

اثر سیروز صفراوی بر پاسخ‌های شل‌شدگی القاء شده با تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک در کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی: نقش مسیر نیتریک‌اکساید و کانابینوئیدهای اندوژن

چکیده

زمینه و هدف: مدیاتور اصلی در ایجاد نعوظ، نیتریک‌اکساید آزاد شده از اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک (NANC) در کورپوس کاورنوزوم می‌باشد. هدف این مطالعه، بررسی اثر وضعیت سیروز بر پاسخ‌های شل‌شدگی NANC در بافت کورپوس موش‌های صحرایی نر و نقش مسیر NO و اندوکابینوئیدها بود. **روش بررسی:** موش‌ها به دو گروه اصلی sham و سیروتیک (جراحی به‌مراه بستن مجرای صفراوی) تقسیم شدند. ۳۰ روز بعد از جراحی، کورپوس کاورنوزوم موش‌های دو گروه بعد از دایسکت و گذاشتن در حمام حاوی آتروپین و گوانتیدین (جهت بلوک کولینرژیک و آدرنرژیک) و به‌دنبال انقباض توسط فنیل‌افرین ($7/5 \mu\text{M}$)، توسط تحریک الکتریکی در فرکانس‌های ۵، ۲، ۱۰ و ۱۵ هرتز دچار شل‌شدگی شدند و نتایج توسط دستگاه الکتروفیزیوگراف ثبت گردید. همچنین اثر آنانداماید ($1 \mu\text{M}$) و نیز اثر هریک از آنتاگونیست‌های اختصاصی رسپتورهای CB1 ($10 \mu\text{M}$)، AM251، CB2 ($10 \mu\text{M}$)، AM630 و وانیلوئیدی (کاپسازپین، $10 \mu\text{M}$) در حضور یا غیاب آنانداماید و اثر مهارکننده سنتز NO یعنی L-NAME ($30,300,1000 \text{ nM}$)، بر پاسخ‌های هر دو گروه بررسی شد. هر گروه شامل شش حیوان بود. **یافته‌ها:** پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به NANC در بافت کورپوس به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) در حیوانات سیروتیک افزایش یافت. آنانداماید پاسخ‌های هر دو گروه را تقویت کرد. اگرچه AM251 و کاپسازپین در گروه sham بر پاسخ‌ها اثری نداشتند، باعث مهار ($p < 0/01$) پاسخ‌های افزایش‌یافته در گروه سیروتیک شدند. همچنین، آنها باعث کاهش اثر آنانداماید در هر دو گروه شدند. AM630 در هیچ یک از گروه‌ها اثری نداشت. هرچند L-NAME به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) پاسخ‌های NANC را در حضور یا غیاب آنانداماید در گروه sham مهار کرد، پاسخ‌های شل‌شدگی در گروه سیروتیک به این اثر مقاوم‌تر بود. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سیروز باعث افزایش پاسخ‌های شل‌شدگی NANC در بافت کورپوس موش‌های صحرایی می‌شود و درگیری مسیر نیتریک‌اکساید و رسپتورهای CB1 و وانیلوئیدی در این میان محتمل می‌باشد.

کلمات کلیدی: سیروز، عملکرد نعوظ، نیتریک‌اکساید، کانابینوئیدها، کورپوس کاورنوزوم

مهدی قاسمی^۱

حامد صادقی‌پور^۲

احمد رضا دهپور^{۳*}

۱- دانشجوی پزشکی

۲- پزشک عمومی

۳- گروه فارماکولوژی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران،

دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی تلفن: ۶۶۱۱۲۸۰۲

email: dehpour@yahoo.com

مقدمه

سیروز کبدی (Cirrhosis) با بسیاری از ناهنجاری‌های همودینامیک و هیدرودینامیک همراه می‌باشد. ازودیلاتاسیون عروق محیطی مرتبط با سیروز منشأ بسیاری از تظاهرات بالینی در بیماران سیروتیک می‌باشد.^۱ اتیولوژی دقیق این مشکلات همچنان مبهم باقی‌مانده است. به هر حال، حجم عظیمی از مطالعات بر این عقیده استوارند که نیتریک‌اکساید (NO) در نهایت در تمام این حوادث نقش مهمی بازی می‌کند و ایزوفرم‌های القاء‌شونده (inducible) و اندوتلیال (endothelial) آنزیم سنتزکننده NO (NOS) یعنی iNOS و eNOS در

افزایش تولید NO دخیل می‌باشند.^{۲-۶} برخی مطالعات نشان داده‌اند که بیان و فعالیت ایزوفرم نورونی آنزیم سنتزکننده NO (neuronal NOS or nNOS) در آئورت و کبد حیوانات سیروتیک افزایش می‌یابد.^{۷-۹} که پیشنهادکننده وجود نقشی برای NO آزاد شده توسط این نوع از آنزیم NOS در سیروز می‌باشد. نقش دقیق فعالیت nNOS در تغییرات پاتوفیزیولوژیک موجود در سیروز به‌طور کامل شناخته نشده است. شواهد قانع‌کننده‌ای وجود دارد که نشان‌دهنده درگیری سیستم کانابینوئیدی اندوژن در تغییرات همو-دینامیک موجود در سیروز می‌باشد.^{۱۰} به‌نظر می‌رسد مکانیسم زمینه‌ای این پدیده شامل افزایش

به یک دهنده NO به نام سدیم نیتروپروساید در حیوانات سیروتیک و بررسی نقش احتمالی سیستم کانابینوئیدی اندوژن به وسیله ارزیابی اثر آنتاگونیست‌های اختصاصی رسپتورهای کانابینوئیدی و وانیلوئیدی بر شل‌شدگی نورونیک کورپوس کاورنوزوم در حیوانات سیروتیک در مقایسه با حیوانات غیرسیروتیک می‌باشد.

روش بررسی

۲.۱. حیوانات: رت‌های نر Sprague-Dawely (انسیتو پاستور ایران) با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در طول مطالعه استفاده شدند. حیوانات در یک اتاق با کنترل نور کافی با سیکل شبانه روزی ۱۲ ساعته نگهداری می‌شدند و به آنها غذا و آب کافی داده می‌شد. آزمایشات مطابق با توصیه کمیته اخلاقی دانشگاه انجام می‌شدند. حیوانات به دو گروه عمدۀ sham و سیروتیک تقسیم شدند.

۲.۲. جراحی: جراحی لاپاراتومی بعد از القاء بی‌هوشی عمومی توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (۵۰ mg/kg) و پرومازین (۱۰ mg/kg) انجام شد. در حیوانات گروه‌های سیروتیک، مجرای صفاوی جدا شده و به‌طور مضاعف در دو نقطه بسته می‌شد. در گروه sham، مجرای صفاوی مشخص شده و دستکاری می‌شد و بدون بستن آن به جای خود برگردانده می‌شد. آزمایشات ۳۰ روز بعد از جراحی روی بافت کورپوس انجام می‌شد و این زمانی بود که حیوانات سیروتیک علائم واضح زردی، خارش، ادرار پررنگ، مدفوع کم‌رنگ، و آسیت پیدا کرده بودند. ۲،۳. آماده نمودن بافت کورپوس کاورنوزوم: 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 که محتوی محلول Krebs-bicarbonate (محتوی: NaCl, 118.1; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.0; MgSO₄, 1.0; NaHCO₃, 25.0; CaCl₂, 2.5; and glucose, 11.1 (به mM) که توسط گاز کاربوژن (O₂ ۹۵٪ و CO₂ ۵٪) به صورت حباب (bubbled) اکسیژن‌دهی می‌شد، قرار داده می‌شد. گلنس پنیس و پیشابراه جدا شده و بافت کورپوس کاورنوزوم از تونیکا آلبوژینه‌ها جدا می‌شد. دو کورپوس کاورنوزوم به وسیله برش سپتوم فیبری بین آنها از یکدیگر جدا می‌شدند. آنها به‌طور جداگانه در یک حمام ارگان (Organ chamber) محتوی ۲۷ ml محلول Krebs-bicarbonate آویزان می‌شدند به‌گونه‌ای که یک انتهای آن به نگهدارنده الکتروود

تولید کانابینوئیدهای اندوژن همچون آنانداماید (Anandamide) و ۲-آراشیدونیل گلیسرول (2-Arachidonyl Glycerol) به ترتیب در ماکروفاژها و پلاکت‌های خون و متعاقباً ازودیلاتاسیون ناشی از آن باشد که حداقل تا قسمتی توسط رسپتورهای کانابینوئیدی CB1 موجود بر سلولهای اندوتلیال عروقی میانجی می‌شود.^{۱۱،۱۲} به‌علاوه، نشان داده شده است که غلظت سرمی آنانداماید در بیماری‌های کبدی حاد و مزمن در انسان افزایش می‌یابد.^{۱۳} مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برای ایجاد شل‌شدگی در بافت کورپوس کاورنوزوم (بافت حیاتی در ایجاد نعوظ) و متعاقب آن ایجاد حالت نعوظ، NO آزاد شده از اندوتلیوم و اعصاب نیتروژنیک این بافت که به نام اعصاب غیرآدرنژیک غیرکولینرژیک (Nonadrenergic Noncholinergic nerves or NANC) معروفند نقشی اساسی ایفا می‌کند.^{۱۴،۱۵} با این حال، بررسی‌ها نشان داده‌اند که نقش اعصاب NANC در القاء این وضعیت چشمگیرتر می‌باشد.^{۱۴،۱۵} پس از آزاد شدن از پایانه‌های اعصاب NANC باعث تحریک آنزیم گوانیل سیکلاز و شل‌شدگی در عضله صاف کاورنوزال و متعاقباً نعوظ می‌شود. در مطالعه‌ای که ما اخیراً انجام دادیم نشان دادیم که کانابینوئیدهای اندوژن همچون آنانداماید نیز ممکن است در شل‌شدگی وابسته به تحریک اعصاب NANC در کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی نقش داشته باشند و این اثر از طریق رسپتورهای CB1 و وانیلوئیدی VR1 میانجی می‌شود.^{۱۶} امروزه به خوبی شناخته شده است که ناتوانی جنسی (impotence) یا اختلال نعوظ (erectile dysfunction) در ارتباط نزدیک با اختلال در شل‌شدگی بافت کورپوس کاورنوزوم می‌باشد.^{۱۷} مطالعه دیگر ما نیز نشان داد که شل‌شدگی نورونیک در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی دچار یرقان صفاوی (کلستاز) افزایش می‌یابد و احتمالاً مسیر نیتریک اکساید در این حالت درگیر می‌باشد.^{۱۸} این مسئله که آیا وضعیت سیروز بر عملکرد بافت کورپوس کاورنوزوم و شل‌شدگی نورونیک آن و لذا فرایند نعوظ اثر دارد مبهم است و تاکنون مطالعه‌ای به اثر محیطی سیروز بر عملکرد نعوظ نپرداخته است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر سیروز صفاوی بر شل‌شدگی نورونیک بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی نر، ارزیابی نقش مسیر NO از طریق بررسی اثر یک مهارکننده آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (L-NAME) بر شل‌شدگی ناشی از تحریک اعصاب NANC و نیز بررسی پاسخ‌های شل‌شدگی

کاورنوزوم در هریک از گروه‌های sham و سیروتیک، پیش‌منقبض شده و هنگامی که انقباض به سطح ثابتی رسید، تحریک رشته الکتریکی (EFS: 150 V, 3 ms duration at a frequency of 5 Hz, for 8 s every 120 s) باعث ایجاد Relaxation القاء شده با NANC می‌شد. در دو گروه جداگانه از حیوانات سیروتیک و sham، آنانداماید ($1 \mu\text{M}$) بعد از آنکه سطح انقباضی به سطح ثابتی می‌رسید به حمام ارگان اضافه شده و پاسخها به تحریک الکتریکی ۲۰ دقیقه بعد از اضافه نمودن آنانداماید ثبت می‌شد. (۲) در بافت کاورنوزال گروه‌های مجزا از حیوانات سیروتیک و sham، آنتاگونیست رسپتور CB1 کانابینوئیدی ($10 \mu\text{M}$, AM251)، آنتاگونیست رسپتور CB2 کانابینوئیدی ($10 \mu\text{M}$, AM630) به حمام ارگان ۱۰ دقیقه قبل از اضافه نمودن آنانداماید ($1 \mu\text{M}$) به حمام ارگان اضافه می‌شدند. جهت بررسی نقش رسپتورهای وانیلوئیدی بر اثرات آنانداماید بر پاسخهای شل‌شدگی به تحریکات الکتریکی، کاپسازپین (آنتاگونیست رسپتور وانیلوئیدی، $10 \mu\text{M}$)، ۲۰ دقیقه قبل از اضافه نمودن آنانداماید ($1 \mu\text{M}$) به حمام ارگان اضافه می‌شد. همچنین، در گروه‌های جداگانه دیگر از حیوانات سیروتیک و sham، اثر هریک از این آنتاگونیستها بر پاسخهای شل‌شدگی وابسته به NANC در غیاب آنانداماید بررسی شد. ۲،۷ اثر L-NAME بر شل‌شدگی وابسته به NANC جهت ارزیابی اثر L-NAME (مهارکننده نیتریک اکساید سنتتاز) بر پاسخهای شل‌شدگی وابسته به NANC در هریک از گروه‌های سیروتیک و sham، رشته‌های کورپوس کاورنوزوم، این دارو در دوزهای مختلف (300 ، 30 ، 3 ، 1000)، ۳۰ دقیقه قبل از ایجاد شل‌شدگی با تحریک الکتریکی در حضور یا غیاب آنانداماید ($1 \mu\text{M}$) به حمام ارگان اضافه شد. ۲،۸ پاسخ‌ها به سدیم نیتروپروساید: بعد از آنکه رشته‌های منقبض شده با فنیل‌افرین در هریک از گروه‌های سیروتیک و sham متعادل شدند، توسط اضافه نمودن دوزهای تجمعی سدیم نیتروپروساید (1 mM - 1 nM) به حمام ارگان دچار شل‌شدگی شدند. همچنین، این پاسخ‌ها یکبار دیگر در حضور جداگانه هریک از داروهای آنانداماید ($1 \mu\text{M}$)، AM251 ($10 \mu\text{M}$)، AM630 ($10 \mu\text{M}$)، و کاپسازپین ($10 \mu\text{M}$) مورد ارزیابی قرار گرفتند. EC_{50} سدیم نیتروپروساید در این گروه‌ها مقایسه شد. ۲،۹ تحلیل آماری: داده‌ها به صورت داده‌ها به صورت Mean \pm S.E.M (انحراف معیار میانگین \pm میانگین) بیان می‌شدند. تحلیل آماری داده‌ها به وسیله آنالیز one-way واریانس (ANOVA) متعاقب

طرف دیگر به یک سیم مرتبط با مبدل نیرو (Narco F-60, Narco Biosystem, Houston, TX, USA) وصل می‌شد. همینطور رشته‌ها در داخل یک سیم پیچ قرار می‌گرفتند و دو سیم خارج شده از سیم پیچ به دو قطب دستگاه تولیدکننده تحریک الکتریکی (Electrical Field Stimulator) وصل می‌شدند. حمام‌های محتوی محلول Krebs-bicarbonate (PH=۷/۴) در دمای 37°C با اکسیژن ۹۵٪ و CO_2 ۵٪ متعادل می‌شدند. رشته‌های کورپوس کاورنوزوم مجازند تا تحت کشش استراحت اپتیمال برای ۴۵ دقیقه متعادل شوند. Optimal Resting Tension برای رشته‌های کورپوس $0/5 \text{ gr}$ بود و این کشش در همه آزمایشات به کار گرفته و هر رشته تنها یکبار استفاده می‌شد. ۲،۴ داروها: داروهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند: فنیل‌افرین هیدروکلراید، آنانداماید (N-rachidonylethanolamine)، AM251، (2, 4-dichlorophenyl)-1-(4-ethyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide، AM630، (pyrazole-3-carboxamide) N-(yl 6-iodo-2methyl-1-(methoxyphenyl) [2-(morpholinyl) Nw-Nitro-]) L-NAME، سدیم نیتروپروساید، (L-Arginine Methyl Ester)، گوانتیدین سولفات و آتروپین سولفات (Sigma, St. Louis, MO, USA). آنانداماید در محلول ۱:۱۸ از امولفور/اتانول/سالیین حل شد. AM251 و AM630 در DMSO (Dimethyl Sulfoxide) و سالیین حل شدند. کاپسازپین در اتانول خالص حل شد. بقیه داروها در آب دو بار تقطیر شده حل شدند. داروها در حجم‌های میکرولیتر به حمام ارگان اضافه شدند و آزمایشات یکبار جهت اثرات حلال داروها کنترل شدند. هیچ یک از حلالها (اتانول، سالیین، DMSO) در حجم‌های به کار رفته اثری بر تون پایه و شل‌شدگی بررسی شده در طول مطالعه نداشتند. ۲،۵ پاسخ‌ها به فنیل‌افرین: در گروه‌های sham و سیروتیک، منحنی‌های غلظت-پاسخ برای فنیل‌افرین (1 mM - 10 nM) به وسیله اضافه نمودن دوزهای تجمعی (cumulative) فنیل‌افرین به حمام ارگان به دست آمد. EC_{50} فنیل‌افرین در هر دو گروه مقایسه شد. ۲،۶ پاسخ‌ها به تحریک رشته الکتریکی (Electrical Field Stimulation or EFS) (۱) برای ثبت تحریکات الکتریکی اعصاب NANC، در کلیه گروه‌ها قبل از ایجاد تحریکات، آتروپین ($1 \mu\text{M}$)، جهت بلوک کولینرژیک و گوانتیدین ($15 \mu\text{M}$)، جهت بلوک آدرنرژیک) به محلول در حمام ارگان اضافه می‌شد. ابتدا توسط $7/5 \mu\text{M}$ فنیل‌افرین، رشته کورپوس

($10 \mu\text{M}$) اثری بر پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم حیوانات sham نداشتند. اثرات L-NAME بر شل‌شدگی وابسته به تحریک الکتریکی اعصاب NANC: L-NAME باعث مهار وابسته به دوز در پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی در فرکانس ۱۰ هرتز در هر دو گروه نمود (شکل ۴) که مطرح‌کننده این موضوع است که NO مسئول ایجاد پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به NANC در این مدل می‌باشد. در مقایسه با گروه sham، در حیوانات سیروتیک پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به NANC به‌طور معنی‌داری به اثرات مهاری L-NAME مقاومتر بودند و همچنین، اثر مهاری L-NAME در حضور آناداماید ($1 \mu\text{M}$) نیز دیده شد. پاسخ‌ها به سدیم نیتروپروساید: سدیم نیتروپروساید باعث ایجاد شل‌شدگی وابسته به غلظت در رشته‌های منقبض شده با فنیل‌افرین در هر دو گروه شد. تفاوت معنی‌داری بین EC₅₀ گروه‌های sham و سیروتیک وجود نداشت ($4/91 \pm 0/84 \mu\text{M}$ و $4/02 \pm 0/28 \mu\text{M}$ ، به ترتیب). همچنین، هیچ یک از آنتاگونیست‌های AM251 ($10 \mu\text{M}$)، AM630 ($10 \mu\text{M}$) و کاپسازپین ($10 \mu\text{M}$) اثری بر پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به غلظت به سدیم نیتروپروساید نشدند.

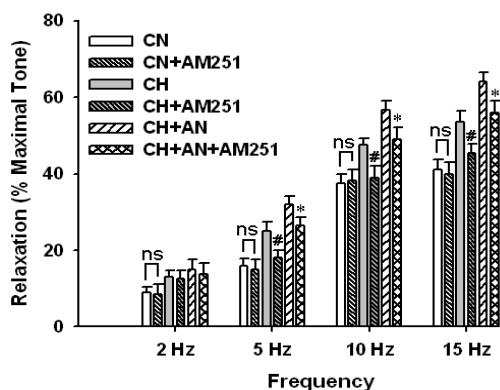
بحث

در مطالعه حاضر، ما نشان دادیم که شل‌شدگی وابسته به تحریک الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی دچار سیروز صفراوی افزایش می‌یابد و همچنین به اثرات مهاری L-NAME، یک مهارکننده رقابتی غیراختصاصی آنزیم نیتریک‌اکساید سنتتاز، مقاومتر می‌باشد. منحنی‌های انقباض - پاسخ برای فنیل‌افرین در بین گروه‌های sham و سیروتیک تفاوت چندانی نداشت که این احتمال را که ممکن است افزایش پاسخ‌های شل‌شدگی ناشی از تغییر در پاسخ‌دهی بافت به فنیل‌افرین باشد، رد می‌کند. در بافت کورپوس کاورنوزوم، NO در اندوتلیوم و اعصاب نیتروژیک به ترتیب توسط آنزیم‌های نیتریک‌اکساید سنتتاز اندوتلیومی (eNOS) و عصبی (nNOS) تولید می‌شود.^{۲۱ و ۱۵} به هر حال، شل‌شدگی کورپوس کاورنوزوم بوسیله تحریک الکتریکی به یک اندوتلیوم عملکردی نیاز ندارد.^{۲۲ و ۲۳} بنابراین، به نظر می‌رسد که اغلب شل‌شدگی وابسته به NO در بافت آلت از فعالیت آنزیم nNOS در اعصاب نیتروژیک ناشی شود.^{۲۴} نتایج ما یک افزایش در شل‌شدگی

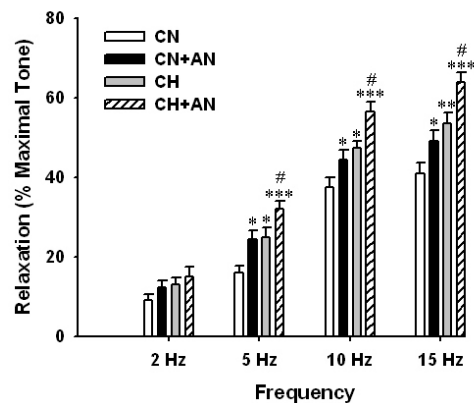
Newman-Keuls as post-hoc test انجام می‌شد و $p < 0/05$ از لحاظ آماری قابل توجه (significance) در نظر گرفته می‌شد.

یافته‌ها

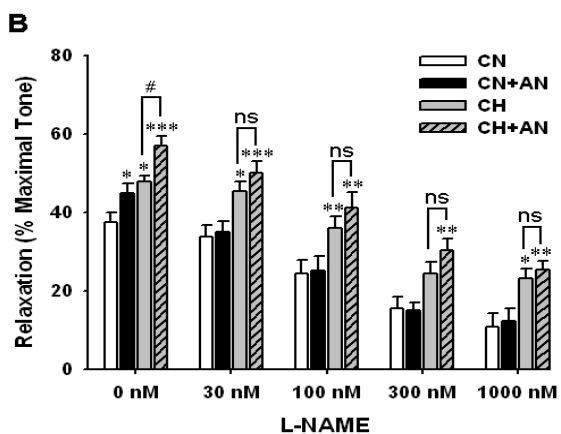
پاسخ‌ها به فنیل‌افرین: فنیل‌افرین باعث انقباض وابسته به دوز در رشته‌های کورپوس کاورنوزوم در هر دو گروه شد. تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین پاسخ انقباضی حداکثر به فنیل‌افرین در گروه sham و سیروتیک ($469 \pm 34 \text{ mg}$ و $468 \pm 30 \text{ mg}$ ، به ترتیب) یا پاسخ انقباضی به $7/5 \mu\text{M}$ فنیل‌افرین ($354 \pm 31 \text{ mg}$ و $345 \pm 35 \text{ mg}$ ، به ترتیب) وجود نداشت. همچنین، میزان EC₅₀ برای گروه‌های کنترل و سیروتیک ($2/63 \pm 0/78 \mu\text{M}$ و $2/75 \pm 0/89 \mu\text{M}$ ، به ترتیب) تفاوت معنی‌داری نداشت. پاسخ‌ها به تحریک رشته الکتریکی (EFS): رشته‌های منقبض شده کورپوس کاورنوزوم در حضور گوانتیدین و آتروپین، در یک حالت وابسته به فرکانس به وسیله EFS دچار شل‌شدگی شدند (شکل ۱). از آنجائی که گوانتیدین و آتروپین اثرات وابسته به تحریک الکتریکی وابسته به اعصاب آدرنژیک و کولینرژیک را مهار می‌کنند، پاسخ‌های شل‌شدگی القاء شده با EFS در عضله صاف کورپوس کاورنوزوم در اثر تحریک اعصاب غیرآدرنژیک غیرکولینرژیک (NANC) می‌باشد. در مقایسه با گروه sham، منحنی فرکانس - پاسخ به EFS به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) در گروه سیروتیک افزایش یافت (شکل ۱). همانطور که در شکل ۱ نیز نشان داده شده است، آناداماید ($1 \mu\text{M}$) به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) پاسخ‌های شل‌شدگی به EFS را در هر دو گروه افزایش داد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، پاسخ‌های شل‌شدگی افزایش یافته در گروه سیروتیک به‌طور قابل ملاحظه‌ای بوسیله آنتاگونیست اختصاصی رسپتور CB1 ($10 \mu\text{M}$)، اما آنتاگونیست اختصاصی رسپتور CB2 ($10 \mu\text{M}$)، AM251) مهار شد. همچنین، preincubation با کاپسازپین ($10 \mu\text{M}$) بر شل‌شدگی وابسته به NANC در موش‌های صحرایی سیروتیک اثری نداشت. همچنین، preincubation با کاپسازپین ($10 \mu\text{M}$) به‌طور معنی‌داری باعث مهار پاسخ‌های افزایش یافته شل‌شدگی وابسته به NANC در گروه سیروتیک نمود (شکل ۳). به علاوه، اثر تقویت‌کننده آناداماید بر پاسخ‌های شل‌شدگی به‌طور معنی‌داری به وسیله هر یک از آنتاگونیست‌های AM251 (شکل ۲) و کاپسازپین (شکل ۳) اما نه بوسیله AM630 آنتاگونیزه شد. هیچ یک از آنتاگونیست‌های AM251 ($10 \mu\text{M}$)، AM630 ($10 \mu\text{M}$) و کاپسازپین



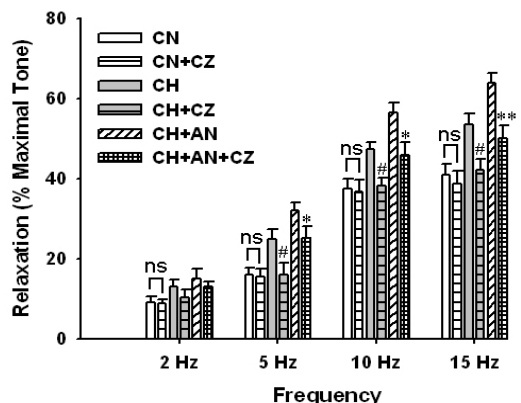
شکل - ۲: هرچند AM251 در گروه sham (CN+AM251) هیچ اثری بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی در بافت کورپوس کاورنوزوم نداشت، باعث جلوگیری از افزایش این پاسخ‌ها در گروه سروتیک (CH+AM251) شد. ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه سروتیک بدون آنانداماید؛ ns به معنای غیر معنی‌دار.



شکل - ۱: پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی در بافت کورپوس کاورنوزوم در گروه‌های (sham (CN)، سروتیک (CH)، sham در حضور آنانداماید (CN+AN) و سروتیک در حضور آنانداماید (CH+AN). ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه sham بدون آنانداماید؛ $p < 0.05$ در مقایسه با گروه سروتیک بدون آنانداماید. $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه sham بدون آنانداماید؛ # در مقایسه با گروه سروتیک بدون آنانداماید.



شکل - ۴: L-NAME به صورت وابسته به دوز باعث مهار پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی در فرکانس ثابت ۱۰ هرتز در هر یک از گروه‌های sham (CN) و سروتیک (CH) در حضور یا عدم حضور آنانداماید شد، اما در گروه‌های سروتیک پاسخ‌های شل‌شدگی به اثرات مهار L-NAME مقاومت‌تر از گروه sham می‌باشد. ($p < 0.05$)، ($p < 0.01$) و ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه معادل sham بدون آنانداماید؛ # در مقایسه با گروه معادل سروتیک بدون آنانداماید؛ ns به معنای غیر معنی‌دار.



شکل - ۳: کاپسازین در گروه sham (CN+CZ) هیچ اثری بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی در بافت کورپوس کاورنوزوم نداشت، ولی موجب جلوگیری از افزایش این پاسخ‌ها در گروه سروتیک (CH+AN) شد. ($p < 0.05$)، ($p < 0.01$) و ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه سروتیک در حضور آنانداماید؛ # در مقایسه با گروه سروتیک بدون آنانداماید؛ ns به معنای غیر معنی‌دار.

فرضیه را مطرح نمودند که NO می‌تواند نقشی در پاتوژنز ناهنجاری‌های همودنیامیک در سیروز داشته باشد،^{۳۰} در طی دهه ۹۰ بسیاری از مطالعات نشان دادند که تولید NO در بستر عروقی حیوانات و بیماران سروتیک افزایش می‌یابد که این نتایج بر مبنای اندازه‌گیری سطوح نیتريت و نیترات سیستمیک،^{۲۶،۲۷} فعالیت آنزیم NOS در آئورت و عروق مزانتریک^{۲۸،۲۹} و سطح cGMP آئورتی^{۲۹} در این گروه از بیماران و حیوانات حاصل شد. همچنین، می‌توان

وابسته به NANC در حیوانات سروتیک را نشان می‌دهد، بنابراین ممکن است مسیر NO و nNOS موجود در اعصاب NANC در افزایش پاسخ‌دهی بافت کورپورال حیوانات سروتیک به تحریک الکتریکی نقش داشته باشند. این یافته، با مطالعات اخیر ما که حاکی از افزایش شل‌شدگی وابسته به NANC در کورپوس کاورنوزوم و همچنین بافت آنوکسیژنوس موش‌های کلاستاتیک بوده است، همخوان می‌باشد.^{۱۸،۲۵} بعد از آن که Moncada و Vallance در سال ۱۹۹۱ این

می‌باشند.^{۱۶} در مطالعه حاضر، ما همچنین نشان دادیم که هرچند آنتاگونیست‌های رسپتورهای CB1 و وانیلوئیدی هیچ اثری بر شل‌شدگی وابسته به NANC در گروه sham نداشتند، باعث کاهش پاسخ‌های شل‌شدگی افزایش یافته در حیوانات سیروتیک شدند. این نتایج با بسیاری از مطالعات دیگر که نشان داده‌اند تغییرات در سیستم کانابینوئیدی ممکن است یکی از مکانیسم‌های مسئول در ایجاد تغییرات همودینامیک در سیروز باشد همخوان می‌باشد.^{۱۱} Batkai نشان داد که در کبد بیماران سیروتیک یک افزایش سه برابری در تعداد رسپتورهای کانابینوئیدی CB1 بر سلولهای اندوتلیال عروقی وجود دارد^{۱۲} که نشان‌دهنده up-regulation این رسپتورها در بیماری کبدی مزمن می‌باشد. در مطالعه مشابه، نشان داده شد که بلوک رسپتورهای CB1 باعث افزایش فشار شریانی و مقاومت عروقی در حیوانات سیروتیک می‌شود که این اثر در حیوانات سالم وجود نداشت.^{۱۳} در مطالعه، Gaskari تولید افزایش‌یافته کانابینوئیدهای نورونی، نقش پاتولوژیک در ایجاد کاردیومیوپاتی ناشی از سیروز داشت که این اثر از طریق رسپتورهای CB1 میانجی می‌شود.^{۱۴} در یک بررسی دیگر، Domnicali نشان داد که عروق مزانتریک موش‌های صحرائی سیروتیک حساسیت بیشتری به آنانداماید از خود نشان می‌دهند و هریک از رسپتورهای CB1 و وانیلوئیدی که عمدتاً در پایانه‌های اعصاب حسی دور عروقی قرار دارند، در این وضعیت درگیر می‌باشند.^{۱۵} همچنین، شواهدی وجود دارد که در بیماران سیروتیک سطوح پلاسمایی آنانداماید افزایش می‌یابد.^{۱۶} در مجموع و با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که سیستم اندوکانبینوئیدی ممکن است در پاسخ‌های شل‌شدگی افزایش یافته در بافت کاونوزال حیوانات سیروتیک نقش داشته باشد. به‌طور خلاصه، این مطالعه نشان داد که پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به تحریک الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرائی سیروتیک افزایش می‌یابد و این اثر احتمالاً به وسیله درگسیری مسیر نیتریک اکساید در این اعصاب و نیز درگیری سیستم کانابینوئیدی اندوژن میانجی می‌شود.

به‌وسیله مهارکننده‌های NOS از کاهش پاسخ‌دهی حلقه‌های عروقی آئورتی حیوانات و بیماران سیروتیک به تنگ‌کننده‌های عروقی جلوگیری به عمل آورد.^{۱۷} هرچند درگیری ایزوفرم‌های iNOS و eNOS در این وقایع پیشنهاد شده بود، نقش nNOS در این وضعیت مبهم بود تا اینکه Xu در سال ۲۰۰۰ گزارش نمود که بیان پروتئین nNOS در آئورت موش‌های صحرائی سیروتیک افزایش می‌یابد.^{۱۸} همچنین، Butterworth نشان داد که بیان ژن کدکننده پروتئین nNOS در بیماری کبدی افزایش می‌یابد.^{۱۹} این یافته‌ها باعث شد تا بر نقش احتمالی nNOS در ناهنجاری‌های عروقی و حتی نورولوژیکی در بیماران سیروتیک بیشتر تأکید شود. در یک مطالعه، Wei نشان داد که بیان mRNA و پروتئین nNOS در کبد موش‌های صحرائی دچار سیروز صفاوی افزایش می‌یابد.^{۲۰} به‌طور مشابهی، Bieker گزارش نمود که سطوح پروتئین و mRNA آنزیم nNOS در آئورت موش‌های سوری سیروتیک و در شریان هپاتیک بیماران سیروتیک افزایش می‌یابد.^{۲۱} از آنجائی که در مطالعه ما پاسخ‌دهی بافت کورپوس کاورنوزوم به یک دهنده NO (سدیم نیتروپروساید) در حیوانات سیروتیک و sham تفاوتی نداشت، به نظر می‌رسد که پاسخ‌های شل‌شدگی افزایش یافته به تحریک NANC در نتیجه افزایش تولید NO در این اعصاب در اثر افزایش فعالیت در آنزیم nNOS باشد. باید توجه داشت که برخی مطالعات در این زمینه به نتایج متفاوتی دست پیدا کرده‌اند. Hernandez در یک بررسی نشان داد که سطوح پروتئین nNOS در بافت مخچه موش‌های صحرائی نر سیروتیک تغییر نمی‌یابد.^{۲۲} حتی در یک مطالعه توسط Montes، کاهش در فعالیت آنزیم NOS در عقده‌های قاعده‌ای موش‌های صحرائی سیروتیک گزارش شد.^{۲۳} Goh نشان داد که هیچ تغییر معنی‌داری در بیان nNOS در بافت کبد بیماران سیروتیک رخ نمی‌دهد.^{۲۴} با توجه به نتایج این تحقیقات مطالعات جزئی‌تری در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه قبلی خود، برای اولین بار نشان دادیم که آنانداماید شل‌شدگی نورونیک در بافت کورپوس کاورنوزوم را تقویت می‌نماید و رسپتورهای CB1 و وانیلوئیدی در این میان درگیر

References

- García-Estañ J, Ortiz MC, Lee SS. Nitric oxide and renal and cardiac dysfunction in cirrhosis. *Clin Sci* 2002; 102: 213-22.
- Martin PY, Ginès P, Schrier RW. Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis. *N Engl J Med* 1998; 339: 533-41.
- Martin PY, Xu DL, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, St John J, et al. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996; 270: 494-9.

4. Morales-Ruiz M, Jiménez W, Pérez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, et al. Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1996; 24: 1481-6.
5. Wiest R, Groszmann RJ. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 411-26.
6. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999; 104: 1223-33.
7. Xu L, Carter EP, Ohara M, Martin PY, Rogachev B, Morris K, et al. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 1110-5.
8. Wei CL, Khoo HE, Lee KH, Hon WM. Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats. *Nitric Oxide* 2002; 7: 91-102.
9. Biecker E, Neef M, Sägeser H, Shaw S, Koshy A, Reichen J. Nitric oxide synthase 1 is partly compensating for nitric oxide synthase 3 deficiency in nitric oxide synthase 3 knock-out mice and is elevated in murine and human cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24: 345-53.
10. Gabbay E, Avraham Y, Ilan Y, Israeli E, Berry EM. Endocannabinoids and liver disease: review. *Liver Int* 2005; 25: 921-6.
11. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998; 12: 1035-44.
12. Bátkai S, Járjai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, et al. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001; 7: 827-32.
13. Fernández-Rodríguez CM, Romero J, Petros TJ, Bradshaw H, Gasalla JM, Gutiérrez ML. Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24: 477-83.
14. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-3.
15. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 503-14.
16. Ghasemi M, Sadeghipour H, Mani AR, Tavakoli S, Hajrasouliha AR, Ebrahimi F, et al. Effect of anandamide on nonadrenergic noncholinergic-mediated relaxation of rat corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 2006; 544: 138-45.
17. Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 2000; 342: 1802-13.
18. Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Role of opioid and nitric oxide systems in the nonadrenergic noncholinergic-mediated relaxation of corpus cavernosum in bile duct-ligated rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 201-7.
19. White R, Ho WS, Bottrill FE, Ford WR, Hiley CR. Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 921-9.
20. Carrier S, Nagaraju P, Morgan DM, Baba K, Nunes L, Lue TF. Age decreases nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis. *J Urol* 1997; 157: 1088-92.
21. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-42.
22. Kim N, Azadzi KM, Goldstein I, Saenz de Tejada I. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest* 1991; 88: 112-8.
23. Blanco R, Saenz de Tejada I, Goldstein I, Krane RJ, Wotiz HH, Cohen RA. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. II. Acetylcholine synthesis. *Am J Physiol* 1988; 254: 468-72.
24. Celtek S, Rodrigo J, Lobos E, Fernández P, Serrano J, Moncada S. Selective nitric oxide neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1804-12.
25. Dehpour AR, Seyyedi A, Rastegar H, Namiranian K, Moezi L, Sadeghipour H, et al. The nonadrenergic noncholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct-ligated rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 445: 31-6.
26. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18: 1139-43.
27. Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998; 28: 1467-73.
28. Cahill PA, Redmond EM, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996; 25: 370-8.
29. Ros J, Jiménez W, Lamas S, Clària J, Arroyo V, Rivera F, et al. Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995; 21: 554-60.
30. Vallances P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-8.
31. Gadano AC, Sogni P, Yang S, Cailmail S, Moreau R, Nepveux P, et al. Endothelial calcium-calmodulin dependent nitric oxide synthase in the in vitro vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1997; 26: 678-86.
32. Butterworth RF. Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2000; 32: 171-80.
33. Hernández R, Martínez-Lara E, Del Moral ML, Blanco S, Cañuelo A, Siles E, et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase maintains nitric oxide production in the cerebellum of thioacetamide cirrhotic rats. *Neuroscience* 2004; 126: 879-87.
34. Montes S, Pérez-Severiano F, Vergara P, Segovia J, Ríos C, Muriel P. Nitric oxide production in striatum and pallidum of cirrhotic rats. *Neurochem Res* 2006; 31: 11-20.
35. Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 588-94.
36. Wiest R, Groszmann RJ. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 411-26.
37. Ros R, Claria J, To-Figueras J, et al. Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 85-93.
38. Gaskari SA, Liu H, Moezi L, Li Y, Baik SK, Lee SS. Role of endocannabinoids in the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in bile duct-ligated rats. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 315-23.
39. Domenicali M, Ros J, Fernández-Varo G, Cejudo-Martín P, Crespo M, Morales-Ruiz M. Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut* 2005; 54: 522-7.

Effect of biliary cirrhosis on nonadrenergic noncholinergic-mediated relaxation of rat corpus cavernosum: Role of nitric oxide pathway and endocannabinoid system

Abstract

Ghasemi M.¹
Sadeghipour H.²
Dehpour A.R.^{3*}

1- Medical Student
2- General Physician
3- Department of
Pharmacology

Tehran University of Medical
Sciences

Background: Relaxation of the corpus cavernosum plays a major role in penile erection. Nitric oxide (NO) is known to be the most important factor mediating relaxation of corpus cavernosum, which is mainly derived from nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerves. The aim of the present study was to investigate the effect of biliary cirrhosis on nonadrenergic noncholinergic (NANC)-mediated relaxation of rat corpus cavernosum as well as the possible relevant roles of endocannabinoid and nitric oxide systems.

Methods: Corporal strips from sham-operated and biliary cirrhotic rats were mounted under tension in a standard oxygenated organ bath with guanethidine sulfate (5 μ M) and atropine (1 μ M) to induce adrenergic and cholinergic blockade. The strips were precontracted with phenylephrine hydrochloride (7.5 μ M) and electrical field stimulation was applied at different frequencies (2, 5, 10, 15 Hz) to obtain NANC-mediated relaxation. In separate precontracted strips of the sham and cirrhotic groups, the concentration-dependent relaxant responses to sodium nitroprusside (10 nM-1mM), as an NO donor, were assessed.

Results: The NANC-mediated relaxation was significantly enhanced in cirrhotic animals ($P<0.01$). Anandamide potentiated the relaxations in both groups ($P<0.05$). The cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 (10 μ M) and the vanilloid receptor antagonist capsazepine (10 μ M) each significantly prevented the enhanced relaxations in cirrhotic rats ($P<0.01$). The CB2 receptor antagonist AM630 had no effect on relaxations in the cirrhotic group. In a concentration-dependent manner, L-NAME (30-1000 nM) inhibited relaxations in both the sham and cirrhotic groups, although cirrhotic groups were more resistant to the inhibitory effects of L-NAME. The degree of relaxation induced by sodium nitroprusside (10 nM-1 mM) was similar in the two groups.

Conclusions: Biliary cirrhosis enhances the neurogenic relaxation in rat corpus cavernosum probably via the NO pathway and cannabinoid CB1 and vanilloid VR1 receptors.

Keywords: Cirrhosis; erectile function; nitric oxide; cannabinoids; corpus cavernosum

*Corresponding author:
Department of Pharmacology,
Tehran University of Medical
Sciences. P.O.Box: 13145-784,
Tehran.
Tel: +98-21-66112802
email: dehpour@yahoo.com