

اثر آننداماید در بهبود پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی نر دیابتیک

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۸/۰۹

چکیده

مهدی قاسمی*

احمدرضا دهبور

گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی تهران

زمینه و هدف: اختلال نعوظ به‌طور شایعی در ۳۵٪ تا ۷۵٪ مردان دیابتی دیده می‌شود. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر اندوکائابینوئیدها بر شل‌شدگی نوروزنیک بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی دیابتیک و نقش احتمالی مسیر نیتریک‌اکساید بوده است. **روش بررسی:** موش‌ها به دو گروه غیردیابتیک و دیابتیک (تجویز استرپتوزوسین، ۴۵mg/kg i.p.) تقسیم شدند. هشت هفته بعد، کورپوس کاورنوزوم آنها بعد از دایسکت و گذاشتن در حمام و به‌دنبال انقباض توسط فنیل‌افرین توسط تحریک الکتریکی در فرکانس‌های دو، ۱۰، پنج و ۱۵ هرتز دچار شل‌شدگی شدند و نتایج توسط دستگاه الکتروفیزیوگراف ثبت گردید. اثر آننداماید (۱μM، ۳، ۱۰) و آنتاگونیست‌های اختصاصی رسپتورهای CB1 (۱μM، AM251)، CB2 (۱μM، AM630) و وانیلوئیدی VR1 (کاپسازپین، ۳μM) در حضور یا غیاب آننداماید و اثر مهارکننده سنتز NO (L-NAME، ۱μM)، بر پاسخ‌های دو گروه بررسی شد. همچنین، اثر تجویز همزمان L-arginine (پیش‌ساز NO، ۱۰۰μM) و آننداماید (۳μM) بر پاسخ‌ها بررسی شد. **یافته‌ها:** شل‌شدگی نوروزنیک (p<۰/۰۰۱) در حیوانات دیابتیک کاهش یافت. آننداماید باعث تقویت این پاسخ‌ها در گروه‌های دیابتیک شد (p<۰/۰۰۱). اگرچه AM251 و کاپسازپین در گروه دیابتیک بر پاسخ‌ها اثری نداشتند، باعث کاهش اثر آننداماید شدند. AM630 هیچ‌یک از گروه‌ها اثری نداشت. L-NAME (p<۰/۰۰۱) پاسخ‌های شل‌شدگی را در حضور یا غیاب آننداماید در گروه‌های کنترل و دیابتیک مهار کرد. تجویز همزمان دوزهای اندک آننداماید و L-arginine باعث بهبود سینرژیک (p<۰/۰۰۱) در پاسخ‌های شل‌شدگی شد. **نتیجه‌گیری:** تجویز حاد یک کائابینوئید اندوزن به نام آننداماید می‌تواند از طریق رسپتورهای CB1 و وانیلوئیدی VR1 و درگیری مسیر نیتریک‌اکساید باعث بهبود پاسخ‌های شل‌شدگی نوروزنیک در بافت کورپوس موش‌های دیابتیک شود.

کلمات کلیدی: دیابت، اختلال نعوظ، آننداماید، سیستم کائابینوئیدی، نیتریک‌اکساید، کورپوس کاورنوزوم

*نویسنده مسئول، تهران، بزرگراه همت، بلوار شاهین شمالی، کوچه عباس پروهان، پلاک ۱۱۵، طبقه سوم
تلفن: ۴۴۴۱۱۷۷
email: m82_ghasemi@yahoo.com

مقدمه

شل‌شدگی بافت کورپوس کاورنوزوم و در نتیجه ورود خون به فضاهای سینوزوئیدی و نعوظ می‌شود.^{۱،۲} هرگونه اختلال در شل‌شدگی بافت کورپوس کاورنوزوم و متعاقباً اختلال در توانایی مردان در ایجاد نعوظ که ارضاکنده عملکرد جنسی است باعث ایجاد وضعیتی می‌شود که به آن اختلال نعوظ (Erectile Dysfunction) می‌گویند. تخمین زده شده است که تا سال ۲۰۲۵ میلادی حدود ۳۲۲ میلیون نفر در سرتاسر دنیا از اختلال نعوظ رنج می‌برند.^۳ به علاوه، مطالعات بالینی متعددی نشان داده‌اند که بیماری دیابت به‌طور بسیار شایعی باعث ایجاد اختلال نعوظ می‌شود و در حدود نیمی از مردان دیابتیک دچار اختلال نعوظ می‌شوند و میزان بروز این اختلال در این

امروزه به خوبی مشخص است که مدیاتور عمده نعوظ نیتریک‌اکساید (Nitric Oxide (NO است که به‌طور عمده توسط اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک (NANC) در داخل بافت کورپوس کاورنوزوم آزاد می‌شود.^۱ تولید NO در این اعصاب به‌وسیله آنزیم سنتزکننده نیتریک‌اکساید نوروئی (nNOS) انجام می‌شود که این آنزیم به‌وسیله جریان ورودی یون‌های Ca⁺⁺ (که بعد از تحریک عصبی اتفاق می‌افتد) و به‌وسیله O₂ فعال می‌شود. NO به‌وسیله تحریک آنزیم گوانیل لیل سیکلاز جهت تولید cGMP عمل می‌کند که آن هم مانع ورود Ca⁺⁺ به عضله صاف کاورنوزال شده و باعث

تمامی مراحل انجام این مطالعه طبق راهنمای مراقبت و به‌کارگیری حیوانات آزمایشگاهی (NIH US publication 86-23 revised 1985) انجام گردید. حیوانات به‌طور تصادفی دو گروه اصلی تقسیم شدند: الف) گروه دیابتیک (Diabetic) که حیوانات این گروه با تزریق داخل صفاقی یک دوز استرپتوزوسین (Streptozocin، انگلستان، شرکت سیگما) با تزریق داخل صفاقی (i.p.) یک دوز ۶۵mg/kg استرپتوزوسین داخل صفاقی که در بافر سیترات (PH:۴/۵) حل شده است دیابتیک شدند. ب) گروه غیر دیابتیک کنترل (Control) که در این گروه‌ها حیوانات تنها محلول بافر سیترات بدون استرپتوزوسین به آنها تزریق شد. نحوه دیابتیک نمودن به این صورت است که ابتدا موش‌های صحرایی نر را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت تحت شرایط گرسنگی قرار دادیم. بیماری دیابت توسط تزریق داخل صفاقی داروی استرپتوزوسین (۴۵mg/kg، STZ) که در ۰/۳ml بافر سیترات (pH=۴/۵) حل گردیده، در حیوانات ایجاد گردید. در حیوانات کنترل یا شاهد، تنها ۰/۳ml محلول بافر سیترات بدون داروی استرپتوزوسین تزریق شد. پس از سه روز توسط گلوکومتر وجود قند در خون گرفته شده از ورید دمی حیوانات بررسی گردید. در صورتی که قند آنها بالاتر از ۳۰۰mg/dl بود، حیوانات به عنوان دیابتیک شناخته شده و آزمایشات هشت هفته بعد از تزریق STZ یا Vehicle (بافر سیترات) در دو گروه دیابتیک و غیردیابتیک (کنترل) انجام شد.

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 ۱۱۸/۱ NaCl، ۴/۷ KCl، ۱/۰ KH₂PO₄، ۱/۰ MgSO₄، ۲۵/۰ NaHCO₃، ۲/۵ CaCl₂ و ۱۱/۱ glucose) (به mM) که توسط گاز کاربوژن (۹۵٪ O₂ و ۵٪ CO₂) به صورت حباب (bubbled) 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 به‌طور جداگانه در یک حمام ارگان (Organ chamber) محتوی ۲۷ml محلول Krebs-bicarbonate آویزان می‌شدند به‌گونه‌ای که یک انتهای آن به نگهدارنده الکتروود و طرف دیگر به یک سیم مرتبط با مبدل نیرو (Narco F-60, Narco Biosystem, Houston, TX, USA) وصل

بیماران حدود ۳۵٪ تا ۷۵٪ می‌باشد.^{۱۰} پاتوژن اختلال نعوظ به عنوان عارضه‌ای از بیماری دیابت به‌طور کامل شناسایی نشده است. لذا با استفاده از دیابت القاء شده با استرپتوزوسین و آلوکسان آزمایشات متعددی بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است و مکانیسم‌های متعددی در مورد اختلال نعوظ ناشی از دیابت مطرح گردیده است.^{۸-۵} بر اساس این فرضیات مطالعات متعددی به منظور پیدا نمودن استراتژی‌های مناسب درمانی در اختلال نعوظ ناشی از دیابت انجام شده است. مدارکی وجود دارد که کانابینوئیدهای اندوژن می‌توانند خاصیت محافظت‌کننده عصبی و دارای اثرات درمانی در دردهای نوروپاتی در مدل‌های آزمایشگاهی دیابت داشته باشند.^{۱۱} همچنین این مواد می‌توانند باعث کاهش استرس اکسیداتیو در بافت شبکه شده و از مرگ سلول‌های عصبی شبکه در دیابت جلوگیری کنند و لذا با این اثرات باعث بهبود مؤلفه نورونیک در رتینوپاتی دیابتی شوند.^{۱۱} اخیراً نشان داده‌ایم کانابینوئیدهای اندوژن همچون آننداماید می‌توانند دارای نقش محیطی در فرایند نعوظ از طریق یک اثر تقویت‌کننده بر شل‌شدگی نورونیک بافت کورپوس کاورنوزوم داشته باشند که این اثر به واسطه رسپتورهای کانابینوئیدی CB1 و وانیلوئیدی VR1 هدایت می‌شود.^{۱۲} در مطالعه قبلی با استفاده از روش وسترن بلات وجود این رسپتورها را در بافت کورپوس کاورنوزوم نشان دادیم.^{۱۲} به‌هرحال، نقش دقیق سیستم اندو کانابینوئیدی در وضعیت‌های پاتولوژیکی که فرایند نعوظ را تحت تأثیر قرار می‌دهد مبهم باقی مانده است. در مطالعه حاضر به بررسی اثرات فارماکولوژیک کانابینوئیدهای اندوژن همچون آننداماید بر عملکرد نورونیک بافت کورپوس کاورنوزوم در موش‌های صحرایی دیابتیک پرداختیم و توانایی آنها را در جهت تغییر شل‌شدگی وابسته به اعصاب NANC در بافت حیوانات دیابتیک مورد ارزیابی قرار دادیم و به بررسی نقش مسیر L-arginine/NO در این حالت پرداختیم.

روش بررسی

حیوانات و نحوه دیابتیک نمودن آنها: موش‌های صحرایی نر نژاد Sprague-Dawely (انستیتو 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 و

شدند. بعد از آنکه سطح انقباضی ثابت شد، رشته‌ها به وسیله اضافه نمودن دوزهای تجمعی سدیم نیتروپروساید (۱mM-۱nM) هر دو دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، دچار شل‌شدگی شدند که به‌طور همزمان این مراحل توسط فیزیوگراف ثبت می‌شد. این مراحل یک‌بار دیگر در حضور آننداماید (۳μM) تکرار شد. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۱ جمع‌آوری گردیدند و داده‌ها (درصد شل‌شدگی به تحریک الکتریکی بافت کورپوس کاورنوزوم در گروه‌های مورد آزمایش، میزان پاسخ‌های انقباضی با فنیل‌افرین در دو گروه کنترل و دیابتیک) به صورت Mean±S.E.M (انحراف معیار میانگین+ میانگین) بیان شدند. تحلیل آماری داده‌ها به وسیله آنالیز one-way واریانس (ANOVA) متعاقب Newman-Keuls as post-hoc test انجام شد. پاسخ‌های انقباضی به فنیل‌افرین توسط آزمون Student's T-test انجام شد و p<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

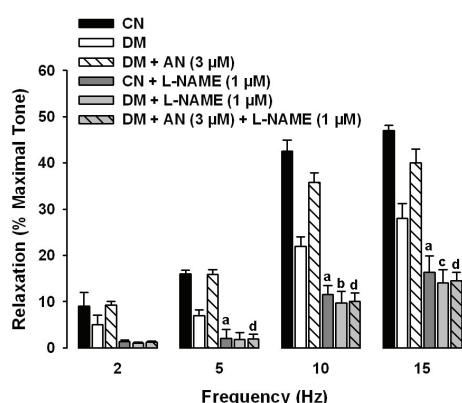
پاسخ‌ها به فنیل‌افرین: تفاوت معنی‌داری در پاسخ‌های انقباضی حداکثر به فنیل‌افرین بین گروه‌های کنترل غیردیابتیک و دیابتیک وجود نداشت. همچنین پاسخ‌های انقباضی به ۷/۵μM فنیل‌افرین در دو گروه مشابه بود (به ترتیب ۳۵۴±۳۱mg و ۳۴۹±۲۵). پاسخ‌ها به

تحریکات الکتریکی اعصاب NANC: بافت منقبض شده کورپوس کاورنوزوم به وسیله تحریکات الکتریکی به صورت وابسته به فرکانس در هر دو گروه کنترل و دیابتیک دچار شل‌شدگی شد (شکل ۱، جدول ۱)، اما پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریکات الکتریکی اعصاب NANC به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) در گروه دیابتیک کاهش یافته بود (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی اثرات آننداماید بر شل‌شدگی القاء شده با تحریک الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم به شرح زیر می‌باشد (جدول ۱): غلظت‌های مختلف آننداماید (۳μM، ۱، ۰/۳) به صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) باعث بهبود شل‌شدگی القاء شده با تحریک الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم حیوانات دیابتیک شد (شکل ۱). هر یک از آنتاگونیست‌های رسپتور CB1 (۱μM، AM251) و VR1 (۳μM، کاپسازپین) به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) باعث مهار اثرات تقویت کننده آننداماید (۳μM) بر شل‌شدگی وابسته به تحریک الکتریکی اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های دیابتیک شدند (شکل ۲). لکن آنتاگونیست رسپتور CB2 (۱μM، AM630) تأثیری بر اثرات آننداماید بر این پاسخ‌ها نداشت. همچنین، هیچ‌یک از آنتاگونیست‌های مذکور به تنهایی بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریکات الکتریکی در بافت دیابتیک اثری نداشتند. L-NAME با

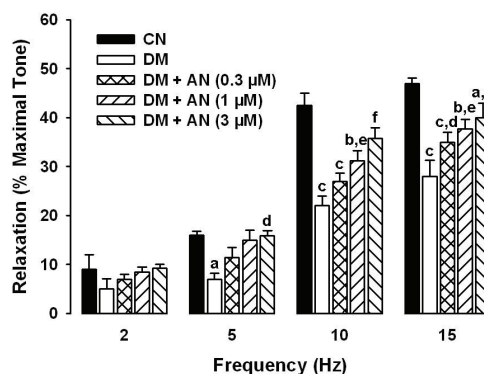
جدول ۱: درصد شل‌شدگی (انحراف معیار± میانگین) به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک (NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل‌افرین در گروه کنترل (CN) و دیابتیک (DM) و در گروه‌های DM در حضور آننداماید (AN)، AM251، کاپسازپین (CP)، L-NAME و L-arginine (L-arg).

گروه‌ها	۲	۵	۱۰	۱۵
کنترل (CN)	۹±۳	۱۶±۰/۸۱	۴۲/۵±۲/۵	۴۷±۱/۲
دیابتیک (DM)	۵±۲/۱	۶/۹۵±۱/۲۳ ^a	۲۲±۱/۹۷ ^c	۲۸±۳/۲۶ ^c
DM+AN (۰/۳μM)	۷±۰/۹۸	۱۱±۲/۱۴	۲۷±۱/۶۵ ^c	۳۵±۲/۰۱ ^{c,d}
DM+AN (۱μM)	۸/۵±۱/۰۲	۱۵±۲/۰۳	۳۱/۲۴±۲/۰۳ ^{b,e}	۳۷/۶۷±۲/۰۱ ^{b,e}
DM+AN (۳μM)	۹/۲۵±۰/۸۱	۱۵/۸۶±۱/۰۱ ^d	۳۵/۷۵±۲/۱۳ ^f	۴۰±۳/۰۱ ^{a,f}
DM+AN (۳μM)+AM251 (۱μM)	۷/۱۷±۱/۷۵	۸/۳۴±۲/۵۶	۲۴/۲۱±۲/۱ ^{c,g}	۳۰/۱±۱/۹۹ ^{c,g}
DM+AN (۱μM)+CP (۳μM)	۶/۲۴±۰/۰۲	۷/۸۱±۱/۷۴	۲۳/۷۵±۳/۰۵ ^{c,g}	۲۹/۴۵±۲/۹۵ ^{c,g}
CN+L-NAME (۱μM)	۱/۴±۰/۳۴	۲/۰۱±۲ ^c	۱۱/۵۶±۱/۹۷ ^c	۱۶/۳۴±۳/۵۴ ^c
DM+L-NAME (۱μM)	۱/۰۱±۰/۰۲	۱/۸۵±۱/۵	۹/۷±۲/۵ ^e	۱۴/۰۱±۲/۹ ^f
DM+AN (۳μM)+L-NAME (۱μM)	۱/۲±۰/۲۴	۱/۹±۱ ⁱ	۱۰/۱±۱/۷۸ ⁱ	۱۴/۵۷±۱/۷۹ ⁱ
CN+L-arg (۱۰۰μM)	۹/۱±۱/۲	۱۶/۲۵±۱/۶۹	۴۳±۲/۴۸	۴۸/۶۵±۳/۰۲
DM+L-arg (۱۰۰μM)	۶/۳۵±۱/۲۳	۸/۵±۲/۰۱	۲۹/۳±۳/۰۵ ^c	۳۷±۱/۵۶ ^{a,f}
DM+AN (۰/۰۳ μM)+L-arg (۱۰۰μM)	۸/۷۵±۲/۰۱	۱۵/۸±۲/۰۹ ^d	۳۹/۵±۳ ^e	۴۲/۵±۲/۹۴ ^e

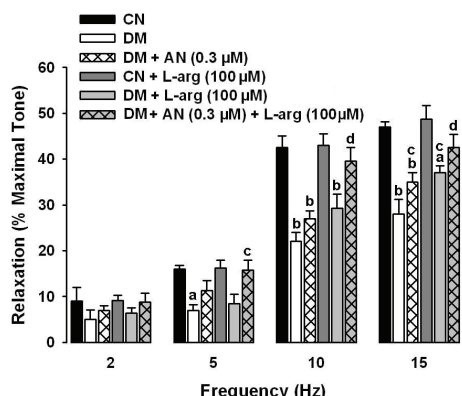
^a یعنی p<۰/۰۵، ^b یعنی p<۰/۰۱ و ^c یعنی p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، ^d یعنی p<۰/۰۵، ^e یعنی p<۰/۰۱ و ^f یعنی p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه دیابتیک، ^g یعنی p<۰/۰۵ و ^h یعنی p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه دیابتیک. ANOVA انجام شد و p<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.



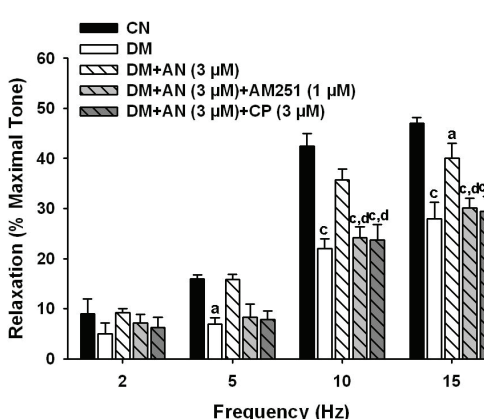
شکل - ۲: پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنژیک غیر کولینرژیک (NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل‌افرین در گروه دیابتیک (DM) و در حضور دوزهای مختلف آنانداماید (۳μM) در غیاب یا حضور AM251 (۱μM) و کاپسازین (۳μM, CP).^a یعنی $p < 0.05$ و ^c یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه دیابتیک کنترل،^d یعنی $p < 0.05$ در مقایسه با گروه دیابتیک که در آن آنانداماید اضافه شده است (آزمون یک‌طرفه ANOVA متعاقب آزمون Newman-Keuls as post-hoc)



شکل - ۱: پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنژیک غیرکولینرژیک (NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل‌افرین در گروه دیابتیک (DM) و در حضور دوزهای مختلف آنانداماید (۰.۳، ۱، ۳μM).^a یعنی $p < 0.05$ ، ^b یعنی $p < 0.01$ و ^c یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل،^d یعنی $p < 0.05$ ، ^e یعنی $p < 0.01$ و ^f یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه دیابتیک (آزمون یک‌طرفه ANOVA متعاقب آزمون Newman-Keuls as post-hoc)



شکل - ۴: اثر L-arginine (۱۰۰μM, L-arg) بر پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به فرکانس در بافت منقبض شده کورپوس کاورنوزوم حیوانات کنترل (CN) و دیابتیک (DM). تجویز همزمان L-arginine (۱۰۰μM) و آنانداماید (۰.۳μM, AN) باعث بهبود چشمگیر در پاسخ‌های شل‌شدگی بافت کورپوس در حیوانات دیابتیک شد.^a یعنی $p < 0.05$ و ^b یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل،^c یعنی $p < 0.05$ و ^d یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه دیابتیک (آزمون یک‌طرفه ANOVA متعاقب بررسی اثرات دی‌متیل سولفوکساید (dimethyl sulfoxide) بر ضایعات و اختلالات نورولوژیکی در ایسکمی مغزی موضعی - موقتی در موش صحرائی (آزمون Newman-Keuls as post-hoc))



شکل - ۳: اثر L-NAME (۱μM) بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی اعصاب غیرآدرنژیک غیرکولینرژیک (NANC) در بافت کورپوس کاورنوزوم منقبض شده با فنیل‌افرین در حضور یا غیاب آنانداماید (۳μM) در هر یک از حیوانات کنترل (CN) و دیابتیک (DM).^a یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل،^b یعنی $p < 0.01$ و ^c یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه دیابتیک،^d یعنی $p < 0.001$ در مقایسه با گروه دیابتیک که در آن آنانداماید (۳μM) اضافه شده است (آزمون یک‌طرفه ANOVA متعاقب آزمون Newman-Keuls as post-hoc)

غلظت ۱μM باعث کاهش چشمگیری ($p < 0.001$) در پاسخ‌های شل‌شدگی القاء شده با تحریک الکتریکی اعصاب NANC در حضور یا عدم حضور آنانداماید (۳μM) شد (شکل ۳). L-arginine (۱۰۰μM) بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی در بافت

حدودی مربوط به استفاده از گونه‌های حیوانی مختلف و یا طول مدت آزمایشگاهی دیابت جهت بررسی حیوانات باشد.

پاسخ‌های انقباضی به فیل‌افرین در دو گروه کنترل و دیابتیک مشابه بود که نشان‌دهنده آن است که کاهش شل‌شدگی نورونیک در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های دیابتیک نمی‌تواند ناشی از تغییر در پاسخ‌دهی این بافتها به فیل‌افرین باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که شل‌شدگی کاهش‌یافته بافت کورپوس کاورنوزوم حیوانات دیابتیک مربوط به نقص در سیستم نوروترانسمیتری NO در این مدل باشد. به‌طور موافق با این پیشنهاد، نشان داده شده است که فعالیت NOS، که به‌وسیله تبدیل 3H-arginine به 3H-citrulline اندازه‌گیری شده بود، و نیز میزان آنزیم nNOS در بافت آلت موش‌های صحرایی دچار دیابت کاهش می‌یابد.^{۵۷} همچنین، کاهش فیبرهای عصبی محتوی آنزیم NOS در اعصاب کاورنوزال و Down-regulation بیان پروتئین nNOS در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های دیابتیک گزارش شده است.^{۱۷} در این مطالعه، برای اولین بار نشان دادیم که ناتوانی بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های دیابتیک در شل‌شدگی وابسته به اعصاب NANC به‌وسیله یک کانابینوئید اندوژن به نام آنانداماید به‌طور وابسته به دوز بهبود می‌یابد. از آنجائی‌که این اثر تقویت‌کننده آنانداماید به‌وسیله هر یک از آنتاگونیست‌های CB1 و VR1 مهار شد، نشان‌دهنده این موضوع است که اثر آنانداماید از طریق درگیر نمودن این رسپتورها در بافت کورپوس کاورنوزوم صورت می‌پذیرد. این یافته با مطالعه اخیر ما در این زمینه که با استفاده از روش وسترن بلات وجود رسپتورهای CB1 و VR1 در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی نشان داده شد همخوان می‌باشد.^{۱۲}

در مطالعه حاضر، ما از AM251 به عنوان آنتاگونیست اختصاصی رسپتور CB1 و از کاپسازین به عنوان آنتاگونیست اختصاصی رسپتور VR1 جهت مهار اثرات آنانداماید بر پاسخ‌های شل‌شدگی وابسته به اعصاب NANC استفاده نمودیم. AM251 به‌طور ساختاری بسیار شبیه SR141716A (ریمونابات) می‌باشد که عضو پیش‌ساز یک سری از مواد به نام آنتاگونیست‌های CB1 دی‌آریل‌پیرازولی می‌باشد. این لیگاندها به آسانی باعث جلوگیری از اثرات میانجی‌گری شده به‌وسیله رسپتورهای CB1 می‌شوند.^{۱۸} نشان داده شده است که AM251 یک آنتاگونیست اختصاصی و پر قدرت برای رسپتورهای CB1 می‌باشد که برای این رسپتورها ۳۰۶ بار انتخابی‌تر از رسپتورهای CB2 اثر

($100\mu\text{M}$) و غلظت‌های پایینی از آنانداماید ($0/3\mu\text{M}$) باعث ایجاد یک بهبود چشمگیر در پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم حیوانات دیابتیک شد که این افزایش در فرکانس‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ هرتز مشهود بود (شکل ۴). به‌نظر می‌رسد که تجویز همزمان آنانداماید و L-arginine یک اثر سینرژستیک در افزایش شل‌شدگی القاء شده با تحریک الکتریکی در بافت کورپوس کاورنوزوم حیوانات دیابتیک شود. پاسخ‌ها به سدیم نیتروپروساید (SNP)؛ در گروه‌های کنترل و دیابتیک، رشته‌های منقبض‌شده کورپوس کاورنوزوم به‌وسیله اضافه نمودن دوزهای تجمعی سدیم نیتروپروساید (1mM - 10nM) هر دو دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، دچار شل‌شدگی شدند. در گروه‌های کنترل و دیابتیک تفاوت معنی‌داری بین پاسخ‌های شل‌شدگی به دوزهای تجمعی سدیم نیتروپروساید (1mM - 10nM) وجود نداشت. هیچ‌یک از آنتاگونیست‌های رسپتور CB1، CB2 و VR1 و آنانداماید بر پاسخ‌های شل‌شدگی به سدیم نیتروپروساید در گروه‌های کنترل و دیابتیک اثری نداشتند.

بحث

در این مطالعه نشان دادیم که شل‌شدگی NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم حیوانات دیابتیک در مقایسه با حیوانات کنترل کاهش چشمگیری داشت. این یافته موافق با مطالعات قبلی در این زمینه می‌باشد.^{۱۳-۱۵} از آنجائی‌که شل‌شدگی به تحریک الکتریکی در حضور مهارکننده NOS در هر دو گروه کنترل و دیابتیک مهار شد نشان‌دهنده آن است که این پاسخ‌ها وابسته به سیستم نوروترانسمیتری NO می‌باشند. همچنین نشان دادیم که دیابت پاسخ‌های شل‌شدگی عضله صاف کاورنوزال به NO را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد، زیرا رشته‌های کورپوس هر دو گروه کنترل غیردیابتیک و دیابتیک پاسخ‌های شل‌شدگی مشابهی را به سدیم نیتروپروساید (دهنده NO) نشان دادند. این یافته نیز سازگار با مطالعات قبلی در این زمینه^{۱۵} و نشان‌دهنده آن است که ناتوانی در شل‌شدگی بافت کورپوس حیوانات دیابتیک به تحریک الکتریکی ممکن است ناشی از کاهش تولید NO یا فراهمی زیستی آن در این حالت باشد. به‌رحال، برخی داده‌ها حاکی از آن است که حساسیت بافت کورپوس کاورنوزوم به سدیم نیتروپروساید در موش‌های صحرایی،^۶ موش‌های سوری^{۱۵} و خرگوش‌های^{۱۶} دیابتیک کاهش می‌یابد. این تناقضات ممکن است تا

گزارش شده کاهش سطح L-arginine در دسترس برای آنزیم NOS می‌تواند در نتیجه وضعیت کاتابولیک در دیابت باشد.^{۲۷} در این مطالعه، ما نشان دادیم که غلظتی از L-arginine که در گروه کنترل اثری بر پاسخ‌های شل‌شدگی به تحریک الکتریکی نداشت، باعث افزایش این پاسخ‌ها در گروه‌های دیابتیک شد اما این اثر تقویت‌کننده تنها در فرکانس‌های بالا یعنی ۱۵ هرتز مشاهده شد. به‌طور سازگار با مطالعات قبلی،^{۱۵} داده‌های ما پیشنهادکننده این حقیقت است که فراهمی کاسته شده arginine برای سنتز NO در بافت‌های کورپوس کاورنوزوم دیابتیک ممکن است بر شل‌شدگی وابسته به NO به تحریک الکتریکی اعصاب NANC اثر منفی بگذارد. یافته ارزشمند دیگر مطالعه ما این بود که تجویز همزمان غلظت‌های پائین آنانداماید و L-arginine باعث یک اثر تقویت‌کننده چشمگیر و سینرژیک در شل‌شدگی نورونیک بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی دیابتیک شد. این یافته می‌تواند تأییدکننده این حقیقت باشد که مسیر NO در اثرات تقویت‌کننده آنانداماید دخیل می‌باشد و از سوی دیگر این اثر می‌تواند بینش جدیدی را جهت استراتژی‌های درمانی در اختلال نعوظ ناشی از دیابت فراهم سازد.

به‌طور خلاصه در این مطالعه نشان دادیم که شل‌شدگی نورونیک وابسته به NO در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی دیابتیک کاهش می‌یابد. آنانداماید (کانابینوئید اندوزن) باعث بهبود چشمگیر در پاسخ‌های شل‌شدگی کاهش یافته در بافت کورپوس موش‌های دیابتیک شد که این اثر وابسته به غلظت بوده و توسط هر یک از آنتاگونیست‌های اختصاصی CBI و VR1 مهار شد که نشان‌دهنده دخالت این رسپتورها در عمل آنانداماید می‌باشد. L-arginine (پیش‌ساز NO) به‌طور نسبی باعث افزایش پاسخ‌های شل‌شدگی کاهش یافته وابسته به اعصاب NANC در بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی دیابتیک شد که نشان‌دهنده درگیری مسیر تولید NO در دیابت در این بافت می‌باشد.

تجویز همزمان دوزهای پایین آنانداماید و L-arginine باعث تقویت سینرژیک در شل‌شدگی نورونیک با بافت کورپوس کاورنوزوم موش‌های صحرایی دیابتیک شد که نشان‌دهنده میانجی بودن مسیر NO در اثرات درمانی آنانداماید و فراهم نمودن یک پنجره جدید در رویکردهای درمانی اختلال نعوظ ناشی از دیابت می‌باشد.

می‌گذارد. به‌علاوه، AM251 حدوداً دو بار اختصاصی‌تر از SR141716A عمل می‌کند.^{۱۸} همچنین، مشخص شده است که کاپسازپین نیز یک آنتاگونیست کلاسیک برای رسپتورهای VR1 می‌باشد.^{۱۹} از سوی دیگر داده‌های ما بیانگر این موضوع است که مهارکننده NO یعنی L-NAME می‌تواند پاسخ‌های شل‌شدگی را حتی در حضور آنانداماید مهار کند.

موافق با این یافته، بسیاری از بررسی‌ها نشان‌دهنده ارتباط نزدیک دو سیستم کانابینوئیدی و NO می‌باشند که این ارتباط عمدتاً از طریق فعالیت رسپتورهای CBI و VR1 صورت می‌گیرد.^{۲۰،۲۱} برای مثال، Stefano و همکارانش نشان دادند تولید NO که به‌وسیله آنانداماید القاء می‌شود یک پدیده وابسته به فعالیت آنزیم NOS می‌باشد.^{۲۱} همچنین، Harris و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که هریک از آنتاگونیست‌های رسپتور VR1 یا مهارکننده‌های آنزیم nNOS می‌تواند باعث کاهش پاسخ‌های شل‌شدگی به آنانداماید در بستر عروق مزانتریک موش‌های صحرایی شوند.^{۲۳}

به نظر می‌رسد که محتمل‌ترین محل برای عمل آنانداماید متعاقب تحریک الکتریکی، غشاء پیش‌سیناپسی اعصاب NANC (یا نینترژیک) در بافت کورپوس کاورنوزوم باشد، چرا که در حضور آنانداماید پاسخ‌های شل‌شدگی به SNP در هر دو گروه کنترل و دیابتیک تغییر معنی‌داری نشان نداد. ما در این مطالعه اثرات بهبود دهنده آنانداماید را در عملکرد نورونیک بافت کورپوس کاورنوزوم حیوانات دیابتیک نشان دادیم. مدارکی وجود دارد که نشان‌دهنده اثرات Neuroprotective سیستم کانابینوئیدی در مدل‌های آزمایشگاهی همچون مدل درد نوروپاتی در دیابت می‌باشد.

برای نمونه، Dogrul در سال ۲۰۰۴ نشان داد که تجویز کانابینوئیدها می‌تواند باعث اثرات ضد درد در مدل آزمایشگاهی Tactile Allodynia در موش‌های سوری دیابتیک شود.^{۱۰} به‌علاوه، نشان داده شد که این اثرات از طریق رسپتورهای CBI میانجی‌گری می‌شود.^{۲۴} تجویز کانابینوئیدها می‌تواند باعث کاهش استرس اکسیداتیو در بافت شبکه‌ای شود و از مرگ سلول‌های عصبی شبکه‌ای جلوگیری نماید و در نتیجه باعث بهبود مولفه نوروپاتی در رتینوپاتی دیابتی شود.^{۱۱} کاهش سطوح پلاسمایی L-arginine در بیماران و حیوانات دیابتیک نشان داده شده است.^{۲۵،۲۶} همچنین،

References

1. Lue TF. Erectile dysfunction. *N Eng J Med* 2000; 342: 1802-13.
2. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 233-66.
3. McKinlay JB. The worldwide prevalence and epidemiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2000; 12: S6-11.
4. Newman HF, Marcus H. Erectile dysfunction in diabetes and hypertension. *Urology* 1985; 26: 135-7.
5. Vernet D, Cai L, Garban H, Babbitt ML, Murray FT, Rajfer J, et al. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology* 1995; 136: 5709-17.
6. Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of diabetes and treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. *Diabetologia* 1999; 42: 343-50.
7. Celtek S, Rodrigo J, Lobos E, Fernández P, Serrano J, Moncada S. Selective nitrenergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1804-12.
8. Seftel AD, Vaziri ND, Ni Z, Razmjouei K, Fogarty J, Hampel N, et al. Advanced glycation end products in human penis: elevation in diabetic tissue, site of deposition, and possible effect through iNOS or eNOS. *Urology* 1997; 50: 1016-26.
9. Ulugol A, Karadag HC, Ipci Y, Tamer M, Dokmeci I. The effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on tactile allodynia in diabetic rats. *Neurosci Lett* 2004; 371: 167-70.
10. Doğrul A, Gül H, Yıldız O, Bilgin F, Güzeldeir ME. Cannabinoids blocks tactile allodynia in diabetic mice without attenuation of its antinociceptive effect. *Neurosci Lett* 2004; 368: 82-6.
11. El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol* 2006; 168: 235-44.
12. 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.
13. Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzi K, Krane RJ, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med* 1989; 320: 1025-30.
14. Azadzi KM, Saenz de Tejada I. Diabetes mellitus impairs neurogenic and endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol* 1992; 148: 1587-91.
15. Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. IkappaB kinase 2 inhibition corrects defective nitrenergic erectile mechanisms in diabetic mouse corpus cavernosum. *Urology* 2006; 68: 214-8.
16. Chang S, Hypolite JA, Velez M, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, et al. Downregulation of cGMP-dependent protein kinase-1 activity in the corpus cavernosum smooth muscle of diabetic rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R950-60.
17. El-Sakka AI, Lin CS, Chui RM, Dahiya R, Lue TF. Effects of diabetes on nitric oxide synthase and growth factor genes and protein expression in an animal model. *Int J Impot Res* 1999; 11: 123-32.
18. Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, et al. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* 1999; 42: 769-76.
19. Valenzano KJ, Sun Q. Current perspectives on the therapeutic utility of VR1 antagonists. *Curr Med Chem* 2004; 11: 3185-202.
20. Howlett AC, Mukhopadhyay S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 2000; 108: 53-70.
21. Stefano GB, Salzet M, Magazine HI, Bilfinger TV. Antagonism of LPS and IFN-gamma induction of iNOS in human saphenous vein endothelium by morphine and anandamide by nitric oxide inhibition of adenylate cyclase. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 813-20.
22. 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.
23. 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.
24. Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, et al. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 2001; 92: 91-100.
25. Grill V, Björkman O, Gutniak M, Lindqvist M. Brain uptake and release of amino acids in nondiabetic and insulin-dependent diabetic subjects: important role of glutamine release for nitrogen balance. *Metabolism* 1992; 41: 28-32.
26. Mans AM, DeJoseph MR, Davis DW, Hawkins RA. Regional amino acid transport into brain during diabetes: effect of plasma amino acids. *Am J Physiol* 1987; 253: E575-83.
27. Bank N, Aynedjian HS. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int* 1993; 43: 1306-12.

Effect of anandamide in improving of the non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the corpus cavernosum from diabetic rats

Ghasemi M.*
Dehpour A.R.

Department of Pharmacology,
School of Medicine, Tehran
University of Medical Sciences,
Iran.

Abstract

Received: September 03, 2008 Accepted: October 29, 2008

Background: It is well known that erectile dysfunction is most commonly associated with diabetes, affecting 35% to 75% of men with diabetes mellitus. Several studies have been carried out to find appropriate strategies for treatment of diabetes-induced erectile dysfunction. The aim of the present study was to investigate the ability of acute administration of the endogenous cannabinoid anandamide *in vitro* to alter the NANC-mediated relaxation of corpus cavernosum from diabetic rats and the possible role of nitric oxide in this manner.

Methods: Diabetes was induced by the administration of streptozotocin for eight weeks. Corpora cavernosa were isolated in organ baths for measurement of agonist-evoked or electrical field stimulation (EFS)-evoked smooth muscle tensions.

Results: The neurogenic relaxation of phenylephrine (7.5 μ M) precontracted isolated corporal strips was impaired in diabetic animals. Anandamide (0.3, 1 and 3 μ M) enhanced the relaxant responses to EFS in diabetic strips in a dose-dependent manner. This effect was antagonized by either the selective cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 (1 μ M) or the selective vanilloid receptor antagonist capsazepine (3 μ M). Concurrent administration of partially effective doses of L-arginine (10 μ M) and anandamide (0.3 μ M) exerted a synergistic improvement in EFS-induced relaxation of diabetic strips ($p < 0.001$). The relaxant responses to the nitric oxide donor sodium nitroprusside of the subjects in the diabetic and control groups were similar.

Conclusions: For the first time, we demonstrated that acute administration of an endogenous cannabinoid, alone or in combination with L-arginine could improve the NO-mediated relaxation of cavernosal smooth muscle in diabetic rats and this effect was mediated by cannabinoid CB1 and vanilloid VR1 receptors within the tissue.

Keywords: Diabetes mellitus; erectile dysfunction; anandamide; cannabinoid system; nitric oxide; corpus cavernosum

*Corresponding author: Department
of Pharmacology, School of
Medicine, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-44411177
email: m82_ghasemi@yahoo.com