بررسی اثر ماده مخدر متامفتامین بر رشد سلولی سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت آندومتر رحم موش‌های صحرایی

زهرا گودرزی[۱]، سید ابراهیم حسینی[۱*]، داوود مهربانی[۲]، سیده سارا هاشمی[۲]

۱-گروه زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲-مرکز تحقیقات سوختگی و ترمیم زخم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

*مسئول مکاتبات: ebrahim.hossini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۱

چکیده

متامفتامین به‌عنوان یک ماده توهم‌زا است که مورد سو مصرف میلیون‌ها نفر در سراسر دنیا قرار می‌گیرد. ایجاد سمیت سلولی در برخی از رده‌های سلولی از اثرات گزارش‌شده، این ماده روان‌گردان می‌باشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر متامفتامین بر رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ استخراج شده از بافت آندومتر رحم موش‌های صحرایی انجام گردید. در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی از بافت آندومتر رحم موش‌های صحرایی استخراج شد و پس از کشت آنها، با روش فلوسایتومتری و بواسطه مارکرهای CD34، CD90، CD105 و مزانشیمی بودن آنها مورد بررسی قرار گرفت. در پاساژ سوم کشت سلولی، اثر سمیت متامفتامین در غلظت ۰/٦ میلی‌مولار در طول مدت ۱ الی ۸ روز بر رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت آندومتر رحم توسط فرمول $PDT= T\times\frac{ln2}{\ln\frac{Xe}{Xb}}$ محاسبه گردید سلول‌های جدا شده از بافت آندومتر رحم، ٢٤ ساعت بعد از انتقال به فلاسک کشت سلولی، کاملاً به کف فلاسک چسبیدند. این سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای سطحی غیر هماتوپویتیک (CD90، CD105) مثبت و از نظر بیان مارکر هماتوپویتیک (CD34) منفی بود، بنابراین هویت مزانشیمی بودن این سلول‌ها تائید گردید. نتایج آزمون شمارش سلولی نیز حاکی از کاهش معنادار رشد سلول‌های تیمار شده با ۰/٦ میلی‌مولار متامفتامین در مقایسه با گروه شاهد بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد سلول‌های جدا شده از بافت آندومتر ، از نوع بنیادی مزانشیمی بوده که بر اساس نتایج حاصل از شمارش سلولی مشخص گردید که متامفتامین می‌تواند با القاء اثرات سمیت سلولی باعث مهار رشد در آنها گردد.

کلمات کلیدی: متامفتامین، اندومتر، سلول بنیادی، رشد سلولی، موش صحرایی.

مقدمه

متامفتامین که شبیه امفتامین و با فرمول C9H13N می‌باشد، دارویی بسیار اعتیادآور، توهم‌زا و سایکواکتیو است که به طور وسیعی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای اثرات سمی بر سیستم عصبی مرکزی می‌باشند. مصرف مکرر متامفتامین سبب آسیب به پایانه‌های عصبی دوپامینرژیک و سروتونرژیک در نواحی مختلف مغز می‌شود. اختلال در حافظه و یادگیری، اضطراب،

افسردگی و نیز اختلالات حرکتی نظیر بیماری پارکینسون از جمله اثرات سمی این دارو بر سیستم عصبی می‌باشند (۱٤، ۲۵).

مصرف متامفتامین باعث افزایش دما، رهاسازی گلوتامات، گونه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن و ملکول-های مرتبط با آپوپتوز می‌گردد (۲۱).

مطالعات نشان داده‌اند که مصرف متامفتامین از طریق واکنش‌های التهابی و تضعیف سیستم ایمنی، فرآیندهای پیری زودرس را فعال نموده و منجر به بیماری‌های مختلف از جمله بیماری های قلبی عروقی، سکته مغزی ، افسردگی و زوال عقل می‌شود (۲٤).

نتایج حاصل از یک بررسی نشان داد که متامفتامین دارای اثرات سمی در سلول‌های بنیادی جنینی مشتق شده از سلول‌های عصبی می‌باشد به طوریکه که از سلول‌های بنیادی می‌توان به عنوان یک مدل کارآمد برای ارزیابی سمیت مواد مخدر از جمله متامفتامین استفاده نمود (۱۷).

نتایج حاصل از یک بررسی موید ان است که مصرف متامفتامین باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی می‌شود (۳۲).

متامفتامین در سیستم عصبی مرکزی باز جذب دوپامین و دیگر نوروترنسمیترهای تک آمین را قطع نموده همچنین باعث تسهیل آزادسازی نوروترانسمیترهای مونوآمینی به درون فضای سیناپسی می‌گردد (۱۱).

نشان داده شده است که ترکیبات متامفتامینی باعث تغییر بیان ژن های موثر در پاسخ‌های رفتاری، مرگ سلولی، رشد و تکثیر سلولی، رشد ونمو سیستم عصبی شده و همچنین منجر به تغییر روند مسیرهای متابولیک طبیعی در تکوین، رشد و تمایز سلو لهای بنیادی یا پیش سازهای عصبی می‌شود (٤، ١٦).

در یک مطالعه نشان داده شد که ماده مخدر شیشه (متامفتامین) باعث تأخیر در چرخه سلولی، کاهش همانندسازی DNA و نتیجه باعث کاهش تعداد رسپتورهای فاکتور رشد اپیدرمی و کاهش سلول‌های بنیادی عصبی می‌شود (۱۵).

سلول‌های بنیادی توانمندی گسترده ای در تولید سلول‌های مشابه با خود و یا کمی متفاوت‌تر و محدودتر از خود را دارند (۲۷).

عملکرد ویژه سلول‌های بنیادی در بازیابی و ترمیم بافت های بدن در طول زندگی می‌باشد و دارای نقش ویژه‌ای در فرایند سلول درمانی هستند. این سلول‌ها، با خودنوزایی تکثیر شده و نسل خود را حفظ نموده و همچنین توانایی تولید سلول‌های تمایز یافته و بالغ یک بافت خاص را نیزدارند (۲۹).

ظرفیت تمایز این سلول‌ها به منشا شکل‌گیری آنها بستگی دارد و با یکدیگر متفاوت است (۲۲).

این سلول‌ها به سه نوع سلول‌های بنیادی جنینی، پرتوان القایی و بالغ تقسیم می شوند. منشا جداسازی سلول‌های بنیادی جنینی، توده‌ی سلولی داخلی بلاستوسیست است، آنها پرتوان بوده و می‌توانند به سلول‌های هر سه لایه‌ی زاینده (اندودرم، اکتودرم و مزودرم) متمایز گردند (۱۰).

سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی، سلول‌های تمایز نیافته بافت‌های بدن با ویژگی چندتوانی می‌باشند که در میان سلول های تمایز یافته وجود داشته و با کمی محدودیت در ظرفیت خودنوزایی می‌توانند سلول-هایی مانند خود را تولید نمایند (۲۹).

اگر چه منبع اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان است (۸) ولی در برخی از مطالعات موفق به جداسازی اجتماعی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت اندومتر رحم گوسفند و گاو شده‌اند (۲۸، ۱۹).

سوءاستفاده از مواد توهم‌زایی نظیر متامفتامین به دلیل تولید و دسترسی راحت و قیمت ارزان این مواد به‌عنوان یک تهدید مهم جهانی برای سلامت انسان‌ها در سراسر دنیا مطرح است (۱، ١٤).

مشتقات آمفتامینی نظیر متامفتامین، در طول سال‌های اخیر به دلیل دارا بودن خواص تحریکی، توهم زایی، احساس لذت و سرخوشی مورد توجه اکثر مردم به ویژه جوانان و نوجوانان قرار گرفته است. همچنین از متامفتامین در درمان بسیاری از اختلالات از جمله اختلال بیش‌فعالی، حملهٔ خواب (نارکولپسی) و چاقی استفاده می‌شود (۳۰).

با توجه به آنکه تاکنون مطالعات چندانی در ارتباط با اثر داروی توهم‌زای متامفتامین بر روی رشد سلول-های بنیادی مشتق از رحم موش‌های صحرایی بالغ صورت نگرفته است لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر متامفتامین بر رشد سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت اندومتر رحم در موش‌های صحرایی بالغ انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر با رعایت مقررات و اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی جهت تهیه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت آندومتر رحم موش های صحرایی بالغ انجام گردید. حیوانات در شرایط استاندارد و با درجه حرارت محیطی۲۰-۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و چرخهٔ نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند. در این مطالعه برای جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت رحم موش-های صحرایی ماده بالغ، بافت آندومتر پس از جدا شدن، در محلول بافر هنکس (Hanks) قرار گرفت و سپس به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شد و با بافر Hanks حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین (دو درصد) شستشو داده شد و آنگاه نمونه‌ها در محلول کلاژناز نوع I با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه برای هضم بافتی قرار گرفته شدند. پس از هضم بافت، برای حذف تکه‌های بافتی هضم نشده و ناخالصی‌های موجود فیلتراسیون توسط فیلترهای ۰/۷ و ۰/٤ میکرومتر انجام شد. سپس برای حذف سلولهای خونی از نمونه‌ها از فایکول استفاده گردید. سپس سلول‌های جدا شده به محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد سرم و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد، کشت داده شد. تعویض محیط کشت هر ۱ روز یک بار صورت پذیرفت.

سپس برای پاساژ سلول‌های بنیادی، بعد از اینکه سلول‌ها، سطح ظرف کشت را به صورت یک لایه کامل پوشش دادند، سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت بررسی گردیدند تا ضمن تعیین میزان تراکم سلولی از عدم آلودگی میکروبی و بقیه‌ی آلودگی‌ها نیز اطمینان گردد.

آنگاه به منظور شناور شدن و به حالت سوسپانسیون در آمدن تمام سلول‌ها ضربه‌های ملایمی به فلاسک محتوی سلول‌ها زده شد و بعد از آنکه کل محیط کشت و سلول‌ها به حالت شناور در آمدند، آنها به یک لوله‌ی استریل انتقال داده شدند.

سپس سلول‌ها با بافر فسفات بدون کلسیم و منیزیم شستشو داده شدند و محلول حاصل از شستشو به سلول‌های قبلی که حاوی مقدار زیادی سلول زنده است، اضافه گردید و سپس ۱ میلی‌لیتر محلول تریپسین EDTA/به سلول‌های شسته شده‌ی کف فلاسک اضافه گردید و برای ۲ مدت تا ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد و بعد از خروج از انکوباتور برای غیر فعال شدن تریپسین به آنها سرم اضافه گردید.

آنگاه لوله‌ی حاوی سلول‌ها را سانتریفیوژ نموده و رسوب ایجاده شده را در حجم مناسبی از محیط کشت تازه ریخته شد و سوسپانسیون در آورده و شمارش سلولی انجام گردید و سپس مقدار مناسبی از سلول‌ها، در فلاسک‌های جدید حاوی مقادیر کافی محیط کشت تازه ریخته شد و این اعمال تا سومین پاساژ به همین ترتیب ادامه یافت. بعد از سومین پاساژ سلول‌ها از نظر ویژگی‌های مورفولوژی و مارکرهای سطح سلولی با کمک میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند.

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

ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی قدرت چسبندگی آنها به کف فلاسک و دوکی شکل بودن آنها می‌باشد. همچنین در این مطالعه برای تایید هویت سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم از روش فلوسیتومتری برای مارکرهای مزانشیمیCD90 و CD105 به عنوان مارکر سلول‌های اندوتلیالی و CD34 مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک استفاده شد.به منظور ارزیابی روند رشد سلولی و به منظور رسم منحنی رشد، دو پلیت ۲٤ حفره‌ای حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر رحم موش‌های صحرایی بالغ در پاساژ چهارم تهیه شد (هر حفره ۱۰۰۰۰ سلول در یک میلی لیتر محیط کشت کامل). هر پلیت به یک گروه اختصاص یافت بدین صورت که به پلیت اول محیط کشت کامل به محیط دوم محیط کشت کامل حاوی متامفتامین با دوز ۰/٦ میکرومولار اضافه شد ۲٤ ساعت بعد سه چاهک از هر پلیت در نظر گرفته، محیط کشت آنها خارج، سلول‌ها با PBS شسته و با Trypsin /EDTA از فلاسک کشت جدا شدند. بعد از سانتریفیوژ، محلول بالایی را دور ریخته و به پلیت سلولی، مقدار معینی محیط کشت کامل اضافه شده و با پیپتاژ سلول‌ها به حالت معلق درآمدند. سپس ۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون با ۵ میکرولیتر تریپان بلو میکس شده و این مخلوط بین لام ولامل نئوبار قرار گرفته شد. تعداد سلول‌های ٤ مربع اطراف شمارش و طبق فرمول زیر تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر محاسبه شد:

شمارش سلول‌ها به ترتیب فوق تا هفت روز متوالی تکرار شد. جهت ارزیابی روند رشد سلولی در آزمایشگاه ، زمان مورد نیاز برای دوبرابر شدن جمعیت سلول‌ها (Population doubling time, PDT) نیزبا استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

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

T: زمان انکوباته نمودن سلول‌ها بر حسب ساعت، Xb: تعداد سلول‌ها در زمان شروع انکوباسیون سلول‌ها و Xe: تعداد سلول‌ها در زمان پایان انکوباسیون سلول‌ها می‌باشد.
سپس منحی رشد سلولی در گروه‌های تجربی و کنترل با هم مقایسه گردید.

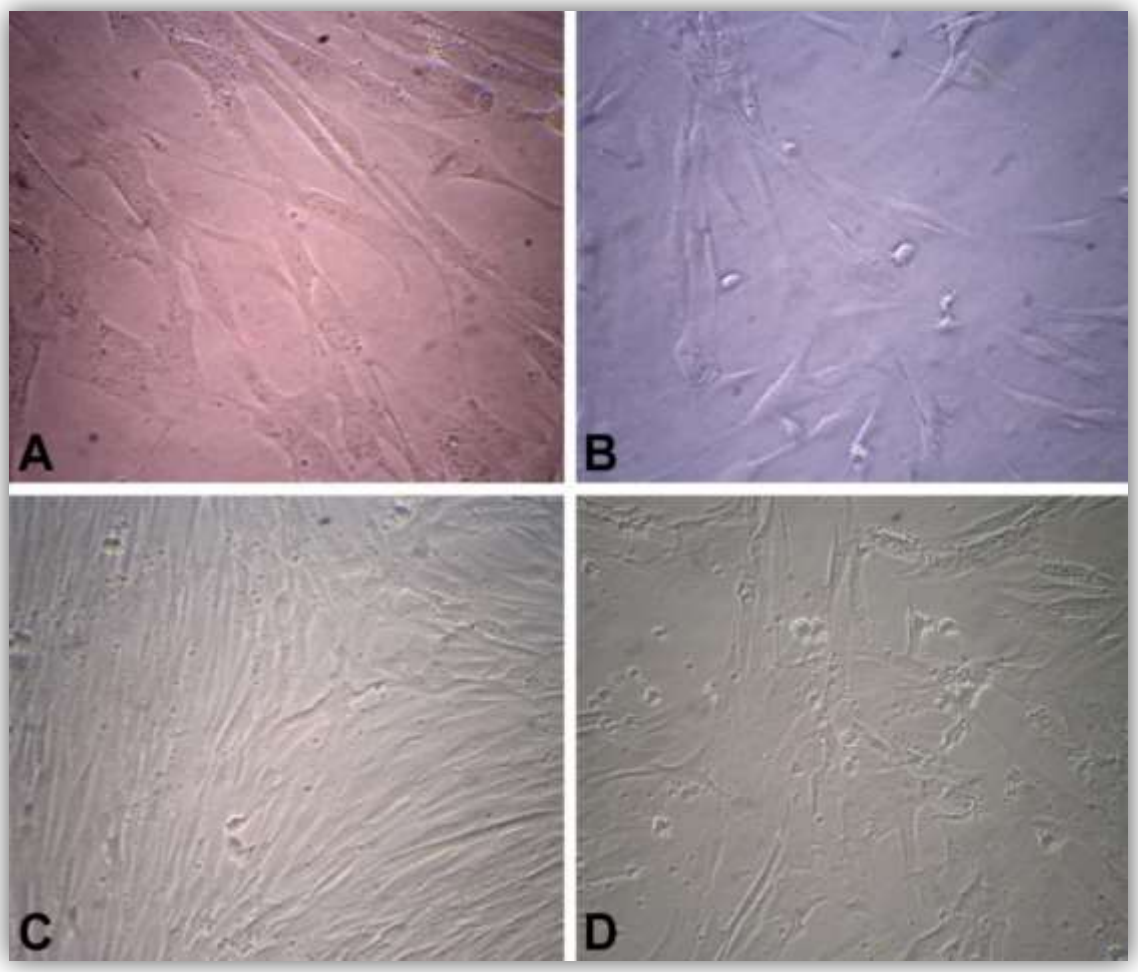
نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد اشکال مختلفی نظیر دوکی، مسطح، ستاره‌ای و یا گرد در روزهای ابتدایی از پاساژ صفر در جمعیت سلولی کف فلاسک‌ها وجود داشت. هرچند بخش عمده‌ای از سلول‌های چسبیده به کف ظرف کشت دوکی شکل بودند که نشان از مزانشیمی بودن آنها می‌باشد. در طول پاساژ صفر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مرور تراکم بیشتری پیدا کردند و به تدریج کلونی‌هایی در سطح ظرف کشت شکل گرفت. به واسطه‌ی شکل‌گیری این کلونی‌ها سلول‌ها با یکدیگر مرتبط شده و به تدریج تمامی سطح ظرف را پوشاندند.
نتایج کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از اندومتر رحم در ابتدا دارای شکل کروی بودند که پس از گذشت ۲٤ ساعت پس از کشت مورفولوژی شبیه به فیبروبلاست یا دوکی شکل را نشان دادند که به کف فلاسک چسبیده بودند. حدودا ۳ تا ٤ روز پس از کشت، یک لایه تک‌سلولی با تراکم ۸۰ تا ۹۰ درصد

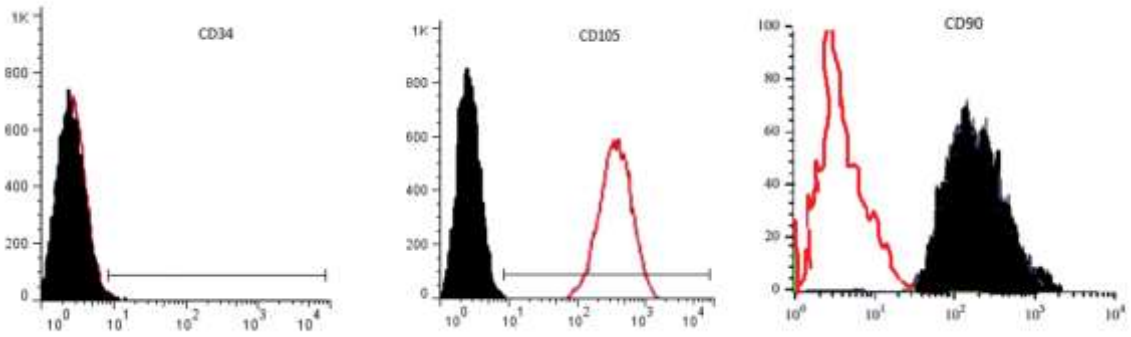
در کف فلاسک تشکیل گردید (شکل ۱).

همچنین در این مطالعه پس از بررسی فلوسایتومتری مشخص گردید که این سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای سطحی غیر هماتوپویتیک (CD90، CD105) مثبت و از نظر بیان مارکر هماتوپویتیک (CD34) منفی می‌باشند و بنابراین هویت مزانشیمی بودن این سلول‌ها با این روش نیز تائید گردید (شکل۲).

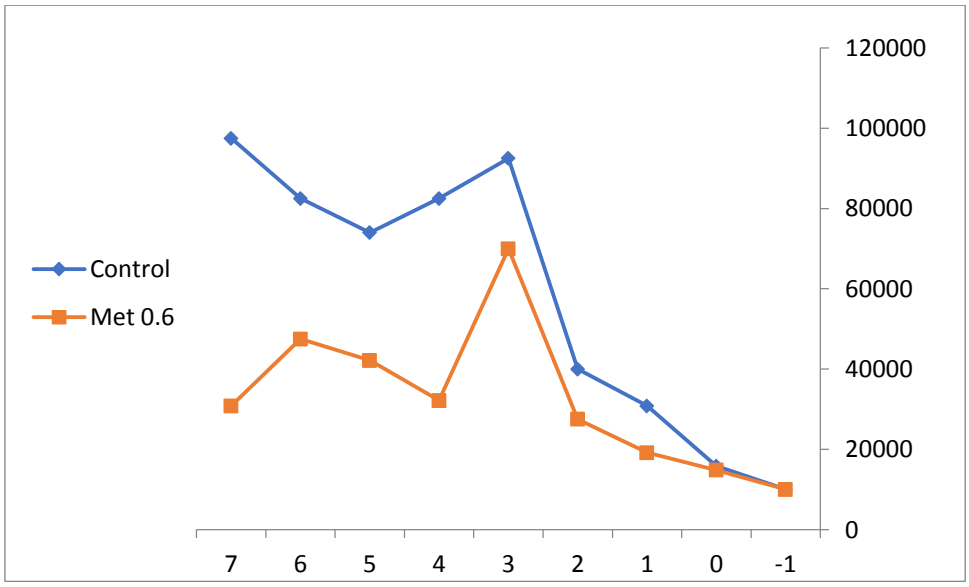
به علاوه نتایج حاصل از شمارش سلولی در این بررسی نشان داد که تا روز سوم تیمار، رشد سلول‌های تحت تیمار با متامفتامین با آهنگی کندتر از سلول‌های گروه کنترل ادامه داشته و از روز سوم تا روز هشتم، در سلول‌های تحت تیمار با متامفتامین رشد سلول‌های مزانشیمی در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل (فاقد تیمار) کاهش شدید می‌یابد (شکل ۳).



شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت اندومتر رحم (دوکی‌شکل)



شکل ۲- تائید هویت سلول‌ها از طریق آنالیز فلوسایتومتری از طریق بیان مارکرهای CD90 و CD105 و عدم بیان مارکر CD34



شکل ۳- نمودار رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت اندومتر رحم در گروه‌های کنترل و تجربی (محور افقی زمان در واحد روز و محور عمودی تعداد سلول‌ها را نشان می‌دهد)

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که متامفتامین باعث کاهش شدید رشد سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت اندومتر رحم موش‌های صحرایی بالغ می شود. با توجه به بررسی مورفولوژی سلول‌ها براساس شکل دوکی آنها و چسبندگی سلول‌ها به کف فلاسک مزانشیمی بودن آنها تایید شد که با نتایج مطالعات قبلی مشابهت دارد (۱۸، ۱۹).

در شناسایی سلول‌های بنیادی اندومتر رحم موش‌های صحرایی به وسیله توان تمایزی به بافت استخوان و چربی نیز مزانشیمی بودن آنها اثبات که با نتایج مطالعات دیگران مشابهت دارد (۱۸، ۱۹).

نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد، متامفتامین می‌تواند باعث افزایش فاکتورهای پیری از جمله فاکتور β- گالاکتوزیداز و سرآمید و کاهش همانندسازی DNA،

کاهش تعداد سلول‌های در حال تقسیم و تغییر در روند رونویسی از ژن‌های کد کننده پروتئین‌های تنظیم کننده چرخه سلول از جمله P53 و P21 و سایتوکاین‌های پیش التهابی که در فرآیند پیری شرکت می‌کنند می‌گردد (۷).

مطالعات متعدد نشان می‌دهند که متامفتامین باعث تغییرات اساسی در بیان ژن‌های مختلف می‌شود که این تغییرات می‌تواند در اثر تغییرات هیستونی از قبیل تغییرات استیلاسیون هیستون‌ها به ویژه استیلاسیون هیستون H3 و H4 می‌گردد (٤).

به علاوه مشخص گردیده است که متامفتامین باعث کاهش در فعالیت هیستون داستیلازها و LINE-1 می-گردد و این امر نیز در تنظیم بیان ژن شرکت می‌کند (۵)

.بنابراین در پژوهش حاضر نیز احتمالا کاهش شدید رشد سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت رحم موش-های صحرایی در نتیجه مصرف متامفتامین به دلیل کاهش همانندسازی DNA به دلیل تغییرات در پروتئین‌های هیستونی بوده است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که متامفتامین فرآیند پیری سلولی را از طریق تحریک بیوسنتز مجدد سرآمیدها و فعال کردن رونویسی از ژن هایی که در التهاب و پیری سلول درگیر می باشند تسریع می‌نماید (۳).

در همین راستا در یک مطالعه دیگر نشان داده شد که متامفتامین در محیط کشت سلول های فیبروبلاست جنینی موش‌ها باعث افزایش بیان فاکتورهای پیری از جمله فاکتور بتا-گالاکتوزیداز، سطوح افزایش یافته سرآمید و همچنین مورفولوژی پهن و مسطح شده سلول می‌گردد (۱۲).

بیوسنتز افزایش یافته سرآمید تحت اثر متامفتامین باعث تسریع پیشرفت فنوتیپ پیری می گردد که از طریق ویژگی‌های تکثیر کاهش یافته، مورفولوژی سلولی تغییریافته، بیان افزایش یافته بتا- گالاکتوزیداز و دیگر مارکرهای در ارتباط با پیری شناخته می‌گردد (۲۳).

در مطالعات نشان داده شده است که داروهایی نظیر متامفتامین با فعال نمودن مسیرهای آپوپتوتیک و کاسپازی و همچنین از طریق تحریک رسپتورهای سیگما ۱ باعث مرگ سلول‌ها می‌شود (۱۷، ۲٦).

نتایج حاصل از یک پژوهش دیگر نشان داد که داروی متامفتامین از طریق کاهش در همانندسازی DNA در فاز S باعث تاخیر در چرخه سلولی و کاهش تعداد رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی و در نتیجه کاهش رشد سلول‌های بنیادی می‌شود (۱۵، ۳۱).

اپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به عنوان یکی از علل اصلی تغییرات دژنراتیو مزمن در شرایط تیمار با متامفتامین نقش دارد که با شکافته شدن یا کلیواژ DNA، فعال شدن کاسپاز ۳ و فعال شدن ژن های پیش آپوپتوزی همراه است (٦). در یک بررسی دیگر نشان داده شد متامفتامین باعث کاهش تکثیر و افزایش روند آپوپتوز سلول‌های زرمینال موش‌های صحرایی می‌شود (۱). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که متامفتامین باعث کاهش در توانایی تکثیر و خود بازسازی سلول‌های بنیادی می‌شود و باعث تغییر مسیر تمایز آن‌ها از مسیر طبیعی به مسیرهای ناهنجار و همچنین باعث تغییر روند تکوین، رشد و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود (٤).

مطالعات اخیر مشخص می‌کند که کاهش رشد سلولی تحت تاثیر متامفتامین به دلیل تحریک سیستم مخرب یوبی کویتین در سلول‌ها می‌باشد (۹). نتایج یک مطالعه برروی موش ها نشان دادند که متامفتامین باعث تغییر کاریوتیپ سلول‌ها می‌گردد (۲۰)، که از این طریق می‌تواند منجر به اختلال در روند رشد و تکثیر سلول ها گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داروی متامفتامین احتمالا از طریق تغییر در بیان ژن‌های موثر در فرایند تکثیر سلولی و تحریک بیان ژن‌های درگیر در پیری زودرس و آپوپتوزیس باعث کاهش رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت آندومتر رحم می‌شود.

منابع

1. Alavi S.H., Taghavi M.M., Moallem S.A. 2008. Evaluation of effects of methamphetamine repeated dosing on proliferation and apoptosis of rat germ cells. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54(2): 85-91.

2. Akhgari M., Mobaraki H., Etemadi-Aleagha A. 2017. Histopathological study of cardiac lesions in methamphetamine poisoning-related deaths. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1): 5.

3. Astarita G.B., Grimaldi N., Realini Z., Justinova L.V., Panlilio A. 2015. Methamphetamine accelerates cellular senescence through stimulation of de novo ceramide biosynthesis. *PloS One*, 10(2): e0116961.

4. Baptista S., Lasgi C., Benstaali C., Milhazes N., Borges F., Fontes-Ribeiro C. 2014. Methamphetamine decreases dentate gyrus stem cell self-renewal and shifts the differentiation towards neuronal fate. *Stem Cell Research*, 13(2): 329-341.

5. Cadet J.L., Jayanthi M. T., McCoy B., Ladenheim F., Saint-Preux E., Lehrmann S. De. 2013. Genome-wide profiling identifies a subset of methamphetamine (METH)-induced genes associated with METH-induced increased H4K5Ac binding in the rat striatum. *BMC Genomics*, 14: 545.

6. Cadet J.L., Jayanthi S., Deng X. 2005. Methamphetamine-induced neuronal apoptosis involves the activation of multiple death pathways. *Neurotoxicity Research*, 8(3-4): 199-206.

7. Campisi J., d'Add di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9): 729-740.

8. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11): 2739-2749

9. Castino R., Lazzeri G., Lenzi P., Bellio N., Follo C., Ferrucci M., Fornai F. 2008. Suppression of autophagy precipitates neuronal cell death following low doses of methamphetamine. *Journal of Neurochemistry*, 106(3): 1426-1439.

10. Conley B.J, CYoung J.,Trounson A.O., Mollard R.2004. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells." *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(4): 555-567.

11. Fleckenstein A.E., Volz T.J., Riddle E.L., Gibb J.W Hanson G.R. 2007. Mechanism of action of amphetamines. *New Insights into the Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 681-698.

12. Freund A., Orjalo A.V., Desprez P.Y., Campisi J. 2010. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. Trends Mol Med, 16(5):238-246.

13. Ghobadi F., Rahmanifar F., Mehrabani D., Tamadon, A., Dianatpour M., Zare S., Razeghian Jahromi I. 2018. Endometrial mesenchymal stem stromal cells in mature and immature sheep: An in vitro study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 16(2): 83-92.

14. Krasnova I.N., Cadet J.L. 2009. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Research Review*, 60(2): 379-407.

15. Mandyam C.D., Wee S., Elena F., Amelia J.C., Heather N.E.,George F.R. 2008.Varied access to intravenous methamphetamine self-administration

Derived Stem Cells: Progress So Far. *International Journal of Photoenergy*, 201(6): 1-8.

23. Mullen T.D., Obeid L.M. 2012. Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anti-Cancer Agents* in *Medicinal Chemistry*, 12(4):340-363.

24. Papageorgiou M., Raza A., Fraser S., Nurgali K., Apostolopoulos V. 2019. Methamphetamine and its immune-modulating effects. *Maturitas*, 121:13-21.

25. Schwarzbach V., Lenk K., Laufs U.2020. Methamphetamine-related cardiovascular diseases**.** *ESC Heart Failure*, 7(2): 407-414.

26. Shen K., Zhang Y., Lv X., Chen X., Zhou R., Nguyen L.2016.Molecular Mechanisms Involving Sigma-1 Receptor in Cell Apoptosis of BV-2 Microglial Cells Induced by Methamphetamine. *CNS Neurological Disorders Drug Targets*, 15(7): 857-865.

27. Smith A. A.2006. glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097): 1060.

28. Tamadon A., Mehrabani D., Zarezadeh Y., Rahmanifar F., Dianatpour M., Zare S.2017.Caprine endometrial mesenchymal stromal stem cell: multilineage potential, characterization, and growth kinetics in breeding and anestrous Stages, *Veterinary and Medicine International*, 2017: 5052801.

29. Thimios A.M., Javier C., Pierfrancesco P., Giovanna O., Lucia J.R. 2017. Monitoring notch signaling-associated activation of stem cell niches within injured dental pulp. *Frontiers Physiology*, 8: 372.

30. Thanos P.K., Kim R., Delis F., Ananth M., Chachati G., Rocco, M.J. 2016. Chronic methamphetamine effects on brain structure and function in rats. *PLoS One*, 11(6): e0155457.

differentially alters adult hippocampal neurogenesis." *Biological Psychiatry*, 64(11): 958-965.

16. Martin T.A., Jayanthi S., McCoM M.T., Brannock C., Ladenheim B., Garrett T. 2012. Methamphetamine causes differential alterations in gene expression and patterns of histone acetylation/ hypoacetylation in the rat nucleus accumbens. *PLoS One*, 7(3): e34236.

17. Meamar R., Dehghani L., Karamali F.2012.Toxicity effects of methamphetamine on embryonic stem cell-derived neuron.. *Journal* of *Research in Medical Sciences*. 17(5): 470-474.

18. Mehrabani D., Hassanshahi M., Tamadon A., Zare S., Keshavarz S., Rahmanifar F.2015. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(2): 103-110.

19. Mehrabani D., Rahmanifar F., Mellinejad M., Tamadon A., Dianatpour M., Zare S. F.2015.Isolation culture characterization and adipogenic differentiation of heifer endometrial mesenchymal stem cells. *Comparative Clinical Pathology*, 24:1159-1164.

20. Mirjalili T., Kalantar S.M., Shams Lahijani M., Sheikhha M.H., Talebi A. 2013. Congenital abnormality effect of methamphetamine on histological, cellular and chromosomal defects in fetal mice.. *Iranian Journal* of *Reproductive Medicine*,11(1):39-46.

21. Miyazaki I., Asanuma M., Diaz-Corrales F.J., Fukuda M., Kitaichi K., Miyoshi K. 2006. Methamphetamine-induced dopamin ergic neurotoxicity is regulated by quinone-formation-elatedmolecules. *FABES Journal*, 20(3): 571-573.

22. Moore T.J., Abrahamse H. 2014. Neuronal Differentiation of Adipose

31. Yuan C.J., Quiocho J.M., Kim A., Wee S., Mandyam C.D. 2011. Extended access methamphetamine decreases immature neurons in the hippocampus which results from loss and altered development of neural progenitors without altered dynamics of the S-phase of the cell cycle. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(1): 98-108.

32. Wang Q., Wei L.W., Xiao H.Q., Xue Y., Du S.H., Liu Y.G. 2017. Methamphetamine induces hepatotoxicity via inhibiting cell division, arresting cell cycle and activating apoptosis: in vivo and in vitro studies. *Food and Chemical Toxicology*, 105: 61-72.