بررسی اثر سیستم کانابینوییدی اندوژن بر عملکرد عصبی بافت کورپوس کاورنوزوم دستگاه تناسلی خارجی موشهای صحرایی نر

مهدی قاسمی I

حامد صادقی‌پور رودسری I

دکتر احمدرضا دهپور II

***دکتر حمیدرضا صادقی‌پور رودسری** III

چکیده

زمینه و هدف: اگر چه بررسی‌ها نشان داده‌اند که اندوکانابینوییدها اثراتی مرکزی بر نعوظ دارند، ولی اثر محیطی آنها بر نعوظ نامشخص می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر آناندامايد(یک کانابینوییدِ اندوژن) بر پاسخ‌های شل شدگی القاء شده با تحریک اعصاب غیرآدرنرژیک غیر کولینرژیک(Non adrenergic Non cholinergic=NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم(بافت حیاتی در ایجاد نعوظ) موشهای صحرایی نر بوده است.

روش بررسی: کورپوس کاورنوزوم موشها بعد از جدا شدن توسط دایسکت دقیق و گذاشتن در حمام ارگان استاندارد اکسیژنه و حاوی آتروپین(۱ میکرومول) و گوانتیدین(۵ میکرومول)(به ترتیب جهت بلوک کولینرژیک و آدرنرژیک) و به دنبال ایجاد انقباض توسط ۷/۵ میکرومول فنیل‌افرین، توسط تحریک الکتریکی در فرکانس‌های ۲، ۵، ۱۰و ۱۵ هرتز، دچار شل شدگی شدند و نتایج توسط دستگاه الکتروفیزیوگراف ثبت گردید. آناندامايد(۱و ۳ میکرومول در گروه‌های مجزا)، ۲۰ دقیقه قبل از تحریکات الکتریکی به حمام ارگان اضافه شد. در گروه‌های مجزای دیگر، هر یک از آنتاگونیست‌های اختصاصی رسپتورهای CB_1(یک میکرومول AM251)، CB_2(یک میکرومول AM630) و وانیلوییدی(۳ میکرومول کاپسازپین)، ٤٥ دقیقه قبل از آناندامايد(یک میکرومول) به حمام اضافه شدند. همچنین، وجود رسپتورهای کانابینوییدی و وانیلوییدی در این بافت توسط روش وسترن بلات ارزیابی شد. هر گروه شامل ٦ حیوان بود. نوع مطالعه به صورت تجربی(Experimental) بوده و تحلیل آماری داده‌ها به وسیله آنالیز یکطرفه واریانس(ANOVA) متعاقب Newman-Keuls as post-hoc test انجام شد و $P<0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به NANC در بافت کورپوس به طور معنی‌داری($P<0/01$) در حضور آناندامايد(۱و ۳ میکرومول) افزایش یافتند. اثر تقویت کننده آناندامايد بر پاسخ‌های NANC در حضور AM251(یک میکرومول) و کاپسازپین(۳ میکرومول) اما نه با AM630(یک میکرومول)، به طور معنی‌داری($P<0/01$) کاهش یافت. همچنین، مهار کننده آنزیم نیتریک اکساید سنتاز[یک میکرومول L-NAME(N^w-Nitro-L-Arginine Methylester)]، به طور معنی‌داری($P<0/001$) پاسخ‌های شل شدگی را در حضور یا غیاب آناندامايد مهار کرد. اگر چه ۳۰ نانومول L-NAME اثری بر پاسخ‌های NANC نداشت، به طور معنی‌داری($P<0/01$) اثر تقویت کننده آناندامايد را بر پاسخ‌های NANC کاهش داد. همچنین، آناندامايد اثری بر پاسخ‌های شل شدگی توسط دوزهای مختلف نیتروپروسایدسدیم(یک میکرومول و ۱۰ نانومول) نداشت. وسترن بلات بافت کورپوس کاورنوزوم نشان داد که پروتئین رسپتورهای CB_1 و VR_1(اما نه CB_2) در این بافت وجود دارند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که آناندامايد(یک اندوکانابینوییدِ) باعث افزایش پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم موشهای صحرایی نر از طریق هر یک از رسپتورهای CB_1 و وانیلوییدی VR_1 می‌شود. به نظر می‌رسد که در این اثر، مسیر نیتریک اکساید درگیر باشد. همچنین، در این مطالعه نشان داده شد که رسپتورهای CB_1 و VR_1 در این بافت وجود دارند.

کلیدواژه‌ها: ۱ – کانابینوییدها ۲ – اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک(NANC) ۳ – نیتریک اکساید ۴ – بافت کورپوس کاورنوزوم ۵ – موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۲۸، تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۵

I) دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران، تهران، ایران.

II) استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران، تهران، ایران.

III) استاد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، خیابان ١٦ آذر، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

هزاران سال است که کانابینوییدها به وسیله بشر استفاده می‌شوند.[۱] امروزه، مطالعات فارماکولوژیک و مولکولی حداقل دو نوع از رسپتورهای کانابینوییدی را به نامهای CB_1 و CB_2 مشخص ساخته‌اند.[۱و ۲] رسپتورهای CB_1 کانابینوییدی عمدتاً در مغز و نیز در سیستم عصبی محیطی وجود دارند، در حالی که رسپتورهای کانابینوییدی CB_2 عمدتاً در بافتهای محیطی و در ارتباط با سیستم ایمنی می‌باشند.[۳و ٤] همانند مورفین، کشف رسپتورهایی برای کانابینوییدهای اگزوژن این احتمال را که ممکن است در بدن، کانابینوییدهای اندوژن وجود داشته باشند، بالا برد. نخستین لیگاند کانابینوییدی که جداسازی شد، آراشیدونیل اتانولامین(Arachydonylethanolamine) بود که به نام آناندامايد(Anandamide) معروف شد.[۵و ٦] اخیراً نیز نشان داده شده است که رسپتورهای وانیلوییدی بر روی اعصاب حسی دور عروقی، ممکن است نقش مهمی را در پاسخ‌های عروقی به آناندامايد ایفا نمایند.[۷و ۸]

برخی بررسی‌ها نشان داده‌اند که تجویز کانابینوییدهای اندوژن و اگزوژن در کنار اثرات متعدد بر سیستم‌های مختلف بدن، بر نعوظ آلت تناسلی خارجی(Penile Erection) و رفتار جنسی(Sexual behavior) نیز اثر می‌گذارند.[۹و ۱۰] گزارش شده است که آنتاگونیست رسپتور CB_1(SR141716A) قادر است که پاسخ‌های نعوظ آلت تناسلی به آپومورفین در موشهای صحرایی را تقویت نماید.[۱۱] همچنین، اخیراً نشان داده شده است که رسپتورهای کانابینوییدی CB_1 در هسته پاراونتریکولار ممکن است عملکرد نعوظ و فعالیت جنسی را احتمالاً با تنظیم نورون‌های اکسی‌توسینرژیک میانجی‌گری کننده عملکرد نعوظ تحت تاثیر قرار دهند.[۱۲] هر چند مطالعات اخیر پیشنهاد کرده‌اند که کانابینوییدها ممکن است از طریق یک مکانیسم مرکزی بر عملکرد جنسی اثر داشته باشند، اثر محیطی کانابینوییدها بر عملکرد نعوظ همچنان مبهم باقی مانده است.

شل شدگی عضله صاف بافت کورپوس کاورنوزوم جهت القاء و نگهداشتن حالت نعوظ، مهم و حیاتی می‌باشد. بخوبی شناخته شده است که نیتریک اکساید(Nitric oxide=NO) که از اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک (NANC) واقع در بافت کورپوس کاورنوزوم آزاد می‌شود، مهم‌ترین میانجی عصبی در شل‌شدگی عضله صاف بافت کورپوس کاورنوزوم است.[۱۳و ۱٤] به نظر می‌رسد که NO عصبی که به وسیله آنزیم سنتز کننده NO عصبی(neuronal =nNOS NOS) تولید می‌شود، مهم‌ترین عامل مسؤول برای شل شدگی فوری بافت کورپوس کاورنوزوم و عروق آلتی باشد.[۱۵]

هدف مطالعه حاضر، ارزیابی اثر آناندامايد(یک کانابینویید اندوژن) بر پاسخ‌های شل شدگی وابسته به تحریک اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم موشهای صحرایی نر بود. در این مطالعه همچنین درگیری احتمالی رسپتورهای کانابینوییدی CB_1 و CB_2 و وانیلوییدی VR_1 در تغییرات مرتبط به آناندامايد در پاسخ‌های شل شدگی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، بیان پروتئین هر یک از این رسپتورها در بافت کورپوس کاورنوزوم به وسیله روش وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

رتهای نر Sprague-Dawely(انستیتو پاستور ایران) با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در طول مطالعه استفاده شدند. حیوانات در یک اتاق با کنترل نور کافی با سیکل شبانه‌روزی ۱۲ ساعته نگهداری می‌شدند و به آنها غذا و آب کافی داده می‌شد. کلیه آزمایشات مطابق با توصیه کمیته اخلاقی دانشگاه انجام شدند.

رتها از طریق Cervical dislocation کشته می‌شدند. پنیس، از طریق جراحی در سطح اتصالات انتهایی به استخوان‌های Pubo-ischial، جدا شده و در ظرف پتری محتوی محلول Krebs-bicarbonate(محتوی NaCl, 118.1; KCl, 4.7; KH_2Po_4, 1.0; $MgSO_4$, 1.0; $NaHCO_3$, 25.0; $Cacl_2$, 2.5; and glucose, 11.1)(به mM) که توسط گاز کاربوژن(۹۵٪ O_2 و ۵٪ CO_2) به صورت حباب(bubbled)

Archive of SID
www.SID.ir

اکسیژن دهی می‌شد، قرار داده می‌شد. گلنس پنیس و پیشابراه، جدا شده و بافت کورپوس کاورنوزوم از تونیکا آلبوژینهآ جدا می‌شد. دو کورپوس کاورنوزوم به وسیله برش سپتوم فیبری بین آنها از یکدیگر جدا می‌شدند. آنها به طور جداگانه در یک حمام ارگان(Organ chamber) محتوی ۲۷ میلی‌لیتر محلول Krebs-bicarbonate آویزان می‌شدند، به گونه‌ای که یک انتهای آنها به نگهدارنده الکترود و طرف دیگر به یک سیم مرتبط با مبدل نیرو(Narco F-60, Narco Biosystem, Houston, TX, USA) وصل می‌شد. همینطور رشته‌ها در داخل یک سیم‌پیچ قرار می‌گرفتند و دو سیم خارج شده از سیم‌پیچ، به دو قطب دستگاه تولید کننده تحریک الکتریکی وصل می شدند. حمام‌های محتوی محلول Krebs-bicarbonate(PH=۷/٤) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با اکسیژن ۹۵٪ و CO2٥٪ متعادل می‌شدند.

رشته‌های کورپوس کاورنوزوم مجازند تا تحت کشش استراحت اپتیمال برای ٤٥ دقیقه متعادل شوند. Optimal Resting Tension برای رشته‌های کورپوس، ۰/٥ گرم می‌باشد و این کشش در همه آزمایشات بکار گرفته شد. در آزمایشاتی که تحریک الکتریکی در آن بکار گرفته می‌شد، یک میکرومول آتروپین(جهت بلوک کولینرژیک) و ٥ میکرومول گوانتیدین(جهت بلوک آدرنرژیک) همواره در محلول حمام ارگان وجود داشت تا وضعیت غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک(NANC) جهت تحریکات بوجود آید. در همه آزمایشات هر رشته کورپوس کاورنوزوم تنها یک بار مصرف می‌شد.

داروهای مورد استفاده در طول مطالعه شامل فنیل‌افرین هیدروکلرید، آناندامایـد، AM251 (آنتاگونیست اختصاصی رسپتور CB_1 کانابینوییدی)، AM630(آنتاگونیست اختصاصی رسپتور CB_2 کانابینوییدی)، کاپسازپین (آنتاگونیست اختصاصی رسپتور VR_1 وانیلوییدی)، سدیم نیتروپروساید(Sodium nitropruside=SNP)، L-NAME (N^w-Nitro-L-Arginine Methyl Ester)، گوانتیدین سولفات و آتروپین سولفات(Sigma, St. Louis, MO, USA) بود. آناندامایـد در محلول ۱:۱:۱۸ از سالین/اتانول/امول‌فور حل شد. AM251 و AM630 در دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) و سالین حل شدند. کاپسازپین در اتانول خالص حل شد و بقیه داروها در آب مقطر حل شدند.

برای ثبت تحریکات الکتریکی اعصاب NANC، در کلیه گروه‌ها قبل از ایجاد تحریکات، یک میکرومول آتروپین(جهت بلوک کولینرژیک) و ۱٥ میکرومول گوانتیدین(جهت بلوک آدرنرژیک) به محلول در حمام ارگان اضافه می‌شد. ارزیابی اثرات کانابینوییدهای اندوژن (آناندامایـد) و رسپتورهای درگیر در آن به صورت زیر بود:

در گروه کنترل، ایجاد شل شدگی ناشی از تحریکات الکتریکی بدون اضافه کردن هیچ دارویی در Organ chamber توسط فیزیوگراف ثبت می‌شد.

در گروه دوم، ۲۰ دقیقه قبل از ایجاد تحریکات الکتریکی به منظور شل شدگی بافت، آناندامایـد(۰/۳، ۱و ۳ میکرومول) به محلول Organ chamber اضافه می‌شد و بعد از ۲۰ دقیقه، تحریکات الکتریکی جهت ایجاد شل شدگی در بافت کورپوس که با ۷/٥ میکرومول فنیل افرین منقبض شده بود، داده می‌شد و به طور همزمان توسط فیزیوگراف ثبت می‌شد.

همچنین در گروه‌های مجزای دیگر، همزمان با متعادل شدن بافت در محلول، آنتاگونیست اختصاصی رسپتور CB_1 (یک میکرومول AM251)، آنتاگونیست اختصاصی رسپتور CB_2(یک میکرومول Am630) و آنتاگونیست اختصاصی رسپتور وانیلوییدی VR_1(۳ میکرومول کاپسازپین یا Capsazepine) به طور جداگانه به محلول اضافه شدند و پس از ٤٥ دقیقه، آناندامایـد(یک میکرومول) به محلول اضافه شد. ۲۰ دقیقه بعد از آن، شل شدگی ناشی از تحریکات الکتریکی در بافت کورپوس کاورنوزوم که با ۷/٥ میکرومول فنیل‌افرین منقبض شده بود، به وسیله ثبت در فیزیوگراف بررسی می‌شد. همچنین، اثر هر یک از این آنتاگونیست‌ها به تنهایی بر پاسخ‌های شل شدگی مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. بعلاوه، اثر هر یک از حلال‌های داروهای مورد

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده یعنی DMSO و اتانول در بیش‌ترین حجم مورد استفاده جهت بررسی داروهای فوق به تنهایی بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریکات الکتریکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای بررسی اثر L-NAME بر اثرات آناندامايد، ۳۰ دقیقه قبل از اضافه نمودن آناندامايد، L-NAME(یک میکرومول و ۳۰ نانومول) به محلول Organ bath اضافه می‌شد و ۲۰ دقیقه بعد از اضافه نمودن آناندامايد(یک میکرومول)، شل شدگی ناشی از تحریکات الکتریکی در بافت کورپوس کاورنوزوم که با ۷/۵ میکرومول فنیل‌افرین منقبض شده بود، به وسیله ثبت در فیزیوگراف بررسی می‌شد.

در گروه کنترل، ایجاد شل شدگی به وسیله SNP بدون اضافه کردن هیچ دارویی در Organ chamber توسط فیزیوگراف ثبت می‌شد. در گروه دوم، ۲۰ دقیقه قبل از ایجاد تحریکات الکتریکی، آناندامايد(Anandamide؛ یک میکرومول) به حمام ارگان اضافه می‌شد و بعد از ۲۰ دقیقه، بافت کورپوس کاورنوزوم توسط ۷/۵ میکرومول فنیل‌افرین منقبض می‌شد و هنگامی که انقباض به سطح ثابتی می‌رسید، رشته‌ها به وسیله اضافه نمودن دوزهای تجمعی سدیم نیتروپروساید(یک نانومول و یک میلی‌مول) هر ۲ دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، Relax می‌شدند که به طور همزمان این مراحل توسط فیزیوگراف ثبت می‌شدند. بررسی اثرات آنتاگونیست‌های CB_1 و CB_2 و وانیلوییدی VR_1 مشابه با مراحل NANC-induced relaxation انجام می‌شد، منتهی به جای تحریک الکتریکی، در اینجا دوزهای تجمعی SNP(یک نانومول و یک میلی‌مول) جهت ایجاد شل‌شدگی استفاده می‌شدند.

بافتهای فریز شده کورپوس کاورنوزوم در بافر PIPA صفر درجه سانتی‌گراد محتوی مهارکننده‌های پروتئاز، ۵۰ میلی‌مول Tris(PH=۸)، ۱۵۰ میلی‌مول کلرید سدیم، NP-40(۱٪)، دزوکسیکولات سدیم(۰/۵٪) و SDS(۰/۱٪) هموژنیزه می‌شدند و سپس سانتریفوژ(۱۰۰۰ ×g و به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) می‌شدند. بعد از تعیین غلظت‌های پروتئین سوپرناتانت‌ها(ارزیابی برادفورد با آلبومین سرم گاو به عنوان استاندارد)، ۱۰ میکروگرم پروتئین از هر نمونه بوسیله SDS-PAGE جدا می‌شد و به غشاء فلورید پلی‌وینایلیدن(PVDF) منتقل می‌شد. بعد از بلوک شدن با بافر سالین Tris(۱۰ میلی‌مول از Tris و ۱۰۰ میلی‌مول از کلرید سدیم) حاوی Tween-20 ۰/۱٪ به مدت ۱ ساعت، غشاءها در طول شب با آنتی‌بادی‌های ضد CB_2، CB_1 و VR_1(به ترتیب با رقت‌های ۱:۲۰۰، ۱:۲۰۰ و ۱:۱۰۰ آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش از USA، CA، Santa Cruz Biotechnology) انکوبه می‌شدند. بعد از شستشو، غشاءها با آنتی‌بادی متصل به ضد آلکالن فسفاتاز IgG خرگوش(anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-linked antibody با رقت ۱:۵۰۰۰؛ UK، Perbio Science) انکوبه می‌شدند. آلکالن فسفات با استفاده از کیتهای BCIP/NBT(Prmega, Madison, USA) تعیین می‌شد. پروتئین‌های استخراج شده از زبان، مغز و طحال موش صحرایی به ترتیب به عنوان بافتهای کنترل مثبت برای واکنش ایمونولوژیک VR_1، CB_1 و CB_2 استخراج شدند.

این مطالعه یک مطالعه علوم پایه تجربی(Experimental) بوده و داده‌ها به صورت انحراف معیار میانگین ± میانگین بیان می‌شدند. تحلیل آماری داده‌ها به وسیله آنالیز یکطرفه واریانس(One-Way ANOVA) متعاقب Newman-Keuls as post-hoc test) انجام شد و $P<0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

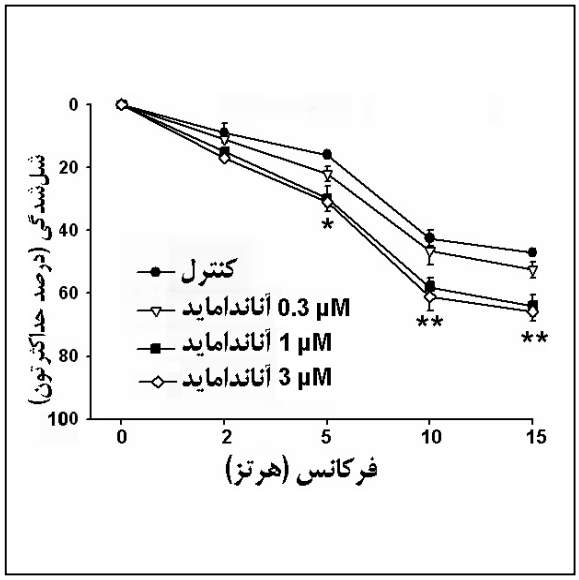
یافته‌ها

همانطور که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، آناندامايد در غلظتهای ۱ و ۳ میکرومول به طور معنی‌داری باعث افزایش شل‌شدگی القاء شده با تحریک الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم شد، اما در غلظت ۰/۳ میکرومول، اثر قابل توجهی بر این پاسخها نداشت. اثر تقویت کننده آناندامايد

Archive of SID
www.SID.ir

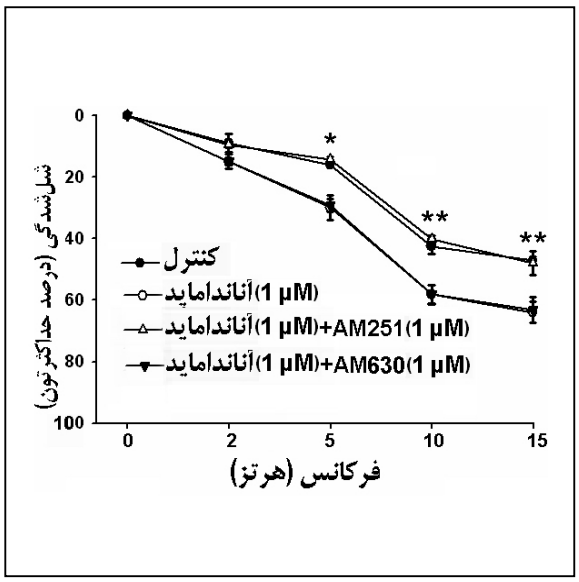
بر پاسخ‌های وابسته به NANC در حضور آنتاگونیست اختصاصی رسپتور کانابینوییدی CB_1 یعنی یک میکرومول AM251 به طور معنی‌داری($P<0/01$) آنتاگونیزه شد. اما آنتاگونیست رسپتور CB_2 یعنی یک میکرومول AM630 اثری بر اثرات آناندامید نداشت (شکل شماره ۲). همچنین، حضور آنتاگونیست اختصاصی رسپتور وانیلوییدی VR_1 یعنی ۳ میکرومول کاپسازپین باعث مهار اثر آناندامید بر پاسخ‌های شل شدگی القاء شده با تحریک اعصاب NANC شد($P<0/01$)(شکل شماره ۳).

هیچ یک از آنتاگونیست‌های CB1، CB2 و VR1 به تنهایی اثری بر پاسخ‌های شل شدگی بافت کورپوس کاورنوزوم به تحریک الکتریکی اعصاب NANC نداشتند. همچنین، هیچ یک از حلال‌های مورد استفاده جهت این داروها یعنی DMSO و اتانول، بر پاسخ‌های شل شدگی به تحریکات الکتریکی اثری نداشتند.



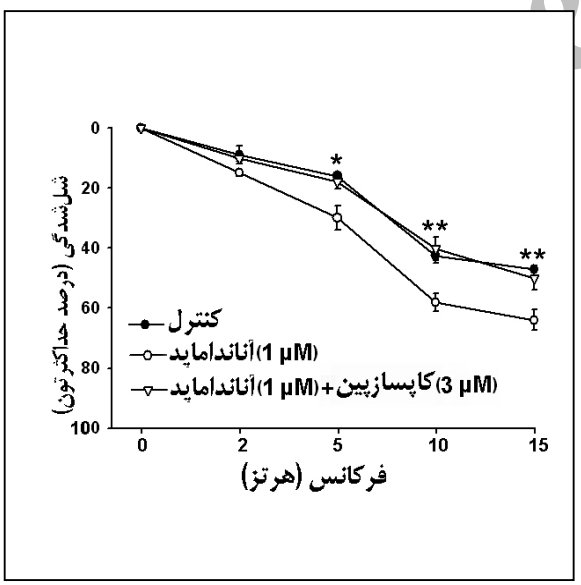
*یعنی $P<0/05$ و ** یعنی $P<0/01$ نسبت به گروه کنترل

شکل شماره ۱- پاسخ‌های شل شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک(NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل افرین در گروه کنترل و در حضور دوزهای مختلف آناندامید.



*یعنی $P<0/05$ و ** یعنی $P<0/01$ نسبت به گروهی که در آن تنها آناندامید(یک میکرومول) اضافه شده است.

شکل شماره ۲- اثر آنتاگونیست‌های اختصاصی رسپتورهای کانابینوییدی CB_1 (یک میکرومول AM251) و CB_2(یک میکرومول AM630) بر پاسخ‌های شل شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک(NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل افرین در حضور آناندامید(یک میکرومول).



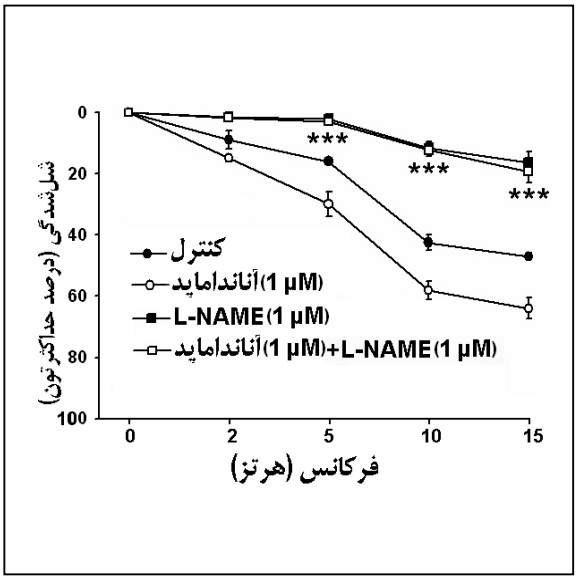
*یعنی $P<0/05$ و ** یعنی $P<0/01$ نسبت به گروهی که در آن تنها آناندامید(یک میکرومول) اضافه شده است.

شکل شماره ۳- اثر آنتاگونیست اختصاصی رسپتور وانیلوییدی VR1(۳ میکرومول کاپسازپین) بر پاسخ‌ها شل‌شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک(NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل‌افرین در حضور آناندامید(یک میکرومول).

Archive of SID
www.SID.ir

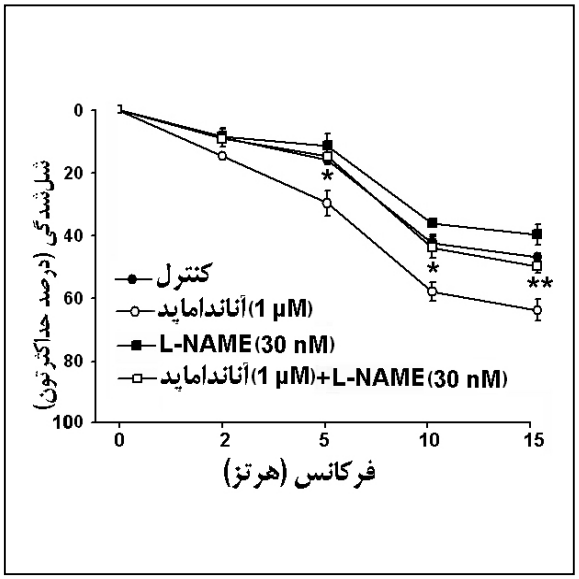
L-NAME با غلظت یک میکرومول، باعث کاهش چشمگیری در پاسخ‌های شل شدگی القاء شده با تحریک الکتریکی اعصاب NANC در حضور یا عدم حضور یک میکرومول آناندامایـد شد($P<0/001$)(شکل شماره ٤). یافته قابل توجه آن بود که اگر چه L-NAME با غلظت ۳۰ نانومول اثری بر پاسخهای شل‌شدگی در گروه کنترل نداشت، باعث کاهش معنی‌دار اثرات تقویت کننده آناندامایـد بر NANC-induced relaxation در بافت کورپوس کاورنوزوم شد($P<0/01$)(شکل شماره ٥).

در گروه کنترل، SNP باعث شل‌شدگی وابسته به دوز در بافت منقبض شده با فنیل‌افرین شد. تفاوت معنی‌داری بین پاسخ‌ها در حضور یا عدم حضور یک میکرومول آناندامایـد وجود نداشت(شکل شماره ٦).



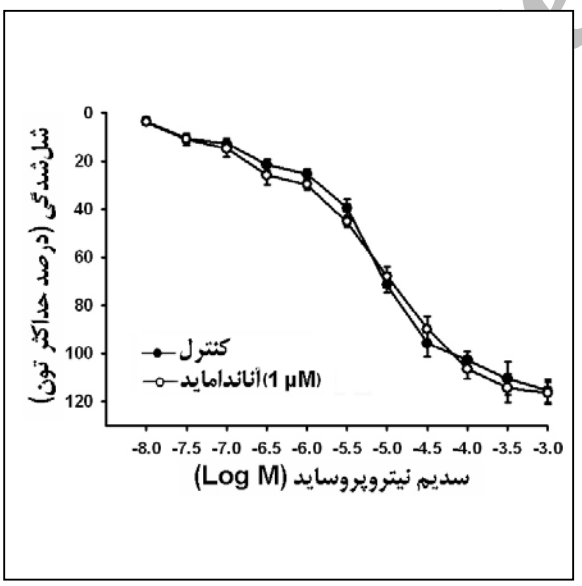
*** یعنی $P<0/001$ در مقایسه با گروه کنترل

شکل شماره ۴- اثر L-NAME(یک میکرومول) بر پاسخ‌های شل شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک(NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل‌افرین در حضور یا غیاب آناندامایـد(یک میکرومول).



*یعنی $P<0/05$ و ** یعنی $P<0/01$ نسبت به گروهی که در آن تنها آناندامایـد(یک میکرومول) اضافه شده است.

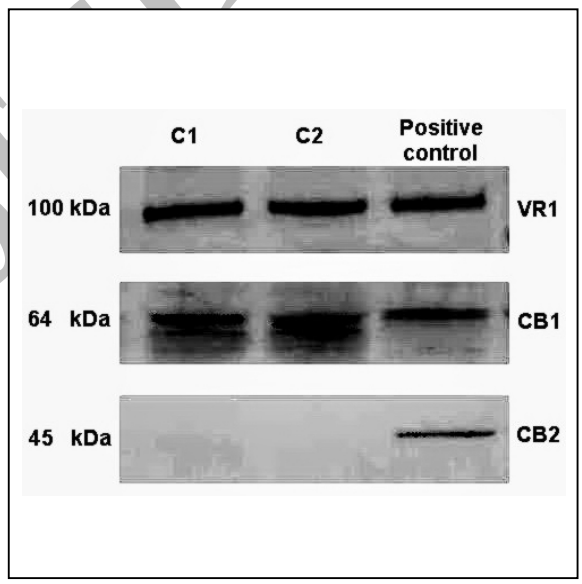
شکل شماره ۵- اثر L-NAME(۳۰ نانومول) بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک(NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل افرین در حضور یا غیاب آناندامایـد(یک میکرومول).



شکل شماره ۶- پاسخ‌های شل‌شدگی به دوزهای مختلف SNP در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل‌افرین در گروه‌های کنترل(Control) و در حضور آناندامایـد(یک میکرومول)

www.SID.ir
Archive of SID

در روش وسترن بلات، با استفاده از آنتاگونیست‌های اختصاصی بافتهای کورپوس کاورنوزوم موشهای صحرایی نر، یک باند تقریباً ٦٤ کیلودالتونی معرف پروتئین CB_1 را که مطابق با گروه کنترل مثبت بود، نشان دادند(شکل شماره ۷). همچنین، آنالیز وسترن بلات رسپتور وانیلوییدی VR_1، یک باند اختصاصی در وزن ملکولی مشابه گروه کنترل مثبت برای این پروتئین‌ها(تقریباً ۱۰۰ کیلودالتون) را نشان داد(شکل شماره ۷). در گروه کنترل مثبت، یک باند اختصاصی ٤٥ کیلودالتونی برای رسپتور CB_2 وجود داشت، در حالی که این باند در بافت کورپوس کاورنوزوم وجود نداشت(شکل شماره ۷).



شکل شماره ۷- وسترن بلات(Western blot) پروتئین رسپتورهای CB_1، CB_2 و VR_1 در بافت کورپوس کاورنوزوم موشهای صحرایی نر کنترل(C1 و C2). پروتئین‌های استخراج شده از زبان، مغز و طحال موشهای صحرایی به عنوان کنترل‌های مثبت(Positive control) به ترتیب برای واکنش ایمونولوژیک رسپتورهای VR_1، CB_1 و CB_2 استفاده شدند.

بحث

در مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داده شد که آناندامايد(یک کانابینوییید اندوژن) باعث اثر محیطی بر عملکرد نعوظ از طریق افزایش پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم دستگاه تناسلی موشهای صحرایی نر می‌شود که به نظر می‌رسد این اثر از طریق رسپتورهای کانابینوییدی CB_1 و وانیلوییدی VR_1 میانجی‌گری می‌شود؛ چرا که هر یک از آنتاگونیست‌های اختصاصی رسپتورهای CB_1 و وانیلوییدی VR_1 باعث مهار اثر آناندامايد گردیدند، در حالی که آنتاگونیست اختصاصی رسپتور کانابینوییدی CB_2 از اثر آناندامايد جلوگیری نکرد. این یافته با نتایج بسیاری از مطالعات قبلی که نشان می‌دهند، آناندامايد می‌تواند آگونیستی برای هر دو رسپتور کانابینوییدی CB_1 و وانیلوییدی VR_1 باشد، سازگار می‌باشد.[۷و ۱۸-۱٦] در یک مطالعه توسط Randall و همکارانش (۱۹۹٦)، نشان داده شد که وازودیلاتاسیون ناشی از آناندامايد در بستر عروق مزانتریک موشهای صحرایی، به واسطه رسپتورهای CB_1 می‌باشد.[۱۹] همچنین، Wagner و همکارانش(۲۰۰۱) نشان دادند که آناندامايد از طریق اثر مستقیم بر رسپتور CB_1 باعث ایجاد شل شدگی در بستر عروق کرونری و مغزی می‌شود.[۲۰] در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده شد که آناندامايد و آنالوگ پایدار آن یعنی مت آناندامايد، باعث ایجاد شل‌شدگی در عروق هپاتیک و مزانتریک موشهای صحرایی و نیز در عروق بازیلار خوکچه‌های آزمایشگاهی می‌شوند که این اثر به واسطه رسپتورهای وانیلوییدی VR_1 بود.[۷] به هر حال، باید توجه داشت که برخی مطالعات گزارش نموده‌اند که آناندامايد ممکن است از طریق رسپتورهای جدیدی غیر از CB_1، CB2 و VR_1، بر ارگان‌های هدف خود اعمال اثر کند[۲۱]، به همین خاطر، جهت تأیید این حقیقت که آیا اثر تقویت کننده آناندامايد بر بافت کورپوس کاورنوزوم به واسطه وجود رسپتورهای کانابینوییدی یا وانیلوییدی در این بافت صورت می‌گیرد؛ در این مطالعه از روش وسترن بلات برای تعیین این رسپتورها استفاده شد و یافته‌های این بررسی به طور جالب توجهی نشان دادند که رسپتورهای کانابینوییدی CB_1 و VR_1(اما نه CB_2) در بافت کورپوس کاورنوزوم موشهای صحرایی وجود دارند.

از آنجایی که غلظت پلاسمایی اندوکانابینوییدها آنقدر کم است که بعید به نظر می‌رسد به رسپتورهای خود همانند یک

Archive of SID
www.SID.ir

هورمون کلاسیک برسند و آنها را فعال نمایند، بنابراین بیش‌تر به عنوان مدیاتورهای اوتاکرین یا پاراکرین عمل می‌کنند. در این مطالعه نیز نشان داده شد که رسپتورهای CB_1 و VR_1 در بافت کورپوس کاورنوزوم وجود دارند و می‌توانند به عنوان هدفی برای اعمال اثر کانابینوییدهای اندوژنی همچون آناندامید در بافت کورپوس کاورنوزوم باشند. سؤالی که ممکن است مطرح شود، این است که منبع تولید کانابینوییدهای اندوژن چیست؟ مطالعات مختلف در بافتهای دیگر نشان داده‌اند که سه نوع سلول به عنوان منبع اندوکانابینوییدها در سیستم عروقی هستند که شامل سلولهای اندوتلیال، اعصاب دور عروقی (perivascular) و سلولهای در گردش خون(همچون پلاکت‌ها، لکوسیت‌ها و ماکروفاژها) می‌باشند.[۱۹و ۲۴-۲۲]

با توجه به اینکه سلولهای اندوتلیال و اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک که نوروترانسمیتر اصلی آنها یعنی نیتریک اکساید نقشی حیاتی در شل‌شدگی بافت کورپوس کاورنوزوم دارد[۱۵-۱۳]، این احتمال وجود دارد که منبع احتمالی اندوکانابینوییدها در بافت کورپوس کاورنوزوم، سلولهای اندوتلیوم سینوزوییدهای کاورنوزال و یا اعصاب NANC باشند. به هر حال مطالعات بیش‌تر و دقیق‌تر در این زمینه لازم می‌باشد.

یافته دیگر این مطالعه آن بود که مهار کننده آنزیم سنتزکننده NO یعنی L-NAME(یک میکرومول)، باعث کاهش معنی‌دار پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک اعصاب NANC در حضور یا عدم حضور آناندامید در بافت کورپوس گردید که این یافته حاکی از آن است که مدیاتور اصلی در شل‌شدگی القاء شده با تحریک اعصاب NANC در این بافت، NO می‌باشد. یافته جالب توجه آن بود که L-NAME با غلظتی که اثری بر این پاسخ‌ها در گروه کنترل نداشت(یعنی ۳۰ نانومول) باعث جلوگیری از اثر آناندامید بر پاسخ‌های الکتریکی در بافت کورپوس کاورنوزوم گردید. این یافته نشان می‌دهد که اثر تقویت کننده آناندامید بر پاسخ‌های شل‌شدگی القاء شده، با تحریک الکتریکی اعصاب NANC به واسطه مسیر نیتریک اکساید(NO) می‌باشد. این یافته با بسیاری از مطالعات دیگر که نشان داده‌اند که NO در بسیاری از اثرات آناندامید در بافتهای مختلف دخیل می‌باشد، همخوان است.[۲۵و ۲۶] در مطالعه‌ای توسط Fimiani و همکارانش(۱۹۹۹)، نشان داده شد که آناندامید باعث افزایش تولید NO در سلولهای اندوتلیال انسان می‌شود.[۲۷] همچنین، در مطالعه‌ای دیگر توسط Stefano و همکارانش(۱۹۹۸)، نشان داده شد که تولید NO القاء شده با آناندامید در سلولهای اندوتلیال انسان به واسطه آنزیم سنتز کننده NO می‌باشد.[۲۵] بعلاوه، Harris و همکارانش(۲۰۰۲)، نشان دادند که استفاده از یک مهار کننده آنزیم سنتز کننده NO عصبی از پاسخ‌های شل‌شدگی به واسطه آناندامید در بستر عروق مزانتریک موشهای صحرایی جلوگیری بعمل می‌آورد.[۲۸] از سوی دیگر، بررسی‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پاسخ‌های شل‌شدگی به یک دهنده NO(سدیم نیتروپروساید)، که باعث فعال شدن مستقیم سنتز cGMP در عضله صاف کورپوس کاورنوزوم می‌شود، در حضور یا عدم حضور آناندامید تفاوتی ندارند. بنابراین به نظر می‌رسد که پاسخ عضله صاف کاورنوزال به NO در حضور آناندامید تغییری نمی‌کند. بنابراین، اثر تقویت کننده آناندامید بر پاسخ‌های شل شدگی ناشی از تحریکات الکتریکی، احتمالاً از طریق افزایش فعالیت آنزیم سنتز کننده NO و یا تسهیل در آزاد شدن NO از اعصاب NANC می‌باشد. به هر حال، مطالعات بیولوژیک دقیق‌تر جهت این فرضیه ضروری به نظر می‌رسد.

با نشان دادن وجود رسپتورهای CB_1 و VR_1 در بافت کورپوس کاورنوزوم و نقش تقویت کننده پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب NANC، قطعاً بینش جدیدی در فیزیولوژی بافت کورپوس کاورنوزوم و متعاقباً فرایند نعوظ ایجاد خواهد شد، چرا که با این مسیر تازه، ممکن است بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیک این فرایند که تا کنون مبهم باقی مانده‌اند، روشن‌تر شود. همچنین، اثر تقویت کننده اندوکانابینوییدها بر عملکرد اعصاب این بافت ممکن است که معرف رویکرد جدیدی جهت استفاده اندوکانابینوییدها در جهت بهبود عملکرد این اعصاب در

Archive of SID
www.SID.ir

موارد پاتولوژیکی همانند دیابت که باعث نوروپاتی می‌شوند، باشد؛ لذا به نظر می‌رسد که مطالعات بیش‌تر جهت بررسی اثرات درمانی کانابینوییدهای اندوژن در بیماری‌هایی که از طریق اختلال در عملکرد اعصاب NANC باعث اختلال نعوظ می‌شوند، لازم باشد. به هر حال، باید توجه داشت که در این مطالعه از اثر اندوکانابینوییدها در محیط in vitro استفاده شده است و از غلظت‌های کمی از آناندامایـد استفاده شده است؛ لذا مطالعات بیش‌تر به صورت in vivo و در گونه‌های حیوانی مختلف لازم است تا اثر این داروها بر عملکرد نعوظ مشخص شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای اولین بار نشان داد که آناندامایـد(یک کانابینوییـد انـدوژن) باعث افزایش پاسخ‌های شل شدگی به تحریکات الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم موشهای صحرایی شد که این اثر از طریق رسپتورهای CB_1 و VR_1 میانجی‌گری می‌شد. همچنین با استفاده از روش وسترن بلات نشان داده شد که رسپتورهای CB_1 و VR_1 در بافت کورپوس کاورنوزوم موشهای صحرایی وجود دارند. به نظر می‌رسد که اثر اندوکانابینوییدها بر عملکرد اعصاب کاورنوزال از طریق یک مکانیسم وابسته به مسیر تولید NO در اعصاب NANC این بافت باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران در قالب طرح تحقیقاتی(شماره ثبت: ۱۳۲/۱۱۶۳۰) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

فهرست منابع

1- Herer J. The emperor wears no cloths: The authoritative historical record of cannabis and the conspiracy against marijuana. 11 th ed. New York: AH HA publishing Co; 1998. p. 20-25.

2- Devane WA, Dysarz FAI, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol 1988; 34: 605-13.

3- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 1990; 346: 561-4.

4- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. Curr Med Chem 1999; 6: 635-64.

5- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 1992; 258: 1946-9.

6- Howlett AC, Bidaut-Russell M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR, Herkenham M. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. Trends Neurosci 1990; 13: 420-3.

7- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerve mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 1999; 400: 452-7.

8- Ralevic V, Kendall DA, Randall MD, Zygmunt PM, Movahed P, Hogestatt ED. Vanilloid receptors on capsaicin-sensitive sensory nerves mediate relaxation to methanandamide in the rat isolated mesenteric arterial bed. Br J Pharmacol 2000; 130: 1483-8.

9- Ferrari F, Ottani A, Giuani D. Inhibitory effects of the cannabinoid agonist on rat sexual behaviour. Physiol Behav 2000; 69: 547-54.

10- Shrenker P, Bartke A. Supression of male copulatory behaviour by Δ^9-THC is not dependent on changes in plasma testosterone or hypothalamic dopamine or serotonin content. Pharmacol Biochem Beh 1985; 22: 415-20.

11- da Silva GE, Fernandez MS, Takahashi RN. Potentiation of penile erection and yawning responses to apomorphine by cannabinoid receptor antagonist in rats. Neurosci Lett 2003; 25: 349-52.

12- Melid MR, Succu S, Mascia MS, Argiolas A. Antagonism of cannabinoid CB1 receptors in the paraventricular nucleus of male rats induces penile erection. Neurosci Lett 2004; 359: 17-20.

13- Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. Biochem Biophys Res Commun 1990; 170: 830-43.

Archive of SID
www.SID.ir

14- Lue TF. Erectile dysfunction. N Eng J Med 2000; 342: 1802-13.

15- Andersson KE. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. J Urol 2003; 170: s6-s14.

16- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor(hVR1). Br J Pharmacol 2000; 129: 227-30.

17- Smart D, Jerman JC, Gunthorpe MJ, Brough SJ, Ranson J, Cairns W, et al. Characterisation using FLIPR of human vanilloid VR1 receptor pharmacology. Eur J Pharmacol 2001; 417: 51-8.

18- Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M, et al. Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. J Neurisci 2001; 21: 1104-9.

19- Randall MD, Alexander SPH, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, et al. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. Biochem Biophys Res Commun 1996; 229: 114-20.

20- Wagner JA, Jarari Z, Batkai S, Kunos G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB receptors. Eur J Pharmacol 2001; 423: 203-10.

21- Wagner JA, Varga K, Jarai Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. Hypertension 1999; 33: 429-34.

22- Hillard CJ. Endocannabinoids and vascular function. J Pharmacol Exp Ther 2000; 294: 27-32.

23- Ishioka N, Bukoski RD. A role for N-arachydonylethanolamine(anandamide) as the mediator of sensory nerve-dependent Ca2+-induced relaxetion. J Pharmacol Exp Ther 1999; 289: 245-50.

24- Deutsch D, Goligorsky MS, Schimd PC, Krebsbach RJ, Schmid HHO, Das SK, et al. Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. J Clin Invest 1997; 100: 1538-1546.

25- Stefano GB, Salzet M, Magazine HL, Bilfinger TV. Antagonism of LPS and INF-(induction of iNOS in human saphenous vein endothelium by morphine and anandamide by NO inhibition of adenylate cyclase. J Cardio Pharmacol 1998; 31: 813-20.

26- Howlett AC, Mukhopadhyay S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. Chem Phys Lipids 2000; 108: 53-70.

27- Fimiani C, Mattocks D, Cavani F, Salzet M, Deutsch DG, Pryor S, et al. Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: Coupling to nitric oxide release. Cell Signal 1999; 11: 189-93.

28- Harris D, McCulloch AI, Kendall DA, Randall MD. Characterization of vasorelaxation responses to anandamide in the rat mesenteric arterial bed. J Physiol 2002; 15: 893-902.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of Endocannabinoid System on the Neurogenic Function of Rat Corpus Cavernosum

M. Ghasemi, [I] ***H. Sadeghi Pour Roudsari,*** [I] ***A.R. Dehpour, PhD*** [II]

****H.R. Sadeghi Pour Roudsari, PhD*** [III]

Abstract

Background & Aim: Although studies have shown the central effects of Endocannabinoid on erection, its' peripheral effect is unknown. The purpose of this study was to investigate the effect of the endogenous cannabinoid anandamide on the nonadrenergic noncholinergic(NANC) relaxant responses to electrical field stimulation in isolated rat corpus cavernosum, a crucial tissue in erectile function.

Material and Methods: The rat corporeal strips were mounted under tension in a standard oxygenated organ bath with guanethidine sulfate(5 μM) and atropine(1 μM)(to produce adrenergic and cholinergic blockade). The strips were precontracted with phenylephrine hydrochloride(7.5 μM) and electrical field stimulation was applied at different frequencies(2, 5, 10, 15 Hz) to obtain NANC-mediated relaxation. Anandamide(0.3, 1 and 3 μM in separate groups) was added 20-min before electrical stimulation. In another group, the selective cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251(1 μM), the selective cannabinoid CB2 receptor antagonist AM630(1 μM) and a vanilloid receptor antagonist capsazepine(3 μM) were separately added to the bathing medium 45-min before anandamide(1 μM) administration. Using western blotting, the existence of cannabinoid and vanilloid receptors were assessed in this tissue. Each group consisted of six rats. This study was an experimental study. Statistical analysis of the data was performed by one-way analysis of variance(ANOVA) followed by Newman-keuls post hoc test. Statistical significance was considered when $P<0.05$.

Results: The results showed that the NANC relaxant responses were significantly enhanced in the presence of anandamide at 1 and 3 μM. The potentiating effect of anandamide(1 μM) on relaxation responses was significantly lessened by either AM251(1 μM) or capsazepine(3 μM), but not by AM630(1 μM)($P<0.01$). Neither of these antagonists had influence on relaxation responses. Preincubation with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME(1 μM) significantly inhibited the relaxation responses in the presence or absence of 1 μM anandamide($P<0.001$). Although at 30 nM, L-NAME did not influence NANC responses, it significantly reduced($P<0.01$) the attentuating effect of anandamide on NANC responses. Anandamide(1 μM)) had no influence on concentration-dependent relaxant responses to sodium nitroprusside(10nM-1mM), an NO donor. Western blotting revealed the existence of cannabinoid CB1(but not CB2) and vanilloid VR1 receptors in rat corpus cavernosum.

Conclusion: For the first time, our results indicated the potentiating activity of anandamide on NANC-mediated relaxation of rat corpus cavernosum through both CB1 and vanilloid receptors. The NO-mediated component of the NANC relaxant responses to electrical stimulation is involved in this enhancement. Also it was shown that CB1 and VR1 receptors are present in this tissue.

Key Words: 1) Cannabinoids 2) NANC(nonadrenergic noncholinergic) Nerves 3) Nitric Oxide(NO) 4) Corpus Cavernosum 5) Rat

I) *Medical Student, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*
II) *Professor of Pharmacology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*
III) *Professor of Physiology, Faculty of Medicine, 16th Azar st., Poursina st., Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*

Archive of SID

www.SID.ir