Research Paper

Evaluation of the Effects of Cannabis on Cell Growth of Stem Cells Derived from Endometrial Tissue of Uterine Rats

Najmea Farhadi[1], Davood Mehrabani[2], Seyed Ebrahim Hosseini[3]*, Seyedeh Sara Hashemi[4]

1. Sc Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2. Associate Professor Burn and Wound Healing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Associate Professor Department of Biology, Faculty of Sciences, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran
4. Assistant Professor Burn and Wound Healing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 2020/05/02 **Accepted:** 2020/12/26

Abstract

Introduction: Cannabis is psychoactive substance that is abused by millions of people the world. Due to the high consumption of this substance among young people of reproductive age, the present study was performed to investigate the effect of cannabis on the growth of endometrial mesenchymal stem cells(msc) derived from rats.

Materials and Methods: In this experimental study, msc were extracted from the endometrium of rats and after culturing and confirming the mesenchymal nature of the cells by flowcytometry and by expressingCD34 and CD90 and not expressingCD105 markers,in the third passage of cell culture, the effects of cannabis in concentration of100and1000ng/ml were calculated on the growth of these cells within1to8days by the

PDT=T×$\frac{ln2}{\ln\frac{Xe}{Xb}}$ formula and the results were analyzed using ANOVA and Tuki tests.

Results: Cells isolated from the endometrium adhered to the floor of the cell culture flask24hours after transfer. The mesenchymal nature of these cells was confirmed by the expression of CD90, CD105and non-expression of CD34markers.The results ofcell counts also showed the growth of cells treated with cannabis until the third day of treatment similar to the control group. From the fourth day in the treatment group with a dose of100ng/ml cannabis increased significantly top<0.05and in the treatment group with a dose of1000ng/ml. Third, there was significant decrease compared to the control group and from the fourth day, significant increase was observed atp<0.05.

Conclusion: The results showed that the cells isolated from the endometrium were of the msc, and that cannabis probably stimulated the growth of these cells through cannabinoid receptors.

***Corresponding Author:** Seyed Ebrahim Hosseini
Address: Associate Professor Department of Biology, Faculty of Sciences, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran
Tel: 09171184495
E-mail: ebrahhim.hossini@yahoo.com

Keywords: Cannabis, Endometrium, Stem cells, Cell growth, Rat

How to cite this article: Farhadi N., Mehrabani D., Hosseini S.E., Hashemi S.S. Evaluation of the Effects of Cannabis on Cell Growth of Stem Cells Derived from Endometrial Tissue of Uterine Rats, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):814-825.

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

Introduction

Stem cells are capable cells that have a great ability to produce cells that are similar to or slightly different from themselves. Stem cells function is the recovery and repair of body tissues during life and their special role in cell therapy. Mature mesenchymal stem cells are used to repair damaged tissue. The ability to differentiate these cells depends on the source of their formation and is different from each other. Stem cells are divided into three categories: embryonic, induced pluripotent and adult. Embryonic stem cells are able to differentiate into cells of all three germinal layers. So far, they have been able to isolate mesenchymal stem cells from the endometrium of sheep and cattle. Cannabis, scientifically named Cannabis sativa, is an annual, herbaceous, flowering plant of the cannabis family that has more than 104 types of cannabinoid compounds. Cannabis is a concentrated gum from the flowering branches of cannabis, which is produced with high levels of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and strong psychoactive properties, and has many therapeutic effects. Cannabis is a drug that is widely used in the world Cannabis has anti-tumor and anti-nausea properties and affects behavioral properties, heat sensitivity, mood regulation, appetite and sexual activity. With cannabinoids, especially THC, it also has strengthening and addictive properties. Cannabinoids affect both types of cannabinoid receptors, CB1 and CB2, which are mainly found in the central nervous system, immune cells, and reproductive tissues, and proliferate or stop growing in various cells, including lymphocytes, neurons. And induce non-neural derived from stem cells. THC induces apoptosis through DNA breakdown and loss of plasma membrane symmetry. TCH has a negative effect on the survival of mesenchymal stem cells, which are one of the most important cells in cell regeneration strategies in tissue engineering. The endometrium is a unique tissue and source of mesenchymal stem cells that are tested in a wide range of clinical applications. Endometrial-derived mesenchymal stem cells can grow extensively in vitro and in vivo. Endometrial stem cells, which include hematopoietic stem cells, mesenchymal cells, and endothelial progenitor cells, may be derived from embryonic stem cells or bone marrow. Because infertility is one of the problems of human beings all over the world, and considering that cannabis use is increasing, especially among young people of reproductive age, and according to studies, cannabis can be used in Different individuals caused changes in stem cell function, so this study was performed to investigate the effect of cannabis on endometrial stem cell growth in adult rats.

Methodology

The present experimental study was performed to evaluate how differentiated mesenchymal stem cells derived from endometrial tissue of adult rats under the influence of cannabis plant extract and in accordance with the rules and principles of working with laboratory animals. The animals were kept under standard conditions with an ambient temperature of 25-20 ° C, relative humidity of 70% and a light cycle of 12 hours of darkness and 12 hours of light. In this study, percolation method was used to prepare the hydroalcoholic extract of this plant. For this purpose, sufficient flowering cannabis branches were prepared in coordination with the Anti-Narcotics Center of Shiraz University of Medical Sciences and dried away from light. Then the extract in the dried flowering branches of cannabis plant was extracted as a solvent using 70% ethanol produced by the German company Merck. Then, in order to completely remove the solvent from the extract, the solution was placed in a rotary apparatus manufactured by Ikar Company, Germany at a temperature of 45 degrees and a rotation of 50 revolutions per minute. The extract was then completely concentrated using a vacuum pump. In the present study, to separate stem cells from the uterine tissue of adult rats, after anesthetizing the mice, the endometrial tissue of the animals was separated and placed in Hanks buffer solution and then with Hanks buffer containing penicillin antibiotic (Penicillin). 2% was washed and then the samples were placed in type I collagenase solution at a concentration of 1 mg / ml for 1 hour at 37 ° C for tissue digestion.

Filtration was performed by 0.7 µm and 0.4 µm filters to remove undigested tissue

fragments and impurities. Isolated cells were transferred to DMEM / F12 medium containing 10% serum and 1% penicillin-streptomycin. After the cells covered the surface of the culture dish with a complete layer, after one week, the culture medium was removed and the cells were washed with 1 ml of phosphate buffered saline (PBS). Then 5 ml of complete culture medium was added to the flask and returned to the incubator. This stage was considered as the zero passage of cells. After about 14 days, when more than 75% of the plate bottom was filled with mesenchymal stem cells and the cells reached their maximum growth rate, the cells were ready for cell passage. The living cells attached to the bottom of the flask were then washed with saline phosphate buffer. Were located, Then, to separate these cells from the bottom of the dish, a combination of trypsin and Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used and Using a few gentle strokes, the still adherent cells were isolated. Using saline phosphate buffer, in addition to diluting trypsin, the isolated cells were transferred into a falcon and centrifuged at 1500 rpm. For 5 to 10 minutes, a cell precipitate formed at the base of the falcon. The supernatant containing saline phosphate buffer and trypsin was then removed. At this stage, by adding a small amount of culture medium on the cells and pipetting them, the cells were dispersed in the culture medium. The cells were then placed in a larger flask and cultured in a larger amount of medium, after which they were kept in an incubator at 37 ° C and 5% CO2 and continued until the third passage. In this study, expressingCD34 and CD90 and not expressingCD105 markers,in the third passage of cell culture, the effects of cannabis in concentration of100and1000ng/ml were calculated on the growth of these cells within1to8days by the

PDT=T×$\frac{ln2}{\ln\frac{Xe}{Xb}}$ formula and the results were analyzed using ANOVA and Tuki tests.

Results

The results of flow cytometric observations in this study showed that stem cells derived from uterine endometrial tissue have adhesion to the bottom of the cell culture vessel and considering that from the fourth passage onwards they are able to express high non-hematopoietic surface markers CD105 and CD90. They also did not have the ability to express the CD34 hematopoietic surface marker, which indicates that mesenchymal cells derived from endometrial tissue. In addition to the cell growth curve diagram and analysis of the data obtained in this study, showed that stem cells derived from uterine endometrial tissue, as a result of treatment with a dose of 100 ng / ml of cannabis extract, from day 0 to day 3, as control cells It has exponential growth and from the fourth day onwards, the growth of cannabis extract treated cells compared to the control group shows a significant increase at the level of $P < 0.05$. Also, the results of data analysis showed that stem cells derived from endometrial tissue treated with a dose of 1000 ng / ml of cannabis extract, like cells in the control group, had an upward growth process until the third day and entered the exponential phase, while From the third to the fourth day, a significant decrease in the growth rate of these cells compared to the cells of the control group was observed at the level of $P < 0.01$ and from the fourth day onwards, the growth trend of these cells again showed a significant increase at the level of $P < 0.01$.

Conclusion

The results of this study showed that stem cells derived from uterine endometrial tissue, in addition to their adhesion to the culture vessel from the fourth passage onwards, these cells did not express the CD34 marker, but expressed the CD105 and CD90 markers to a high extent, which confirms mesenchymal In addition, cannabis extract has been shown to increase the growth of these cells. Stem cells isolated from uterine endometrial tissue have a heterogeneous population of cells and have a high level of expression of stem cell-specific surface markers. Flow cytometric analysis has shown that endometrial stem cells are positive for CD90, CD105 and CD146 and for CD31, CD34 are negative. Endogenous and exogenous cannabinoid compounds have the ability to control cells in adults in a dose-dependent manner. Short-term induction of cannabinoids has no effect on cell proliferation and neurogenesis in the hippocampus, whereas long-term induction of exogenous cannabinoids affects these growth stages. Cannabinoids, with their antioxidant properties, enhance the chemical protective effects in living organisms. CBD, a non-psychoactive cannabinoid

compound, has antitumor and therapeutic effects on human neuroblastoma cells. THC stimulates the modulation of mesenchymal stem cells by activating the CB2 receptor in inflammation with the release of cytokines from stimulated lipopolysaccharide microglia. In addition, pretreatment with THC enhances the immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells. Bone marrow derivative induces chronic hyperglycemia and chronic contraction injury models. In this way, it reduces the release of proinflammatory cytokines. Using hematopoietic anti-marker antibodies such as CD45, CD14, CD56, CD34 and CD38, it was shown that endometrial tissue-derived mesenchymal cells do not express these markers, while mesenchymal markers do not express CD90, CD73, CD105 and CD29. Cannabis has a positive effect on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into fat cells in rats. Human fat mesenchymal cells maintain their osteoblastic differentiation in the presence of hydroalcoholic extract of cannabis.

In transgenic mice lacking CB1 receptors, the lack of these receptors in stem cells reduces stem cell proliferation and reduces the number of new cells. Therefore, in the present study, cannabis extract probably induced the growth of endometrial tissue-derived mesenchymal cells by binding to CB1 receptors. Cannabinoids, as one of the active components of cannabis through cannabinoid receptors CB1 and CB2 and stimulation of metabolic enzymes regulate cell proliferation, differentiation and cell survival. Endocannabinoid systems affect the cell growth of this important tissue by acting on specific mechanisms that are important for the formation and maintenance of the endometrium. Consumption of cannabis extract by DNA fragmentation as well as free radicals and fat peroxidation leads to cell death. Depending on the dose of cannabis and also the type of cells studied and the density of cannabinoid receptors in them, this substance increases or decreases cell growth. Therefore, in the present study, the effect of increasing cell growth can be attributed to the dose. Attributed the drug and the type of cells studied. Cannabinoid receptors are expressed at the very beginning of development and are considered as an important factor for the survival and growth of mesenchymal stem cells. Since activation of ERK1 / 2, PI 3-k and Akt pathways are involved in inhibiting the process of apoptosis and stimulating cell growth and cannabinoid systems also stimulate these cellular signaling pathways (14), in the present study, cannabis extract is probably from By binding to cannabinoid receptors and activating these pathways, it has increased the growth of endometrial uterine mesenchymal stem cells in rats.

Acknowledgment

We would like to thank all those who helped us in this research. We would also like to show our gratitude to the anonymous reviewers for their so-called insights.

Conflict of Interest: Authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر ماده حشیش Cannabis بر رشد سلولی سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت آندومتر رحم موش‌های صحرایی بالغ

نجمه فرهادی[۱]، داوود مهربانی[۲]، سیدابراهیم حسینی[۳*]، سیده سارا هاشمی[۴]

۱. استاد دانش‌آموخته گروه زیست‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲. دانشیار مرکز تحقیقات سوختی و ترمیم زخم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳. دانشیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، مؤسسه آموزش عالی زند شیراز، شیراز، ایران
۴. استادیار مرکز تحقیقات سوختی و ترمیم زخم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۶

* نویسندهٔ مسئول: سید ابراهیم حسینی
نشانی: گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، مؤسسه آموزش عالی زند شیراز، شیراز، ایران
تلفن: ۰۹۱۷۱۱۸۴۴۹۵
رایانامه: ebrahhim.hossini@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0003-0548-0114
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-9169-8189

کلیدواژه‌ها:
کانابیس، اندومتر، سلول بنیادی، رشد سلولی، موش صحرایی

چکیده

زمینه و هدف: کانابیس، ماده روان‌گردانی است که مورد سوءمصرف میلیون‌ها نفر در دنیا قرار می‌گیرد. با توجه به شیوع ناباروی و مصرف زیاد این ماده در بین جوانان، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره کانابیس بر رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از آندومتر موش‌های صحرایی بالغ انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلولهای بنیادی مزانشیمی از آندومتر رحم موش‌های صحرایی استخراج گردید و پس از کشت و تأیید مزانشیمی بودن سلول‌ها با روش فلوسایتومتری و براساس بیان مارکرهای CD34 و CD90و بیان نشدن مارکر CD105، در پاساژ سوم کشت سلولی، تأثیر کانابیس در غلظت‌های ۱۰۰۰ ng/ml و ۱۰۰ در طول مدت ۱ الی ۸ روز بر میزان رشد این سلول‌ها توسط فرمول $PDT= T\times\frac{ln2}{\ln\frac{Xe}{Xb}}$ محاسبه گردید و نتایج با استفاده از آزمون‌های ANOVA و توکی آنالیز شدند.

یافته‌ها: سلول‌های جدا شده از آندومتر، ۲۴ ساعت پس از انتقال، کاملاً به کف فلاسک کشت سلولی چسبیدند. مزانشیمی بودن این سلول‌ها با بیان مارکرهای سطحی CD90، CD105 و بیان نشدن مارکر CD34 تأیید گردید. نتایج شمارش سلولی نیز حاکی از رشد سلول‌های تیمار شده با کانابیس تا روز سوم تیمار مشابه با گروه کنترل بود و از روز چهارم درگروه تیمار با دوز ۱۰۰ng/mlکانابیس افزایش معناداری در سطح $p<۰/۰۵$ و در گروه تیمار با دوز ۱۰۰۰ng/ml در روز سوم نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار و از روز چهارم افزایش معناداری در سطح $p<۰/۰۱$ مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد سلول‌های جدا شده از آندومتر، از نوع بنیادی مزانشیمی بودند و عصاره کانابیس احتمالاً از طریق گیرنده‌های کانابینوئیدی باعث تحریک رشد این سلول‌ها می‌گردد.

مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های توانمندی هستند که توانایی زیادی در تولید سلول‌های شبیه خود یا متفاوت‌تر از خود را دارند (۱). عملکرد سلول‌های بنیادی، بازیابی و ترمیم بافت‌های بدن در دوران زندگی می‌باشد و نقش ویژه آنها در سلول‌درمانی است. از سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی، برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده استفاده می‌شود (۲). توان تمایزی این سلول‌ها بستگی به منبع ایجاد آنها دارد و با یکدیگر متفاوت است (۳). سلول‌های بنیادی به سه دسته جنینی، پرتوان القایی و بالغ تقسیم می‌شوند. سلول‌های بنیادی جنینی، قادرند به سلول‌های هر سه لایه ژرمینال متمایز گردند (۴). تاکنون موفق به جداسازی سلول‌های

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

بنیادی مزانشیمی از اندومتر گوسفند و گاو شده‌اند (۵). شاهدانه با نام علمی Cannabis sativa ، گیاهی یک‌ساله، علفی، گل‌دار و از خانواده کلنلباسه می‌باشدکه دارای بیش از ۱۰۴ نوع ترکیب کانابینوئیدی است (۶).حشیش صمغ متراکم شده از سرشاخه‌های گلدار کانابیس است که با داشتن میزان بالای دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول (THC) و خواص روان‌گردانی قوی، تولید می‌شود و اثرات درمانی فراوانی نیز دارد (۷). حشیش ماده مخدری است که به‌صورت گسترده در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸).کانابیس دارای خواص ضدتومور و ضدتهوع است و بر ویژگی‌های رفتاری، حساسیت حرارتی، تنظیم خلق، اشتها و فعالیت جنسی تأثیر دارد و با داشتن کانابینوئیدها، به‌ویژه THC دارای خواص تقویت‌کننده و اعتیادآور نیز می‌باشد (۹). کانابینوئیدها هر دو نوع رسپتورهای کانابینوئیدی، CB1 وCB2 که به‌طور عمده در سیستم عصبی مرکزی، سلول‌های ایمنی و بافت‌های تولیدمثلی وجود دارند را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تکثیر، یا توقف رشد در سلول‌های مختلف، از جمله، لنفوسیت‌ها، سلول‌های عصبی و غیرعصبی مشتق شده از سلول‌های بنیادی را القا می‌کنند (۱۰). THC از طریق تجزیه DNA و از دست رفتن تقارن غشای پلاسمایی باعث القای آپوپتوز می‌شود (۱۱). TCH تأثیر منفی بر بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمال دارد در حالی که این سلول‌ها یکی از مهم‌ترین سلول‌ها در استراتژی‌های مهندسی بافت به‌شمار می‌روند (۱۲). اندومتریوم، بافتی منحصربه‌فرد و منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که این سلول‌ها قادر به خودتجدیدی گسترده و دارای پتانسیل تمایز به غضروف، استخوان، چربی، نورون و الیگودندروسیت می‌باشند (۱۳). از طرف دیگر در شرایط فیزیولوژیکی، سیستم کانابینوئیدی از طریق فعال‌سازی مسیر ERK1/(Extracellular signal ۲ regulated kinase)، phosphoinositide 3 -kinase (PI 3-k)و Akt (protein kinase B) نقش مهمی در تنظیم مهاجرت سلول‌های آندومتر دارد (۱۴). سلول‌های بنیادی جداسازی شده از اندومتر، جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها دارند و سلول‌های بنیادی جداسازی شده دارای سطوح بالایی از بیان مارکرهای سطحی ویژه سلول‌های بنیادی، خصوصاً با منشأ مزودرم می‌باشند (۱۵). سلول‌های بنیادی آندومتر که شامل سلول‌های بنیادی خون‌ساز، مزانشیمی و پیش‌ساز اندوتلیال هستند ممکن است مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی یا مغز استخوان باشند (۱۶). از آنجا که ناباروری یکی از معضلات انسان‌ها در دنیا می‌باشد و با توجه به آنکه استفاده از کلنابیس به‌ویژه در بین جولنان که در سنین باروری قرار دارند رو به افزایش است و با عنایت به مطالعات، مصرف حشیش می‌تواند در افراد باعث تغییر در عملکرد سلول‌های بنیادی گردد، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر حشیش بر رشد سلول‌های بنیادی مشتق از اندومتر رحم موش‌های صحرایی بالغ انجام گردید.

۲. مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر با هدف بررسی چگونگی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت آندومتر رحم موش‌های صحرایی بالغ تحت تأثیر عصاره گیاه کانابیس و با رعایت مقررات و اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و پروتکل آن در کمیته اخلاق دانشگاه تحت شماره IR.Miau.1396.806 به تصویب رسید. حیوانات در شرایط استاندارد و با درجه حرارت محیطی ۲۰-۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند. در این بررسی برای تهیه عصاره هیدروالکلی این گیاه، از روش پرکولاسیون استفاده گردید. بدین منظور به میزان کافی سرشاخه‌های گلدار کلنابیس با هماهنگی مرکز مبارزه با مواد مخدر دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و به دور از نور خشک گردید. سپس عصاره موجود در سرشاخه‌های گلدار خشک شده گیاه کانابیس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد تولید شده توسط شرکت مرک آلمان به‌عنوان حلال استخراج گردید. سپس به‌منظور حذف کامل حلال از عصاره، محلول در دستگاه روتاری ساخت شرکت ایکار، کشور آلمان در دمای ۴۵ درجه و گردش ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. آن‌گاه عصاره با استفاده از پمپ خلأ کاملاً تغلیظ گردید (۱۷). در مطالعه حاضر برای جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت رحم موش‌های صحرایی بالغ، پس از بی‌هوش کردن موش‌ها، بافت آندومتر رحم حیوانات جدا و در محلول بافر هنکس[1] قرار داده شد و سپس با بافر Hanks حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین (دو درصد) شستشو داده شد و آن‌گاه نمونه‌ها در محلول کلاژناز نوع I با غلظت 1 mg/ml به مدت 1 ساعت در دمای ۳۷ درجه برای هضم بافتی قرار داده شدند. برای حذف قطعات بافتی هضم نشده و ناخالصی‌های موجود فیلتراسیون، توسط فیلترهای 0.7 µm و 0.4 µmانجام شد. سپس برای حذف سلول‌های خونی از نمونه‌ها از فایکول استفاده گردید. سلول‌های جدا شده به محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد سرم و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین انتقال داده شدند. بعد از اینکه سلول‌ها، سطح

1 Hanks

ظرف کشت را به‌صورت یک لایه کامل پوشش دادند، پس از یک هفته، محیط کشت، خارج و سلول‌ها با ۱ میلی‌لیتر Phosphate buffered saline (PBS) شستشو شدند. سپس دوباره ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل به فلاسک افزوده و به انکوباتور بازگردانده شدند. این مرحله به‌عنوان پاساژ صفر سلول‌ها در نظر گرفته شد و در مدت هر سه روز یک بار حدود ۷۰ درصد از محیط کشت، خارج و با محیط جدید جایگزین گردید. پس از حدود ۱۴ روز که بیش از ۷۵ درصد کف پلیت از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پر شد و سلول‌ها به حداکثر میزان رشد خود رسیدند، سلول‌ها آماده پاساژ سلولی شدند. سپس سلول‌های زنده که به کف فلاسک چسبیده‌اند، با بافر فسفات سالین شستشو شدند و آن‌گاه برای جدا کردن این سلول‌ها از کف ظرف از ترکیب دو ماده تریپسین و Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) استفاده گردید و پس از افزودن تریپسین/EDTA، فلاسک‌ها به مدت ۲ الی ۵ دقیقه داخل انکوباتور قرار گرفتند و با استفاده از چند ضربه ملایم، سلول‌هایی که هنوز چسبیده بودند نیز جدا گردیدند و با استفاده از بافر فسفات‌سالین، علاوه بر رقیق کردن تریپسین، سلول‌های جدا شده به داخل یک فالکون انتقال داده شدند و پس از سانتریفیوژ کردن با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه، رسوب سلولی ته فالکون تشکیل گردید. سپس مایع رویی که شامل بافر فسفات‌سالین و تریپسین است خارج گردید. در این مرحله با افزودن مقدار کمی محیط کشت روی سلول‌ها و پیپتاژ کردن آنها، سلول‌ها در محیط کشت پخش گردیدند. سپس سلول‌ها وارد یک فلاسک بزرگ‌تر شدند و در مقدار بیشتری محیط مناسب، کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و co2 5 درصد نگهداری شدند و تا سومین پاساژ مراحل به همین ترتیب ادامه یافت. پس از سومین پاساژ، سلول‌ها از نظر ویژگی‌های مورفولوژی و مارکرهای سطح سلولی بررسی شدند (۱۸). در این بررسی به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم، از روش فلوسیتومتری برای مارکرهای مزانشیمی CD90 و CD105 به‌عنوان مارکر سلول‌های اندوتلیالی و CD34 مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک استفاده شد. در این مطالعه، سلول‌های حاصل از پاساژ چهارم، پس از تریپسینه و سانتریفیوژ کردن در اپندورف ریخته و با PBS شسته شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس به نمونه‌ها آنتی‌بادی‌های اولیه CD105 و CD90 کونژوگه با (PE فیکواریترین) و CD34 کونژوگه با (FITC فلورسنس ایزوتیوسیانات) اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند. در مرحله بعد، سلول‌ها پس از شستشو با PBSبه مدت ۱۰ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند.

سپس به سلول‌ها بافر فیکس‌کننده فرمالین ۱ درصد اضافه شد و با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز شدند. در این بررسی برای سنجش میزان سمیت عصاره هیدروالکلی کلنابیس و تعیین دوز قابل استفاده از روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide استفاده شد. بدین ترتیب که حدود ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکه (Invitrogen-USA) حاوی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی دور ریخته شد و به محیط کشت جدید غلظت‌های مختلف عصاره کلنابیس از ۲۰ng/ml، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ..... تا ۶۰۰۰ng/ml اضافه گردید و به مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور (دمای ۳۷°C و ۵٪CO2) قرار داده شد. سپس محیط کشت سلول‌ها با ۲۰µl محلول تازه MTT با غلظت 5mg/ml تعویض شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C محلول رویی سلول‌ها تخلیه و به هر چاهک ۲۰۰ml میلی‌لیتر محلول دی‌متیل سولفوکسید DMSO (Sigma-Aldrich-Germany) اضافه گردید تا کریستال‌های فورمازون تشکیل شده در اثر واکنش با MTT از بین برود. در نهایت جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر (polarstar omega-BMG LABTECH-Germany) در طول موج ۵۷۰nm محاسبه گردید. و براساس نتایج حاصل از آزمون MTT و مقایسه درصد بقای سلولی، در مطالعه حاضر، دوزهای ۱۰۰ng/ml و ۱۰۰۰ برای تیمار سلول‌ها به‌کار گرفته شد و به‌منظور پایش سرعت رشد سلولی ۶ پلیت ۲۴ حفره‌ای حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی رحم، دو پلیت به‌ازای هر سه گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۱۰۰ ng/ml و ng/ml ۱۰۰۰ عصاره کانابیس در پاساژ چهارم تهیه گردید (هر حفره ۱۰۰۰۰ سلول در یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل) (۱۹). هر ۶ پلیت در انکوباتور قرار داده شدند. از روز بعد، سه حفره از هر پلیت در نظر گرفته شد، محیط کشت آنها خارج گردید، سلول‌ها با PBS شسته و با Trypsin/EDTA از کف فلاسک کشت جدا شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را دور ریخته و به رسوب سلولی حاصله، حدود یک میلی محیط کشت کامل افزوده گردید و با پیپت کردن سلول‌ها کاملاً معلق شدند. سپس ۷ میکرولیتر از این مخلوط سلولی با ۷ میکرولیتر رنگ تریپان بلو مخلوط گردید و این مخلوط بین لامل و لام نئوبار قرار داده شد. تعداد سلول‌های موجود در چهار مربع اطراف، شمارش و طبق فرمول زیر تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید:

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

شمارش سلول‌ها به‌ترتیب فوق تا هشت روز متوالی تکرار شد. برای ارزیابی روند رشد سلولی در آزمایشگاه، زمان موردنیاز برای دوبرابر شدن جمعیت سلول‌ها نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و سپس منحنی رشد سلولی در گروه‌های تجربی و کنترل با هم مقایسه گردید (۱۹).

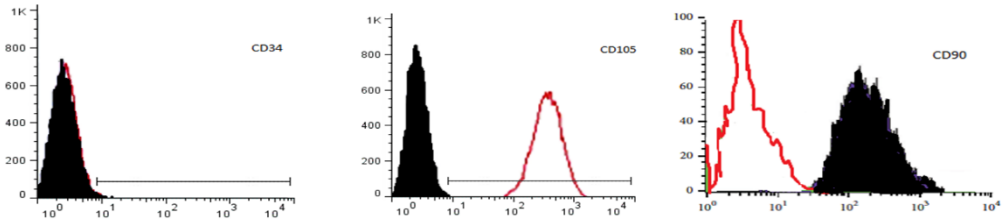
$$PDT = T \times \frac{ln2}{\ln\frac{Xe}{Xb}}$$

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

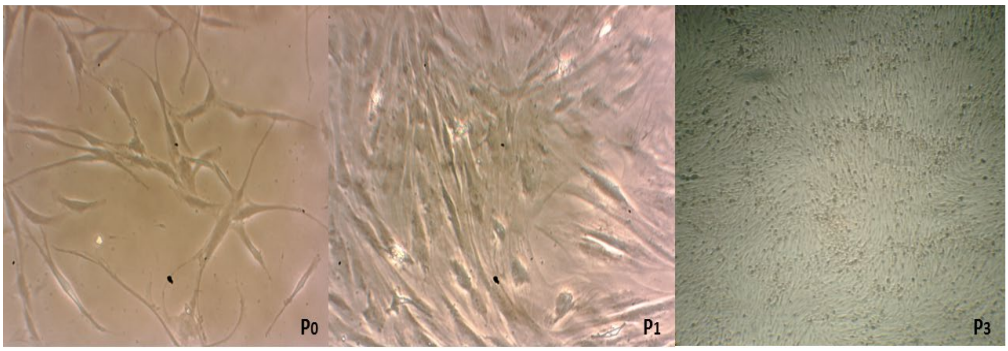
در این بررسی برای تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۵۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو (۰/۴ درصد) مخلوط می‌کنیم، بعد از ۵ دقیقه، مقدار ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط را برمی‌داریم و با استفاده از لام نئوبار در خانه‌های مربوط به شمارش گلبول‌های سفید، سلول‌های زنده شمارش شدند و در پایان، نتایج با کمک نرم‌افزار SPSS-20 و با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و توکی تجزیه‌وتحلیل شدند و اختلاف داده‌ها در سطح P< ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

۳. یافته‌ها

نتایج حاصل از مشاهدات فلوسایتومتری در این بررسی نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت اندومتر رحم دارای خاصیت چسبندگی به کف ظرف کشت سلولی می‌باشند و با توجه به اینکه از پاساژ چهارم به بعد نیز قادر به بیان بالای مارکرهای سطحی غیرهماتوپویتیک CD105 و CD90 می‌باشند و هم‌چنین توانایی بیان مارکر سطحی خون‌ساز CD34 را نیز نداشتند که بیانگر مزانشیمی بودن سلول‌های مشتق شده از بافت آندومتر رحم می‌باشد (اشکال ۱ و ۲)

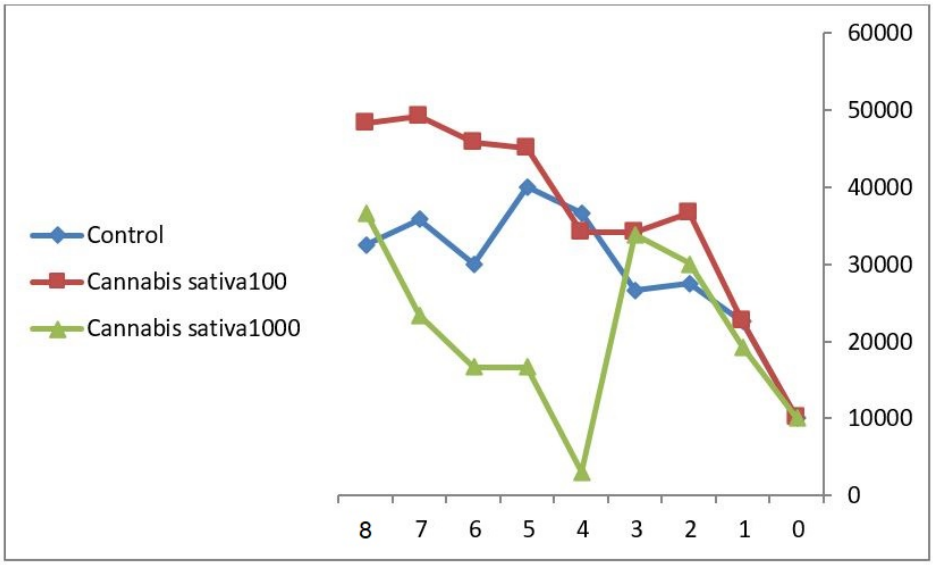


شکل ۱. نشان‌دهنده بیان مارکرهای سطحی غیرهماتوپویتیک (CD105وCD90) و بیان نشدن مارکر هماتوپویتیک (CD34) می‌باشد که این نشان‌دهنده مزانشیمی بودن سلول‌ها است.



شکل ۲. اشکال نشان‌دهنده دوکی‌شکل شدن سلول‌ها در پاساژهای صفر، ۱ و ۳ و ویژگی مزانشیمی بودن آنها است بزرگ‌نمایی ۱۰۰

نمودار منحنی رشد سلولی و آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده در این بررسی نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت آندومتر رحم، در اثر تیمار با دوز ۱۰۰ ng/ml عصاره کانابیس، از روز صفر تا روز سوم، همانند سلول‌های گروه کنترل رشد تصاعدی دارد و از روز چهارم به بعد رشد سلول‌های تحت تیمار با عصاره کانابیس نسبت به گروه کنترل، افزایش معناداری در سطح P< ۰/۰۵ نشان می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌های این بررسی نشان داد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت آندومتر رحم تحت تیمار با دوز ng/ml ۱۰۰۰ عصاره کانابیس نیز همانند سلول‌های گروه کنترل، تا روز سوم روند رشد افزایشی داشته و وارد فاز تصاعدی گردیده‌اند در حالی که از روز سوم تا روز چهارم، در میزان رشد این سلول‌ها نسبت به سلول‌های گروه کنترل، کاهش معناداری در سطح P< ۰/۰۱ مشاهده گردید و از روز چهارم به بعد روند رشد این سلول‌ها مجدداً افزایش معناداری را در سطح P< ۰/۰۱ نشان داد (نمودار ۱).



نمودار ۱. رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت اندومتر رحم در گروه کنترل (فاقد تیمار) و گروه‌های تحت تیمار با عصاره کانابیس نشان‌دهنده اثر تحریکی عصاره کانابیس با دوز ۱۰۰ ng/ml بر رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اندومتر رحم و همچنین اثر مهاری عصاره کانابیس با دوز ۱۰۰۰ ng/ml در روز سوم تیمار و اثر تحریکی آن بر رشد این سلول‌ها از روز چهارم به بعد می‌باشد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت اندومتر رحم، علاوه بر خاصیت چسبندگی آنها به ظرف کشت از پاساژ چهارم به بعد نیز این سلول‌ها، مارکر CD34 را بیان نکردند اما مارکرهای CD105 و CD90 را به میزان بالایی بیان کردند که موید مزانشیمی بودن آنها است، همچنین نشان داده شد که عصاره کانابیس باعث افزایش روند رشد این سلول‌ها می‌گردد. سلول‌های بنیادی جداسازی شده از بافت آندومتر رحم، جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها دارد و دارای میزان بالایی از بیان مارکرهای سطحی ویژه سلول‌های بنیادی می‌باشند و آنالیزهای فلوسایتومتری نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی اندومتریال برای CD105, CD90و CD146 مثبت و برای CD34, CD31 منفی هستند (۲۰). ترکیبات کلنابینوئیدی لندوژن و اگزوژن، به شکل وابسته به دوز، توانایی کنترل سلول‌ها را در بالغین دارند؛ بدین صورت که القای کوتاه‌مدت کلنابینوئیدها تأثیری بر تکثیر سلولی و نورون‌زایی در هیپوکامپ ندارد، در حالی‌که القای درازمدت کلنابینوئیدهای اگزوژن این مراحل رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۱). کانابینوئیدها با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث تقویت اثرات محافظتی شیمیایی در بدن موجودات زنده می‌شوند (۲۲). CBD که یک ترکیب کانابینوئیدی غیرروان‌گردان است، دارای اثرات ضدتوموری و درمانی بر سلول‌های نوروبلاستومای انسانی است (۲۳). THC از طریق فعال‌سازی گیرنده CB2 باعث افزایش تعدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی در التهابات توأم با رهاسازی سیتوکنین‌ها از میکروگلیاهای لیپوپلی‌ساکاریدی تحریک شده می‌شود، به علاوه پیش‌تیمار با THC باعث افزایش اثرات ایمونومدولاتوری سلول‌های بنیادی

مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بر هیپرگلیسمی حرارتی و مدل‌های جراحتی انقباض مزمن می‌شود. به این ترتیب که باعث کاهش رهاسازی سیتوکنین‌های پیش‌التهابی می‌گردد (۲۴). با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضدمارکرهای هماتوپوئیتیک ازجمله CD45، CD14، CD56 ، CD34 و CD38 نشان داده شد که سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت آندومتر رحم، مارکرهای یاد شده را بیان نمی‌کنند در حالی که مارکرهای مزانشیمی CD90، CD73 ، CD105 و CD29 را بیان می‌کنند (۲۵). حشیش بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های چربی در موش‌های صحرایی، تأثیر مثبت دارد (۲۶). سلول‌های مزانشیمی چربی انسان در حضور عصاره هیدروالکلی گیاه کانابیس، قابلیت تمایز استئوبلاستی خود را حفظ می‌کنند (۱۷). در موش‌های ترانس ژنیک فاقد گیرنده‌های CB1، فقدان این گیرنده‌ها در سلول‌های بنیادی منجر به کاهش تکثیر سلول‌های بنیادی و کاهش تعداد سلول‌های جدید می‌شود (۲۷). بنابراین در مطالعه حاضر احتمالاً عصاره کلنابیس از طریق اتصال به گیرنده‌های CB1 باعث رشد سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت آندومتر شده است. کانابینوئیدها، به‌عنوان یکی از اجزای فعال حشیش از طریق گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 و تحریک آنزیم‌های متابولیک باعث تنظیم تکثیر سلولی، تمایز و بقای سلول‌ها می‌شود (۲۸). سیستم‌های اندوکانابینوئیدی از طریق تأثیر بر سازوکارهای خاصی که برای ایجاد و نگهداری اندومتر مهم هستند بر رشد سلولی این بافت مهم تأثیر می‌گذارند (۲۹). مصرف عصاره گیاه کلنابیس از طریق قطعه‌قطعه کردن DNA و همچنین ایجاد رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون چربی، منجر به مرگ سلولی می‌گردد (۳۰). بسته به دوز مصرفی کانابیس و همچنین نوع سلول‌های موردمطالعه و تراکم گیرنده‌های کلنابینوئیدی در آنها، این ماده باعث افزایش یا کاهش رشد سلولی می‌شود (۳۱)؛ بنابراین در بررسی حاضر نیز علت اثر افزایش رشد سلولی را می‌توان به دوز مصرفی دارو و نوع سلول‌های موردمطالعه نسبت داد. گیرنده‌های کانابینوئیدی در همان ابتدای رشد و نمو بیان می‌شوند و برای بقا و رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی، عاملی مهم به‌حساب می‌آیند (۳۲). از آنجا که فعال‌سازی مسیرهای ERK1/۲ ، PI 3-k و Akt در مهار روند آپوپتوزیس و تحریک رشد سلولی نقش دارند و سیستم‌های کانابینوئیدی نیز باعث تحریک این مسیرهای سیگنالینگ سلولی می‌شوند (۱۴)؛ بنابراین در پژوهش حاضر، عصاره کانابیس نیز احتمالاً از طریق اتصال به گیرنده‌های کانابینوئیدی و فعال‌سازی این مسیرها باعث افزایش رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی آندومتر رحم موش‌های صحرایی شده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که حشیش با داشتن ترکیبات کانابینوئیدی و احتمالاً از طریق اتصال به گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 باعث رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت آندومتر می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مساعدت‌های حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز که در اجرای این پروژه همکاری داشتند، سپاسگزاری به‌عمل می‌آورند .

References

[1]. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M. Stem cells: past, present, and future. Stem Cell Res Ther.2019; 10(68):1165-85. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5.
[2]. Thaller SR, Elliot S2, Arroyo EJ.Stem Cells: Importance of Elucidating a Stem Cell Laboratory. J Craniofac Surg. 2020 Jan/Feb;31(1):4-5.
[3]. Kazemi S, Parivar K. Hayati Rudbari N , Yaghmaei P , Sadeghi B. Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue and Decidua.Journal of Animal physiology and Development.2020;13(3):41-56.
[4]. Benmelouka AY, Munir M, Sayed A, Attia MS, Ali MM, Negida A, et al. Neural Stem Cell-Based Therapies and Glioblastoma Management: Current Evidence and Clinical Challenges. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(5): 2258.
[5]. Lara E, Rivera NJ, Cabezas J, Navarrete F, Saravia F. Endometrial Stem Cells in Farm Animals: Potential Role in Uterine Physiology and Pathology. Bioengineering 2018; 5(3): 75.
[6]. Asadi S, Moghadam H, Naghdi Badi H, Naghavi M, Salami S. A Review on Agronomic, Phytochemical and Pharmacological Aspects of Cannabis (Cannabis sativa L.). J. Med. Plants. 2019; 18 (70) :1-20
[7]. Desrosiers NA, Ramaekers JG, Chauchard E,Gorelick DA. Smoked cannabis' psychomotor andneurocognitive effects in occasional and frequent smokers. J Anal Toxicol.2015; 39(4): 251-61.
[8]. Rodrigues R S, Lourenço D M , Paulo S L, Mateus J M, Ferreira M F, Mouro F . "Cannabinoid Actions on Neural Stem Cells: Implications for Pathophysiology." Molecules (Basel, Switzerland)2019; 24(7): 1350.
[9]. Papaseit E, Pérez-Mañá C, Pérez-Acevedo AP, Hladun O, Torres-Moreno M. Cannabinoids: from pot to lab. Int J Med Sci. 2018; 15(12): 1286–95.
[10].Fonseca BM, Correia-da-Silva G. "Cannabinoid-induced cell death in endometrial cancer cells: involvement of TRPV1 receptors in apoptosis." Journal of physiology and biochemistry.2018; 74(2): 261-72.
[11]. Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. Front Mol Neurosci. 2018; 11: 487.
[12].Amalinei C, Pavaleanu I, Grigoras A, ICaruntu ID, Giusca SE. The endometrial regeneration frontiers: from mechanisms to applications in regenerative medicine. Rom J Morphol Embryol 2018; 59(2): 407-25.
[13]. Cohen K, Weizman A, Weinstein A. Positive and negative

effects of cannabis and cannabinoids on health. Clinical Pharmacology & Therapeutics.2019; 105(5): 1139-47.
[14]. Mohseni kouchesfahani H, Ebrahimi Barough S, Ai J, Anbar H. Endometrial stem cells differentiation into neural cells by LY294002 small molecule. Koomesh. 2016; 18 (1) :62-70
[15]. Nielsen S, Gowing L, Sabioni P. Pharmacotherapies for cannabis dependence. Cochrane Database Syst Rev. 2019 Jan 28;1:CD008940.
[16]. Heydari-keshel S, Rezaei Taviranii M, Ai J, Soleimani M, Ghanbari Z, Baradaran-Rafii A. Isolation and characterization of endometrial mesenchymal stem cells and the evaluation of surface markers in comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2015; 11 (4) :295-305.
[17]. 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 GorganUniv Med Sci.2019;21(2):50-58.
[18]. Jamshidi M, Hosseini SE, Mehrabani D, Amini M. Effect of hydroalcoholic extract of Cannabis (Cannabis sativa L.) on morphology and the process of human adipose-drived mesenchymal stem cell growth. Electron J Gen Med. 2018; 15(3): em31.
[19]. Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, Shelton RM. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. Cryobiology. 2014;69(2):342-47.
[20]. Goudarzi Z, Hoseini SE, Mehrabani D, Hashemi SS, Amin Derakhshanfar, Feridoun Karimi-Busheri5. Effect of methamphetamine on uterine tissue, anxiety and apoptotic genes in female Wistar rats. Online Journal of Veterinary Research.2020; 24(9): 526-536
[21]. Kouchesfahani H M, Ebrahimi-Barough S, Ai J. Differentiation of endometrial stem cells into motor neurons by the use of purmorphamin small molecule. Tehran Univ Med J. 2017; 74 (12) :861-68.
[22]. Dariš B, Verboten MT, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation. Bosn J Basic Med Sci. 2019 Feb; 19(1): 14–23. doi: 10.17305/bjbms.2018.3532
[23]. Fisher T, Golan H, Schiby G, PriChen S, Smoum R. In vitro and in vivo efficacy of non-psychoactive cannabidiol in neuroblastoma. Curr Oncol. 2016;23(2):S15-22.
[24]. Aviello G, Romano B, Borrelli F, Capasso R, Gallo L. Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. J Mol Med (Berl). 2012;90(8):925-34.
[25]. Junran X, Dongju X, Yun X, Jinning Z, Li J, Xuming H. Up-regulation of immunomodulatory effects of mouse bone-marrow derived mesenchymal stem cells by tetrahydrocannabinol pre-treatment involving cannabinoid receptor CB2. Oncotarget. 2016; 7(6): 6436–47.
[26]. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA.Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. Hum Reprod Update. 2016;22(2):137-63.
[27]. Sazmand M, Mehrbani D, Hosseini E, Amini M. Analyzing the Effects of Adipogenic Potential in Hydro-Alcoholic Extract of Marijuana on Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells of Adult Male Rats. Horizon Med Sci. 2018; 24 (4) :270-76.
[28]. Zimmermann T, Maroso M, Beer A, Baddenhausen S, Ludewig S, Fan W,et al. Neural stem cell lineage-specific cannabinoid type-1 receptor regulates neurogenesis and plasticity in the adult mouse hippocampus. Cereb Cortex. 2018;28(12):4454-71.
[29]. Galve-Roperh I, Chiurchiù V, Díaz-Alonso J, Bari M, Guzmán M, Maccarrone M. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. Prog Lipid Res. 2013;52(4):633-50.
[30]. Sanchez A M, Vigano P, Mugione A, Panina- P, Candiani M. The molecular connections between the cannabinoid system and endometriosis. Molecular Human Reproduction.2012; 18(12): 563-571.
[31]. Parsa F, Hosseini E, Mehrabani D, Hashemi S. The Effect of Cannabis Extract on SH-SY5Y Nerve Cell. J Ardabil Univ Med Sci. 2021; 20 (2) :232-241
[32]. Prenderville JA, Kelly ÁM, Downer EJ. The role of cannabinoids in adult neurogenesis. Br J Pharmacol. 2015; 172(16): 3950-63.