مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۸
صفحات: ۲۰۴- ۱۹۷

تاثیر WIN 55212-2 در سمیت ناشی از دیازینون و تداخل آن با گیرنده N–متیل–D–آسپارتات در سلول‌های رده PC12

منصوره هاشمی [*] *MSc*، فریده بهرامی [۱] *PhD*، علیرضا عسگری [۲] *PhD*، هدایت صحرایی [۱] *PhD*

چکیده

اهداف. در این مطالعه، اثر حفاظتی WIN 55212-2 (آگونیست گیرنده CB1) و نیز تداخل احتمالی آن با گیرنده NMDA در سلول‌های رده PC12 بررسی شد.

مواد و روش‌ها. سلول‌های رده PC12 در محیط کشت DMEM+F12 همراه با ۱۰٪ سرم کشت داده شدند. سلول‌ها با دیازینون ۲۰۰ میکرومولار در حضور یا فقدان WIN 55212-2 با دوز ۰/۱ میکرومولار، AM251 و MK801 با دوز ۱ میکرومولار و NMDA با دوز ۱۰۰ میکرومولار در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه تیمار شدند. بعد از ۴۸ ساعت، میزان بقای سلول‌ها با استفاده از کیت MTS و مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس ارزیابی شد.

یافته‌ها. با در معرض‌گذاری سلول PC12 با دیازینون (۲۰۰ میکرومولار)، کاهش معنی‌داری در میزان بقای سلول‌ها مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$). تیمار سلول‌ها با WIN 55212-2 (۰/۱ میکرومولار) و NMDA (۱۰۰ میکرومولار) قبل از در معرض‌گذاری دیازینون، میزان بقای سلول‌ها را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($p<۰/۰۱$). همچنین، آنتاگونیست گیرنده کانابینوئیدی CB1 (AM251) با دوز ۱ میکرومولار افزایش میزان بقای سلولی ایجادشده توسط WIN 55212-2 را مهار نکرد ($p<۰/۰۰۱$). اما، آنتاگونیست گیرنده NMDA (MK801) با دوز ۱ میکرومولار افزایش میزان بقای سلولی ایجادشده توسط NMDA را مهار کرد ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری. WIN 55212-2 و NMDA از سلول‌های PC12 در برابر سمیت ناشی از دیازینون محافظت می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: آگونیست گیرنده CB1 کانابینوییدی، دیازینون، NMDA، سلول‌های فئوکروموسیتوما

Archive of SID

دریافت مقاله: ۸۸/۱۰/۲۴، پذیرش مقاله:۸۸/۱۲/۸

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
mansooreh.hashemi@ yahoo.com
۱ "مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی" و "گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده علوم‌پزشکی"، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
۲ گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

www.SID.ir

مقدمه

علی‌رغم تاریخچه قدیمی (بیش از ۴۰۰۰ سال) استفاده دارویی از کانابینوییدها، معرفی این مواد در طب جدید و مدرن به‌تازگی آغاز شده است. فعال‌ترین شکل این مواد یعنی Δ9- تتراهیدروکانابیدیول (Δ9-THC)، ۴۰ سال پیش شناسایی شده و همچنین کمتر از ۲۰ سال از کشف سیستم درون‌زاد کانابینوییدها و رسپتورهای آن می‌گذرد [۱]. اندوکانابینوییدها از اسیدچرب ۲۰کربنه آراشیدونیک‌اسید مشتق شده‌اند. امروزه ۵ نوع اندوکانابینویید شناخته شده است که مهم‌ترین آنها، آناندامايد (AEA) و ۲– آراشیدونوییل‌گلیسرول (2-AG) هستند [۲]. دو نوع رسپتور کانابینوییدی CB1 و CB2 شناسایی شده است که این دو نوع رسپتور علاوه بر تفاوت در توالی اسیدهای آمینه، از نظر مکانیزم‌های انتقال پیام، انتشار در بافت‌ها و حساسیت به آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های خاص، متفاوت هستند [۳]. رسپتورهای CB1 عمدتا در سیستم عصبی– مرکزی وجود دارند، درحالی‌که رسپتورهای CB2 اساسا در سلول‌های ایمنی لکوسیت‌ها، طحال و روده پراکنده هستند [۴].

تحقیقات *در شیشه* نشان داده است که رسپتورهای CB1 می‌توانند رهاشدن چندین نوع نوروترانسمیتر و نورومدولاتور مثل استیل‌کولین، گلوتامات، دوپامین‌گابا را مهار کنند. این مهار، در سیستم عصبی–مرکزی از طریق پیش‌سیناپسی صورت می‌گیرد [۵]. به‌نظر می‌رسد کانابینوییدهای اندوژن از پایانه پس‌سیناپسی نورون، رها شده و به‌صورت قهقرایی (رو به عقب) به سمت سیناپس حرکت می‌کنند و بر رسپتورهای پیش‌سیناپسی می‌نشینند [۶]. یکی از نقش‌های قابل توجه کانابینوییدها محافظت نورونی است [۷]. به‌عنوان مثال، هیپوکسی و ایسکمی از مواردی هستند که منجر به افزایش و غیرطبیعی‌شدن فعالیت سیستم گلوتاماتی و سایر پروسه‌ها می‌شوند و آسیب نورونی (مانند پارکینسون، آلزایمر و مولتیپل‌اسکلروزیس) ایجاد می‌کنند [۵]. تحقیقات نشان می‌دهد، هنگامی‌که میانجی‌های محافظت‌کننده نورونی مثل آناندامايد و 2AG (از کانابینوییدهای‌اندوژن) در آسیب سلول‌های مغزی استفاده شوند، آسیب مغزی را کاهش می‌دهند [۵]. مکانیزم محافظتی کانابینوییدها می‌تواند از طریق کاهش سمیت گلوتاماتی [۸] یا مهار ورود کلسیم به داخل سلول باشد [۹]. دیازینون یکی از ترکیبات ارگانوفسفره است که در حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود و کاربرد وسیعی در کشاورزی و مصارف خانگی برای مبارزه با آفات و حشرات دارد [۱۰]. مهم‌ترین و آشکارترین سمیتی که از طریق دیازینون ایجاد می‌شود، مهار آنزیم استیل– کولین‌استراز (AChE) است که مسمومیت کولینرژیک را به‌دنبال دارد. علاوه بر این، تعدادی از مطالعات، اختلالات نورولوژیک و سایکولوژیک را در افراد نشان می‌دهد که ناشی از سمیت با دیازینون است. در مورد مکانیزم اختلالات نورولوژیکی و سایکولوژیکی، اطلاعات اندکی در دست است. در این مورد اهداف غیرکولینرژیک و ماکرومولکولی ارگانو فسفره، نقش مهمی در این سمیت عصبی دارد، مانند:

– پراکسیداسیون و تخریب غشاهای لیپیدی با تولید رادیکال‌های آزاد که در نتیجه این عمل مخرب، غشا سخت شده و نفوذپذیری خود را از دست می‌دهد [۱۱].

– آپوپتوز سلولی از طریق استرس اکسیداتیو [۱۲].

– دمیلینه‌شدن عصب سیاتیک و تورم آکسونی [۱۳].

– کاهش سرعت هدایت در فیبرهای حسی– محیطی و عصب سیاتیک [۱۴].

سلول‌های رده PC12 از سلول‌های فئوکروموسیتومای فوق کلیه رت تهیه می‌شوند. با توجه به تحقیقات قبلی به‌نظر می‌رسد که این سلول‌ها، مدل مناسبی برای مطالعه مشکلات مختلف نوروبیولوژی و نوروشیمی هستند که شامل مکانیزم‌های عملکرد NGF (فاکتور رشد عصبی) و نقش آن در تکوین و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی، شروع و تنظیم رشد نوریت‌ها و متابولیزم، ذخیره و ترشح کاتکول‌آمین‌ها است [۱۴]. همچنین با توجه به این‌که رده سلولی PC12 حاوی گیرنده CB1 است، این امکان وجود دارد که گیرنده‌های CB1 کانابینوییدی در محافظت از سلول‌های دستگاه‌عصبی در برابر عوامل مخرب، عمل کنند. بنابراین این سلول‌ها مدل مناسبی برای بررسی اثر حفاظتی کانابینوییدها در برابر عوامل ارگانوفسفره هستند [۱۵]. از آن‌جایی که مطالعه مکانیزم‌های اثر حفاظتی کانابینوییدها بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است، لذا بر آن شدیم تا علاوه بر اثر محافظتی کانابینوییدها، مکانیزم این اثر و تداخل آن با سیستم گلوتاماتی را با سمیت حاصل از دیازینون، مورد ارزیابی قرار دهیم. هدف از این مطالعه، بررسی مکانیزم اثر حفاظتی WIN 55212-2 (آگونیست گیرنده CB1) در سمیت ناشی از

Archive of SID

www.SID.ir

دیازینون (DZ) و تداخل احتمالی آن با گیرنده N- متیلD- آسپارتات (NMDA) در سلول‌های رده PC12 (فئوکروموسیتوما) بود.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار سلول‌های رده PC12

سلول‌های PC12 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در فلاسک‌های کشت ۴۰ میلی‌لیتری در محیط کشت DMEM+F12 (Gibco؛ بریتانیا) همراه با افزودنی‌هایی شامل ۱۰٪ سرم جنینی گاو (Gibco؛ بریتانیا) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک آنتی‌مایکوتیک، کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند. در ابتدا برای دسترسی به دوز مناسب، دوزهای مختلف دیازینون و WIN 55212-2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با دوز انتخابی دیازینون (۲۰۰ میکرومولار) در حضور یا عدم حضور آگونیست‌های گیرنده‌های CB1و NMDA، WIN 55212-2 (۰/۱μM) و NMDA (۱۰۰μM) و آنتاگونیست‌های گیرنده‌های CB1 و NMDA (AM251 ۱ μM و MK801) در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه تیمار شده و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند.

ارزیابی میزان بقای سلول‌ها

برای سنجش میزان بقای سلول‌ها از کیت MTS [-۵-(۳-کربوکسی‌متوکسی‌فنیل)-۲-(۴-سولفوفنیل)-۲H - تترازولیوم- اینرسالت MTS، ۳-(۵،۴-دی‌متیتازول-۲-y ۱)] استفاده شد. به این منظور سلول‌های PC12 با تراکم ۱×۱۰^{۴} سلول، در هر یک از خانه‌های ظروف کشت ۹۶خانه، کشت داده شدند. سپس سلول‌ها درمعرض تیمارهای مختلف قرارگرفتند. پس از ۴۸ ساعت، دو محلول کیت MTS حاوی MTS و PMS (فنازین متاسولفات) به نسبت ۱:۲۰ در ۶cc محیط کشت DMEM+F12 حل شد و پس از تخلیه محیط قبلی، ۱۲۰ میکرولیتر از محلول MTS حل‌شده به هر خانه ظرف کشت، اضافه و به‌مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب نوری سلول‌های زنده رنگ‌گرفته، توسط دستگاه الایزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها

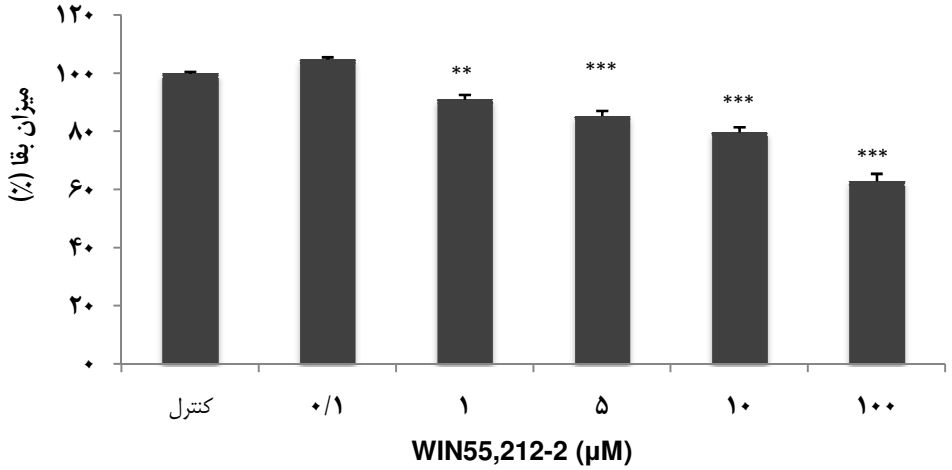
بدین منظور سلول‌ها با تراکم $۱۰^{۴}$ سلول در هر خانه از ظرف کشت ۶خانه، کشت داده شدند. پس از تیمار سلولی با داروهای مختلف، از سلول‌های موجود در ظرف کشت به‌صورت نقاط تصادفی، با میکروسکوپ نوری معکوس و بزرگنمایی‌های ۱۰×، ۲۰× و ۳۲× عکس گرفته شد.

داده‌های مربوط به میزان بقای سلول‌ها به‌صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین، محاسبه شد و از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد. تفاوت‌های با $p<۰/۰۵$، معنی‌دار درنظر گرفته شد.

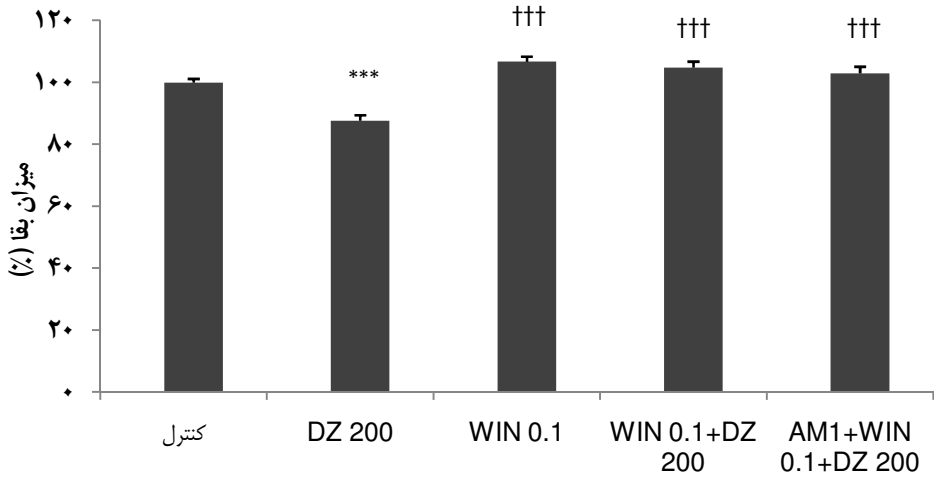
نتایج

در این مطالعه، میزان بقای سلول‌های PC12 در حضور غلظت‌های مختلف آگونیست گیرنده CB1 کانابینوییدی WIN 55212-2 بررسی شد. برای این‌که دوز پاسخ WIN 55212-2 تعیین شود، سلول‌های PC12 با دوزهای مختلف ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار WIN 55212-2 تیمار شدند. نتایج نشان داد که دوزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار WIN 55212-2 منجر به کاهش میزان بقای سلول‌های PC12 شده است. به‌نظر می‌رسد، این دوزها با ایجاد سمیت، مرگ‌ومیر را در سلول‌ها افزایش داده‌اند. اما دوز ۰/۱ میکرومولار WIN 55212-2 میزان بقای سلول‌های PC12 را افزایش داد. بنابراین در ادامه آزمایش از دوز ۰/۱ میکرومولار، به‌عنوان دوز حفاظت‌کننده نورونی استفاده شد (درصد میزان بقا در دوزهای ۱۰۰، ۱۰، ۵، ۱، ۰/۱ به‌ترتیب ۶۳، ۸۰، ۸۵، ۹۱ و ۱۰۵٪ است؛ نمودار ۱). به‌منظور یافتن دوز مناسب دیازینون، سلول‌های PC12 با ۴ دوز مختلف دیازینون تیمار شدند. نتایج نشان داد که با افزایش دوز دیازینون، میزان بقای سلول‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. بدین ترتیب دوز ۲۰۰ میکرومولار دیازینون در ادامه آزمایش به‌عنوان دوز مناسب، مورد استفاده قرارگرفت. زیرا دوزهای بالاتر دیازینون (۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) آسیب بسیار زیادی به سلول وارد کردند و به‌نظر می‌رسد، سلول با این دوزها دچار مرگ سلولی از نوع نکروز شود.

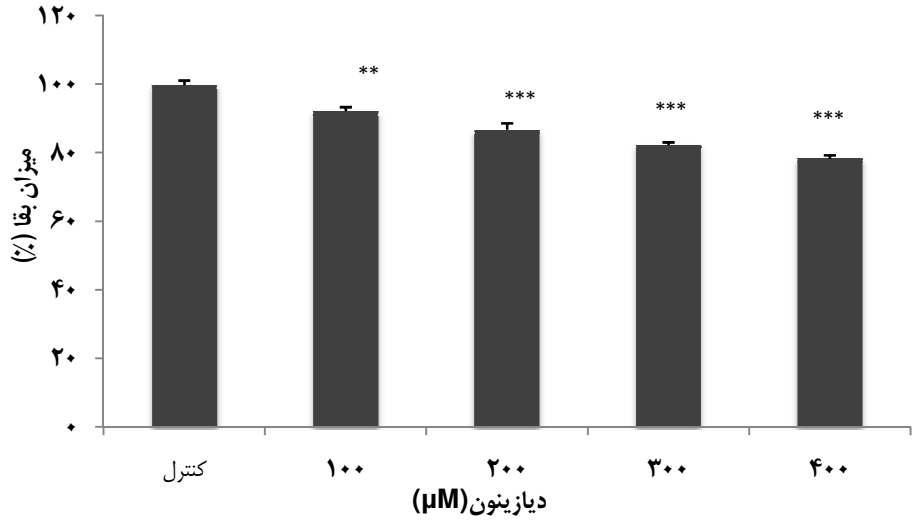
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱) بررسی اثر آگونیست گیرنده CB1 کانابینوییدی (WIN 55,212-2) بر میزان بقای سلول‌های PC12
** و *** به‌ترتیب نشان‌دهنده p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل هستند. (n = 6).

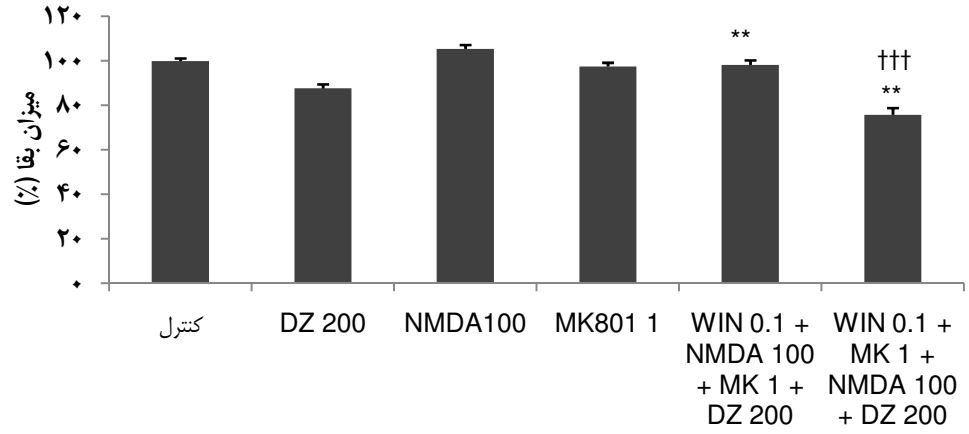


نمودار ۲) بررسی اثر دیازینون بر میزان بقای سلول‌های PC12
** و *** به ترتیب نشان‌دهنده p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل است (n = 6).



نمودار ۳) بررسی اثر توام کانابینوییدها با دیازینون بر میزان بقای سلول‌های PC12
***مقایسه گروه کنترل با دیازینون (DZ)، (p<۰/۰۰۱)
†††مقایسه گروه دیازینون با سایر گروه‌ها p<۰/۰۰۱، (n = 6).

www.SID.ir



نمودار ٤) اثر تداخل کانابینوئیدها با NMDA بر درصد بقای سلول‌های PC12.

** نشان‌دهنده p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه دیازینون

††† نشان‌دهنده p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه WIN+MK801+NMDA+POX (n = 6)

دوز ۱۰۰ میکرومولار آسیب کمتری نسبت به دوز ۲۰۰ میکرومولار ایجاد کرد. با توجه به این نتایج، دوز ۲۰۰ میکرومولار به‌عنوان دوز ایده‌آل درنظر گرفته شد. (درصد میزان بقا در دوزهای ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ میکرومولار دیازینون، به‌ترتیب ۷۸، ۸۲، ۸۶ و ۹۲٪ است؛ نمودار ۲).

در مورد نتایج مربوط به اثر توام کانابینوییدها با دیازینون بر میزان بقای سلول‌های PC12، تجزیه و تحلیل آماری میزان بقای سلول‌ها در گروه‌های مختلف نشان داد که WIN 55212-2 سبب افزایش معنی‌داری در میزان بقای سلول‌های تیماریافته با دیازینون شده است. برای تعیین این‌که آیا اثر حفاظتی WIN 55212-2 از طریق گیرنده CB1 انجام می‌شود، دوز ۱ میکرومولار AM251 (آنتاگونیست گیرنده CB1 کانابینوییدی) در گروه دیگری مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که اثرات حفاظتی WIN 55212-2 توسط AM 251 بلوک نمی‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که اثر حفاظتی WIN 55212-2 ممکن است از طریق دیگری علاوه بر گیرنده CB1 کانابینوییدی باشد (نمودار ۳).

بررسی مورفولوژی سلول‌ها نشان داد که در گروه دیازینون به‌تنهایی، میزان تراکم سلولی نسبت به گروه کنترل کاهش و میزان آسیب سلولی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین، در گروه WIN+MK801 +NMDA+DZ آسیب سلولی زیادی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در گروه‌هایی که سلول دچار آسیب سلولی شده بود، سلول از حالت دوکی (فرم طبیعی) به حالت گرد (فرم غیرطبیعی) تبدیل شد. همچنین تاول‌هایی نیز روی سلول‌های درمعرض دیازینون مشاهده شد، اما در سایر گروه‌ها کاهش تراکم سلولی و آسیب سلولی قابل توجهی مشاهده نشد (شکل ۱).

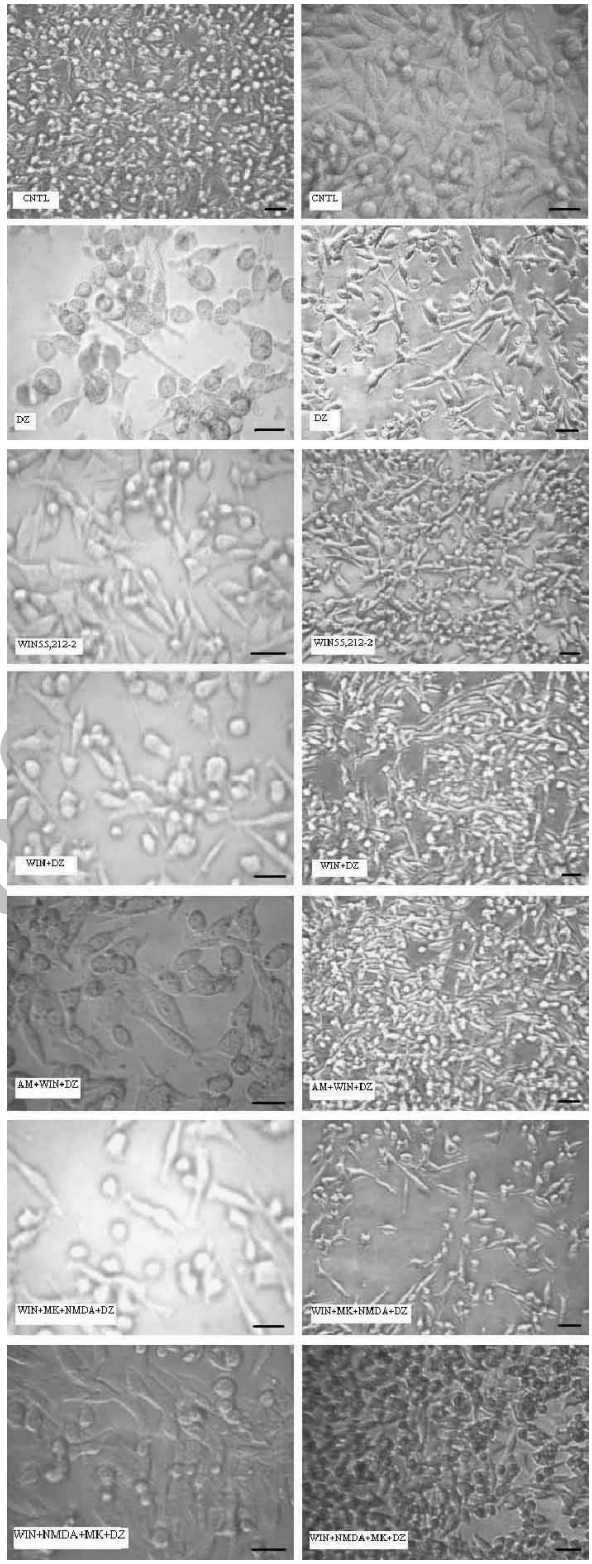
نتایج مربوط به تداخل کانابینوئیدها با NMDA بر درصد بقای سلول‌های PC12

نتایج تداخل NMDA با WIN55,212-2 نشان می‌دهد که درصد بقای سلول‌ها در گروه‌های WIN+NMDA+MK801+DZ به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دیازینون افزایش یافت. اما گروه WIN+MK801+NMDA+DZ نسبت به گروه دیازینون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. علاوه بر این، گروه WIN+NMDA+MK801+DZ نسبت به گروه WIN+MK801+NMDA+DZ، افزایش معنی‌داری را در بقای سلول‌ها نشان داد (نمودار ۴).

بحث

مطالعات ما نشان داد که دیازینون، بقای سلول‌های PC12 را به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد (حدود ۱۵٪). هنگامی‌که سلول‌های PC12 با دوز ۰/۱ میکرومولار WIN 55212-2 با دیازینون تیمار شدند، میزان بقای این سلول‌ها افزایش یافت (حدود ۲۰٪) که به‌نظر می‌رسد این دارو اثر حفاظتی از خود نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱) اثر دیازینون بر مورفولوژی سلول‌های PC12 با توجه به تراکم سلولی (در سمت راست Scale Bar= 20 µm) و با توجه به آسیب سلولی (در سمت چپ Scale Bar= 40 µm)

جیاچن و همکاران گزارش کردند که WIN 55212-2 از سلول‌های AF5 (یک رده سلولی که از سلول‌های قسمت مزانسفال مغز موش صحرایی تهیه می‌شود) در برابر سمیت ناشی از NMDA اثر حفاظتی دارد. با افزایش دوز WIN 55212-2، میزان بقا در سلول‌ها کاهش یافت. اما دوزهای پایین WIN 55212-2 در برابر سمیت NMDA اثر حفاظتی ایجاد کردند [۸]. علاوه بر این، *ترسا* و همکاران نتیجه مشابهی را در سلول‌های رده PC12 به‌دست آوردند و هنگامی‌که این سلول‌ها درمعرض سم بتا- آمیلویید قرارگرفتند، توسط کانابیدیول، حفاظت شدند [۱۶]. در ادامه بررسی‌ها، سلول‌ها با AM251 (آنتاگونیست گیرنده CB1 کانابینوییدی) همراه با WIN 55212-2 و دیازینون تیمار شدند. یافته‌های ما نشان داد که در این گروه، میزان بقای سلول‌ها افزایش یافته است. در راستای نتیجه ما، *جیاچن* و همکاران و *ترسا* و همکاران نیز هنگامی‌که از آنتاگونیست کانابینوییدی SR141716-A استفاده کردند، میزان بقای سلول‌ها افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد که در مطالعه حاضر، میزان گیرنده CB1 در سلول‌های PC12 کم باشد [۸، ۱۶] یا این‌که آنتاگونیست گیرنده CB1 (AM251) به‌صورت آگونیست نسبی عمل کرده باشد [۱۷].

بنابراین در ادامه این مطالعه، میزان بقای سلول‌ها در هنگام تداخل اثر WIN 55212-2 با NMDA ارزیابی شد. نتایج حاصل از سنجش میزان بقای سلول‌ها نشان داد، هنگامی‌که سلول‌ها با WIN 55212-2 و NMDA تیمار شدند، میزان بقای سلول‌ها نسبت به دیازینون افزایش یافته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که NMDA اثر حفاظتی دارد (با وجود این‌که اثر حفاظتی WIN 55212-2 و NMDA تقویت‌کننده یکدیگر نبودند). بنابراین، در این مطالعه نیز نشان داده شد که تحت شرایط خاص، NMDA نه‌تنها سمی نیست بلکه از سلول‌های PC12 درمعرض دیازینون محافظت می‌کند. *پیتر* و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که گیرنده‌های NMDA با توجه به جایگاهشان نسبت به سیناپس می‌توانند اثر حفاظتی یا آسیب نورونی ایجاد کنند [۱۸]. مکانیزم‌های حفاظتی مختلفی برای اثر حفاظتی NMDA معرفی شده است. از جمله می‌توان به مکانیزم وابسته به کلسیم، تحریک تولید BDNF (فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز)، مهار مسیر آپوپتوزی JNK، فعالیت مسیرهای حیات سلول (MAPK/ERK1,2، PI3-K/Akt، PKA/CREB، NFκB) اشاره کرد [۱۹].

Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه، هنگامی‌که سلول‌ها با MK801 قبل از NMDA تیمار شدند، میزان بقای سلول‌ها کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که هنگامی‌که جلوی عملکرد NMDA توسط MK801 گرفته شود، سمیت القاشده حتی بیشتر از دیازینون به‌تنهایی، بوده است. این نتیجه می‌تواند ناشی از حذف اثرات محافظتی NMDA باشد. در تحقیقی که توسط *زوآن* و همکاران انجام شد، اثر حفاظتی NMDA در سلول‌های گرانول مغزی درمعرض پاروکسان بررسی شد و مشاهده کردند که غلظت ۱۰۰ میکرومولار NMDA کاملا فعالیت آنزیم کاسپاز۳ را متوقف می‌کند و مانع از آپوپتوز سلولی می‌شود. در هنگامی‌که سلول‌ها با MK801 تیمار شدند، مرگ‌ومیر سلول‌ها افزایش یافت. لذا غلظت‌های کم NMDA (۱۰۰ میکرومولار) تحریک گیرنده‌های NMDA را کاهش می‌دهد و این عامل منجر به حفاظت سلولی می‌شود [۲۰]. *لوکا* و همکاران در تحقیق خود نتیجه گرفتند که گلوتامات برای تکثیر، رشد و تکامل سلول‌های عصبی در دوره جنینی لازم است. همچنین در سیستم عصبی، بین گیرنده‌های NMDA و CB1 تداخل عمل وجود دارد [۲۱]. *فرانسسکا* و همکاران در تحقیق خود مشاهده کردند که در سلول‌های هیپوکامپ، گیرنده‌های گلوتاماتی از نوع mGLU1α و CB1 در جایگاه‌های نزدیک به هم قرار دارند. این تحقیق می‌تواند تاییدی برای نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه ما باشد [۲۲]. همچنین *جیان* و همکاران به این نتیجه رسیدند که بین گیرنده CB1 و گیرنده گلوتاماتی متابوتروپیکII در نورون‌های هرمی قشر فرونتال رت، تداخل اثر وجود دارد [۲۳]. همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد که دیازینون باعث کاهش تعداد سلول‌های PC12 و تغییر شکل ظاهری سلول از حالت دوکی به حالت گرد می‌شود. اما هنگامی‌که این سلول‌ها با WIN 55212-2 به‌تنهایی و ترکیب AM251، WIN 55212-2 یا دیازینون تیمار داده شدند، تعداد سلول‌های PC12 افزایش یافت. با توجه به همخوانی نتایج حاصل از مورفولوژی با نتایج حاصل از میزان حیات، می‌توان نتیجه گرفت که این دو مرحله از کار می‌توانند یکدیگر را تایید کنند. بررسی‌های محققین نشان داد، هنگامی‌که سلول‌های شبکیه چشم جنین جوجه در غلظت‌های مختلف دیازینون قرار گیرد، اندازه تعداد سلول‌های شبکیه کاهش می‌یابد. علاوه بر این، سطح بیرونی سلول چروکیده و نامنظم می‌شود [۲۴]. در تحقیق دیگری، هنگامی‌که نورون‌های هیپوکامپ درمعرض غلظت‌های مختلف پاروکسان قرارگرفتند، علایمی مانند ظهور تاول‌ها بر سطح جسم‌سلولی، وجود شکل میلین و واکوئل‌های متعدد حاوی مواد هضمی در سلول‌ها و عدم یکپارچگی غشا و سیتوپلاسم به‌وجود آمد [۲۵]. همچنین، هنگامی‌که سلول‌های قشر مغز با آگونیست گیرنده CB1 (HU210) و سمیت حاصل از NMDA تیمار شدند، تعداد این سلول‌ها افزایش یافت [۲۶].

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، تحقیق حاضر نشان داد که WIN 55212-2 اثر حفاظتی در برابر سمیت دیازینون دارد. همچنین به‌نظر می‌رسد، در این تحقیق، با بررسی آنتاگونیست گیرنده CB1 (AM251)، اثر حفاظتی ممکن است از طریق گیرنده نباشد بلکه احتمال دارد این اثر از طریق سایر مکانیزم‌ها از جمله مهار کانال‌های کلسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ حاصل شود، درحالی‌که NMDA اثر حفاظتی‌اش را از طریق گیرنده اعمال کرده است و بین اثر WIN 55212-2 و NMDA در عمل حفاظت سلولی، تداخل وجود دارد.

منابع

1- Fankhauser M. Incannabis and cannabinoids. J Ther Pharmacol. 2002;4:37-51.
2- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. J Pharmacol Exp Ther. 2002;301:1020-4.
3- Howlett AC. The cannabinoid receptors. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002;69:619-31.
4- Maria RP, Estefania N, Cristina B, Rosa MT, Julian R. Functional neuroanatomy of the endocannabinod system. Pharmachol Biochem Behav. 2005;81:239-47.
5- Franjo G, Cannabinoids: Current drug target. CNS Neurol Disord. 2005;4:507-30.
6- Takako OS, Takashi M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. Neuron. 2001;29:729-38.
7- Robert I, Monica R, Massimiliano B. Cannabinods and neuroprotection. Mol Neurobiol. 2001;24:29-51.
8- Jia C, Chun-Ting L, Stacie E, Xiaolin D. Protective effects of Δ^9-tetrahydrocannabinol against N-methyl-D-aspartate induced AF5 cell death. Brain Res Mol Brain Res. 2005;134:215-25.
9- Shou-Yuan Z, Daniel B, Elena G, Stephen MC,

Archive of SID
www.SID.ir

NMDA-mediated protection against neuronal apoptosis: A stimuli-dependent effect. Neurochemistry. 2009;10:1007-22.
20- Xuan W, Feng T, Peter O, Ann M. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors increases paraoxon-induced apoptosis in cultured neurons. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;208:57-67.
21- Luca F, Tomasini M, Beggiato S, Gactani S. Short- and long-term consequences of prenatal exposure to the cannabinoid against WIN 55212-2 on rat glutamate transmission and cognitive functions. Neural Transm. 2009;10:221-32.
22- Francesca B, Francesco F, Flavio M, Lucio A. mGLU1α receptors are co-expressed with CB1 receptors in a subset of interneurons in the CA1 region of organotypic hippocampal slice cultures and adult rat brain. Neuropharmacology. 2008;55:428-39.
23- Jean-Gael B, Nathalie A, Marie-Paule R, Satoru O, Emmanuel V. Direct and indirect interaction between cannabinoid CB1 receptor and group II metabotropic glutamate receptor signaling in layer V pyramidal neurons from the rat prefrontal cortex. Eur J Neurosci. 2003;17:981-90.
24- Paraoanu LE, Mocko JB, Becker-Roeck M, Smidek-Huhn J, Layer PG. Exposure to diazinon alters in vitro retinogenesis: Retinospheroid morphology, development of chicken retinal cell types and gene expression. Toxicol Sci. 2006;89:314-24.
25- Yousefpour M, Bahrami F, Shahsavan behboodi B, Khoshbaten A, Asgari A. Paraoxon-induced ultrastractural growth changes of rat cultured hippocampal cells in neurobasal/B27. Toxicology. 2006;217:221-7.
26- Fabian D, Vilma M, Diego C, Carine A, Frida L, Fernando C, et al. Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Nauroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. Mol Cell Neurosci. 2007;34:551-61.
Andrew B. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. Neuropharmacology. 2005;48:1086-96.
10- Karalliedde L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. Anesthesia. 1999;54:1073-88.
11- Valavanidis A, Viahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol Environ Saf. 2006;64:178-89.
12- Abou-Donia MB. Organophosphrus ester-induced chronic neurotoxicity. Arch Environ Health. 2003;58:484-97.
13- Goodman GA, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 7th ed. New York: Macmillan Publishing; 1980.
14- Laham S, Long G, Schrader K, Szabo J. Induction of electrophysiological and morphological changes in Sprague-dawley rats, fed tributoxyethyl phosphate. Appl Toxicol. 1984;4:42-8.
15- Lloyd A, Arthur S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Cell Biol. 1976;73:2424-8.
16- Teresa I, Giuseppe E, Ramona E, Rita S, Massimo DR, Angelo A. Neuroprotective effect of cannabidiol: A non-psychoactive component from Cannabis sativa, on β-amyloid induced toxicity in PC12 cells. Neurochemistry. 2004;89:134-41.
17- Clemens S, Marcus S, Christian B, Katharina K, Harald DM, Stefan S, et al. Neuroprotective cannabinoid receptor antagonist SR141716-A prevents down regulation of excitotoxic NMDA receptors in the ischemic penumbra. Acta Neuropathol. 2006;112:277-86.
18- Peter B, Oliver D, Hilmar B. A quantitative method to assess extrasynaptic NMDA receptor function in protective effect of synaptic activity against neurotoxicity. Neuroscience. 2008;11:1-15.
19- Danuta J, Wladyslaw L. Different mechanisms of

Archive of SID

www.SID.ir

Kowsar Medical Journal
Volume 14, Issue 4, Winter 2010
Page: 33

Effect of WIN 55212-2 in Diazinon-induced toxcicity and its interaction with N-methyl-D-aspartate receptor in PC12 cell line

Hashemi M.[*] ***MSc*****, Bahrami F.**[1] ***PhD*****, Asgari A. R.**[2] ***PhD*****, Sahraei H.**[1] ***PhD***

Abstract

Aims. In this study, the protective effect of WIN 55212-2 (CB1 receptor agonist) and its interaction with N-methyl-D-aspartate receptor in diazinon-induced toxcicity in PC12 cells was evalued.

Materials & Methods. In this study, PC12 maintained in DMEM+F12 culture medium supplemented with 10% fetal bovin serum. The cells were treated with diazinon (200 μM) in the presence or absence of WIN 55212-2 (0.1 μM), NMDA (100 μM), AM251 and MK801 (1 μM) in 15 minutes intervals. After 48 hours of exposure, cells viability and morphology were evaluated by MTS kit and invert light microscope, respectively.

Results. Following the exposure of PC12 cells to diazinon (200 μM), a reduction in cell survival was observed ($p<0.001$). Treatment of the cells with WIN 55212-2 (0.1 μM) and NMDA (100 μM) prior to diazinon exposure, significantly elevated cell survival ($p<0.01$). Also, AM 251(1 μM) did not inhibit cell survival increase induced by WIN 55212-2 ($P<0.001$). However, MK801(1 μM) inhibited cell survival increase induced by NMDA ($p<0.001$).

Conclusion. WIN 55212-2 and NMDA protect PC12 cells against diazinon-induced toxicity.

Keywords: WIN 55,212-2, Diazinon, NMD, PC12

Archive of SID

Submission Date: 14/1/2010, Acceptation Date: 27/2/2010

* Correspondence address: Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran mansooreh.hashemi@yahoo.com

1"Applied Neurosciences Research Center" & "Department of Physiology & Biophysics, Faculty of Medicine", Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Department of Physiology & Biophysics, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

www.SID.ir