

Original Paper

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

Mehregan Jamshidi (M.Sc), Ph.D Candidate in Physiology, Department of Biology, College of Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran. Ph.D Candidate in Physiology, Department of Biology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. jamshidi_mehregan@yahoo.com ORCID ID: 0000-0002-0107-4824

***Seyed Ebrahim Hosseini (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Associate Professor, Department of Biology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. ebrahim.hossini@yahoo.com ORCID ID: 0000-0003-0548-0114

Davood Mehrabani (Ph.D), Assistant Professor, Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5738-1719

Masoud Amini (M.D), Assistant Professor, Laparoscopy Research Center, Department of Surgery, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5553-6994

Abstract

Background and Objective: The resin secretions of *Cannabis sativa* are called Hashish, which has medicinal and psychological properties. The most important psychoactive compound of this plant is THC (Delta-9-Tetrahydrocannabinol), which can stimulate cannabinoid receptors in the body. This study was carried out to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of *Cannabis sativa* on cell survival and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells.

Methods: In this experimental study, mesenchymal stem cells derived from fat tissue of human abdominal were treated with 100 ng/ml concentration of hydroalcoholic extract of *Cannabis sativa*. Flow cytometry and RT-PCR techniques were used for detection of cells. The cytotoxic effect of *Cannabis sativa* extract and osteoblastic differentiation of cells were investigated using MTT method and Alizarin-Red staining, respectively. The karyotype analysis was performed with the preparation of extended metaphase chromosomes.

Results: The identity of the fat mesenchymal stem cells was confirmed by the expression of non-hematopoietic mesenchymal markers (CD90, CD44 and CD73) and the lack of expression of the hematopoietic marker (CD34 and CD45). The Alizarin-Red showed that the treatment with *Cannabis sativa* has no effect on the osteoblastic differentiation of human fat mesenchymal stem cells, and the treated cells were differentiated into bone cells same as control group. Also, *Cannabis sativa* extract has no effect on the structure, morphological status and number of chromosomes of these cells.

Conclusion: This study showed that human fat mesenchymal cells in the presence of a hydroalcoholic extract of *Cannabis sativa* maintain the ability of osteoblastic differentiation. Also, this extract has no effect on the chromosomal karyotype of the cells.

Keywords: *Cannabis sativa*, Fat mesenchymal cells, Osteoblast, Karyotype

Received 13 Feb 2018

Revised 9 Apr 2018

Accepted 25 Apr 2018

Cite this article as: Mehregan Jamshidi, Seyed Ebrahim Hosseini, Davood Mehrabani, Masoud Amini. [Effect of hydroalcoholic extract of *Cannabis sativa* on cell survival and differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue to osteoblast-like cells]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Summer; 21(2): 50-58. [Article in Persian]

اثر عصاره هیدروالکلی گیاه کانابیس بر بقاء سلولی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان به سلول‌های شبه استئوبلاستی

مهرگان جمشیدی، دانشجوی دکتری فیزیولوژی، گروه آموزشی زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. jamshidi_mehregan@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0002-0107-4824
دکتر سیدابراهیم حسینی، گروه آموزشی زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
ORCID ID: 0000-0003-0548-0114
دکتر داود مهربانی، استادیار، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
ORCID ID: 0000-0002-5738-1719
دکتر مسعود امینی، استادیار، مرکز تحقیقات لاپاراسکوپی، بخش جراحی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
ORCID ID: 0000-0001-5553-6994

چکیده

زمینه و هدف: ترشحات رزینی گیاه کانابیس، حشیش نام دارد و دارای خواص دارویی و روانگردانی فراوان است. مهم‌ترین ترکیب روانگردان این گیاه *THC* (دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول) است که قادر به تحریک گیرنده‌های کانابینوئیدی در بدن است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره هیدروالکلی گیاه کانابیس بر بقاء سلولی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان به سلول‌های شبه استئوبلاستی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از بافت چربی ناحیه شکمی انسان با غلظت 10 ng/ml از عصاره هیدروالکلی گیاه کانابیس تیمار شدند. تایید هویت سلول‌ها با استفاده از تکنیک‌های فلوسایتومتری و *RT-PCR* انجام شد. اثر سیتوتوکسیک عصاره کانابیس به روش *MTT* و قابلیت تمایز استئوبلاستی سلول‌ها با کمک رنگ‌آمیزی آلیزارین رد بررسی شد. به کمک تهیه گسترش منافازی کروموزوم سلولی، آنالیز کاریوتیپ انجام گردید.

یافته‌ها: هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی با بیان مارکرهای مزانشیمی غیرهماتوپوئیتیک (*CD90*، *CD44* و *CD73*) و عدم بیان مارکر هماتوپوئیتیک (*CD34* و *CD45*) تایید شد. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد نشان داد که تیمار با کانابیس اثری بر تمایز استئوبلاستی این سلول‌ها ندارد و سلول‌های تیمار شده مانند سلول‌های گروه کنترل به سلول‌های استخوانی تمایز یافتند. همچنین عصاره کانابیس اثری بر ساختار، وضعیت مورفولوژیکی و تعداد کروموزوم‌های این سلول‌ها نداشت.

نتیجه گیری: سلول‌های مزانشیمی چربی انسان در حضور عصاره هیدروالکلی گیاه کانابیس قابلیت تمایز استئوبلاستی خود را حفظ می‌نمایند. همچنین این عصاره اثری بر کاریوتیپ کروموزومی سلول‌ها ندارد.

کلید واژه‌ها: کانابیس، سلول‌های مزانشیمی چربی، استئوبلاست، کاریوتیپ

* نویسنده مسؤول: دکتر سیدابراهیم حسینی، پست الکترونیکی brahim.hossini@yahoo.com

نشانی: شیراز، کیلومتر ۵ جاده شهرک صدرا پردیس دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، تلفن ۴۳۱۱۱۴۸-۰۷۱، شماره ۴۳۱۱۱۷۲

وصول مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۱/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۲/۵

مقدمه

گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 در بدن انسان از نوع متصل به G پروتئین هستند و در اثر اتصال با کانابینوئیدها فعال می‌شوند (۴). نتایج یک بررسی بیانگر آن است که دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول باعث ایجاد علائم مثبت و منفی اسکیزوفرنی، ادراک متغیر، افزایش اضطراب، حالت سرخوشی، اختلال در یادآوری آبی یا تاخیری کلمات، مشکلات شناختی، حواس پرتی و اختلال در حافظه فرد می‌شود. این ماده همچنین باعث افزایش سطح کورتیزول در پلاسمای خون افراد مصرف کننده می‌شود (۵). کانابینوئیدهای اندوژن و آگزوژن قادرند که به شکل وابسته به دوز تکثیر سلول را در بالغین کنترل کنند. به این ترتیب که القاء

کانابیس (*Cannabis sativa*)، گیاهی یک ساله، دوپایه، علفی، گل‌دار و از خانواده کاناباسه است (۱). در این گیاه بیش از ۷۰۰ ترکیب شیمیایی طبیعی شناسایی شده است که ۱۰۴ ترکیب آن کانابینوئیدی و بقیه غیر کانابینوئیدی هستند (۲). حشیش همان صمغ متراکم شده و استخراج شده از برگ و گل‌های ماده خشک شده گیاه کانابیس است که به دلیل داشتن میزان بالای دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول (مهم‌ترین کانابینوئید روانگردان کانابیس) تولید و روانه بازار می‌شود که دارای اثرات روانگردانی و درمانی فراوانی است (۳).

مارکرهای استخوانی در سلول‌های مزانشیمی چربی نشان‌دهنده تمایز زیاد این سلول‌ها به سلول‌های استخوانی است (۱۵). همچنین در مطالعه‌ای نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مغز استخوان در شرایط یکسان و در پاساژهای سلولی ۵، ۱۰ و ۱۵ به ترتیب در محیط کشت تمایز به استخوان و تمایز به چربی به سلول‌های استخوان و چربی تمایز می‌یابند که درصد سلول‌های مثبت در رنگ آمیزی آلزارین‌رد در پاساژ ۱۵ برای سلول‌های مزانشیمی استخوانی بیشتر از سلول‌های مزانشیمی چربی است (۱۶). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در محیط تمایز به چربی به کمک رنگ آمیزی اوایل‌رد، قطرات چربی را به نمایش گذاشته که نشان‌دهنده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده به سلول‌های آدیپوسیتی است و در رنگ آمیزی آلزارین‌رد، وجود رسوبات کلسیم مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده تمایز سلول‌های جداسازی شده به سلول‌های استئوسیتی است (۱۷). در یک بررسی با قرار دادن سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی موش‌های صحرایی جدا شده در محیط کشت تمایز به استخوان، نشان داده شد که سلول‌ها قادرند به سلول‌های استئوبلاستی تمایز یابند (۱۳). گیاه کانایس برای درمان آلرژی و اثرات ضدالتهابی و بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده می‌شود (۱۸). ترکیبات این گیاه دارای خاصیت ضدالتهابی و آپوپتوتیک هستند و باعث کاهش روند رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شوند (۱۹ و ۲۰). همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم و بازسازی اندام‌ها، پزشکی پیوند و مهندسی بافت نقش اساسی دارند (۲۰). مطالعات مختلفی نقش موثر متابولیت‌های گیاهی را در مسیرهای تمایزی سلول‌های مزانشیمی مورد بررسی قرار داده‌اند (۲۱)؛ اما نقش ترکیبات عصاره کانایس بر روند تمایزی سلول‌های بنیادی در انسان بررسی نشده است. لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره هیدروالکلی گیاه کانایس بر بقاء سلولی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان به سلول‌های شبه‌استئوبلاستی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز طی سال ۱۳۹۶ انجام شد و مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز (IR.MIAU.REC.1396.806) قرار گرفت.

عصاره‌گیری: به منظور بررسی چگونگی تمایز استئوزنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسان تحت تاثیر گیاه کانایس، عصاره هیدروالکلی این گیاه به روش پرکولاسیون تهیه گردید. برای این منظور برگ گیاه کانایس با هماهنگی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و مرکز مبارزه با مواد مخدر تهیه شد و توسط مرکز بیوسیتما تیک دانشگاه علوم پزشکی شیراز تایید گردید. به مدت دو هفته در محیط تاریک و بدون رطوبت خشک شد. ابتدا

کوتاه مدت کانابینوئیدها اثری بر تکثیر سلولی و نوروژن‌زایی در هیپوکامپ ندارد. در حالی که القاء درازمدت کانابینوئیدهای اگزوزن این تکثیر سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۶). میکروپارتیکل‌های حاوی دلتا-۹-تراهیدروکانابینول باعث افزایش آپوپتوز، کاهش تکثیر سلولی و کاهش رنگ‌زایی تومورها می‌شود (۷). کانابینوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند و اثرات محافظتی شیمیایی در بدن موجود زنده را افزایش می‌دهد (۸). CBD که یک کانابینوئید غیرروانگردان است؛ اثرات ضدتوموری و درمانی بر سلول‌های نوروبلاستوما انسانی دارد (۹). دلتا-۹-تراهیدروکانابینول باعث فعال‌سازی گیرنده CB2 و در نتیجه افزایش تعدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی در التهاب توام با رهاسازی سیتوکین‌ها از میکروگلیاهای لیپوپلی ساکاریدی تحریک شده می‌شود. تیمار با دلتا-۹-تراهیدروکانابینول با کاهش رهاسازی سیتوکین‌های پیش‌التهابی، باعث افزایش اثرات ایمونومدولاتوری در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌شود (۱۰). سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل توانایی تکثیر زیاد به عنوان یک منبع مهم در پزشکی و کاربردهای بالینی به‌شمار می‌روند. این سلول‌ها همچنین قابلیت خودنوزایی و پتانسیل چندتوانی دارند. در نتیجه قادر به ترمیم بافت هستند. سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی همانند سایر سلول‌های مزانشیمی دارای ظاهر دوکی شکل، قابلیت اتصال به کف ظروف پلاستیکی کشت، قدرت تمایز به سایر رده‌های مزانشیمی، بیان نشانگرهای سطحی مشابه با سلول‌های بنیادی مشتق از استخوان هستند (۱۱ و ۱۲). این سلول‌ها نسبت به سایر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مقاوم‌ترند؛ با افزایش سن فرد دچار کاهش تعداد و کاهش قدرت تکثیر نمی‌شوند. با روش غیرتهاجمی مانند لیپوساکشن و ابدومینوپلاستی می‌توان حجم زیادی از بافت چربی تهیه کرد. بنابراین در درمان و مهندسی بافت کاربرد فراوانی دارند (۱۳). نتایج حاصل از یک مطالعه در ارتباط با پتانسیل تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی نشان داد که رسوبات کلسیم و فعالیت آلکالین فسفاتاز در پاساژ ۲ در بیشترین حد خود و در پاساژ ۴ به‌طور کامل از بین می‌رود. بنابراین افزایش شماره پاساژ باعث تخریب روند رشد سلول شده و در نتیجه از پاساژ ۲ به عنوان یک منبع کلینیکی مفید برای استخوان‌سازی حاصل از سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان استفاده می‌شود (۱۴). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، استخوان، پوست افراد بالغ و پوست نوزادان، پس از ۲۱ روز قرار گرفتن در محیط کشت تمایز به استخوان به سلول‌های استخوانی تمایز یافته و در آنها شاخص‌های استخوانی از جمله آلکالین فسفاتاز، استوکلسین و استئوپنتین مشاهده می‌گردد. بیان زیاد

محیط کشت تازه جایگزین گردید و مجدداً درون انکوباتور قرار داده شد. در این مراحل رشد سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. بعد از این که به تراکم حدود ۹۰ درصد رسیدند؛ پاساژ داده شدند تا در پاساژ چهارم مواجهه با عصاره کانابیس انجام شود. به منظور تایید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از تکنیک‌های فلوسایتومتری و RT-PCR استفاده گردید. در تکنیک فلوسایتومتری از آنتی‌بادی‌های Anti-CD90 (۳µl)، Anti-CD34 (۴µl)، Anti-CD44 (۴µl)، Anti-CD73 (۳µl) استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۰۰۰۰ سلول پاساژ چهارم در ۵ میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و یک میلی‌لیتر محلول PBS به آن اضافه گردید. به یکی از نمونه‌ها (کنترل منفی) هیچ آنتی‌بادی اضافه نشد. پس از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و شستشو با PBS، فلوسایتومتری توسط FACS Sort انجام شد.

جداسازی RNA، سنتز cDNA و RT-PCR: به منظور سنجش بیان مارکرهای ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی، مارکرهای CD73، CD45 و کنترل داخلی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در انجام مراحل RT-PCR پس از استخراج RNA از نمونه‌های مختلف سلولی، طبق پروتکل کیت استخراج RNA (یکتاتجهیز آزما) غلظت RNA به دست آمده توسط اسپکتروفتومتر تعیین گردید. ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت فرمتاز انجام شد. cDNA با دیگر مواد واکنش شامل PCR buffer، Taq DNA Polymerase، dNTPmix، H₂O، MgCl₂ و پرایمرهای R و F (برای CD45 و CD73) مخلوط گردید. سپس میکروتیوب در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (دنا توراسیون)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه (اتصال پرایمر)، ۳۰ ثانیه نیز در دمای ۷۲ درجه و نهایتاً ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دنا توراسیون اولیه و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور طولی‌سازی نهایی چرخه تکثیر انجام شد. محصولات PCR برای حضور باندهای مورد نظر به کمک سایبرگرین (DNA safe stain) به روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد برده شد و باندهای تولیدشده تحت تابش فرابنفش (UV) با کمک سیستم ژل‌داکت مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش میزان سمیت عصاره هیدروالکلی با تست MTT: برای سنجش میزان سمیت عصاره هیدروالکلی و تعیین دوز قابل استفاده، از روش MTT استفاده شد. گروه‌بندی زمانی و تعداد مواجهه برای آنالیز تست MTT طبق جدول یک انجام شد. سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهک (Invitrogen-USA) قرار داده شد و پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد حدود ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک حاوی محیط کشت وجود داشت. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی دور ریخته و به محیط کشت جدید غلظت‌های مختلف

۵۰ گرم پودر خشک شده گیاه به مدت ۷۲ ساعت در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد (Merck-Germany) به عنوان حلال، در دستگاه پرکولاتور قرار داده شد. پس از گذشت این زمان با باز کردن شیر پرکولاتور عصاره خارج شد و به طور همزمان محلول اتانول به آن اضافه گردید تا محلول خارج شده از پرکولاتور بیرنگ شود. به منظور حذف کامل حلال، محلول در دستگاه روتاری (IKA- Germany) با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و گردش ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در پایان عصاره با استفاده از پمپ خلا کاملاً تغلیظ گردید. عصاره تهیه شده در ظروف شیشه‌ای ریخته شد و برای انجام مراحل بعدی در یخچال نگهداری گردید. رقیق‌سازی عصاره برای مواجهه سلول‌ها با استفاده از اتانول و آب مقطر صورت پذیرفت.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسان و فلوسایتومتری: نمونه‌های بافت چربی برای انجام این پژوهش از ناحیه شکم یک بیمار مرد ۴۰ ساله با رضایت کامل وی و زیر نظر پزشک جراح تحت عمل ابدومینوپلاستی از بیمارستان مادر و کودک شیراز جمع‌آوری گردید. حدود ۲۰ گرم بافت چربی توسط پزشک جراح در اتاق عمل و تحت شرایط استریل استخراج شد و در فالكون (BD-USA) استریل حاوی سالیین بافری فسفات‌ه و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استریپتومایسین و ضدقارچ آمفوتریسین قرار گرفت. برای جلوگیری از فساد بافتی فالكون محتوی نمونه روی مقادیری یخ قرار گرفت و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز انتقال داده شد. نمونه چربی زیر هود لامینار به قطعات ریز تبدیل شد. برای حذف سلول‌های خونی، چندین بار توسط محلول PBS (USA-Gibco) شستشو داده شد و محلول رویی دور ریخته شد. پس از اضافه کردن حدود ۶ میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز ۰/۲ درصد نوع یک، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد. پس از مرحله تجزیه آنزیمی، فالكون حاوی نمونه از حمام آب گرم خارج گردید. برای مخلوط شدن آنزیم با محیط، پیپتاژ صورت گرفت. سوپ سلولی حاصل با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه و در دمای اتاق و با ۲ تا ۳ بار تکرار سانتریفیوژ شد. روغن و بافت چربی رویی به آرامی حذف گردید. رسوب ته فالكون که حاوی سلول‌های ته‌نشین شده چربی بود؛ به فلاسک ۷۵ (orang-USA) مخصوص کشت سلولی حاوی DMEM و FBS ۱۰ درصد (Biowest-USA) منتقل شد. در نهایت فلاسک داخل انکوباتور (CO₂ Incubator-MEMMERT GERMANY) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حاوی ۵ درصد CO₂ برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک بار تعویض گردید. بدین منظور محلول رویی فلاسک دور ریخته شد و

مدت ۳-۴ ساعت درون انکوباتور (۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂) قرار گرفت. سپس محیط رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. سلول‌ها تریسینه شده، به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۲۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. به سلول‌های کف فلاسک ۶ml محلول هیپوتونیک KCl با غلظت ۰/۵۶ درصد اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه درون انکوباتور (۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂) قرار گرفت. پس از خارج نمودن از حمام آب گرم، یک میلی‌لیتر محلول فیکساتیو سرد شامل متانول و اسیداستیک به نسبت ۳ به ۱ برای فیکس کردن به نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۲ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه و حذف محیط فوقانی، ۳ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو سرد شامل متانول و اسیداستیک به نسبت ۲ به ۱ به آن اضافه گردید. گسترش متافازی کروموزوم سلولی با استفاده از رنگ آمیزی گیمسا و گورلیشن تهیه گردید. از مرحله متافاز کروموزومی عکس‌برداری شد و توسط نرم‌افزار Cytovision مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲: نتایج الیزاریدر بر اساس گروه‌بندی زمانی و تیمار با

| دوزهای مختلف عصاره کانابیس در تست MTT | | | |
|---------------------------------------|---------|--------|-------------|
| گروه ۳ | گروه ۲ | گروه ۱ | دوز (ng/ml) |
| ۰/۷۰۵۰ | ۰/۴۹۴۷ | ۰/۲۲۳۵ | ۲۰ |
| ۰/۶۶۲۰ | ۰/۵۴۷۵ | ۰/۴۹۶۳ | ۳۰ |
| ۰/۶۴۵۳ | ۰/۴۲۴۳ | ۰/۶۱۲۳ | ۴۰ |
| ۰/۶۳۶۱ | ۰/۵۰۹۵ | ۰/۶۷۰۱ | ۵۰ |
| ۰/۶۴۲۵ | ۰/۴۳۱۰ | ۰/۶۳۴۰ | ۶۰ |
| ۰/۵۸۲۰ | ۰/۳۸۷۰ | ۰/۵۷۶۵ | ۷۰ |
| ۰/۶۳۷۳ | ۰/۴۳۰۵ | ۰/۵۷۷۵ | ۸۰ |
| ۰/۶۲۷۰ | ۰/۴۵۵۳ | ۰/۶۱۲۸ | ۹۰ |
| ۰/۶۴۶۰ | ۰/۳۹۴۵ | ۰/۵۷۹۸ | ۱۰۰ |
| ۰/۶۲۵۰ | ۰/۳۴۱۰ | ۰/۵۳۴۰ | ۱۱۰ |
| ۰/۶۲۹۰ | ۰/۴۳۲۳ | ۰/۵۲۶۰ | ۱۲۰ |
| ۰/۴۹۹۳ | ۰/۴۳۶۰ | ۰/۵۶۰۸ | ۱۳۰ |
| ۰/۶۲۵۳ | ۰/۶۲۲۳ | ۰/۲۵۲۵ | ۱۴۰ |
| ۰/۶۶۲۸ | ۰/۴۹۱۸ | ۰/۴۵۸۰ | ۱۵۰ |
| ۰/۶۲۸۰ | ۰/۴۸۴۸ | ۰/۶۰۳۳ | ۲۰۰ |
| ۰/۵۶۰۵ | ۰/۴۳۴۸ | ۰/۶۴۳۵ | ۳۰۰ |
| ۰/۵۷۱۰ | ۰/۵۳۱۵ | ۰/۶۱۷۳ | ۴۰۰ |
| ۰/۵۶۲۰ | ۰/۵۳۹۵ | ۰/۵۹۴۸ | ۵۰۰ |
| ۰/۴۴۱۵ | ۰/۵۳۷۳ | ۰/۵۶۷۳ | ۶۰۰ |
| ۰/۵۹۵۸ | ۰/۴۶۱۰ | ۰/۵۷۱۸ | ۱۰۰۰ |
| ۰/۷۲۵۷ | ۰/۴۹۰۳ | ۰/۶۱۵۵ | ۲۰۰۰ |
| ۰/۶۵۹۰ | ۰/۵۷۵۰ | ۰/۶۱۳۵ | ۴۰۰۰ |
| ۰/۴۵۳۳ | ۰/۵۳۰۸ | ۰/۵۷۳۰ | ۵۰۰۰ |
| ۰/۰۶۷۰ | ۰/۶۶۶۵ | ۰/۵۵۸۷ | ۶۰۰۰ |
| | ۰/۵۸۱۵ | | Control |
| | ۰/۱۹۶۷۵ | | Empty |

یافته‌ها

تست MTT: با توجه به نتایج حاصل از آزمون MTT که در جدول ۲ آمده است؛ سلول‌ها در تیمار با همه دوزها زنده‌مانی را

عصاره کانابیس از ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ تا ۶۰۰۰ ng/ml اضافه گردید و به مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂) قرار داده شد. سپس محیط کشت سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر محلول تازه MTT با غلظت ۵ mg/ml تعویض شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد محلول رویی سلول‌ها تخلیه و به هر چاهک ۲۰۰ml میلی‌لیتر محلول (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 الیزاریدر (polarstar omega-BMG LABTECH-Germany) در طول موج ۵۷۰nm محاسبه گردید.

جدول ۱: گروه‌بندی زمانی و تعداد مواجهه برای آنالیز تست MTT

| گروه‌ها | زمان و تعداد مواجهه |
|---------|---------------------------------|
| ۱ | بررسی یک بار مصرف پس از ۲۴ ساعت |
| ۲ | بررسی یک بار مصرف پس از ۷۲ ساعت |
| ۳ | بررسی سه بار مصرف پس از ۷۲ ساعت |
| کنترل | - |

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به سلول‌های

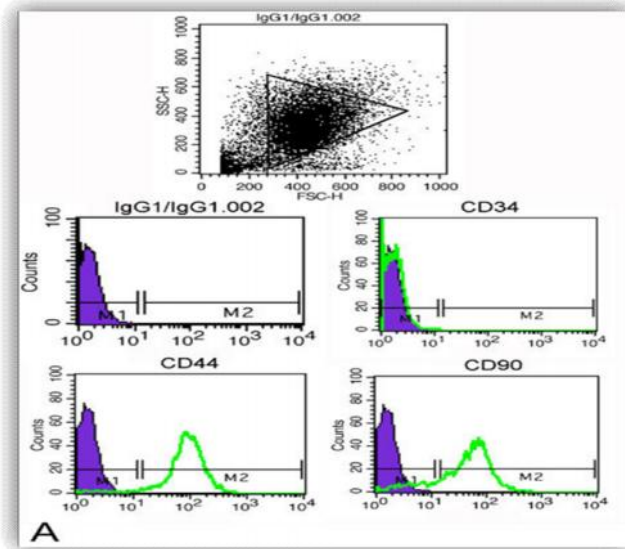
شبه‌استنوبلاست: برای القاء تمایز استئوژنیک، سلول‌های پاساژ ۴ در پلیت ۶ چاهک به میزان ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک (در مجموع ۴ چاهک) کشت داده شدند. ۲ چاهک به عنوان کنترل و ۲ چاهک به عنوان تمایز به استخوان در حضور عصاره هیدروآلکلی گیاه کانابیس انتخاب شدند. در هر چاهک، محیط رویی سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان شامل DMEM و ۱۰ درصد FBS حاوی آسکوربیک اسید (۰/۰۵ gr/lit)، بتاگلیسروفسفات (۱۰mM/lit) و دگزامتازون (۱۰M) جایگزین گردید. به منظور بررسی تاثیر عصاره هیدروآلکلی گیاه کانابیس، مقدار ۱۰۰ ng/ml این ماده به محیط تمایز موجود در ۲ چاهک حاوی محیط تمایز اضافه شد و بررسی سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده به مدت ۲۱ روز انجام گردید. در این مدت هر سه روز یک بار محیط تعویض گردید (۱۳). بعد از گذشت ۲۱ روز محیط روی سلول‌ها حذف شد و دوبار با PBS شستشو داده شد. با استفاده از فرمالدئید ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه سلول‌ها فیکس شدند و سپس چندین بار با آب مقطر به آرامی شستشو داده شدند. به هر چاهک یک میلی‌لیتر محلول رنگی آلزارین‌رد اضافه شد. سلول‌ها پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون و چند بار شستشو با آب مقطر توسط میکروسکوپ اینورت (Nikon ECL IPSE TS100- JAPAN) بررسی شدند.

کاربوتیپ: برای آنالیز کاربوتیپ سلولی، ابتدا سلول‌های پاساژ ۴

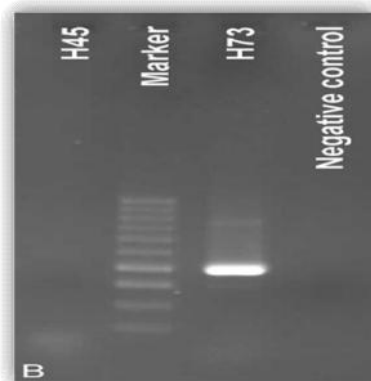
درون فلاسک ۲۵ml ریخته شد و پس از رسیدن به تراکم حدود ۷۰ درصد به آنها ۰/۱μg/ml کولسمید اضافه گردید. فلاسک به

جدول ۳: توالی پرایمرها و اندازه محصول در RT-PCR

| ژن | رفت (5'-3') | برگشت (5'-3') | سایز محصول (bp) |
|------|------------------------|----------------------|-----------------|
| CD45 | AACAACCACTCTGAGCCCTTCT | CCCCTGGTGCACATCTAATA | 302 |
| CD73 | CAGCGAGGACTCCAGCAAG | TATCCAACGATTCCCAACT | 396 |



شکل ۱: بیان مارکر غیرهماتوپویتیک CD90 و CD44 مثبت و هماتوپویتیک CD34 منفی



شکل ۲: عدم حضور CD45 و حضور CD73 در هر سه گروه

تمایز استئوبلاستی: در گروه‌های کنترل و تیمار با دوز ۱۰۰ ng/ml سلول‌های مزانشیمی چربی انسان، سلول‌ها در هر دو گروه کنترل و تیمار به سلول‌های استئوبلاست تمایز یافتند. توده‌های سلولی به دنبال رنگ آمیزی آلزارین رد قرمز رنگ شدند. این امر نشانه معدنی شدن ماتریکس است. طی تمایز خودبه‌خودی سلول‌ها به سلول‌های استخوان ساز، املاح مدنی در فضای بین سلولی مشخص است. حال آن که در سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته هیچگونه رسوب خارج سلولی کلسیمی مشاهده نمی‌شود (شکل ۳). رسوب کلسیم نشان‌دهنده تمایز موفقیت آمیز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست و تشکیل استخوان است.

نشان دادند. از آنجا که بر اساس مطالعات پیشین، غلظت ماده روانگردان THC در پلاسمای خون معنادران ۶-۱۵ ng/ml بر آورد شده است (۲۲ و ۲۳) و همچنین ۲۰-۱۰ درصد عصاره کانابیس را THC تشکیل می‌دهد (۲۴)؛ بر این اساس غلظت مناسب در محدوده ۱۵۰-۳۰ ng/ml انتخاب شد. از این محدوده غلظتی، دوز ۱۰۰ ng/ml برای تیمار سلول‌ها به کار گرفته شد.

اثبات مزانشیمی بودن سلول‌ها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و RT-PCR: سلول‌های مزانشیمی استخراج شده ابتدا به صورت معلق با جمعیت هتروژن پهن، چندوجهی و دوکی شکل بودند. در پاساژهای بالاتر تعداد سلول‌های دوکی شکل بیشتر شد. به طوری که در پاساژ چهارم بیشتر سلول‌ها ظاهری دوکی شکل داشتند و به کف ظروف پلاستیکی محیط کشت چسبیده بودند. مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی، با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری تایید گردید. این سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای سطحی غیرهماتوپویتیک (CD90 و CD44) مثبت و از نظر بیان مارکر هماتوپویتیک (CD34) منفی بودند (شکل یک). به علاوه در RT-PCR حضور مارکرهای اختصاصی این نوع از سلول‌ها بررسی شد. در نتیجه این مراحل باندهای اختصاصی مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی با مارکر سطحی CD73 مشاهده شدند؛ اما اثری از باندهای اختصاصی مربوط به سلول‌های بنیادی خونساز با مارکر CD45 نبود (جدول ۳ و شکل ۲).

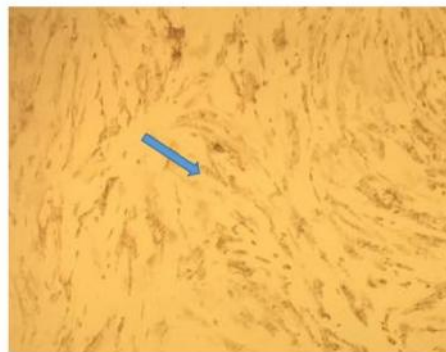
کاریوتیپ: نتایج حاصل از مقایسه کاریوتیپ کروموزومی قبل و پس از تیمار با عصاره کانابیس نشان داد که این عصاره اثری در ساختار، وضعیت مورفولوژیکی و تعداد کروموزومها ندارد (شکل ۴).

بحث

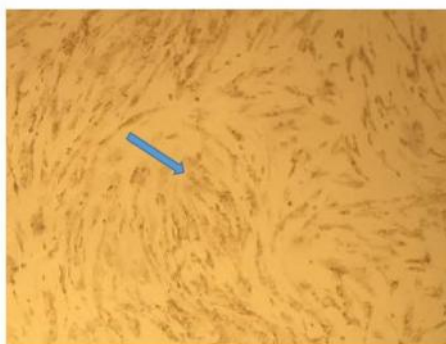
با توجه به نتایج مطالعه حاضر، تصاویر تهیه شده از سلول‌های مزانشیمی بافت چربی ناحیه شکمی انسان با استفاده از میکروسکوپ معکوس نشان داد که در ابتدای جداسازی، سلول‌ها به صورت گرد و شناور بوده و تعداد کمی از آنها به صورت دوکی شکل، چندوجهی و چسبیده به کف فلاسک بودند. سلول‌های دوکی شکل نسبت به سلول‌های دیگر سرعت رشد بیشتری داشتند و پس از اولین پاساژ بیشترین درصد سلولی را تشکیل داده و کلونی سلولی ایجاد کردند. در پاساژهای بعدی جمعیت همگن تری از سلول‌های دوکی شکل با هسته‌های مشخص نمایان شد که مورفولوژی تیپیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. این سلول‌ها به طور گسترده کف فلاسک را اشغال کردند. بر اساس نتایج این پژوهش، ظاهر دوکی شکل سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی در حضور عصاره گیاه کانابیس همچنان حفظ شد. در مطالعه‌ای که غلظت دلتا-۹-تتراهدروکانابینول معادل مقدار دریافت شده در سرم خون مصرف کنندگان کانابیس در نظر گرفته شده بود، مشاهده گردید که کدگذاری ژنی برای رشد، آپوپتوز، مورفولوژی سلولی و مسیرهای تبادل یونی توسط دلتا-۹-تتراهدروکانابینول تعدیل می‌شود (۲۵).

در مطالعه حاضر ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با بیان مارکرهای مزانشیمی CD44، CD73 و CD90 و عدم بیان مارکرهای هماتوپویتیک CD34 و CD45 تایید گردید. در سلول‌های تیمار شده با عصاره کانابیس در دوز ۱۰۰ng/ml همانند گروه کنترل، مارکرهای مزانشیمی CD44، CD73 و CD90 بیان گردید؛ ولی مارکرهای هماتوپویتیک CD34 و CD45 بیان نشد. براساس نتایج فلوسایتومتری، سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان در پاساژ ۲، مارکرهای مزانشیمی کلاسیک از جمله CD44، CD73 و CD105 را بیان می‌کنند؛ اما CD14، CD19، CD34، CD45 و HLA-DR را بیان نمی‌کنند (۱۴و۱۵).

پتانسیل تمایز به استخوان دلیل اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی است. در رنگ آمیزی سلول‌ها با آلزارین‌رد در هر دو گروه کنترل و تیمار شده با عصاره کانابیس در دوز ۱۰۰ng/ml رسوبات کلسیم مشاهده شد که نشان‌دهنده تمایز سلول‌های جداسازی شده به سلول‌های استئوسیتی است. پس می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌ی کانابیس باعث القاء تمایز استئوژنی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود. بر اساس یک پژوهش، پیام‌رسانی اندوکانابینوئیدی تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی هماتوپیتیک و



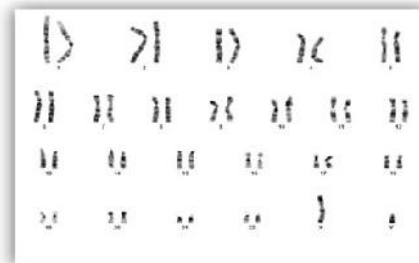
الف



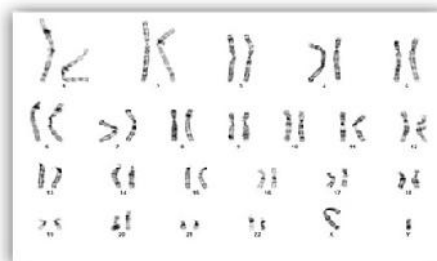
ب

شکل ۳: نتیجه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به استخوان

فلش‌ها محل تشکیل ندول‌های استخوانی را نشان می‌دهند. الف) سلول‌های گروه کنترل؛ ب) سلول‌های گروه تیمار رنگ‌آمیزی آلزارین‌رد؛ بزرگ نمایی ۴۰ X



الف



ب

شکل ۴: کاریوتیپ کروموزومی الف) قبل از مواجهه با عصاره کانابیس ب) پس از تیمار با عصاره کانابیس

اثر عصاره گیاه کانابیس در درمان بیماری‌های گوناگون از جمله گلوکوم، رفع تهوع ناشی از شیمی درمانی، مولتیپل اسکروزیس و آلزایمر اثبات شده است. همچنین مشاهده شده که عصاره کانابیس باعث افزایش روند رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود (۳۱). لذا با توجه به اهمیت تمایز استوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مهندسی بافت، کاربردهای بالینی مانند درمان پوکی استخوان و پزشکی پیوند، پیشنهاد می‌شود که بیان ژن‌های تمایزی مرتبط از جمله COL1A1 و RnX2 در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های مزانشیمی چربی انسان در حضور عصاره هیدروالکلی گیاه کانابیس قابلیت تمایز استوبلاستی خود را حفظ می‌نمایند. لذا می‌توانند در مهندسی بافت و پزشکی بالینی مورد استفاده قرار گیرند و در درمان پوکی استخوان موثر واقع شوند. همچنین این عصاره اثری بر کاربوتیپ کروموزومی سلول‌ها ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان نامه (شماره ۹۹۶۷۸۷۶۷۸) خانم مهرگان جمشیدی برای اخذ درجه دکتری در رشته فیزیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس بود. بدین وسیله از مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خاطر حمایت انجام امور آزمایشگاهی کشت سلولی قدردانی می‌گردد.

References

1. Tettey J. Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products. New York: United Nations Office on Drugs and Crime Vienna United Nations. 2009.
2. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. Trends Pharmacol Sci. 2009 Oct; 30(10): 515-27. doi: 10.1016/j.tips.2009.07.006
3. Hartman RL, Brown TL, Milavetz G, Spurgin A, Gorelick DA, Gaffney G, et al. Controlled vaporized cannabis, with and without alcohol: subjective effects and oral fluid-blood cannabinoid relationships. Drug Test Anal. 2016 Jul; 8(7): 690-701. doi: 10.1002/dta.1839
4. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. Pharmacotherapy. 2013 Feb; 33(2): 195-209. doi: 10.1002/phar.1187
5. D'Souza DC, Perry E, MacDougall L, Ammerman Y, Cooper T, Wu YT, et al. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. Neuropsychopharmacology. 2004 Aug; 29(8): 1558-72. doi: 10.1038/sj.npp.1300496
6. Kochman LJ, dos Santos AA, Fornal CA, Jacobs BL. Despite strong behavioral disruption, Delta9-tetrahydrocannabinol does not affect cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. Brain Res. 2006 Oct; 1113(1):86-93. doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.080
7. Hernán Pérez de la Ossa D, Lorente M, Gil-Alegre ME, Torres

مزانشیمی را تنظیم می‌کنند و نقش کلیدی در تشکیل چند نوع سلول در بافت‌های محیطی از جمله سلول‌های خونی، آدیپوسیت، استوبلاست، استوکلاست و سلول‌های اپیتلیال دارد. گیرنده‌های کانابینوئیدی از مراحل ابتدایی نمو، بیان شده و فعالیت می‌کنند (۲۶). در مطالعه‌ای بر روی نقش گیرنده کانابینوئیدی نوع یک در طی تمایز استوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نشان داده شد که گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع یک نقش پیش‌بقایی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته در طی استرس حاد دارند و میزان این گیرنده‌ها طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش می‌یابد. همچنین فیتوکانابینوئید اگزورژن تراهایدروکانابینول باعث کاهش بقا و توانایی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود (۲۷). کانابینوئیدها باعث تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی و ایجاد یک شبکه سیناپسی عملکردی در مغز و در نتیجه نمو این اندام می‌شوند (۲۸ و ۲۹). همسو با نتایج این بررسی، در یک مطالعه نشان داده شد که کانابینوئیدها سبب افزایش توده استخوانی در بدن شده و بنابراین برای درمان پوکی استخوان مفید هستند (۳۰). پس با توجه به نتایج مطالعه حاضر، توانایی تمایز استوبلاستی سلول‌های مزانشیمی چربی انسان در حضور عصاره هیدروالکلی گیاه کانابیس و در نتیجه افزایش توده استخوانی در بدن فرد، می‌تواند در موارد درمان و پزشکی کاربرد داشته باشد. بررسی کاربوتیپ کروموزومی نشان داد که عصاره کانابیس تاثیری در ساختار، وضعیت مورفولوژیکی و تعداد کروموزوم‌های سلول نداشته است.

- Biochemistry and Function. 2013 Jun; 31(4): 271-80. doi: 10.1002/cbf.2950
13. Mehrabani D, Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *J Hum Reprod Sci.* 2015 Apr-Jun; 8(2): 103-10. doi: 10.4103/0974-1208.158618
 14. Di Battista JA, Shebaby W, Kizilay O, Hamade E, Abou Merhi R, Mebarek S, et al. Proliferation and differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) into osteoblastic lineage are passage dependent. *Inflamm Res.* 2014 Nov; 63(11): 907-17. doi: 10.1007/s00011-014-0764-y
 15. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev.* 2013 Feb; 9(1): 32-43. doi: 10.1007/s12015-012-9365-8
 16. Abdanipour A, Noori-Zadeh A, Mohamadi Z, Rashid Sheykh Ahmad F, Akbari P. [Comparison of adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells in prolonged passages based on viability and auto-differentiation]. *J Rafsanjan Univ Med Sci.* 2015; 13(12): 1141-52. [Article in Persian]
 17. Solali S, Kaviani S, Soleimani M, Zonoubi Z. [Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue]. *Koomesh.* 2015; 16(4): 505-11. [Article in Persian]
 18. de Lago E, Gómez-Ruiz M, Moreno-Martet M, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids, multiple sclerosis and neuroprotection. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2009 Nov; 2(6): 645-60. doi: 10.1586/ecp.09.42
 19. Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology.* 2010; 215(8): 598-605. doi: 10.1016/j.imbio.2009.04.001
 20. Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget.* 2014 Aug; 5(15): 5852-72. doi: 10.18632/oncotarget.2233
 21. Bamdadpasand Shekarsarayi F, Eslami Farsani M, Heydariya N. [The effect of soy isoflavone on the proliferation and differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes and expression of collagen II and aggrecan genes]. *Qom Univ Med Sci J.* 2017; 11(1): 18-28. [Article in Persian]
 22. Milman G, Bergamaschi MM, Lee D, Mendu DR, Barnes AJ, Vandrey R, et al. Plasma cannabinoid concentrations during dronabinol pharmacotherapy for cannabis dependence. *Ther Drug Monit.* 2014 Apr; 36(2): 218-24. doi: 10.1097/FTD.0b013e3182a5c446
 23. Berghaus G, Scheer N, Schmidt P. Effects of Cannabis on Psychomotor Skills and Driving Performance - a Metaanalysis of Experimental Studies. 13th International Conference on Alcohol, Drugs and Traffic Safety (T'95). Australia, 13-18 August 1995.
 24. Appendino G, Chianese G, Tagliatalata-Scafati O. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Curr Med Chem.* 2011; 18(7): 1085-99.
 25. Khare M, Taylor AH, Konje JC, Bell SC. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cytotrophoblast cell proliferation and modulates gene transcription. *Mol Hum Reprod.* 2006 May; 12(5): 321-33. doi: 10.1093/molehr/gal036
 26. 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 Oct; 52(4): 633-50. doi: 10.1016/j.plipres.2013.05.004
 27. Gowran A, McKayed K, Campbell VA. The cannabinoid receptor type 1 is essential for mesenchymal stem cell survival and differentiation: implications for bone health. *Stem Cells Int.* 2013; 2013: 796715. doi: 10.1155/2013/796715
 28. Prenderville JA, Kelly ÁM, Downer EJ. The role of cannabinoids in adult neurogenesis. *Br J Pharmacol.* 2015 Aug; 172(16): 3950-63. doi: 10.1111/bph.13186
 29. Maccarrone M, Guzmán M, Mackie K, Doherty P, Harkany T. Programming of neural cells by (endo) cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Dec; 15(12): 786-801. doi: 10.1038/nrn3846
 30. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab.* 2006 Nov; 4(5): 341-48. doi: 10.1016/j.cmet.2006.10.008
 31. 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-driven mesenchymal stem cell growth. *Electron J Gen Med.* 2018; 15(3): em31. doi:10.29333/ejgm/86194