

Original Article

The Neuroprotective Effect of Cannabinoid Receptor Agonist (WIN55,212-2) in Paraoxon Induced Neurotoxicity in PC12 Cells and N-methyl-D-aspartate Receptor Interaction

Mansoureh Hashemi, M.Sc.^{1,2}, Farideh Bahrami, Ph.D.^{1,2*}, Hedayat Sahraei, Ph.D.^{1,2},
Leila Golmanesh, M.Sc.³, Soheil Sadri, M.Sc.⁴

1. Applied Neurosciences Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Physiology and Biophysics Department, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Fertility and Infertility Research Center, Stem Cell Division, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 19395-6558, Physiology and Biophysics Department, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: farideh_bahrami@yahoo.com

Received: 6/Oct/2009, Accepted: 24/May/2010

Abstract

Objective: Considering that cannabinoids protect neurons against neurodegeneration, in this study, the neuroprotective effect of WIN55,212-2 in paraoxon induced neurotoxicity in PC12 cells and the role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor were evaluated.

Materials and Methods: In this study PC12 cells were maintained in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM+F12) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were treated with paraoxon (200 μ M) in the presence or absence of WIN55,212-2 (0.1 μ M), NMDA receptor agonist NMDA (100 μ M), cannabinoid receptor antagonist AM251 and NMDA receptor antagonist MK801 (1 μ M) at 15 minutes intervals. After 48 hours of exposure, cellular viability and protein expression of the CB1 receptor were evaluated in PC12 cells.

Results: Following the exposure of PC12 cells to paraoxon (200 μ M), a reduction in cell survival and protein level of the CB1 receptor was observed ($p < 0.01$). Treatment of the cells with WIN55,212-2 (0.1 μ M) and NMDA (100 μ M) prior to paraoxon exposure significantly elevated cell survival and protein level of the CB1 receptor ($p < 0.01$). Also, AM251 (1 μ M) did not inhibit the cell survival and protein level of the CB1 receptor increase induced by WIN55,212-2 ($p < 0.001$). However, MK801 (1 μ M) did inhibit cell survival and protein expression of the CB1 receptor increase induced by NMDA ($p < 0.001$).

Conclusion: The results indicate that WIN55,212-2 and NMDA protect PC12 cells against paraoxon induced toxicity. In addition, the neuroprotective effect of WIN55,212-2 and NMDA was cannabinoid receptor-independent and NMDA receptor dependent, respectively.

Keywords: WIN55,212-2, Paraoxon, NMDA, Viability, PC12 Cells

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 183-190

اثر حفاظتی آگونیسست گیرنده کانابینوئیدی (WIN55,212-2) در سمیت ناشی از پاروکسان در سلول‌های PC12 و تداخل گیرنده N-methyl-D- aspartate با این اثر

منصوره هاشمی ^۱M.Sc.، فریده بهرامی ^۲Ph.D.*، هدایت صحرایی ^۳Ph.D.، لیلا گل‌منش ^۴M.Sc.،
سهیل صدری ^۵M.Sc.

۱. دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، تهران، ایران
۴. دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، بخش سلول‌های بنیادی، کرمانشاه، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۵۵۸-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک
پست الکترونیک: [Email: farideh_bahrami@yahoo.co](mailto:farideh_bahrami@yahoo.co)

دریافت مقاله: ۸۸/۷/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۳

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر حفاظتی آگونیسست گیرنده (WIN55,212-2) کانابینوئیدی در سمیت ناشی از پاروکسان در سلول‌های PC12 و نقش گیرنده NMDA در این اثر

* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های رده PC12 در محیط کشت (DMEM+F12) کشت (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) همراه با ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. سلول‌ها با پاروکسان ۲۰۰ میکرومولار در حضور یا فقدان WIN55,212-2 با دوز ۰/۱ میکرومولار، آنتاگونیسست گیرنده کانابینوئیدی (AM251) و آنتاگونیسست گیرنده N-methyl-D-aspartate (NMDA) (MK801) با دوز ۱ میکرومولار و آگونیسست گیرنده NMDA با دوز ۱۰۰ میکرومولار در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه تیمار شدند. بعد از ۴۸ ساعت، درصد بقای سلول‌ها و میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 ارزیابی شد.

* **یافته‌ها:** با در معرض گذاری سلول PC12 با پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار)، کاهش معنی‌داری برای درصد بقای سلول‌ها و میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 مشاهده شد ($p < 0/01$). تیمار سلول‌ها با WIN55,212-2 (دوز ۰/۱ میکرومولار) و NMDA (۱۰۰ میکرومولار) قبل از در معرض گذاری پاروکسان درصد بقای سلول‌ها و میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 را به طور معنی‌داری افزایش داد ($p < 0/01$). هم‌چنین، AM251 با دوز ۱ میکرومولار افزایش درصد بقای سلول‌ها و میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 ایجاد شده توسط WIN55,212-2 را مهار نکرد ($p < 0/001$). اما MK801 با دوز ۱ میکرومولار افزایش درصد بقای سلول‌ها و میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 ایجاد شده توسط NMDA را مهار کرد ($p < 0/01$).

* **نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهند که WIN55,212-2 و NMDA از سلول‌های PC12 در برابر سمیت ناشی از پاروکسان محافظت می‌کنند. به نظر می‌رسد شاید اثر حفاظت نورونی WIN55,212-2 و NMDA به ترتیب مستقل از گیرنده CB1 وابسته به گیرنده NMDA باشد.

* **کلیدواژگان:** آگونیسست گیرنده کانابینوئیدی، پاروکسان، آگونیسست گیرنده NMDA، میزان بقای سلولی، رده سلولی PC12

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۱۹۰-۱۸۳

مقدمه

از رها شدن نوروترانسمیترهای متعدد مثل گلوتامات، گابا و سروتونین می‌باشد (۱، ۴، ۵). کانابینوئیدها پس از فعالیت، توسط آنزیم فتی‌اسید آمید هیدرولاز (Fatty Acid Amid Hydrolase; FAAH) موجود در جسم سلولی نورون پس سیناپسی هیدرولیز می‌شوند (۳). ترکیبات ارگانوفسفره (Organophosphorus; OP) عوامل عصبی هستند که هنوز به عنوان سلاح‌های شیمیایی در حملات جنگی و برای مبارزه با آفات در کشاورزی استفاده می‌شوند. مکانیسم اصلی مسمومیت حاد با ترکیبات ارگانوفسفره مهار آنزیم استیل کولین استراز (آنزیم تجزیه کننده نوروترانسمیتر استیل کولین) است. پس از مهار این آنزیم، مسمومیت کولینرژیک ایجاد می‌شود (۶). علاوه بر اثر کولینرژیک، ترکیبات ارگانوفسفره با تولید رادیکال‌های آزاد، ساختارهای سلولی را پراکسیده می‌کند. رادیکال‌های آزاد تولید شده در مغز باعث کاهش مصرف اکسیژن، پیری و آسیب نورونی می‌شوند (۷). ترکیبات ارگانوفسفره مسمومیت مزمن را ایجاد می‌کند که اختلالات عصبی از جمله: بیماری‌های آلزایمر (۸)، پارکینسون (۹) و

کانابینوئیدها، گروهی از ترکیبات ۲۱ کربنه هستند که از ریشه‌های غده ای گیاهی به نام Cannabis Sativa تهیه می‌شوند. فعال‌ترین شکل این مواد Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) می‌باشد (۱، ۲). سیستم کانابینوئیدی از گیرنده‌های کانابینوئیدی، لیگاند‌های اندوژن و آنزیم‌های بیوسنتز کننده و تجزیه کننده کانابینوئیدی تشکیل شده است (۳). امروزه دو نوع گیرنده کانابینوئیدی CB1 و CB2 را شناسایی کرده‌اند؛ گیرنده‌های CB1 به طور عمده در سیستم عصبی و گیرنده‌های CB2 در طحال، سلول‌های ایمنی و روده وجود دارند. به دنبال شناسایی گیرنده‌های کانابینوئیدی، لیگاند‌های کانابینوئیدی برای این گیرنده‌ها کشف شدند (۱). کانابینوئیدها به عنوان ضد تشنج، آنتی‌اکسیدان، ضد تهوع، ضد سرطان، ضد التهاب و محافظت کننده نورونی (Neuroprotection) عمل می‌کنند (۱، ۳). نقش حفاظت نورونی کانابینوئیدها مربوط به مکانیسم‌های مختلفی مثل مهار کانال‌های کلسیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ و جلوگیری

اثر حفاظتی WIN55,212-2 و تداخل آن با گیرنده N-methyl-D-aspartate

مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، سلول‌ها برای ارزیابی درصد بقا و سنجش بیان پروتئین گیرنده CB1 آماده شدند.

ارزیابی میزان بقای سلول‌ها (Viability Assay)

برای سنجش میزان بقای سلول‌ها از کیت MTS [5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium- inner salt, MTS 3-(4,5-dimethylazol-2-yl)] استفاده شد. به این منظور سلول‌های PC12 با تراکم 1×10^4 سلول در هر خانه ظروف کشت ۹۶ خانه، کشت داده شدند سپس سلول‌ها در معرض تیمارهای مختلف قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت، دو محلول کیت MTS حاوی MTS و Phenazine Methasulfate (PMS) به نسبت ۱:۲۰ در ۶ سی سی محیط کشت DMEM+F12 حل شدند. پس از تخلیه محیط قبلی، ۱۲۰ میکرولیتر از محلول MTS حل شده به هر خانه ظروف کشت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از این مدت، جذب نوری سلول‌های زنده رنگ گرفته توسط دستگاه الایزا این مدت، جذب نوری سلول‌های زنده رنگ گرفته توسط دستگاه الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA) در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شدند.

وسترن بلات

ابتدا برای تهیه هموزن سلولی، سلول‌ها با تراکم تقریباً 1×10^6 در هر خانه ظروف کشت ۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، سلول‌ها دوبار با بافر فسفات (PBS) سرد شسته شدند. سپس با بافر لیز سرد ۲۵ میلی مولار Tris-HCL ۱ میلی مولار EDTA یک درصد تریتون X100، یک میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) و $pH=7.4$ لیز و از ته ظرف جدا شدند. نمونه‌ها به طور جداگانه جمع‌آوری شدند و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در نهایت، مایع رویی که حاوی پروتئین بود برداشته شد. پس از سنجش پروتئین به روش برادفورد (۱۲)، ۱۲ میکروگرم از پروتئین هر نمونه بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد برده شد. پس از مرحله بلات شدن (انتقال پروتئین از ژل به غشای نیتروسولوز)، پروتئین‌ها بر روی غشای نیتروسولوز با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی علیه گیرنده CB1 با رقت ۱:۲۰۰ حاصل از خرگوش یا با آنتی‌بادی اختصاصی علیه بتا-اکتین به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. گیرنده CB1 و پروتئین بتا اکتین توسط آنتی‌بادی اختصاصی اولیه شناسایی شدند و به آنها اتصال یافتند. سپس آنتی‌بادی‌های ثانویه اختصاصی خرگوش متصل Horse Radish Proxidase (HRP) برای شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه گیرنده CB1 و بتا-اکتین با رقت ۱:۱۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. انکوباسیون آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت گرفت. بعد از شست‌وشوی غشای نیتروسولوز، سوبسترای مایع Tetramethylbenzidine (TMB) 3', 5', 3', 5' بر روی غشا اضافه و در اثر واکنش TMB با HRP، باندهای پروتئینی ظاهر شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های مربوط به وسترن بلات با استفاده از نرم افزار Image J به دست آمد. داده‌های وسترن بلات و درصد بقای سلول‌ها به صورت

(MS) Multiple Sclerosis (۱۰) را به همراه دارند. به دنبال این اختلالات، محققان در جستجوی ترکیب موثر در پیشگیری از آسیب نورونی هستند. یک دسته از ترکیباتی که امروزه مورد بررسی قرار می‌گیرد، کانابینوئیدها هستند که شاید در آینده به عنوان حفاظت کننده نورونی مورد استفاده قرار گیرند.

سلول‌های رده PC12 از سلول‌های فتوکروموسیتومای فوق کلیه رت تهیه می‌شوند. با توجه به تحقیقات قبلی به نظر می‌رسد که این سلول‌ها، مدل مناسبی برای مطالعه مشکلات مختلف نورویبولوژی و نوروشیمی باشند (۱۱). از آنجایی که رده سلولی PC12 حاوی گیرنده CB1 می‌باشد، به نظر می‌رسد این سلول‌ها برای بررسی اثر حفاظتی کانابینوئیدها در برابر عوامل ارگانوفسفره مناسب باشند (۱۱). از آنجایی که مطالعه مکانیسم‌های اثر حفاظتی کانابینوئیدها بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است، بر آن شدیم تا علاوه بر اثر محافظتی کانابینوئیدها، تداخل گیرنده N-methyl-D-aspartate (NMDA) با این اثر را در برابر سمیت ناشی از پاروکسان در سلول‌های PC12 مورد ارزیابی قرار دهیم.

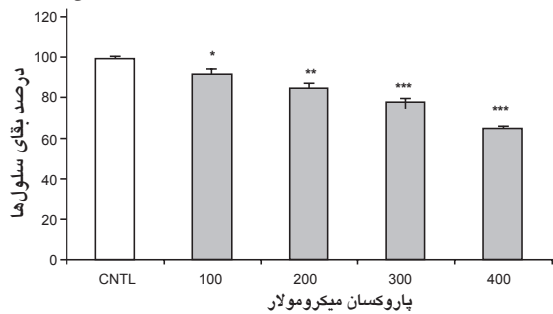
مواد و روش‌ها

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, UK) همراه با افزودنی‌هایی شامل ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum (Gibco, UK) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک آنتی‌مایکوتیک کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. در ابتدا برای تعیین دوز مناسب، سلول‌ها با دوزهای مختلف آگونیست گیرنده CB1 (WIN55,212-2) (Tocris)، آنتاگونیست گیرنده CB1 (AM251) (Tocris) و پاروکسان (Sigma) تیمار شدند. در مرحله بعد سلول‌ها در گروه‌های مختلف به ترتیب زیر تیمار شدند:

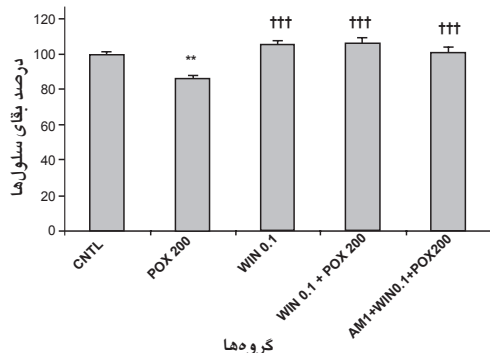
۱. پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار)، ۲. WIN55,212-2 (۰/۱ میکرومولار)، ۳. NMDA [آگونیست گیرنده NMDA (۱۰۰ میکرومولار)، ۴. MK801 [آنتاگونیست گیرنده NMDA (۱ میکرومولار، (Sigma)]، ۵. WIN55,212-2 ۱۵ دقیقه قبل از پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار) (WIN+POX)، ۶. AM251 (۱ میکرومولار) ۱۵ دقیقه قبل از WIN55,212-2 (۰/۱ میکرومولار) و پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار) ۱۵ دقیقه بعد از WIN55,212-2 (۰/۱ میکرومولار) (AM251+WIN+POX)، ۷. NMDA (۱۰۰ میکرومولار) ۱۵ دقیقه قبل از پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار) (NMDA+POX)، ۸. MK801 (۱ میکرومولار) ۱۵ دقیقه قبل از NMDA (۱۰۰ میکرومولار) و پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار) ۱۵ دقیقه بعد از NMDA (MK+NMDA+POX)، ۹. به ترتیب WIN55,212-2 (۰/۱ میکرومولار)، NMDA (۱۰۰ میکرومولار)، و پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار) در فواصل ۱۵ دقیقه اضافه شدند (WIN+NMDA+POX)، ۱۰. به ترتیب WIN55,212-2 (۰/۱ میکرومولار)، NMDA (۱۰۰ میکرومولار)، MK801 (۱ میکرومولار) و پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار) در فواصل ۱۵ دقیقه اضافه شدند (WIN+NMDA+MK+POX)، ۱۱. به ترتیب WIN55,212-2 (۰/۱ میکرومولار)، MK801 (۱ میکرومولار)، NMDA (۱۰۰ میکرومولار) و پاروکسان (۲۰۰ میکرومولار) در فواصل ۱۵ دقیقه اضافه شدند (WIN+MK+NMDA+POX). در ادامه سلول‌ها به

در قسمت سوم مطالعه هدف اصلی، یافتن دوز مناسب پاروکسان بود. طبق نتایج حاصل دوز ۲۰۰ میکرو مولار پاروکسان درصد بقای سلول را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($p < 0.01$). بدین ترتیب این دوز با کاهش ۱۵ درصدی بقای سلولی در ادامه آزمایش به عنوان دوز مناسب مورد استفاده قرار گرفت؛ (درصد بقای سلول در دوز ۱۰۰ میکرو مولار پاروکسان ۹۲ درصد و دوز ۲۰۰ میکرو مولار پاروکسان ۸۵ درصد، دوز ۳۰۰ میکرو مولار ۷۸ درصد و دوز ۴۰۰ میکرو مولار ۶۵ درصد (شکل ۳)).



شکل ۳: اثر دوزهای مختلف پاروکسان بر درصد بقای سلولهای PC12 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون *** و ** به ترتیب نشان دهنده $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل ($n=6$).

اثر توأم کانابینوئیدها با پاروکسان بر درصد بقای سلولهای PC12 نتایج بقای سلولها در هنگامی که سلولها با WIN55,212-2 ۱۵ دقیقه قبل از پاروکسان تیمار شدند، نشان داد که در گروه WIN55,212-2 همراه با پاروکسان درصد بقای سلولهای PC12 در مقایسه با گروه پاروکسان به طور معنی داری افزایش می یابد ($p < 0.001$). برای تعیین اینکه آیا اثر حفاظتی WIN55,212-2 از طریق گیرنده CB1 انجام می شود؟ دوز ۱ میکرو مولار AM251 (آنتاگونیست گیرنده CB1) در گروه دیگری مورد بررسی قرار گرفت. در این گروه سلولهای PC12 با AM251، ۱۵ دقیقه قبل از WIN55,212-2 و پاروکسان ۱۵ دقیقه بعد از WIN55,212-2 تیمار شدند. نتایج نشان داد که اثرات حفاظتی WIN55,212-2 توسط AM251 مهار نمی شود ($p < 0.001$). بنابراین به نظر می رسد که اثر حفاظتی WIN55,212-2 ممکن است از طریق گیرنده دیگری علاوه بر گیرنده CB1 باشد (شکل ۴).

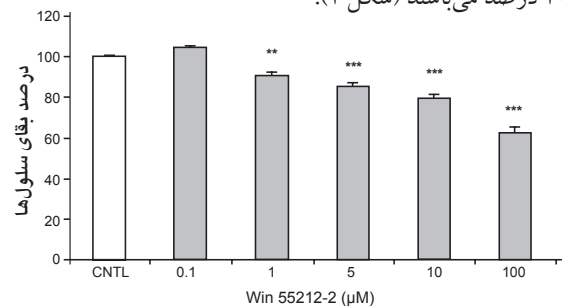


شکل ۴: اثر توأم کانابینوئیدها با پاروکسان بر درصد بقای سلولهای PC12. WIN55,212-2، ۱۵ دقیقه قبل از پاروکسان به محیط کشت اضافه شد (WIN+POX) و در گروه دیگر AM251، ۱۵ دقیقه قبل از WIN و پاروکسان ۱۵ دقیقه بعد از WIN به محیط کشت اضافه شدند (AM+WIN+POX). در نهایت سلولهای تیمار شده ۴۸ ساعت انکوبه شدند. *** نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. ++ نشان دهنده $p < 0.01$ در مقایسه با گروه پاروکسان ($n=6$).

میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه شد و از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و با استفاده از تست Tukey برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروهها استفاده شد. تفاوت های با $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

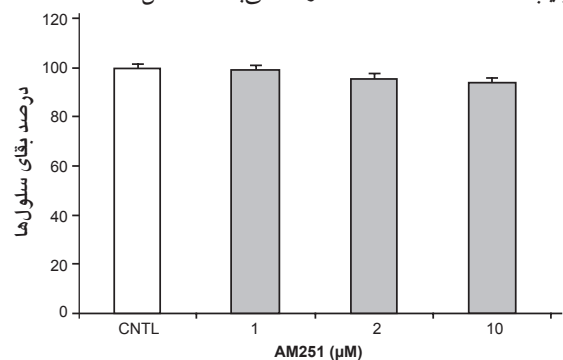
یافته ها

اثر AM251، WIN55,212-2 و پاروکسان بر درصد بقای سلولها در قسمت اول برای اینکه دوز - پاسخ WIN55,212-2 را تعیین کنیم. سلولهای PC12 با دوزهای مختلف ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار WIN55,212-2 تیمار شدند. نتایج نشان داد که دوزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار WIN55,212-2 اثر سمی دارند و منجر به کاهش درصد بقای سلولهای PC12 می شوند ($p < 0.001$). اما دوز ۰/۱ میکرومولار WIN55,212-2 نه تنها خاصیت سمی نشان نداد، بلکه درصد بقای سلولهای PC12 را افزایش داد. هر چند این افزایش معنی دار نیست. بنابراین در ادامه آزمایش از دوز ۰/۱ میکرومولار به عنوان دوز پیشنهادی برای حفاظت نورونی استفاده شد، درصد بقای سلولها در دوزهای ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۱۰۰، ۱، ۵، ۱۰، ۶۳، ۸۰، ۸۵ و ۹۱ درصد می باشد (شکل ۱).



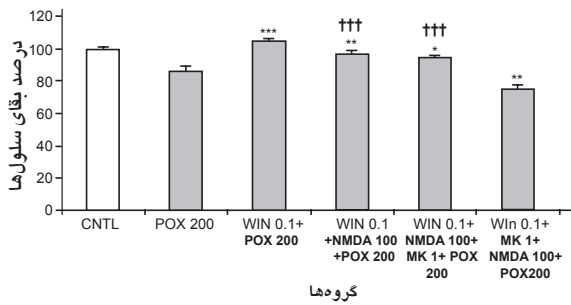
شکل ۱: اثر دوزهای مختلف آگونیست گیرنده CB1 (WIN55,212-2) بر درصد بقای سلولهای PC12 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون *** و ** به ترتیب نشان دهنده $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل ($n=6$).

در قسمت دوم، سلولهای PC12 برای تعیین دوز پاسخ آنتاگونیست گیرنده CB1 (AM251) با دوزهای مختلف ۱۰ و ۱ میکرومولار تیمار شدند. درصد بقای سلولهای PC12 با افزایش دوز AM251 کاهش یافت. در نتیجه، دوز پاسخ مناسب برای ادامه کار دوز ۱ میکرو مولار انتخاب شد؛ (درصد بقای سلول در دوزهای ۱، ۲، ۱۰ میکرو مولار به ترتیب ۹۳/۸۲، ۹۵/۸۲، ۹۹/۱۳ درصد می باشد (شکل ۲)).

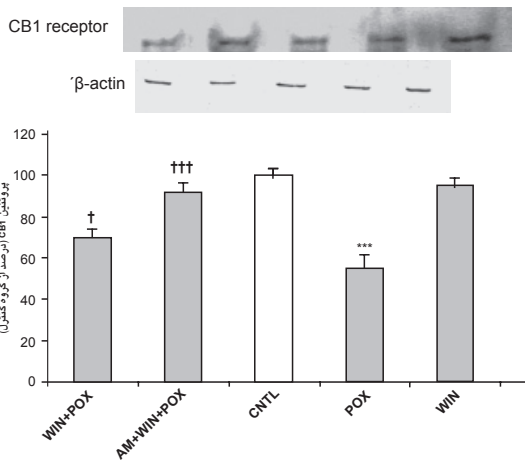


شکل ۲: اثر دوزهای مختلف آنتاگونیست گیرنده CB1 (AM251) بر درصد بقای سلولهای PC12 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون ($n=6$).

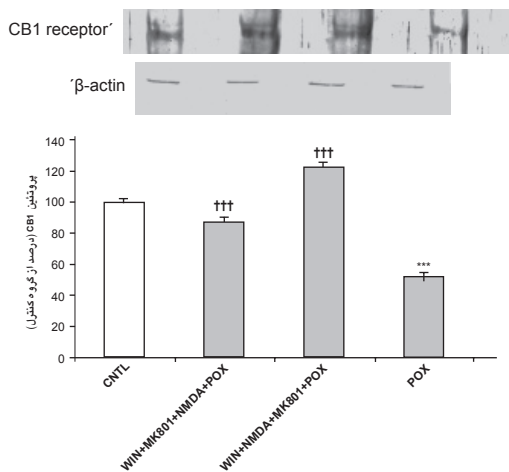
اثر حفاظتی WIN55,212-2 و تداخل آن با گیرنده N-methyl-D-aspartate



شکل ۶: اثر تداخل کانابینوئیدها با NMDA بر درصد بقای سلول‌های PC12. در گروه‌های مختلف داروهای فواصل ۱۵ دقیقه‌ای به محیط کشت اضافه شدند و در نهایت سلول‌های تیمار شده ۴۸ ساعت انکوبه شدند. *، ** و *** به ترتیب نشان دهنده $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه پاروکسان. ††† نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه WIN+MK801+NMDA+POX. (n=۶)

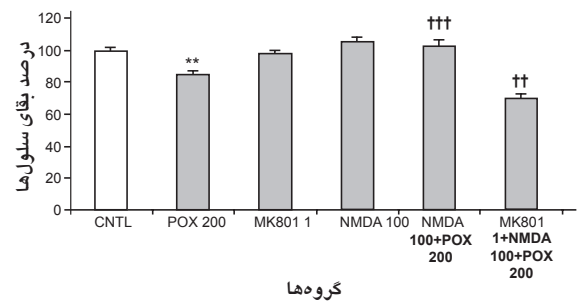


شکل ۷: آنالیز وسترن بلات گیرنده CB1 در هنگام اثر توام کانابینوئیدها با پاروکسان در سلول‌های PC12. *** نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. ††† و † به ترتیب نشان دهنده $p < 0.001$ و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه پاروکسان. (n=۶)



شکل ۸: آنالیز وسترن بلات گیرنده CB1 در هنگام اثر توام WIN55,212-2 با NMDA در سلول‌های PC12. *** نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. ††† نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه پاروکسان. (n=۶)

اثر توأم NMDA با پاروکسان بر درصد بقای سلول‌های PC12
نتایج بقای سلول‌ها در هنگامی که سلول‌ها با NMDA ۱۵ دقیقه قبل از پاروکسان تیمار شدند، نشان داد که در گروه NMDA همراه با پاروکسان درصد بقای سلول‌های PC12 در مقایسه با گروه پاروکسان به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p < 0.001$). برای تعیین اینکه آیا اثر حفاظتی NMDA از طریق گیرنده NMDA انجام می‌شود؟ دوز ۱ میکرو مولار MK801 (آنتاگونیست گیرنده NMDA) در گروه دیگری مورد بررسی قرار گرفت. در این گروه سلول‌های PC12 با MK801، ۱۵ دقیقه قبل از NMDA و پاروکسان ۱۵ دقیقه بعد از NMDA تیمار شدند. نتایج نشان داد که اثرات حفاظتی NMDA توسط MK801 مهار می‌شود ($p < 0.01$). بنابراین به نظر می‌رسد که اثر حفاظتی NMDA ممکن است از طریق گیرنده انجام شود (شکل ۵).



شکل ۵: اثر توأم NMDA با پاروکسان بر درصد بقای سلول‌های PC12. NMDA ۱۵ دقیقه قبل از پاروکسان به محیط کشت اضافه شد (NMDA+POX) و در گروه دیگر MK801، ۱۵ دقیقه قبل از NMDA و پاروکسان ۱۵ دقیقه بعد از NMDA به محیط کشت اضافه شدند (MK+NMDA+POX). در نهایت سلول‌های تیمار شده ۴۸ ساعت انکوبه شدند. ** نشان دهنده $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل. †† و ††† به ترتیب نشان دهنده $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه پاروکسان. (n=۶)

اثر تداخل WIN55,212-2 با NMDA بر درصد بقای سلول‌های PC12
نتایج تداخل NMDA با WIN55,212-2 نشان می‌دهد در گروه WIN+NMDA+MK801+POX سلول‌ها به ترتیب در فواصل ۱۵ دقیقه‌ای تیمار شدند. همچنین در گروه دیگری WIN+NMDA+POX سلول‌ها به ترتیب با در فواصل ۱۵ دقیقه‌ای تیمار شدند. درصد بقای سلولی در این دو گروه در مقایسه با دو گروه پاروکسان و WIN+MK801+NMDA+POX به طور معنی‌داری افزایش یافتند ($p < 0.01$). اما در گروهی که سلول‌ها با WIN+MK801+NMDA+POX در فواصل ۱۵ دقیقه‌ای تیمار شدند، درصد بقای سلولی نسبت به پاروکسان کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$) (شکل ۶).

اثر توأم کانابینوئیدها با پاروکسان بر میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 سلول‌های PC12
نتایج وسترن بلات نشان داد که پاروکسان میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد ($p < 0.001$). اما WIN55,212-2 نسبت به گروه کنترل تفاوتی را نشان نمی‌دهد. میزان بیان پروتئین گیرنده CB1 در دو گروه WIN+POX و AM+WIN+POX به طور معنی‌داری نسبت به گروه پاروکسان افزایش یافت ($p < 0.001$) (شکل ۷).

اثر توأم WIN55,212-2 با NMDA بر میزان پروتئین گیرنده CB1 سلول‌های PC12

نتایج نشان داد که گروه‌های تداخل WIN55,212-2 با NMDA نسبت به گروه پاروکسان به طور معنی‌داری افزایش یافته‌اند ($p < 0.001$) (شکل ۸).

بحث

در این مطالعه، اثر احتمالی حفاظت نورونی WIN55,212-2 و تداخل NMDA در برابر سمیت ناشی از پاروکسان بررسی شد. برای مطالعه این ویژگی، از سلول‌های رده PC12 (فتوکروموسیتوما) استفاده شده است؛ زیرا همان طور که در مقدمه گفته شد این سلول‌ها مدل مناسبی برای مطالعات اثر حفاظتی WIN55,212-2 در برابر سمیت عوامل ارگانوفسفره می‌باشند. نتایج فوق نشان می‌دهد که درصد بقای سلول‌ها در دوزهای ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار پاروکسان به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابند. با توجه به اینکه سلول در دوزهای بالای پاروکسان (۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) دچار مرگ سلولی از نوع نکروز می‌شوند (۱۳)، بنابراین دوز ۲۰۰ میکرومولار پاروکسان به عنوان دوز مناسب انتخاب شد. همچنین هنگامی که دوزهای مختلف WIN55,212-2 بررسی شد، در دوزهای بالای WIN55,212-2 سلول‌ها دچار مرگ و میر شدند در حالی که WIN55,212-2 با دوز ۰/۱ به نظر می‌رسد اثر حفاظت‌کنندگی در سلول ایجاد کند. در ادامه بررسی، هنگامی که سلول‌های PC12 با دوز ۰/۱ میکرومولار WIN55,212-2 همراه با پاروکسان تیمار شدند، درصد بقای این سلول‌ها افزایش یافت (حدود ۲۰ درصد) که به نظر می‌رسد WIN55,212-2 با دوز ۰/۱ میکرومولار اثر حفاظتی از خود نشان می‌دهد. جی‌اچ‌ن و همکاران، دوزهای مختلف WIN55,212-2 (۰/۱ تا ۱۰۰ میکرومولار) را در سلول‌های رده AF5 بررسی کردند. با افزایش دوز WIN55,212-2 درصد بقای سلول‌ها کاهش یافت. در حالی که دوزهای پایین WIN55,212-2 در برابر سمیت NMDA اثر حفاظتی ایجاد کردند (۱۴).

علاوه بر این لوون و همکاران نتیجه مشابهی را در سلول‌های رده PC12 به دست آوردند و هنگامی که این سلول‌ها در معرض سم بتا-آمیلوئید قرار گرفتند، توسط (آگونیست گیرنده CB1 Cannabidiol) حفاظت شدند (۲). دیرنگل و همکاران گزارش کردند که دوزهای بالای کانابینوئیدها منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز می‌شوند. با فعالیت این آنزیم‌ها رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند که در نهایت پراکسیداسیون لیپیدی و مرگ سلولی را در پی دارند (۱۵).

در ادامه بررسی‌ها، سلول‌ها با AM251 (آنتاگونیست گیرنده CB1) همراه با WIN55,212-2 و پاروکسان تیمار شدند. این کار برای تعیین این نکته که آیا اثر حفاظتی دیده شده از WIN55,212-2 به دلیل تحریک گیرنده CB1 بوده است یا خیر؟ انجام شد. یافته‌ها نشان داد که در حضور AM251 همراه با WIN55,212-2 و پاروکسان درصد بقای سلول‌ها کم نشد. بنابراین در مطالعه حاضر، یکی از دلایل مستقل از گیرنده عمل کردن اثر حفاظتی WIN55,212-2، می‌تواند مقدار کم گیرنده CB1 در سلول‌های PC12 تمایز نیافته باشد (۱۶) یا اینکه اثر حفاظتی WIN55,212-2 ممکن است از طریق مسیر یا مسیرهای دیگری غیر از گیرنده CB1 باشد. دو مکانیسم احتمالی برای توجیه عملکرد

مستقل کانابینوئیدها از گیرنده‌هایشان ارایه شده است که شامل:

۱. اثر مستقیم کانابینوئیدها بر کانال‌های کلسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ

۲. اثر بر سیالیت و سایر ویژگی‌های فیزیوشیمیایی غشا یافته‌های اخیر پیشنهاد می‌کنند که کانابینوئیدها بیشتر اثر تعدیل‌کنندگی خود را از طریق اثر مستقیم بر کانال‌های کلسیمی اعمال می‌کنند (۱۷).

در این مطالعه، میزان بیان گیرنده کانابینوئیدی CB1 در سلول‌های PC12 ارزیابی شد. هنگامی که سلول‌های PC12 در معرض پاروکسان قرار گرفتند، میزان تراکم باند نسبت به کنترل کاهش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد پاروکسان با کاهش بیان پروتئین گیرنده CB1 و بلوک گیرنده CB1 سمیت خود را القا کرده است (۱۸).

در گروهی که WIN55,212-2 به تنهایی استفاده شد، تراکم باند به طور تقریب هم‌اندک کنترل است. به نظر می‌رسد WIN55,212-2 در بیان گیرنده CB1 هیچ تغییری ایجاد نمی‌کند. نتیجه مشابهی جی‌اچ‌ن و همکاران در سلول‌های AF5 گرفته بودند (۱۴). از طرفی WIN55,212-2 همراه با پاروکسان بیان گیرنده CB1 را به طور معنی‌داری نسبت به پاروکسان افزایش داد. بنابراین WIN55,212-2 می‌تواند یا از طریق افزایش بیان گیرنده CB1 (۱۹) یا مهار بلوک گیرنده CB1 توسط پاروکسان (۱۸) عمل کرده باشد. با توجه به نتایج مطالعه فرناندز لویز و همکاران (۱۹) می‌توان نتیجه گرفت که WIN55,212-2 به تنهایی اثری در افزایش بیان گیرنده CB1 ندارد اما هنگامی که همراه با پاروکسان استفاده می‌شود، WIN55,212-2 اثر سمیت پاروکسان را کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد که سیستم کانابینوئیدی در برابر محرک‌های آسیب‌زا مثل سموم و آسیب‌های مغزی وارد عمل می‌شود.

در گروهی که سلول‌ها در معرض WIN55,212-2، AM251 و پاروکسان قرار گرفتند. شاهد نکته جالبی هستیم. به ظاهر AM251 آنتاگونیست گیرنده CB1 نه تنها اثر برگرداننده WIN55,212-2 در بلوک گیرنده توسط پاروکسان را مهار نمی‌کند بلکه بیان گیرنده را نسبت به گروه ترکیبی WIN55,212-2 با پاروکسان افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد AM251 همانند یک آگونیست نسبی عمل کرده باشد (۲۰). این نتیجه در راستای عدم تاثیر AM251 در بازگرداندن اثر محافظتی WIN55,212-2 در سنجش درصد بقای سلول‌ها می‌باشد. زیرا AM251 با وجود اینکه یک آنتاگونیست گیرنده CB1 است، نتوانست اثرات WIN55,212-2 را معکوس نماید. شاید AM251 از طریق تداخل با سایر عناصر غشایی رفتار خاصی از خود به نمایش می‌گذارد.

با توجه به بررسی‌های انجام شده قبلی، گلوتامات مرگ سلولی و اختلالات عصبی ایجاد می‌کند. امروزه ثابت شده است که فعالیت گیرنده‌های NMDA در تمایز و بقای سلول‌های عصبی نیز نقش دارند (۶). علاوه بر این، نشان داده شده است که NMDA (آگونیست گیرنده NMDA) در دوزهای پایین (۱۰۰ میلی‌مولار) اثر حفاظتی برای سلول‌های عصبی ایجاد می‌کنند (۲۱). بنابراین در ادامه این مطالعه، درصد بقای سلول‌ها در هنگام تداخل اثر NMDA با پاروکسان را ارزیابی کردیم. نتایج حاصل از سنجش درصد بقای سلول‌ها نشان داد که NMDA همراه با سمیت پاروکسان از سلول‌های PC12 محافظت می‌کند.

است. هم‌چنین در سیستم عصبی بین گیرنده‌های NMDA و CB1 تداخل عمل وجود دارد (۲۴). بوسیا و همکاران در تحقیق خود مشاهده کردند که در سلول‌های هیپوکامپ گیرنده‌های گلوتاماتی از نوع $mGlu1\alpha$ و CB1 در جایگاه‌های نزدیک به هم قرار دارند. این تحقیق می‌تواند تاییدی برای نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر باشد (۲۵).

نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کلی، این تحقیق نشان داد که WIN55,212-2 با توجه به دوز، سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. دوز کم WIN55,212-2 اثر حفاظتی در برابر سمیت پاروکسان دارد. هم‌چنین به نظر می‌رسد اثر حفاظتی در این تحقیق با بررسی بیان گیرنده CB1 و کاربرد آنتاگونیست گیرنده CB1 (AM251) می‌تواند از طریق گیرنده نباشد بلکه احتمال دارد این اثر از طریق سایر مکانیسم‌ها از جمله مهار کانال‌های کلسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ حاصل شود. در صورتی که NMDA اثر حفاظتی‌اش را از طریق گیرنده اعمال کرده است و بین اثر WIN55,212-2 و NMDA در عمل حفاظت سلولی تداخل وجود دارد. بنابراین، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای برای شروع کارهای دقیق‌تر و گسترده‌تری در این زمینه باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه‌های مربوط به این تحقیق توسط دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی پرداخت شد. لذا از همکاری این مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Grotenhermen F. Cannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; 4(5): 507-530.
- Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem.* 2004; 89(1): 134-141.
- Svízenská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 90(4): 501-511.
- Pazos MR, Núñez E, Benito C, Tolón RM, Romero J. Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81(2): 239-247.
- Maejima T, Ohno-Shosaku T, Kano M. Endogenous cannabinoid as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci Res.* 2001; 40(3): 205-210.
- Wu X, Tian F, Okagaki P, Marini AM. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors increases paraoxon-induced apoptosis in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 208(1): 57-67.
- Kessiova M, Alexandrova A, Georgieva A, Kirkova M, Todorov S. In vitro effects of CB1 receptor ligands on lipid peroxidation and antioxidant defense systems in the rat brain. *Pharmacol Rep.* 2006; 58(6): 870-875.
- Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection me-

دی بررسی انجام شده که بنگتسون و همکاران گزارش شد که گیرنده‌های NMDA با توجه به جایگاه‌شان نسبت به سیناپس می‌تواند اثر حفاظتی یا آسیب‌نورونی ایجاد کند (۲۲).

مکانیسم‌های حفاظتی مختلفی برای اثر حفاظتی NMDA معرفی شده است. از جمله می‌توان به مکانیسم وابسته به کلسیم، تحریک تولید BDNF، مهار مسیر آپوپتوزی JNK، فعالیت مسیرهای حیات سلول (MAPK/ERK1/2, PI3-K/Akt, PKA/CREB, NFκB) اشاره کرد (۲۳).

در این مطالعه هنگامی که سلول‌ها با MK801 قبل از NMDA تیمار شدند، درصد بقای سلول‌ها کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد، هنگامی که جلوی عملکرد NMDA توسط MK801 گرفته شد. سمیت القا شده به تنهایی حتی بیشتر از پاروکسان بوده است. این نتیجه می‌تواند ناشی از حذف اثرات محافظتی NMDA باشد. طی تحقیق ویو و همکاران، اثر حفاظتی NMDA در سلول‌های گرانول مغزی در معرض پاروکسان بررسی شد؛ آنها مهار آنزیم Caspase 3 توسط NMDA را مسئول اثر حفاظتی در سلول‌های گرانول مغزی معرفی کردند (۶).

در نهایت درصد بقای سلول‌ها و میزان بیان گیرنده CB1 در هنگام تداخل اثر WIN55,212-2 با NMDA ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در هنگام تداخل WIN55,212-2 با NMDA درصد بقای سلول‌ها و میزان بیان گیرنده CB1 نسبت به پاروکسان افزایش می‌یابد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد در عمل محافظتی سلولی بین سیستم‌های گلوتاماتی و کانابینویدی تداخل وجود دارد. فرارو و همکاران در تحقیق خود نتیجه گرفتند که گلوتامات برای تکثیر، رشد و تکامل سلول‌های عصبی در دوره جنینی لازم

diated by blockade of microglial activation. *J Neurosci.* 2005; 25(8): 1904-1913.

9. García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.* 2007; 1134(1): 162-170.

10. Docagne F, Muñetón V, Clemente D, Ali C, Loria F, Correa F, Hernangómez M, Mestre L, Vivien D, Guaza C. Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Mol Cell Neurosci.* 2007; 34(4): 551-561.

11. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73(7): 2424-2428.

12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.

13. Yousefpour M, Bahrami F, Shahsavani behboodi B, Khoshbaten A, Asgari A. Paraoxon-induced ultrastructural growth changes of rat cultured hippocampal cells in neurobasal/B27. *Toxicology.* 2006; 217: 221-227.

14. Chen J, Lee C, Errico S, Deng X, Cadet JL, Freed WJ. Protective effects of Δ9-tetrahydrocannabinol against N-methyl-D-aspartate-induced AF5 cell death. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 134: 215-225.

15. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999; 22(9): 391-397.
16. Molderings GJ, Bonisch H, Hammermann R, Gothert M, Bruss M. Noradrenaline release-inhibiting receptors on PC12 cells devoid of alpha2 and CB(1) receptors: similarities to presynaptic imidazoline and edg receptors. *Neurochem Int.* 2002;40:157-167.
17. Murat Oz. Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: focus on endocannabinoids. *Pharmacol Ther.* 2006; 111 (1): 114-144.
18. Nallapaneni A, Liu J, Karanth S, Pope C. Modulation of paraoxon toxicity by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *Toxicology.* 2006; 227(1-2): 173-183.
19. Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Nuñez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, and Lizasoain I. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr. Res.* 2006; 60: 169-173.
20. Sommer C, Schomacher M, Berger C, Kuhnert K, Müller HD, Schwab S, Schäbitz WR. Neuroprotective cannabinoid receptor antagonist SR141716-A prevents downregulation of excitotoxic NMDA receptors in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol.* 2006; 112(3): 277-286.
21. Bahrami F, Yousefpour M, Mehrani H, Golmanesh L, Sadraee SH, Khoshbaten A, Asgari A. Type of cell death and the role of acetylcholinesterase activity in neurotoxicity induced by paraoxon in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Biol Hung.* 2009; 60(1): 1-13.
22. Bengtson CP, Dick O, Bading H. A quantitative method to assess extrasynaptic NMDA receptor function in the protective effect of synaptic activity against neurotoxicity. *BMC Neurosci.* 2008; 24(9): 11.
23. Jantas D, Lason W. Different mechanisms of NMDA-mediated protection against neuronal apoptosis: a stimuli-dependent effect. *Neurochem Res.* 2009; 34(11): 2040-2054.
24. Ferraro L, Tomasini MC, Beggiato S, Gaetani S, Cassano T, Cuomo V, Amoroso S, Tanganelli S, Antonelli T. Short- and long-term consequences of prenatal exposure to the cannabinoid agonist WIN55,212-2 on rat glutamate transmission and cognitive functions. *J Neural Transm.* 2009; 116(8): 1017-1027.
25. Boscia F, Ferraguti F, Moroni F, Annunziato L, Pellegrini-Giampietro DE. mGlu1alpha 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(4): 428-439.