/90$ درصد و $65 \pm 2/41$ درصد برای تیماری نیکوتینی و کافئینی بود؛ که البته مقایسه داده‌های یادشده بین گروه‌ها حاکی



نمودار ۱. ارزیابی میزان قابلیت‌های میتوکندریایی سلول‌های بنیادی مزانشیمال جداسازی شده از مغز استخوان موش سوری در مجاورت غلظت ۰/۱ میلی‌مولار کافئین و غلظت ۰/۱ میکرومولار نیکوتین. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.



نمودار ۲. ارزیابی میزان قابلیت‌های برداشت نوترال رد توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال جداسازی شده از مغز استخوان موش سوری در مجاورت غلظت ۰/۱ میلی‌مولار کافئین و غلظت ۰/۱ میکرومولار نیکوتین. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

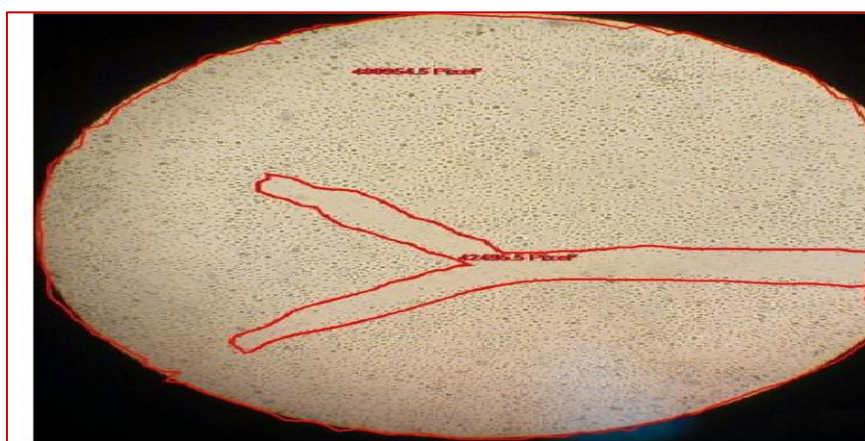
تیمار با آن حتی بعد از گذشت ۴۸ ساعت نیز ناحیه دچار ضایعه ترمیم نخواهد شد (شکل ۲ و نمودار ۲).

بحث

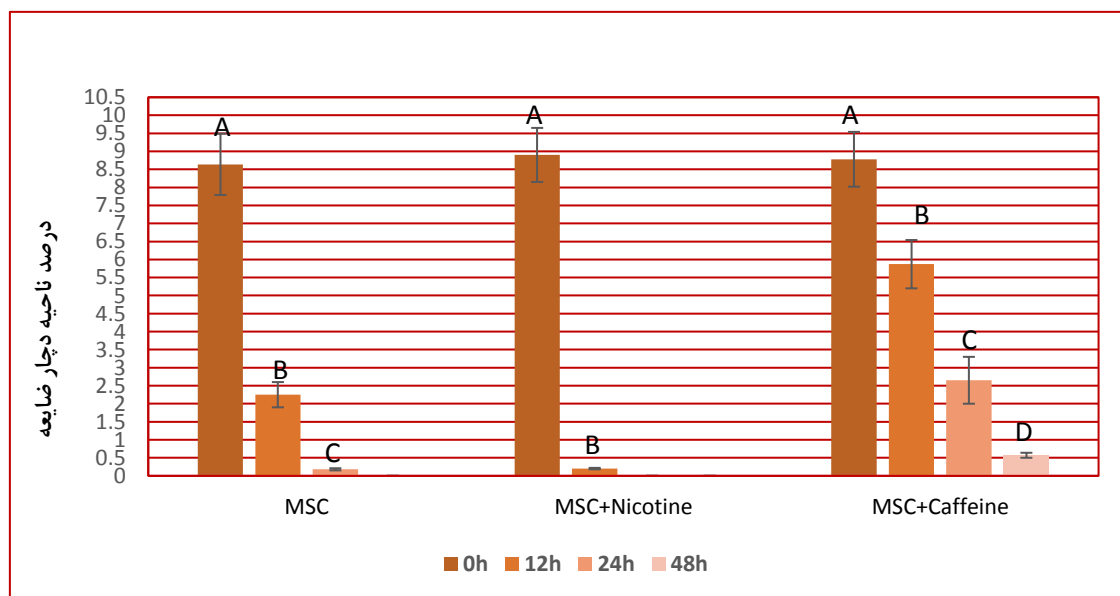
نیکوتین و بالأخص کافئین از جمله پرمصرف ترین مواد باقابلیت فارماکولوژیک در انسان هستند. با توجه به حضور گیرنده های آدنوزینی بر روی MSCها که توسط کافئین تحت تأثیر قرار می-

با توجه به نمودار ۲ نیکوتین به طرز معنی داری موجب کاهش قابلیت های غشایی MSCها در مقایسه با گروه شاهد شده است؛ درحالی که کافئین موجب افزایش قدرت غشایی در MSCها نسبت به گروه شاهد گردید.

نتایج تست خراش نشان داد که در گروه بدون تیمار حداقل زمان بالای ۲۴ ساعت برای پر شدن ناحیه دچار ضایعه نیاز است، درحالی که در گروه تیمار با نیکوتین فرآیند نوزایی به سرعت



شکل ۲. قابلیت نوزایی سلول های MSC. خراش اولیه ایجاد شده بر روی سلول های بنیادی مزانشیمال جدا شده از مغز استخوان موش سوری.



نمودار ۳. میزان پیشرفت نوسازی سلول های بنیادی مزانشیمال جداسازی شده از مغز استخوان موش سوری در حضور غلظت ۰/۱ میلی مولار کافئین و غلظت ۰/۱ میکرومولار نیکوتین. داده ها با استفاده از نرم افزار AxioVision و بر مبنای شکل ۲ ارزیابی شدند. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

گیرد و همچنین گیرنده های کولینرژیک پاسخگو به نیکوتین در سطح این سلول ها (۱۵)، در این مطالعه سعی شد اثر دو ماده

صورت گرفته و در محدوده زمانی ۲۴ ساعت قسمت اعظم ناحیه پر خواهد شد. در مورد کافئین شرایط متفاوت بوده و در مورد

فوق را به عنوان مواد پرمصرف طبیعی بر برخی از جنبه‌های عملکردی MSC ارزیابی نماییم.

عملکرد MSC در محیط درون تنی تحت تأثیر سیگنال‌های متعددی از قبیل میانجی‌های تولیدشده توسط سایر سلول‌های بدن و همچنین مواد دارویی قرار می‌گیرد. به طور مثال نشان داده شده است که MSCها موجب افزایش زنده‌مانی نوتروفیل‌ها در بافت می‌گردد (۱۱). همچنین نشان داده شده است که سلول‌های MSC دارای گیرنده‌های Toll like از قبیل TLR3,4 هستند (۲۵). MSC در شرایط تحریک نشدن توسط این لیگاند‌ها از ایجاد شرایط ضدالتهابی و شرایط مساعد جهت عملکرد طبیعی بافت حمایت می‌کند؛ درحالی‌که در عفونت‌ها تحریک گیرنده‌های TLR توسط LPS باکتری منجر به تغییر فنوتیپ MSC و تبدیل آن‌ها به سلول‌های حامی پیشبرد و فراخوانی التهاب می‌گردد (۲۵).

در این مطالعه پس از تیمار سلول‌های MSC با کافئین یا نیکوتین در ابتدا اقدام به بررسی عملکرد حیاتی MSCها شد. رنگ تریپان بلو به عنوان یک رنگ حیاتی قابلیت تشخیص سلول‌های سالم از مرده را دارا است (۲۶). نتایج حاصل از تست تریپان بلو حاکی از کاهش تعداد مطلق سلول‌های زنده پس از تیمار با کافئین بود درحالی‌که تعداد مطلق در تیمار با نیکوتین افزایش یافت.

در تست MTT قابلیت میتوکندری در تبدیل ماده MTT به کریستال‌های فورمازون مورد ارزیابی قرار گرفت. بدیهی است امکان دارد که یک سلول با وجود زنده بودن قابلیت کمی در تبدیل MTT به فورمازون داشته باشد؛ به عبارت دیگر برخلاف تریپان بلو که زنده‌مانی را مشخص می‌کند تست MTT مقیاسی از قدرت حیاتی میتوکندری‌های سلول‌ها را بیان می‌کند (۱۱). در ادامه به منظور بررسی قابلیت‌های غشای سلولی اقدام به ارزیابی میزان برداشت سلولی NR توسط MSCها شد. رنگ نوترال رد یک رنگ کاتیونی بوده که توسط غشای سلول‌ها برداشت شده و در داخل فراکشن لیزوزومی آن‌ها تغلیظ می‌گردد. میزان برداشت نوترال رد به عوامل متعددی از قبیل قابلیت‌های غشایی مرتبط است (۲۷). بنابراین هرچه قدر سلول‌های زنده دارای غشاهای انعطاف پذیرتر و قابلیت اندوسیتیک بیشتر باشند، میزان برداشت NR افزایش می‌یابد. در مجموع میزان برداشت NR مقیاسی از قدرت حیاتی سلول‌ها است در همین راستا نتایج این تحقیق نیز نشان دهنده

کاهش مطلق تعداد سلول‌های زنده پس از تیمار با کافئین است. همچنین به نظر می‌رسد که تیمار با کافئین منجر به کاهش قدرت حیاتی از نظر شاخص فعالیت متابولیک می‌گردد؛ به عبارت دیگر سلول‌هایی که در تست تریپان بلو همچنان زنده بودند نیز بعد از تیمار با کافئین دارای فعالیت کمتری بودند. البته بر اساس تست نوترال رد به نظر می‌رسد که قابلیت غشایی این سلول‌ها برخلاف میتوکندری افزایش یافته است. پس این سلول‌ها به طور فعال تری اندوسیتوز نموده و NR را در خود ذخیره می‌کند که البته این نتایج در راستای افزایش MTT و میزان زنده‌مانی MSCها پس از تیمار با نیکوتین است.

خواص هیدروفوبیک کافئین اجازه عبور آن از تمام غشاهای بیولوژیکی را می‌دهد. کافئین در کبد متابولیزه می‌شود و به فرم دی متیل و منو متیل اکسانتین، دی متیل و منو متیل اوریک اسید و مشتقات یوراسیل تبدیل می‌گردد (۲۸). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که MSCها آدنوزین تولید می‌کنند و همچنین گیرنده‌ی آن را نیز دارا است (۱۸). مطالعات نشان داده است که چهار گیرنده آدنوزینی A1R, A2AR, A2BR, A3R را بیان می‌کنند. A2B گیرنده‌ی غالب در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال است. در مراحل اولیه تمایز به استخوان میزان بیان A2B و در مراحل نهایی A2A افزایش می‌یابد. بیان A1R و A2AR در تمایز به چربی نقش دارد (۱۳). در عین حال کافئین با مهار آنزیم فسفودی استراز باعث ماندگاری بیشتر CAMP در داخل سلول شده و فعال سازی پروتئین کیناز A را باعث می‌شود. سطح بالای CAMP تکثیر را مهار می‌کند (۲۹). همچنین نشان داده شده است که کافئین موجب کاهش بیان ژن‌های اساسی در تمایز MSC به استخوان می‌شود (۲۹).

تحریک گیرنده نیکوتین روی MSCها با استفاده از نیکوتین یا آگونیست آن از طریق گیرنده‌ی $\gamma\alpha$ نیکوتینی موجب افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی و همچنین القای فسفریلاسیون در برخی پروتئین کینازهای داخل سلول می‌شود و در نتیجه افزایش تکثیر آن‌ها را در پی دارد. غلظت‌های غیر سمی نیکوتین باعث افزایش مهاجرت خودبه‌خودی MSCهای انسانی می‌شود درحالی‌که این مهاجرت توسط bFGF و C3a در *invivo* مهار می‌شود (۳۰). به نحو جالب توجهی نشان داده شده است که MSCهای تیمار شده با نیکوتین تأثیر بهتری در کاهش علائم در مدل تجربی بیماری MS در رت‌ها داشته‌اند (۳۱).

نتیجه گیری

مورد تأثیر نیکوتین بر روی MSCها اثرات متناقضی را گزارش کرده‌اند. به‌طور مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Li و همکاران صورت گرفته است؛ گزارش نموده‌اند که نیکوتین در غلظت‌های ۰/۰۴ میلی‌مولار تا ۲ میلی‌مولار موجب افزایش قابلیت تومورزایی MSCهای مشتق از بند ناف جنین شده است (۴).

تحقیق دیگر انجام‌شده حاکی از آن است که نیکوتین در محدوده غلظتی ۹۲۴۶ میکرومولار بر روی تمایز MSCها دارای اثرات سمی بوده است به‌طوری‌که تکثیر MSCها متوقف‌شده و اکثراً وارد G0 یا G1 شده‌اند (۲۴). البته باید توجه داشت که دوز استفاده‌شده در این مطالعات بسیار بیشتر از دوز مصرفی در این بررسی (۰/۱ میکرومولار) است. ذکر این نکته ضروری است که، نیکوتین تنها یکی از مواد تشکیل‌دهنده سیگار است و مطمئناً نتایج حاصل از مصرف نیکوتین قابل‌تعمیم به سیگار نیست. درگذشته نشان داده شده است که نیکوتین موجب اثرات ضدالتهابی در مدل تجربی MS می‌گردد. ولی دود سیگار موجب تشدید علائم می‌گردد (۲۱).

درنهایت باید یادآور شد که ممکن است اثرات نیکوتین و کافئین در طولانی‌مدت حتی در یک غلظت متوسط و یا حتی پایین نیز متفاوت از اثرات کوتاه‌مدت آن است؛ بنابراین مطالعه‌ی حاضر تنها یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده تحقیقات بیشتری در شرایط برون تنی با استفاده از دوزهای متعدد زمان‌های متفاوت تیمار صورت بگیرد.

تکثیر و تمایز و مهاجرت سلولی نیازمند حضور مقادیر مناسبی از واسطه‌های فعال اکسیژن است (۳۲). بنابراین ممکن است که نیکوتین پس از انتقال پیام و تأثیرگذاری بر روی میتوکندری و افزایش متابولیسم آن‌ها فراهم آمدن شرایط افزایش تقسیم، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها را موجب شده باشد. باید توجه داشت که در بیولوژی ROS ازجمله مهم‌ترین پیامبرهای داخل سلولی محسوب می‌شود. کلسیم نیز عامل دیگری است که در تنظیم متابولیسم حرکت و تکثیر و یا القای آپتوز در سلول‌ها نقش دارد (۳۲، ۳۳). به نحو جالب‌توجهی هردو عامل نیکوتین و کافئین موجب افزایش سطوح کلسیم داخل سلولی می‌گردد (۱۵). باین‌حال باید در نظر داشت در صورتی‌که سطح کافئین از یک حد مشخصی بالاتر رود سلول وارد مسیر آپتوز می‌گردد. بر

ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال که آن‌ها را برای درمان زخم مناسب می‌کند ناشی از توانایی آن‌ها برای مهاجرت به مکان آسیب یا التهاب است. برخلاف بسیاری از داروها که تنها مسیرهای پاتوفیزیولوژیکی را تحت تأثیر قرار می‌دهند MSCها از طرق مختلفی موجب ترمیم زخم می‌گردند (۳). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در مورد قدرت بازسازی ناحیه خراش خورده در کشت MSCها، می‌توان نتیجه گرفت که ظاهراً افزایش قدرت متابولیت سلول‌ها در مورد نیکوتین در کنار کاهش فعالیت اندوستیوتیک منجر به تسریع روند خودزایی و نوزایی MSCها شده است. درحالی‌که کافئین از طریق کاهش قدرت متابولیک و افزایش اندوستیوز موجب کاهش قدرت خود بازسازی و نوسازی MSCها می‌گردد. یکی از موارد مهم جهت استفاده از MSCها قابلیت این سلول‌ها جهت مهاجرت و لانه‌گزینی به ناحیه آسیب‌دیده است. یکی از بزرگ‌ترین محدودیت‌های موجود عدم رسانش و مهاجرت کافی MSCها به ناحیه آسیب‌دیده است. به این منظور تاکنون راهکارهای فارماکولوژیک از قبیل استفاده از ۱۷- بتا استرادیول جهت افزایش رسانش این سلول‌ها به بافت آسیب‌دیده پانکراس در مدل دیابت تجربی استفاده شده است. در همین راستا در این مطالعه اقدام به ارزیابی اثرات کافئین و نیکوتین بر روی مهاجرت این سلول‌ها شد. بر این اساس به نظر می‌رسد که نیکوتین در محدوده غلظت استفاده‌شده برخلاف کافئین دارای اثرات مفیدی برافزایش مهاجرت سلول‌ها داشت در همین راستا مطالعات گذشته نیز به‌خوبی نشان داده است که استفاده زیاد از کافئین در افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید میزان ترمیم بافت آسیب‌دیده را به دنبال درمان‌های متداول کاهش می‌دهد. بنابراین این احتمال وجود دارد که علاوه بر مکانیسم‌های روتین از قبیل تأثیر کافئین بر روی سلول‌های ناحیه سینوویال، ممکن است که بخشی از اثرات مخرب کافئین مربوط به کاهش مهاجرت سلول‌های بنیادی به محل آسیب‌دیده باشد. همچنین اثرات مفید نیکوتین در کاهش ضایعات و ترمیم زخم‌های ناشی از کولیت اولسراتیو و همچنین بهبود آسیب‌های مفصلی نشان داده شده است که کاملاً هم‌راستا با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق است.

باید در نظر داشت که تأثیر مواد به‌صورت وابسته به دوز است به‌طوری‌که با بررسی منابع، برخی از مطالعات ممکن است در

و به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم زهرا زینالی (با کد ۳۶۱/پد/۳) انجام شده است. نویسندگان از همکاری جناب آقای اصغر علیاری کارشناس محترم آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع را اعلام نکرده‌اند.

اساس نتایج ما به نظر می‌رسد که کافئین در میزان به‌کاررفته موجب افزایش قابل‌توجه کلسیم داخل سلولی القای آپوپتوز می‌گردد. از طرف دیگر کافئین موجب افزایش سطح cAMP می‌گردد و از این طریق مهار تقسیم سلولی را ایجاد می‌کند.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه

References

1. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell biology international*. 2006;30(9):681-7.
2. 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):142-9.
3. Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;125(2):510-6.
4. Li T, Zhang J, Zhang J, Zhang N, Zeng Y, Tang S, et al. Nicotine-enhanced stemness and epithelial-mesenchymal transition of human umbilical cord mesenchymal stem cells promote tumor formation and growth in nude mice. *Oncotarget*. 2018;9(1):591-606.
5. Jaerve A, Schira J, Muller HW. Concise review: the potential of stromal cell-derived factor 1 and its receptors to promote stem cell functions in spinal cord repair. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(10):9-732.
6. Cagliani J, Grande D, Molmenti EP, Miller EJ, Rilo HLR. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. *Journal of stem cell and regenerative biology*. 2017;3(2).
7. Avercenc-Leger L, Guerci P, Virion JM, Cauchois G, Hupont S, Rahouadj R, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):161.
8. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid AA, Dalir-Naghadeh B. Phenotypic modulation of auto-reactive cells by insertion of tolerogenic molecules via MSC-derived exosomes. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*. 2012;3(4):257-61.
9. Esmaili Gourvarchin Galeh H, Meysam Abtahi Froushani S, Afzale Ahangaran N, Hadai SN. Effects of Educated Monocytes with Xenogeneic Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium in a Mouse Model of Chronic Asthma. *Immunological investigations*. 2018;1-17.
10. Alcayaga-Miranda F, Varas-Godoy M, Khoury M. Harnessing the Angiogenic Potential of Stem Cell-Derived Exosomes for Vascular Regeneration. *Stem cells international*. 2016; 6:3409169.
11. Pourtayeb S, Abtahi Froushani SM. Nicotine can modulate the effects of the mesenchymal stem cells on neutrophils. *Advances in medical sciences*. 2017;62(1):165-70.
12. Mansouri Motlagh B, Afzale Ahangaran N, Abtahi Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2015;18(7):672-6.
13. Shushtari N, Abtahi Froushani SM. Caffeine Augments The Instruction of Anti-Inflammatory Macrophages by The Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2017;19(3):415-24.
14. Mansouri Motlagh B, Abtahi Froushani SM, Afzale Ahangaran N. Vitamin D3 Modifies the Impacts of the Supernatants of Mesenchymal Stem Cells on Macrophages Functions. *Zahedan J Res Med Sci*. 2017;19(6):e9761.
15. Abbasi A, Kukia NR, Froushani SMA, Hashemi SM. Nicotine and caffeine alter the effects of the LPS- primed mesenchymal stem cells on the co-cultured neutrophils. *Life Sciences*. 2018;199:41-7.
16. Esmaili H, Delirez N, Ahangaran NA, Abtahi Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone-marrow-derived mesenchymal stem



cells on neutrophil functions. *Turkish Journal of Biology*. 2014;38(7):365-370.

17. Afzal ahangran N, Nekoei Z, Deliraj N, Abtahi Froushani SM. The effects of mesenchymal stem cells treated with estrogen on neutrophil cells functions. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2017;7(2):241-7. [In Persian]

18. Shushtari N, Abtahi Froushani S. Caffeine Augments The Instruction of Anti-Inflammatory Macrophages by The Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal*. 2017;19:418-27.

19. Poole RL, Tordoff MG. The Taste of Caffeine. *Journal of caffeine research*. 2017;7(2):39-52.

20. Kim SY. Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ and $\beta 4$ Subunits Contribute to Nicotine-Induced Apoptosis in Periodontal Ligament Stem Cells. *Molecules and cells*. 2012;33(4):343-50.

21. Khezri S, Abtahi Froushani SM, Shahmoradi M. Nicotine Augments the Beneficial Effects of Mesenchymal Stem Cell-based Therapy in Rat Model of Multiple Sclerosis. *Immunological investigations*. 2018;47(2):113-24.

22. Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2009;18(1):103-12.

23. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nature protocols*. 2009;4(1):102-6.

24. Wahl EA, Schenck TL, Machens H-G, Egaña JT. Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation, and paracrine potential. *Scientific reports*. 2016;6:22957.

25. Rashedi I, Gomez-Aristizabal A, Wang XH, Viswanathan S, Keating A. TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2017;35(1):265-75.

26. Vakili Zahir N, Nakhjavani M, Hajian P, Shirazi FH, Mirzaei H. Evaluation of Silibinin Effects on the Viability of HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma) and HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) Cell Lines. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2018;17(1):261-7.

27. Antal P, Sipka S, Suranyi P, Csipo I, Seres T, Marodi L, et al. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. *Annals of hematology*. 1995;70(5):259-65.

28. Tyralla EE, Dodson WE. Caffeine secretion into breast milk. *Archives of Disease in Childhood*. 1979;54(10):787-800.

29. Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW, et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *British journal of pharmacology*. 2010;161(7):1542-52.

30. Schraufstatter IU, DiScipio RG, Khaldoyanidi SK. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells. *Journal of stem cells*. 2009;4(4):203-15.

31. Khezri S, Abtahi Froushani SM, Shahmoradi M. Nicotine Augments the Beneficial Effects of Mesenchymal Stem Cell-based Therapy in Rat Model of Multiple Sclerosis. *Immunological investigations*. 2018;47(2):113-24.

32. Yarosz EL, Chang CH. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-mediated Immunity and Disease. *Immune network*. 2018;18(1):e14.

33. Anguita E, Villalobo A. Ca(2+) signaling and Src-kinases-controlled cellular functions. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2018;650:59-74.



Original Article

The Effects of Nicotine and Caffeine Treatment on the Vitality and Regenerative Potentials of Mesenchymal Stem Cells

Zeinali Z, Abtahi Froushani M*

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 13 Nov 2018

Accepted: 09 Apr 2019

Abstract

Background & Objective: Previous studies indicated that Mesenchymal stem cells (MSCs) express some of the nicotinic receptor subunits and adenosine receptors. Therefore, MSCs function may be controlled by two very consuming environmental substance like nicotine (nicotinic receptor-agonist) and caffeine (adenosine antagonist). The purpose of the present study is to determine the role of nicotine or caffeine on the some of the function of MSCs.

Materials & methods: The mesenchymal stem cells were isolated from the bone marrow of NMRI. The cells were incubated with caffeine (0.1mM) and or with nicotine (0.1μM) for 48 hours. In a set of experiments, the cells were trypsinized and the vitality, the biological activity of cell membranes and the potentials mitochondrial redaction of them were assumed. In another experiments, the cutler plates were scratched with tip of the sampler, and the regeneration velocity of scar was evaluated by an optical camera.

Results: Treatment of MSCs with nicotine caused a significant increase in the absolute number of MSCs, concurrent with an increase in mitochondrial function. While caffeine decreased the vitality of cells, it also promoted a significant reduction in mitochondrial activity of remnant live cells. Nicotine induced a significant reduction in membrane activity of cells, while caffeine treatment exhibited a marked raise in neutral red uptake by MSCs compared to neutral red uptake by control cells. Regenerative assay showed that nicotine markedly promoted the regenerative potential of MSCs, while caffeine markedly reversed the regenerative potential of MSCs.

Conclusion: It seems that nicotine at used dose promoted the regenerative potential of MSCs, while caffeine had a revers effects.

Keywords: Mesenchymal Stem cell, Caffeine, nicotine

*Corresponding Author: Abtahi Froushani Seyed Meysam, Department of microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

E-mail: sm.abtahi@urmia.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-2579-6618>