

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDOKANNABİNOİDLER ARACILI NON-NİTRERJİK NON-ADRENERJİK
NON-KOLİNERJİK NÖROTRANSMİTER SALIVERİLMESİNİN
FONKSİYONEL OLARAK TANIMLANMASI:
TAVŞAN KORPUS KAVERNOZUMUNDA İNVİTRO ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ
DR. İSMAİL MERT VURAL

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. YUSUF SARIOĞLU

ANKARA-2007

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin başlangıcından bugüne kadar danışman hocam olmanın çok ötesinde her konuda bana emeği geçen, hoşgörü ve desteğini her zaman gösteren, asistanı olmaktan büyük mutluluk duyduğum Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU'na, uzmanlık eğitimimin her aşamasında gösterdiği hoşgörü, yardım ve destek için Prof. Dr. Sevim ERCAN'a, eğitimimde emekleri olan başta Prof. Dr. Hakan ZENGİL olmak üzere Anabilim Dalımızın bütün öğretim üyelerine, asistanlığımın ilk yıllarında laboratuvar çalışmalarını öğrenmemde büyük katkısı olan “ağabeyim” Ergin DİLEKÖZ PhD'e, aynı Anabilim Dalında asistanlık yaptığım ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Elif Hilal VURAL'a, yaklaşık dört yıldır beraber çalıştığım ve her zaman bana destek olan arkadaşım Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK'e ve diğer asistan arkadaşlarıma ve bugünlere gelmemi sağlayan çok sevgili aileme içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Penis Anatomisi ve Histolojisi	4
2.2. Penil Ereksiyon Hemodinamiği	5
2.3. Penil Ereksiyon Fizyolojisi	5
2.3.1. Adrenerjik Nörotransmisyon	6
2.3.2. Kolinergik Nörotransmisyon	7
2.3.3. NANK Nörotransmisyon	7
2.3.3.1. Kasılmadan Sorumlu NANK Mediyatörler	8
2.3.3.2. Gevşemeden Sorumlu NANK Mediyatörler	9
2.4. Endokannabinoiderjik Sistem	12
2.4.1. Kannabinoidlerin Santral Sinir Sistemindeki Etkileri	16
2.4.2. Kannabinoidlerin Periferdeki Etkileri	19
GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. İzole Korpus Kavernozum Preparatının Hazırlanması	23

3.2. Deney Protokolu	23
3.2.1. EAU Aracılı NANK Gevşeme Yanıtlarının Tanımlama Çalışmaları	24
3.2.2. EAU Aracılı Non-Nitrerjik NANK Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid ve Vaniloid Reseptör Antagonistlerinin Etkisinin Araştırılması	25
3.2.3. EAU Aracılı Non-Nitrerjik NANK Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Etkisinin Araştırılması	26
3.2.4. Fenilefrinle Kasılmış Dokularda Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Gevşetici Etkilerinin Araştırılması	26
3.2.5. Ekzojen Sodyum Nitroprussiat (SNP) ve Papaverinle Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Agonist ve Antagonistlerinin Etkilerinin Araştırılması	28
3.3. Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler	29
3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz	29
BULGULAR	
4.1. EAU Aracılı NANK Gevşeme Yanıtlarının Tanımlanması	31
4.2. EAU Aracılı NANK Non-Nitrerjik Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid ve Vaniloid Reseptör Antagonistlerinin Etkisi	33
4.3. EAU Aracılı NANK Non-Nitrerjik Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Etkisi	36
4.4. Fenilefrinle Kasılmış Dokularda Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Gevşetici Etkileri	38

4.5. SNP ve Papaverinle Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerinde Kannabinoid	40
Agonist ve Antagonistlerinin Etkileri	
TARTIŞMA VE SONUÇ	42
ÖZET	55
YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)	56
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACEA	Araşidonil-2-kloroetilamid
ADP	Adenozin difosfat
2-AG	2-araşidonilgliserol
AIDS	Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu
ANOVA	Varyans analizi
ATP	Adenozin trifosfat
CB ₁	Kannabinoid reseptörü-1
CB ₂	Kannabinoid reseptörü-2
DAG	1,2 diaçilgliserol
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfooksit
EAU	Elektriksel Alan Uyarısı
ET	Endotelin
g	Gram
GABA	Gama-aminobütirik asit
Hz	Hertz
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginin metil ester
L-NOARG	N ^G -nitro-L-arginin
M	Molar
ml	Mililitre
ms	Milisaniye

NANK	Nonadrenerjik-Nonkolinerjik
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
s	Saniye
sAMP	Siklik adenzin monofosfat
sGMP	Siklik guanozin monofosfat
SNP	Sodyum Nitroprusiat
PDE	Fosfodiesteraz
PG	Prostaglandin
THC	Δ^9 -tetrahidrokannabinol
TXA ₂	Tromboksan A ₂
TTX	Tetrodotoksin
UDP	Uridin difosfat
UTP	Uridin trifosfat
V	Volt
VIP	Vazoaktif intestinal peptid
VR ₁	Vaniloid reseptörü-1

1.GİRİŞ

Penil ereksiyonun regülasyonunda birçok santral ve periferik nörotransmitterler ve sinyal mekanizmaları rol oynamaktadır. Eretilite ve antierektilete arasındaki denge, penil vasküler tonus ve korpus kavernozum düz kası kontraktilesine bağlıdır (107) . Gevşetici ve kasıcı faktörler arasındaki denge penisin fonksiyonel durumunu belirler. Korpus kavernozum düz kası gevşemesi penil ereksiyonun başlaması ve devamı için kritik bir role sahiptir (2,3,95). α -1 adrenoceptörleri üzerinden noradrenalin korpus kavernozum düz kası ve penil damarları kasmaktadır (2). Korpus kavernozum düz kası gevşemesinden esas olarak nitrik oksit (NO)'in sorumlu olduğu gösterilmiştir ve NO major erektile nörotransmitter olarak kabul edilmektedir (55,64). NO ve noradrenalinden başka diğer sinir veya endotel kaynaklı medyatörlerin penil ereksiyondaki rolü henüz tam olarak tespit edilememiştir (2). Klitoral korpora kavernoze ve anokoksigeus kası gibi bazı ürogenital sistem dokularında NO tek başına non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) gevşeme yanıtlarından sorumludur. Bu dokularda yapılan çalışmalarda elektriksel alan uyarısı (EAU) aracılı gevşeme yanıtlarını nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi inhibitörleri tek başlarına tam olarak önlemişlerdir (16,71). Fakat tavşan korpus kavernozumunda yapılan çalışmalarda EAU aracılı gevşeme yanıtları yüksek frekanslarda NOS enzimi inhibitörleri ile tam olarak ortadan kaldırılamamıştır (8,64,120). Benzer şekilde at interkavernoze penil arteri, tavşan vajina duvarı ve domuz üretrası gibi ürogenital sistem dokularında yapılan çalışmalarda da EAU aracılı NANK gevşeme yanıtları NOS enzimi inhibitörleri ile tam olarak ortadan kaldırılamamıştır (102,116,123,124). Tavşan vajina duvarında yapılan çalışmalarda bu non-nitrenjik NANK gevşeme yanıtlarından pürin, pirimidin ve peptidlerin sorumlu olmadıkları gösterilmiştir (123,124)

Kenevir bitkisinin bileşenlerinden biri olan Δ^9 -tetrahidrokannabinol(THC), bu bitkinin psikoaktif etkilerinden sorumludur. 1990'lı yılların başından itibaren yapılan çalışmalarda anandamid ve 2-araşidonilgliserol (2-AG) gibi endojen cannabinoidlerin varlığı tespit edilmiştir. Hem THC ve sentetik analoglarının hem de endokannabinoidlerin etkilerini spesifik cannabinoid reseptörleri olan CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden gösterdikleri yine bu yıllarda saptanmıştır (28,30,46,97). Daha sonraki yıllarda endojen cannabinoid olan anandamidin vaniloid reseptörler (VR₁) aracılığı ile de etki gösterdiği saptanmıştır (41,127). Endokannabinoidler santral sinir sisteminde postsinaptik uçtan salıverilerek presinaptik cannabinoid reseptörleri üzerinden klasik nörotransmitterlerin salıverilmesini kontrol etmektedirler (28,30,46,97). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda cannabinoid reseptör antagonistlerinin, santral sinir sisteminde dopaminerjik ve nitreerjik sistemi etkileyerek penil ereksiyona neden oldukları gösterilmiştir (24,76). Kannabinoidler etkilerini santral sinir sistemi yanı sıra periferde de göstermektedirler. Başta kardiyovasküler sistemde olmak üzere sentetik ve endojen cannabinoidlerin periferik etkileri birçok dokuda araştırılmıştır. Ghasemi ve arkadaşları endojen cannabinoid olan anandamidin CB₁ ve vaniloid reseptörleri aracılığı ile NANK gevşeme yanıtları üzerine olan NO aracılı artırıcı etkisini sıçan korpus kavernozumunda göstermiş ayrıca CB₁, CB₂ ve vaniloid reseptör antagonistlerinin NANK gevşeme yanıtları üzerine direkt olarak etkisinin olmadığını rapor etmiştir (41). Sıçan prostatında yapılan başka bir çalışmada da sentetik cannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2'nin CB₁ reseptörleri aracılığı ile epitel hücrelerinden prostaglandin salıverilmesine neden olduğu ve sonuçta düz kas gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir (108).

Amaç:

Bu çalışmada izole tavşan korpus kavernozumunda EAU aracılı non-nitrenjik NANK gevşeme yanıtlarının tanımlanması ve bu yanıtlarda endokannabinoidlerin nöromodulator veya nöronal faktör olarak rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca endokannabinoidlerin olası etkilerini hangi cannabinoid reseptörleri üzerinden gerçekleştirdikleri, bu etkilerinde vaniloid reseptörlerinin rolü olup olmadığı ve etkilerini gösterirken siklooksijenaz yolu ile etkileşip etkileşmedikleri araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Penis Anatomisi ve Histolojisi:

Penis radiks penis ve korpus penis olmak üzere iki bölümden oluşur. Korpus penis ise ereksiyondan sorumlu olan sağ ve sol tarafta birer tane bulunan bir çift korpus kavernozum ve ortalarında ventral olarak bulunan bir adet korpus spongiozumdan oluşur. Bu üç silindirik erektile doku kütlesi ve üretra dışarıdan deri ile sarılmıştır. Her üç yapıda kollajen liflerden zengin tunika albuginea adlı dirençli bir kılıfla ayrı ayrı çevrilidir. Korpus spongiozum üretrayı çevreler ve distal kısmı genişleyerek glans penisini oluşturur. Kavernoza doku süngerimsi yapıdadır ve sinüzoidal trabeküller, fibröz doku, elastik lifler ve düz kaslardan oluşur. Sinüzoidler düzensiz yapıdaki boşluklardır ve fenestrasyon göstermeyen endotel hücreleri ile döşelidir (1,42,77). Penil üretranın ise büyük bölümü yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplanmıştır ve glans peniste bu, çok katlı yassı epitele dönüşür. Mukus salgılayan Litre bezleri penil üretra boyunca bulunurlar (1).

Penis kanlanması internal iliak arterin dalı olan internal pudendal arter aracılığı ile olur. Internal pudendal arterden, bulbar, üretral ve kavernoza arterler çıkar. Kavernoza arter, tunika albugineayı delerek helisin arterler olarak adlandırılan çok sayıda spinal kısa terminal dalları verir. Bu terminal dallar sayesinde kavernoza arter beslenmenin yanı sıra ereksiyonda da rol oynar. Gelen kanı drene eden venler ise, derin dorsal ven, yüzeysel dorsal ven ve kavernoza venlerdir. Helisin arterler ve derin dorsal venler arasında arteriovenöz şantlar vardır. Penisin lenfatik akımı ise kasık yüzeysel ve derin lenf düğümlerine açılır (42,77).

Penisin somatik innervasyonundan pudental sinir sorumlu iken otonomik innervasyonu hem parasempatik hem de sempatik sinir lifleri ile olur. Parasempatik innervasyonu sağlayan liflerin kökeni sakral 1-2-3 spinal segmenttir. Sempatik liflerin çıkış merkezi ise lumbar 1-2-3 spinal segmentlerdir (42,77).

2.2. Penil Ereksiyon Hemodinamiği:

Ereksiyon oluşumunda korpus kavernozum düz kası, arteriol ve arterial duvarı düz kasları anahtar rolü oynar (27). Dinlenme durumunda penis korpus kavernozum ve arteriol düz kaslarını kasılı halde tutan sempatik sistemin kontrolü altındadır ve peniste minimal kan akımı vardır (77). Seksüel stimulasyon kavernoza sinir sonlanmalarından gevşetici nörotransmitterlerin salıverilmesini tetikler. Salıverilen nörotransmitterler korpus kavernozum, arteriol ve arterial düz kaslarda gevşeme oluşturur. Sonuçta, arterial dilatasyon, sinuzoidlerde kan göllenmesi, subtunikal venöz pleksusda kompresyon, tunika kapasitesinde artış ve parsiyel oksijen ve intrakavernoza basınçlarda artış oluşur. İskiokavernoza kasın kasılması ile de ilave basınç artışı oluşur (27). Sempatik sinir sisteminin tekrar baskın hale gelmesi ile bütün bu süreç geri döner ve penis dinlenme durumundaki flasid halini geri alır (77).

2.3. Penil Ereksiyon Fizyolojisi:

Penil ereksiyonun regülasyonunda birçok santral ve periferel nörotransmitterler ve sinyal mekanizmaları rol oynamaktadır. Erektile ve antierektile arasındaki denge, penil vasküler tonus ve korpus kavernozum düz kası kontraktilesine bağlıdır (107). Gevşetici ve

kasıcı faktörler arasındaki denge penisin fonksiyonel durumunu belirler. Korpus kavernozum düz kası gevşemesinden esas olarak NO sorumlu iken, düz kas kasılmasından sorumlu ana nörotransmitter ise noradrenalindir (2,77). Penil ereksiyon mekanizması ile ilgili nörotransmitterlerden aşağıda kısaca bahsedilmektedir.

2.3.1. Adrenerjik Nörotransmisyon:

Penisde düz kas kasılmasından sorumlu ana nörotransmitter noradrenalindir. Noradrenalin salıverilmesi α -adrenoreseptörler aracılığı ile penil damar yatağındaki helisin arterlerinde ve korpus kavernozumdaki trabeküler düz kaslarında kasılma yanıtı oluşturmaktadır (3,47,77). Penisde α -adrenoreseptörler ile birlikte β -adrenoreseptörler de saptanmıştır. β -adrenoreseptörler korpus kavernozumda ve penil arterlerde gevşeme oluşturmalarına rağmen fonksiyonel olarak α -adrenoreseptörler kadar önemli değildirler (47,77). İnsan korpus kavernozumunda yapılan reseptör bağlama çalışmalarında α -adrenoreseptörlerin β -adrenoreseptörlere göre on kat daha fazla bulunduğu saptanmıştır (70). α -adrenoreseptörlerin hem α -1 hem de α -2 alt tipleri korpus kavernozum düz kasında saptanmıştır (47,77). At penil arterlerinde yapılan çalışmalarda α -1 ve α -2 adrenoreseptörleri post-sinaptik olarak gösterilmiştir. Fakat α -adrenoreseptör kasıcı yanıtlarından baskın olarak α -1 alt tipi sorumludur (100). Ayrıca pre-sinaptik yerleşimli α -2 adrenoreseptörleri bulunmakta ve NO salıverilmesini inhibe etmektedir (101).

2.3.2. Kolinerjik Nörotransmisyon:

İnsan ve çeşitli memeli penil dokusunda yapılan birçok çalışmada bu dokuda kolinerjik sinir liflerin ve muskarinik reseptörlerin varlığı gösterilmiştir. Kolinerjik sistem aktivasyonu peniste ereksiyona neden olmaktadır (49,109,110). İnsan korpus kavernozumunda yapılan çalışmada bu dokudaki muskarinik reseptör alt tipleri belirlenmiştir. M_2 ve M_4 reseptör alt tipleri düz kaslarda, M_3 reseptör alt tipi de endotelde olmak üzere muskarinik reseptörlerin M_1 , M_2 , M_3 ve M_4 alt tipleri gösterilmiştir (110). Muskarinik reseptör agonistleri, endotelden NO salıverilmesini sağlayarak ve adrenerjik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe ederek korpus kavernozum düz kasında gevşeme yanıtlarına ve dolayısıyla ereksiyona neden olmaktadır (3,4).

2.3.3. NANK Nörotransmisyon:

NANK sistem hem nörotransmisyon ile hemde nöromodülasyon ile penil erektile dokularda gevşeme ve kasılma yanıtlarının her ikisinde de rol oynamaktadır (2,3,107). Bu sisteme ait transmitterler/modülatörler adrenerjik ve kolinerjik sinirlerde de bulunmaktadır. Fakat NO harici diğer sinir veya endotel kaynaklı NANK mediyatörlerin penil ereksiyonda ki rolü henüz tam olarak tespit edilememiştir (2).

2.3.3.1. Kasılmadan Sorumlu NANK Mediyatörler:

Endotelinler:

İnsan ve çeşitli memeli penil dokusunda yapılan çalışmalarda endotelin peptidleri ve bunların reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (6,19,84,96). İnsan korpus kavernoza düz kas hücre membranında endotelin reseptörünün ET_A ve ET_B alt tiplerinin her ikisinin de varlığı saptanmıştır (19). Ayrıca endotelin peptidlerin ET_B reseptörleri üzerinden nitroerjik sinirlerden NO salıverilmesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Fakat bu inhibisyonun nitroerjik sinirler aracılı ereksiyona önemli bir etkisi yoktur (84). İnsan korpus kavernoza endoteli endotelin 1 (ET-1), endotelin 2 (ET-2) ve endotelin 3 (ET-3) 'ün hepsini de sentez edebilmektedir. Endotelin reseptörlerine ET-1 ve ET-2 yüksek afinite ile bağlanmaktayken ET-3 daha düşük afinite göstermektedir (96). ET-1 korpus kavernoza düz kası ve kavernoza arterde yavaşça gelişen ve uzun süreli olan kasılmalara neden olmaktadır (6). Anjiyotensin-II ve süperoksit anyonu gibi serbest radikaller ET fonksiyonunda modülatör olarak rol oynamaktadırlar (77).

Anjiyotensin-II

İnsan korpus kavernoza anjiyotensin II sentezleyip salıvermektedir (62). İnsanda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda anjiyotensin II'nin korpus kavernoza düz kasında AT1 reseptörleri aracılığı ile kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir (22,62,83). Ayrıca anjiyotensin II reseptör antagonistleri korpus kavernoza düz kasında gevşemeye ve dolayısıyla ereksiyona neden olmaktadır (62).

2.3.3.2. Gevşemeden Sorumlu NANK Mediyatörler:

Korpus kavernozum düz kası gevşemesinden esas olarak NO'nun sorumlu olduğu gösterilmiştir ve NO major erektile nörotransmitter olarak kabul edilmektedir. Korpus kavernozumda gevşeme yanıtı oluşturan diğer NANK maddelerin nörotransmitter veya nöromodülatör olarak rolleri tam olarak bilinmemektedir (2,3,55,64,95,107).

Nitrik Oksit (NO):

NO'nun nörotransmitter olduğunun keşfedilmesi, otonom sinir sistemi tarafından innerve olan doku ve organların fizyolojik olarak işleyişleri açısından yeni bir bakış açısı getirmiştir. NO küçük reaktif bir gaz molekülüdür. Damar tonusunun, trombosit agregasyonunun, trombosit adezyonunun ve damar düz kas hücrelerinin çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynar (107). 1990'lı yılların başından itibaren insanda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmaların sonucunda NO'nun major erektile nörotransmitter olduğu hipotezi kabul edilmiştir (2,55,107). NO, L-Argininden nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından kalmodulin varlığında kalsiyum ve diğer kofaktörlerin aktivasyonu ile sentezlenir (11). NO'nun korpus kavernozumda iki temel kaynağı vardır. Birincisi nitrejik sinir liflerindeki nöronal NOS (nNOS), diğride penil vasküler endotel ve penil sinuzoidal endotel hücrelerinde bulunan endotelial NOS (eNOS)'dur. Ayrıca korpus kavernozum düz kas hücrelerinde NOS varlığı saptanmıştır (14,40). Ereksiyon kontrolünde nNOS'un eNOS'dan daha önemli bir izoform olduğu düşünülmektedir (15). Nitrejik sinirlerden NO salınması presinaptik reseptörler aracılığı ile asetilkolin, noradrenalin, ATP ve peptidler gibi birçok

nörotransmitter tarafından etkilenmektedir (107). NO'nun en önemli fizyolojik hedefi, çözünebilir guanilat siklaz enzimidir ve bu enzim aracılığıyla siklik GMP (sGMP) yapımını artırır. Artmış sGMP düzeyleri korpus kavernozaum düs kası ve kavernoza arterde oluşan gevşeme yanıtlarından sorumludur (10). sGMP protein kinaz G'yi aktive eder (50). Protein kinaz G birçok iyon kanalını fosfatlar. Sonuçta bu yolak sitoplazmaya hücre içi depolardan ve hücre dışından Ca^{+2} girişini inhibe eder ve K^{+} kanallarını açıp hücre dışına K^{+} çıkışını sağlar (107). sGMP, fosfodiesteraz (PDE) enzimi tarafından GMP'ye yıkılarak etkisi sona erdirilir. PDE5 izoenzimi sGMP'ye spesifiktir (2). sGMP düzeyleri erektil fonksiyon bozukluğunun tedavisinde en önemli terapötik hedefdir (107).

Prostaglandinler:

Mekanik veya asetilkolin gibi kimyasal ajanlarla aktive olan korpus kavernozaum endotelinin prostaglandin sentezi yapabildiği gösterilmiştir. Fosfolipaz A_2 aracılığı ile fosfolipidlerden oluşan araşidonik asit lipo-oksijenaz enzimi ile lökotrienlere, siklo-oksijenaz enzimi ile prostaglandinlere dönüşmektedir. Prostaglandin D_2 (PGD_2), prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaglandin I_2 (PGI_2) ve tromboksan A_2 (TXA_2) insan ve çeşitli türlerdeki hayvan korpus kavernozaumlarında bulunmaktadır (3,77). Oksijen basıncı direkt olarak prostaglandin sentezini etkilemektedir. Hipoksik durumlarda bazal ve asetilkolin ile stimüle edilmiş prostaglandin düzeyleri korpus kavernozaumda azalmaktadır (25,26). $PGF_{2\alpha}$ ve TXA_2 erektil dokularda kasılmaya neden olurken PGE_1 gevşemeye neden olmaktadır. Potent vazadilatör olan PGI_2 korpus kavernozaum bazal tonusunu artırırken, noradrenalin ile kastrılmış bazı dokularda gevşeme yanıtlarına neden olmaktadır (48,77). Ayrıca PGD_2 , PGE_1

ve PGE_2 'nin pre-sinaptik etkileri vardır. PGE_1 ve PGE_2 insan korpus kavernozumunda adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salıverilmesini inhibe ederken, PGD_2 noradrenalin salıverilmesini artırır (77). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada intrakavernoza olarak PGE_1 enjeksiyonunun NO, eNOS ve nNOS düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (37).

Korpus kavernozum düz kasında spontan olarak kas tonusu oluşmaktadır. İn vitro yapılan çalışmalarda bu spontan aktivasyon kendini dinlenme geriliminde tonik ve fazik değişimler ile göstermektedir. Spontan aktivasyonun fizyolojik önemi tam olarak bilinmemektedir. İndometasin bu spontan aktivasyonu önlemekte ve dokuların bazal gerilimini düşürmektedir (20). Tavşan korpus kavernozumunda spontan aktivasyondan PGE_2 ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ 'in sorumlu olabileceği gösterilmiştir (56).

Sonuç olarak prostaglandinlerin penil ereksiyonu kontrol eden periferik mekanizmalar içinde direkt olarak değil de modülatör olarak görev aldığı düşünülmektedir. Ayrıca araşidonik asitten lipo-oksijenaz enzimi ile oluşan lökotrienlerin penil tonus üzerine olan rolleri bilinmemektedir (77).

Diğer Mediyatörler:

Vazoaktif intestinal peptid (VIP) içeren sinir lifleri penil dokuda bulunmaktadır. Asetilkolin ve NO ile birlikte aynı parasempatik nöronlarda bulundukları gösterilmiştir (49). Uzun yıllardan beri VIP'in korpus kavernozumda gevşetici etkisi olduğu bilinmektedir. 1980'li yılların sonlarında VIP'in en önemli gevşetici nörotransmitter olduğu düşünülmekteydi. Fakat NO ile karşılaştırılınca gevşetici etkisi çok daha düşük düzeydedir (77). Günümüzde bu etkisini nöromodülatör mü yoksa nörotransmitter mi olarak oluşturduğu,

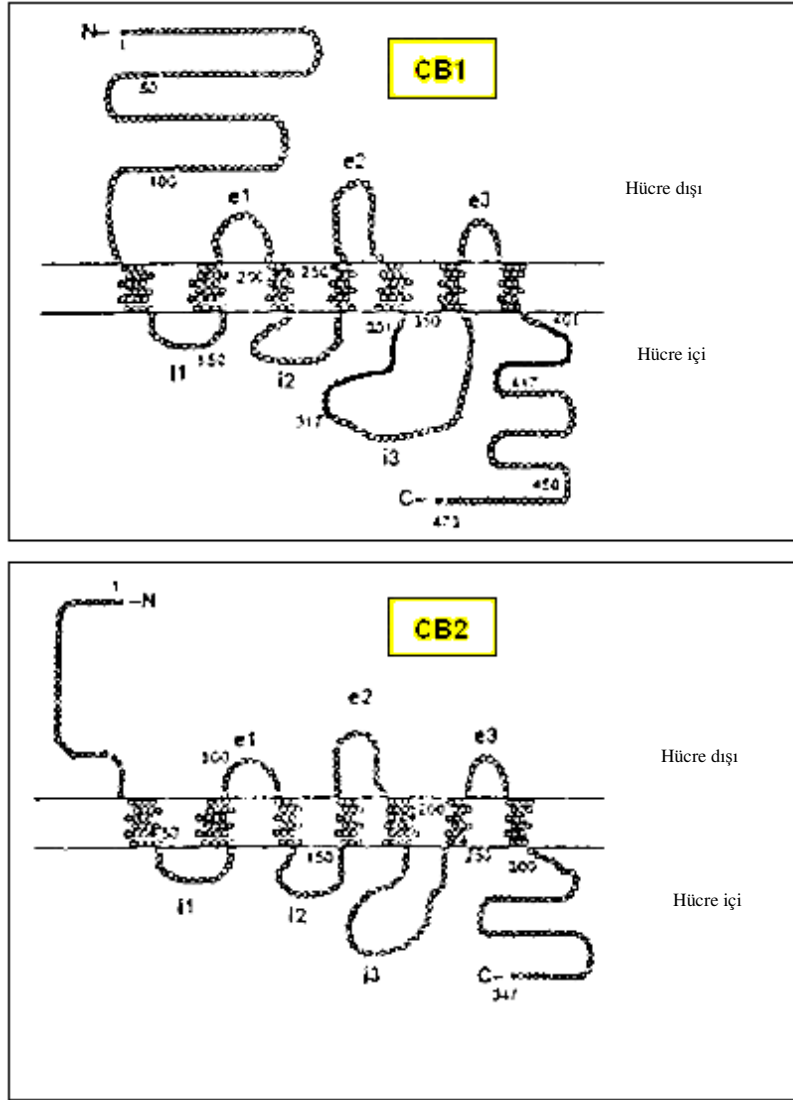
penil nörotransmisyonadaki rolü tam olarak bilinmemektedir. (3). Korpus kavernozumda gevşetici etkisinin NO oluşumuna bağlı olduğunu gösteren çalışmalar vardır (65).

Adenozin ve ATP korpus kavernozumda gevşeme yanıtlarına neden olmaktadır (61,63). Fakat penil ereksiyon mekanizmalarındaki rolleri tam olarak bilinmemektedir.

Benzer şekilde adrenomedullin de korpus kavernozumda gevşeme yanıtları oluşturmaktadır fakat mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır (43).

2.4. Endokannabinoiderjik Sistem:

Kenevir bitkisi insanlar tarafından binlerce yıldır kullanılmaktadır. Kenevir bitkisinde bulunan 60'ın üzerinde bileşen tanımlanmıştır. Bu bileşenlerden biri olan THC, bu bitkinin psiko-aktif edici etkilerinden sorumludur (7,90,97). Kenevir bitkisi milattan önceki yıllardan itibaren Asya'da tedavi amacı ile kullanılıyordu. 19. yüzyılda batı tıbbında kullanılmaya başlandı. Çok sayıdaki yan etkisinden ve her bitkiden elde edilen kannabinoidlerin standartizasyonu sağlanamadığından dolayı 20. yüzyılda tıpta kullanımı anlamlı derecede azaldı (97,125). Endojen kannabinoiderjik sistemin ve spesifik kannabinoid reseptörlerinin saptanmasından sonra, kannabinoidler tedavi ajanı olarak tekrar gündeme geldiler. Kimyasal olarak sentezlenen kannabinoid türevlerinin etkinliği ve güvenilirliği bilimsel olarak gösterilenlerin tedavide kullanıma girmeleri beklenmektedir. Ağrı, multiple skleroz, spinal kord hasarı, epilepsi, Parkinson hastalığı, glokom, anoreksi, AIDS'e bağlı kilo kaybı ve kemoterapiye bağlı bulantı ve kusma tedavisinde kullanılmaları ile ilgili klinik çalışmalar vardır (7,97,125).



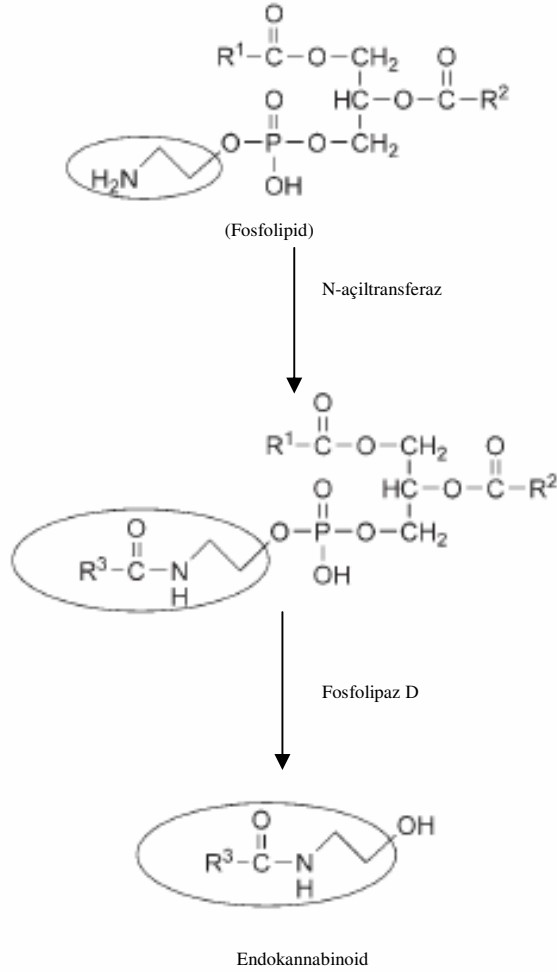
Şekil-1: Spesifik kannabinoid reseptörleri CB₁ ve CB₂'nin yapısı (119).

1990'lı yılların başında yapılan çalışmalarda anandamid ve 2-araşidonilgliserol (2-AG) gibi endojen kannabinoidlerin varlığı tespit edilmiştir. Hem THC ve sentetik analogları hem de endokannabinoidler etkilerini spesifik kannabinoid reseptörleri üzerinden gösterdikleri yine bu yıllarda saptanmıştır (28,30,46,90,97). İlk olarak CB₁ reseptörü sıçan beyinde ve nöronal hücrelerde klonlanmıştır. Bu reseptörün G protein bağlı olduğu ve adenilat siklaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (75). Daha sonra yapılan bir çalışmada

dalak marjinal zonunda bulunan makrofajlarda G protein bağı CB₂ reseptörü klonlanmıştır (80). Endojen kannabinoid olan anandamidin vaniloid reseptörler (VR₁) aracılığı ile de etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (42,127). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda endokannabinoidlerin GPR55 ve GPR119 gibi nadir bulunan (orfan) reseptörlere de bağlandıkları ve bu reseptörleri aktive ettikleri gösterilmiştir. GPR55'in ağrı iletiminde rol alabileceği düşünülmektedir (9). Johns ve ark. GPR55'in kannabinoidler tarafından aktive edildiğini fakat bu reseptörün kannabinoidlerin vazodilatör etkilerinden sorumlu olmadığını göstermişlerdir (58). GPR119 ise daha çok pankreas ve gastrointestinal kanalda saptanmıştır. Fakat bu reseptörlerin etkileri ve fizyolojik önemleri tam olarak bilinmemektedir (9).

Endokannabinoidler klasik nörotransmitterlerden farklı olarak veziküllerde depolanmazlar ve veziküllerden salıverilmezler. Anandamid hücre membranında bulunan fosfolipidlerin yıkımı ile oluşur. Hücre içine Ca⁺² girişi N-açiltransferaz enzimini aktive eder. N-açiltransferaz ve N-açilfosfatidiletanolamid fosfolipaz D enzimleri sıra ile iki basamaklı reaksiyonun basamaklarını ayrı ayrı katalize ederek anandamidi sentezlerler (32,33,81). 2-AG ise 1,2 diaçilgliserol (DAG)'ün DAG lipaz ile veya 2-araşidonil-lizofosfolipid'in fosfolipaz A1 ile yıkımıyla oluşur. Hücre içi Ca⁺² miktarı 2-AG sentezi için de önemlidir (111). Sinaptik aralığa salıverilen endokannabinoidler bu aralıktan selektif taşıyıcı aracılığı ile hızlıca hücre içine alınırlar ve böylece etkileri sonlandırılır. İleri derecede lipofilik oldukları için hücre dışında kısa süreli olarak bulunurlar ve dolayısı ile etkisi kısa sürelidir. Dokulara dağılımları lipofilitelerinden dolayı zordur. Anandamid hücre içinde, hücre içi membranına bağlı olan yağ asidi amidohidrolaz enzimi tarafından etanolamin ve araşidonata yıkılır. 2-AG ise monoaçilgliserol lipaz enzimi tarafından yıkılır. Yağ asidi amidohidrolaz daha çok post-sinaptik hücrelerde, monoaçilgliserol lipaz ise daha çok pre-sinaptik hücrelerde

bulunmaktadır. Monoağılglicerol lipaz enzimi endokannabinoidleri yıkan bir diğ er enzimdir. Endokannabinoidleri yıkan enzimler son yıllarda yeni ilaç geliş tirmede hedef halini almış tırlar (31-33,111).



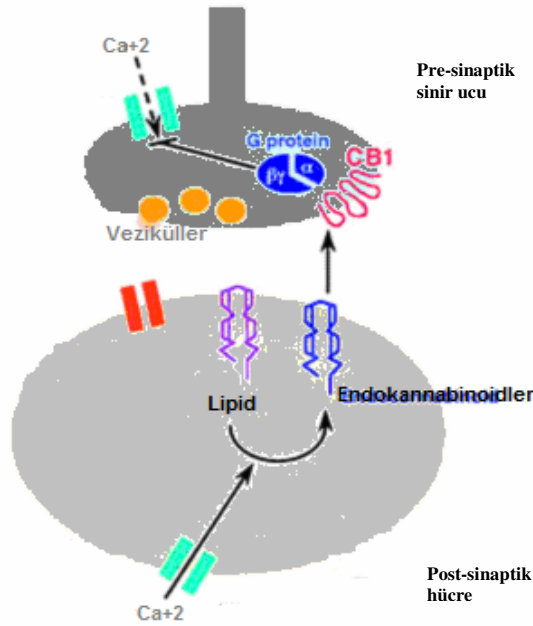
Şekil-2: Endokannabinoidlerin sentez basamakları (81).

Santral sinir sisteminde, endokannabinoidler post-sinaptik hücrelerden salıverilirler ve etkilerini pre-sinaptik uçta gösterirler. Pre-sinaptik uçta CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden klasik nörotransmitterlerin salıverilmesini etkilerler (36). Periferde sinaptik aralık değı en boyutlardadır. Endokannabinoidlerin sinaptik aralı ta kalış  süreleri çok kısa olduğu için post-

sinaptik hücrelerden yani düz kas hücrelerinden salıverilip pre-sinaptik uçta etki göstermesi çok mümkün görülmemektedir (32,91). Periferde endokannabinoidlerin pre-sinaptik uçtan salıverildikleri ve etkilerini hemen bu uçta gösterdikleri düşünülmektedir. Ayrıca endotel hücrelerinden de salıverildikleri ve nörotransmitter salıverilmesini lokal olarak modüle ettikleri düşünülmektedir (32).

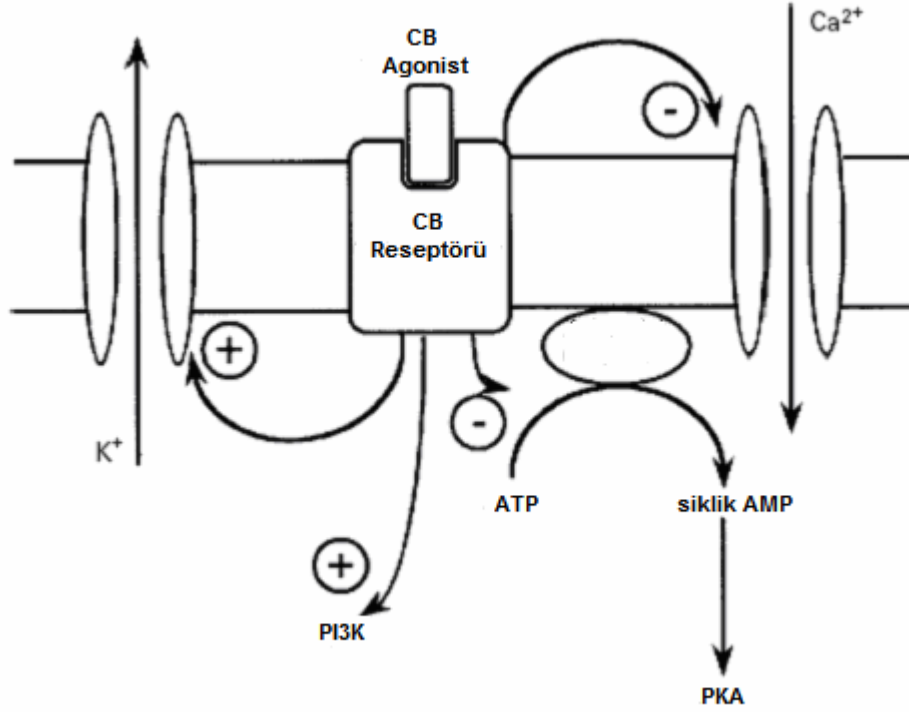
2.4.1. Kannabinoidlerin Santral Sinir Sistemindeki Etkileri:

Santral sinir sisteminin değişik bölgelerinde THC ve endokannabinoidlerin nörotransmitter salıverilmesi üzerine olan etkileri 1990'lı yılların başından beri araştırılmaktadır. Post-sinaptik hücrelerden salıverilen endokannabinoidler etkilerini pre-sinaptik uçta CB₁ reseptörleri üzerinden klasik nörotransmitter salıverilmesini azaltarak veya artırarak gösterirler (36).



Şekil-3: Santral Sinir Sisteminde endokannabinoidlerin sentezi ve etki mekanizması (118).

Sıçan korteksinde yapılan çalışmalarda CB₁ reseptör aktivasyonunun farklı nörotransmitterlerin salıverilmesini etkilediği gösterilmiştir. THC prefrontal korteksde hücre dışı GABA seviyesini azaltırken, glutamat ve dopamin seviyelerini artırmaktadır (89). Benzer şekilde kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2 frontal korteksde noradrenalin salıverilmesini artırmaktadır (82). Bu etkilerinin kannabinoid kullanımı ile oluşan kognitif fonksiyon bozukluklarının mekanizmasında rol aldığı düşünülmektedir (82,89). Bir çalışmada THC'nin prefrontal korteksde CB₁ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini uzun süreli azalttığı gösterilmişken (88) başka bir çalışmada ise THC ve WIN 55,212-2'nin yine prefrontal korteksde endojen opioid peptidler aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir (39). Prefrontal kortekse benzer şekilde hipokampusda da THCnin CB₁ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini uzun süreli azalttığı (88) fakat THC ve WIN 55,212-2'nin yine aynı bölgede endojen opioid salıverilmesini artırarak asetilkolin salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir (39). Ayrıca THC dorsal hipokampusda glutamat salıverilmesini CB₁ reseptörleri aracılığı ile azaltmaktadır. Bu azalmanın kannabinoidlere bağlı oluşan hafıza kaybından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (38). Multiple sklerozun hayvan modeli olan deneysel alerjik ensefalitli hayvanlarda THC, CB₁ reseptörleri aracılığı ile nörodejenerasyonu ve beyin omurilik sıvısında glutamat seviyelerini azaltmaktadır (38). Opioid ve kannabinoid sistem arasında etkileşim olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Kannabinoidler endojen opioidlerin seviyelerini hem nukleus accumbensde hem de ventral tegmental alanda artırmaktadırlar (103,112). Ayrıca opioid reseptör antagonistlerinin kannabinoidlerin etkilerinin bir kısmını azalttığı, bir kısmını ise tamamen ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (103). Ayrıca kannabinoidler korteks, striatum ve nukleus accumbensin içinde bulunduğu santral sinir sistemi bölgelerinde dopamin salıverilmesini artırmaktadır (18,74,89).



Şekil-4: Kannabinoid reseptör agonistinin spesifik reseptörüne bağlanması sonucu gelişen ikincil olaylar (51).

Endokannabinoidler immün sistemi baskılayarak çeşitli hastalıklarda nöron hasarı oluşumunu engellemektedirler. Fakat nöronların ekzojen veya endojen kannabinoidler ile uzun süreli maruz kalması apoptozis oluşturan mekanizmaları aktive edeceği için nöronal hasar gerçekleşecektir. Endokannabinoidlerin santral sinir sistemindeki etkileri şu an için tam olarak anlaşılmamıştır ve karmaşıktır. Bundan dolayı hastalıkların endokannabinoid temelli tedavileri için birçok in vitro, in vivo ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır (111).

2.4.2. Kannabinoidlerin Periferdeki Etkileri:

Kannabinoidlerin kardiyovasküler sistem üzerine olan etkileri ve etki mekanizmaları birçok çalışmada araştırılmıştır. Anandamid sıçanlarda intravenöz uygulandığında hipotansiyona neden olmaktadır. Bu etkisini sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini CB₁ reseptörleri aracılığı ile pre-sinaptik olarak azaltarak yaptığı gösterilmiştir (113,114). Başka bir çalışmada da anandamidin CB₁ reseptörleri üzerinden hipotansiyon ve hipotermi oluşturduğu gösterilmiştir (67). Kobayda yapılan başka bir çalışmada da anandamid CB₁ reseptörleri üzerinden hipotansiyon oluşturmuş ve sinaptik aralığa salıverilen endokannabinoidleri bu aralıktan hücre içine alıp etkisini sonlandıran selektif taşıyıcının inhibisyonu anandamidin etkisini artırmıştır (13). Birçok farklı damar yatağında anandamidin farklı mekanizmalar ile vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir. Tavşan böbreğinde NO aracılığı ile sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini azaltmakta, arteriollerde gevşemeye neden olmakta ve mikrosirkülasyonu etkilemektedir (29). Sıçan mezenter arterinde hiperpolarizasyon oluşturarak (92), sıçan hepatik arter düz kasında ise hücre içi Ca⁺² depolarını etkileyerek (126) gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir. Koyun koroner arterinde ise araşidonik asit ürünleri aracılığı ile endotel bağımlı gevşeme yanıtı oluşturmuştur (44). Ayrıca mezenterik arterlerde vaniloid reseptörleri üzerinden endotel bağımsız gevşemeye neden oldukları gösterilmiştir (127). Kannabinoidlerin vazodilatasyon dışında negatif kronotropik etkileri vardır ve bradikardi oluştururlar. Bu etkilerini yine CB₁ reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirirler (66). Ayrıca kannabinoidlerin kalbi iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (68,69,98). Sıçan kalbinde hem CB₁ hem de CB₂ reseptörleri saptanmıştır. CB₁ reseptörleri endotel hücrelerinde bulunmakta ve NO

sentezini artırarak kalbi iskemiden korumaktadır. CB₂ reseptörleri ise kardiyomyositlerde bulunmaktadır ve koruyucu etkisi endotel bağımsızdır (69). THC ile yapılan başka bir çalışmada ise, THC'nin kalp hücrelerini hipoksiden CB₂ reseptörleri aracılığı ile NO seviyesini artırarak koruduğu gösterilmiştir (98).

Kannabinoidler kendi spesifik reseptörleri üzerinden solunum sisteminde de etkilidirler (12,104,115,121,122). Marijuana içimi veya THC alınımı insanlarda bronkodilatasyon oluşturabilmektedir. Fakat astmalı hastalarda bu agonistler bronkokonstriksiyon oluşturmakta ve tedavide olası kullanımları belirsizleşmektedir (12). Kapsaisine duyarlı duyuşal sinirlerde yapılan çalışmalarda kannabinoid agonistlerinin bu sinir sonlanmalarından bronkokonstriksiyon yapan ajanların salıverilmesini azalttığı gösterilmiştir. Kobaylarda bu etkilerini CB₂ reseptörleri aracılığı ile (121), kemirgenlerde ise CB₁ reseptörleri aracılığı ile (12) oluşturdıkları gösterilmiştir. Anandamid ve WIN 55,212-3 sıçan trakeasında yapılan bir çalışmada EAU aracılı kasılma yanıtlarını CB₂ reseptörleri aracılığı ile azaltmıştır (122). Kobay trakeasında yapılan başka bir çalışmada da kannabinoidlerin CB₂ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini azalttığı gösterilmiştir. Fakat bu inhibisyonun kolinerjik kasılmalar üzerinde fizyolojik öneminin fazla olmadığı belirtilmiştir (104). Aynı zamanda kannabinoidler kobay akciğerlerinde noradrenerjik sinir sonlanmalarında bulunan CB₁ reseptörleri aracılığı ile noradrenalin salıverilmesini azaltmaktadırlar. Böylece β -2 adrenoreseptörleri üzerinden oluşan sempatik sinir sistemi aracılı solunum yolları genişlemesi sınırlanmaktadır (115).

Gastrointestinal sistemde kannabinoidlerin kolinerjik aşırımı etkilemekte olduğu ve astilkolin salıverilmesini azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (23,52,57,106). Kobay myenterik pleksusunda yapılan bir çalışmada WIN 55,212 CB₁ reseptörleri aracılığı ile

asetilkolin salıverilmesini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada CB₁ reseptör antagonisti tek başına uygulandığında asetilkolin salıverilmesini artırmıştır. Bu sonuç asetilkolin salıverilmesi üzerinde endojen bir kannabinoid baskısı olabileceği veya antagonistin parsiyel agonistik etkisi ile olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (23). Benzer şekilde kobay ileumunda EAU aracılı kolinerjik kasılmaları anandamid ve WIN 55,212 CB₁ reseptörleri aracılığı ile azaltmış ve CB₁ reseptör antagonisti tek başına uygulandığında EAU aracılı kolinerjik kasılmaları artırmıştır (57). İnsan kolon sirküler düz kasında da kannabinoidlerin CB₁ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini azalttığı gösterilmiştir (52). Sıçan mide fundusunda yapılan başka bir çalışmada ise kannabinoidlerin asetilkolin salıverilmesi üzerinde olan azaltıcı etkilerinden CB₂ reseptörlerinin de sorumlu olduğu gösterilmiştir (106).

Kannabinoidlerin genitoüriner sistem üzerine olan etkileri ve etki mekanizmaları birçok çalışmada araştırılmıştır. Tavşan böbreğinde NO aracılığı ile sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini azaltmakta, arteriollerde gevşemeye neden olmakta ve mikrosirkülasyonu etkilemektedir (29). Fare mesanesinde yapılan bir çalışmada mesanede CB₁ reseptörlerin varlığı ve bu reseptörler üzerinde endojen kannabinoid tonusu olduğu saptanmıştır (85). Aynı şekilde sıçan vas deferensinde de CB₁ reseptörlerin varlığı ve bu reseptörler üzerine olan endojen kannabinoid tonus saptanmıştır (21). Kannabinoidler hem tavşan hem de fare vas deferensinde EAU aracılı kasılma yanıtlarını azaltmışlardır. Fare vas deferensinde bu etkilerini hem CB₁ hem de CB₂ reseptörleri aracılığı ile oluştururken (45), tavşan vas deferensinde sadece CB₁ reseptörleri bu etkiden sorumludur (5). CB₂ reseptörlerinin üremede önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Bu reseptörlerin spermatogeneziste, sperm-oosit birleşmesinde ve birden fazla spermle döllenmenin

engellenmesinde rolünün olduğu düşünülmektedir. Endokannabinoidlerin etki ve etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılmasının infertilite tedavisinde katkısı olacağı düşünülmektedir (72). Kannabinoidler penil ereksiyon oluşumunu da santral ve periferik mekanizmalar ile etkilemektedirler. Daha önce yapılan çalışmalarda kannabinoid reseptör antagonistlerinin, santral sinir sisteminde dopaminerjik ve nitreerjik sistemi etkileyerek penil ereksiyona neden oldukları gösterilmiştir (24,76). Ghasemi ve arkadaşları anandamidin CB₁ ve vaniloid reseptörleri aracılığı ile EAU aracılı NANK gevşeme yanıtlarını artırdığını sıçan korpus kavernozumunda göstermişlerdir. Bu etkilerini direkt olarak değil de NO aracılı olarak gerçekleştirmektedirler (41).

CB₂ reseptörleri ilk olarak immün sistem hücrelerinde saptanmıştır. B lenfositler, NK hücreleri, monositler, nötrofiller ve T lenfositler CB₂ reseptörlerinin gösterildiği hücrelerdir (60). Kannabinoidler immün sistem yanıtlarını baskılamaktadırlar. Bu baskılamanın CB₂ reseptörleri aracılığı ile sAMP/protein kinaz A yolağının inhibisyonu ile oluştuğu düşünülmektedir (59,60,111).

Ayrıca endokannabinoidler apoptozise neden olmaktadır (34,99). CB₁ ve CB₂ reseptörleri aracılığı ile kaspas2,8 ve 9 aktivasyonuna, sitokrom c salıverilmesinde azalmaya neden oldukları gösterilmiştir (34). Kanseri hücrelerinde de apoptozis yapıcı etkileri vardır. İnsan osteosarkom hücrelerinde kaspas 3 aktivasyonu ile apoptozis yaptıkları gösterilmiştir (53). Tümör hücresi çoğalmasını engellemenin yanı sıra antianjiogenik etkileride vardır (87). Kannabinoidlerin kanser tedavisinde ki yerleri araştırılmaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzole Korpus Kavernozum Preparatının Hazırlanması

Deneylerde 4-6 aylık 3-3,5 kg. ağırlığında 30 adet albino erkek tavşanlar kullanıldı. Tavşanlar normal laboratuvar koşullarında standart laboratuvar hayvanı yemi ile beslendi. Tavşanlar kulak veninden tiopental (30 mg/kg, i.v.) ile anesteziye edildikten sonra penis, korpus kavernozumların iskiüm'a tutunduğu seviyeden kesilerek izole edildi. Doku, önceden 37° C'ye ısıtılmış ve %5 CO₂, %95 O₂ karışımı ile havalandırılan Krebs solüsyonu bulunan petrilere konuldu. Petrilerde epidermal doku, bağ dokusu, korpus spongiozum ve üretra dikkatli olarak penis dokusundan uzaklaştırıldı. Daha sonra korpus kavernozum longitudinal olarak eşit boyuttaki (3x3x20 mm) dört şeride kesildi ve her bir şeritte ayrı olarak çalışıldı. Dokular organ askısı yardımıyla Krebs solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyosuna bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kayıt etmek için Grass izometrik kuvvet transdüserine (FT 03, Grass Instruments, Quincy, MA, ABD) bağlı olacak şekilde yerleştirildi. İzometrik düz kas kasılmaları ve gevşemeleri transdüserler aracılığı ile Grass marka kayıt sisteminde (79 E, Grass Instruments, Quincy, MA, ABD) kayıt edildi.

3.2. Deney Protokolü

Dokulara deneylerin başlangıcında 2 g ön gerilim uygulandı ve 15 dk da bir yıkanarak bir saat süre ile dengelenmeye bırakıldı. Spontan tonusun oluşması nedeniyle bozulan gerim dinlenme süreci boyunca tekrar 2 g'a ayarlandı. Dinlenme periyodunun ardından yapılan ön

deneylerde EAU için uygun parametreler belirlendi. EAU için dokular iki platin elektrod arasına vertikal olarak ve elektrodalara değmeyecek şekilde asıldı. Elektriksel stimulasyon için Grass S48 Stimülatör (Grass Instruments, Quincy, MA, ABD) kullanıldı. Fenilefrin ile kastırılmış dokularda 120 s. aralıkla 10 s. süre ile 70 V, 1 ms. parametrelerinde ve 2-32 Hz arasında Hz-gevşeme yanıtları alındı.

EAU aracılı gevşeme yanıtları, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinin etkisini ortadan kaldırmak için bütün gruplarda sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin (10^{-6} M) ve non-selektif muskarinik reseptör antagonisti olan atropin (10^{-6} M) varlığında alındı. Guanetidin ve atropin organ banyosuna dokular fenilefrin (10^{-5} M) ile kasılmadan 30 dk. önce eklendi.

3.2.1. EAU Aracılı NANK Gevşeme Yanıtlarının Tanımlama Çalışmaları:

Guanetidin ve atropinli ortamda dokular fenilefrin (10^{-5} M) ile kasıldılar. Kasılma yanıtları platoya ulaşınca 2-32 Hz aralığında EAU aracılı kontrol Hz-gevşeme yanıtları elde edildi. Gevşeme yanıtları elde edildikten sonra ortama Na^+ kanal blokörü olan TTX (10^{-6} M) ve spesifik voltaj bağımlı N tipi Ca^{+2} kanal blokörü olan ω -gonotoksin GVIA (10^{-7} M) ilave edildi ve 15 dk. beklendi. 15 dakikalık bekleme süresi sonunda Hz-gevşeme yanıtları tekrarlandı.

Bir grup izole tavşan korpus kavernozumun preparatında da EAU aracılı kontrol Hz-gevşeme yanıtları elde edildikten sonra ortama L-NAME (10^{-4} M) ilave edildi ve 30 dk. beklendi. 30 dakikalık bekleme süresi sonunda Hz-gevşeme yanıtları tekrarlandı.

Daha sonraki deney gruplarında dokular fenilefrin (10^{-5} M) ile kasılmadan 30 dk. önce guanetidin ve atropin ile birlikte endotel ve sinir hücreleri kaynaklı NO'nun etkisini ortadan kaldırmak için organ banyosuna L-NAME (10^{-4} M)'de eklendi.

Non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarında peptitlerin, pürinlerin ve prostaglandinlerin rolünü araştırmak için kontrol Hz-gevşeme yanıtları elde edildikten sonra ortama peptidaz olan α -kimotripsin, P2x reseptörlerini desensitize eden α,β -metilen ATP (10^{-4} M) veya siklooksijenaz inhibitörü olan indometasin (10^{-5} M) ilave edildi ve gevşeme yanıtları tekrarlandı.

Her bir dokuda sadece bir maddenin kontrol yanıtları üzerine olan etkisine bakıldı.

3.2.2. EAU Aracılı Non-Nitrerjik NANK Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid ve Vaniloid Reseptör Antagonistlerinin Etkisinin Araştırılması:

Korpus kavernozum şeritlerinden kontrol Hz-gevşeme yanıtları elde edildi. Daha sonra, ortama CB₁ reseptör antagonisti olan AM251 (10^{-6} M), CB₂ reseptör antagonisti olan AM630 (10^{-6} M) veya vaniloid reseptör antagonisti olan kapsazepin (3×10^{-6} M) eklendi ve 30 dakika sonra EAU aracılı gevşeme yanıtları tekrarlandı. Antagonistlerin gevşeme yanıtları üzerine olan etkisine dokuların bir kısmında tek tek bir kısmında ise AM251 ve AM630 birlikte verilerek bakıldı.

Ayrı bir grup dokuda ise kontrol Hz-gevşeme yanıtları indometasin (10^{-5} M)'li ortamda elde edildi. Daha sonra ortama AM251 (10^{-6} M) veya AM630 (10^{-6} M) eklendi ve 30 dakika sonra EAU aracılı gevşeme yanıtları tekrarlandı. İndometazin (10^{-5} M) ortama dokular

fenilefrinle (10^{-5} M) ile kasılmadan 30 dk. önce guanetidin (10^{-6} M), atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M) ile birlikte verildi.

Ayrı bir grup dokuda ise EAU ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerine AM251, AM630 ve kapsazepinin çözücüsü olan DMSO'nun etkisine bakıldı.

3.2.3. EAU Aracılı Non-Nitrerjik NANK Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Etkisinin Araştırılması:

Korpus kavernozum şeritlerinden kontrol Hz-gevşeme yanıtları elde edildikten sonra organ banyosuna endojen kannabinoid olan anandamid (10^{-6} M), selektif CB₁ reseptör agonisti olan ACEA (10^{-6} M) ve selektif CB₂ reseptör agonisti olan JWH015 (10^{-6} M) ilave edildi ve gevşeme yanıtları tekrarlandı. Bir dokuda sadece bir agonistin kontrol yanıtları üzerine olan etkisine bakıldı. Agonistler organ banyosuna ilave edildikten 30 dakika sonra EAU aracılı gevşeme yanıtları tekrarlandı.

Ayrıca farklı bir grup dokuda anandamidin EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtları üzerine olan etkisine CB₁ reseptör antagonisti AM251 (10^{-6} M) ve CB₂ reseptör antagonisti AM630 (10^{-6} M) varlığında bakıldı.

3.2.4. Fenilefrinle Kastırılmış Dokularda Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Gevşetici Etkilerinin Araştırılması:

Ayrı bir deney grubunda ise guanetidin ,atropin ve L-NAME'li ortamda dokular fenilefrin (10^{-5} M) ile kasıldılar. Kasılma yanıtları platoya ulaşınca ekzojen anandamid

gevşeme yanıtları kümülatif (10^{-7} - 10^{-5} M) olarak elde edildi. Yapılan zaman kontrol deneylerinde bazı dokularda anandamidin gevşetici etkisine taşıfilaksi geliştiği görüldü. Taşıfilaksi gelişmesi yanıtların yanlış değerlendirilmesine yol açacağı için aynı dokuda kannabinoid reseptör antagonistleri varlığında anandamid gevşeme yanıtları tekrarlanmadı. Farklı dokularda ekzojen anandamid gevşeme yanıtları kümülatif olarak AM251, AM630 veya kapsazepin varlığında alındı. Taşıfilaksi gelişimini önlemek için ortamda antagonist bulunsun veya bulunmasın anandamid gevşeme yanıtları kümülatif olarak her bir dokudan sadece bir kez alındı.

Ayrı bir grup izole korpus kavernozum preparatında ise kümülatif olarak ACEA (10^{-6} - 10^{-4} M) veya JWH015 (10^{-6} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları alındı. Bir dokuda sadece bir agonistin gevşetici etkisine bakıldı.

Gevşeme yanıtların üzerinde pre-sinaptik sinir uyarımının etkisi olup olmadığını araştırmak için ayrı bir grup korpus kavernozum şeridinde de anandamid, ACEA ve JWH015 gevşeme yanıtları kümülatif olarak TTX (3×10^{-6} M) varlığında alındı.

Benzer şekilde gevşeme yanıtların üzerinde pre-sinaptik Ca^{+2} hareketlerinin etkisi olup olmadığını araştırmak için ayrı bir grup korpus kavernozum şeridinde de anandamid, ACEA ve JWH015 gevşeme yanıtları kümülatif olarak ω -gonotoksin GVIA (10^{-7} M) varlığında alındı.

Ayrıca gevşeme yanıtların üzerinde siklooksijenaz yolağının etkisi olup olmadığını araştırmak için ayrı bir grup korpus kavernozum şeridinde de anandamid, ACEA ve JWH015 gevşeme yanıtları kümülatif olarak indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı.

TTX, ω -gonotoksin GVIA, indometasin, AM251, AM630 ve kapsazepin ortama guanetidin, atropin ve L-NAME ile birlikte eklendi.

Fenilefrin ile kastırılmış dokularda kapsazepin (3×10^{-6} M) gevşeme yanıtı oluşturmuştur. Bu yanıtların kannabinoidler ile olan ilişkisini araştırmak için guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda fenilefrinle kastırılmış farklı grup dokuda anandamid (10^{-6}), AM251 (10^{-6}) veya AM630 (10^{-6}) varlığında kapsazepin (3×10^{-6}) aracılı gevşeme yanıtları tekrarlandı.

3.2.5. Ekzojen Sodyum Nitroprusiat (SNP) ve Papaverinle Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Agonist ve Antagonistlerinin Etkilerinin Araştırılması:

Ayrı bir deney grubunda ise guanetidin , atropin ve L-NAME'li ortamda fenilefrin (10^{-5} M) ile kastırılmış dokularda kümülatif olarak kontrol ekzojen SNP (10^{-8} - 10^{-5} M) ve ekzojen papaverin (10^{-7} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları elde edildi. Kannabinoid reseptör agonist ve antagonistlerinin nitrejik sistem üzerine postsinaptik olarak etkilerini araştırmak için ekzojen SNP gevşeme yanıtları anandamid, AM251, AM630 veya kapsazepin varlığında tekrarlandı. Kannabinoid reseptör agonist ve antagonistlerinin düz kas kasılmaları üzerine postsinaptik olarak etkilerini araştırmak için ise ekzojen papaverin gevşeme yanıtları anandamid, AM251, AM630 veya kapsazepin varlığında tekrarlandı. Bir dokuda sadece bir maddenin kontrol yanıtları üzerine olan etkisine bakıldı.

3.3. Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler

Banyo solüsyonu olarak kullanılan Krebs-Henseleit çözeltisinin bileşimi (mM), NaCl 118; KCl 4.7; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄-2H₂O 0.9; CaCl₂-2H₂O 1.26; MgCl-6H₂O 0.5; Glukoz monohidrat 11.

Fenilefrin hidroklorid, atropin sülfat, guanetidin monosülfat, L-NAME hidroklorid, TTX, ω -gonotoksin GVIA, α -kimotripsin (tip II) (sığır pankreasından), α,β -metilen ATP lityum tuzu, indometasin, papaverin hidroklorid, anandamid, kapsazepin ve ACEA Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, ABD)'den temin edilirken, AM251 [N-(piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1 (2,4-diklorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-karboksamid], AM630 [6-iyodo-2-metil-1-[2-(4 morfolinil)etil]-1H-indol-3-il (4 metioksifenil)metanon ve JWHO15 [(2-metil-1-propil-1H-indol-3-il)-1-naptialenilmetanon] Tocris (Ellisville, MO, USA)'den temin edildi. Fenilefrin hidroklorid, atropin sülfat, guanetidin monosülfat, L-NAME hidroklorid, TTX, α -kimotripsin (type II) (sığır pankreasından), α,β -metilen ATP lityum tuzu ve papaverine hidroklorid distile suda çözündü. İndometasin, anandamid, AM251, AM630, JWHO15, kapsazepine ve ACEA DMSO'da çözündü.

3.4. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

L-NAME'in kontrol yanıtlarına olan etkisi ifade edilirken, EAU aracılı gevşeme yanıtları fenilefrin kasılmalarının yüzdesi olarak hesaplandı. Kannabinoid reseptör antagonisti ve agonistlerinin kontrol yanıtlarına olan etkisi ifade edilirken, EAU aracılı gevşeme yanıtları

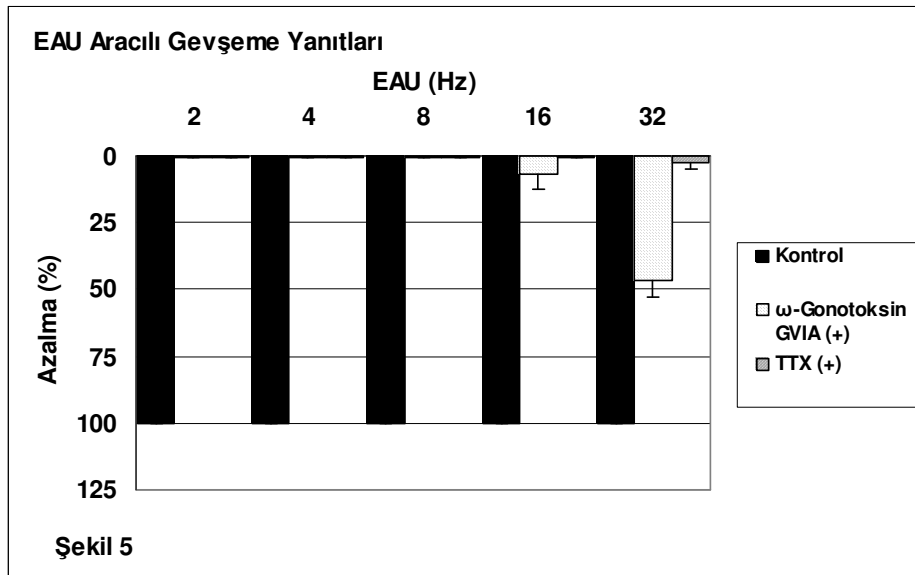
her frekansda aynı frekansdaki kontrol yanıtlarının yüzdesi olarak hesaplandı. Ekzojen gevşeme yanıtları ise fenilefrin kasılmalarının yüzdesi olarak ifade edildi.

Verilerin istatistiksel analizi “SPSS for Windows 13.0” programı ile bilgisayar ortamında yapıldı. Deneysel sonuçlar, ortalama değeri±standart hata ile ifade edildi. Deney gruplarından elde edilen yanıtların istatistiksel olarak anlamlılığını değerlendirmek için ikili gruplarda Mann Whitney U testi, üçlü ve üzerindeki gruplarda ANOVA ve takiben Bonferroni testi kullanıldı. $p<0.05$ ise ortalamalar arası fark anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

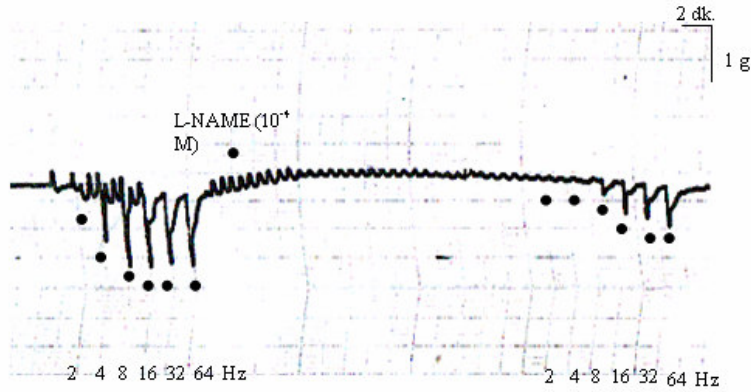
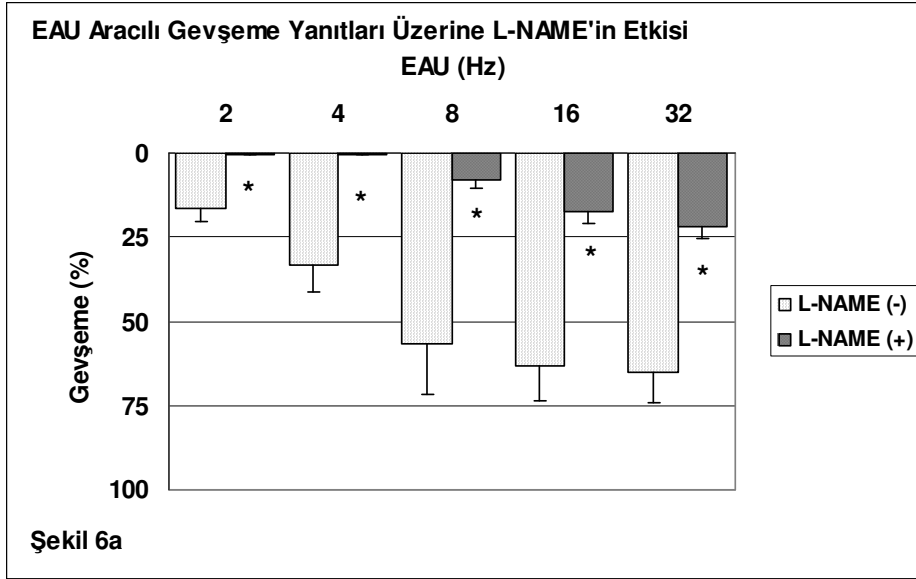
4.1. EAU Aracılı NANK Gevşeme Yanıtlarının Tanımlanması:

Guanetidin ve atropinli ortamda fenilefrin ile kastırılmış dokularda EAU gevşeme yanıtlarına neden oldu. Bu gevşeme yanıtları organ banyosuna TTX (10^{-6} M) uygulanması ile ortadan kalktı. ω -gonotoksin GVIA (10^{-7} M) bu yanıtları anlamlı olarak azalttı (Şekil 5).



Şekil-5: EAU aracılı NANK gevşeme yanıtları üzerine TTX (10^{-6} M), ω -gonotoksin GVIA (10^{-7} M)'nın etkisi. Gevşeme yanıtları fenilefrin (10^{-5} M) ile kastırılmış dokularda guanetidin (10^{-6} M) ve atropin (10^{-6} M) varlığında alındı (* , $p < 0.05$; $n=4$).

L-NAME, EAU aracılı NANK gevşeme yanıtlarını düşük frekanslarda (2-4 Hz) ortadan kaldırmış, yüksek frekanslarda (8-32 Hz) anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 6a-b). L-NAME (10^{-4} M) uygulanması dokularda tonus artışına ($\%36.30 \pm 9.04$) neden olmuştur.



Şekil 6b

Şekil-6: EAU aracılı NANK gevşeme yanıtları üzerine L-NAME'in (10^{-4} M) (6a) etkisi ve bu etkiyi gösteren tipik bir trase (6b). Gevşeme yanıtları fenilefrin (10^{-5} M) ile kastırılmış dokularda guanetidin (10^{-6} M) ve atropin (10^{-6} M) varlığında alındı. Gevşeme yanıtları fenilefrin ile oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi (* , $p < 0.05$; $n=6$).

Guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda fenilefrin ile kastırılmış preparatlarda EAU yüksek frekanslarda (8-32 Hz) gevşeme yanıtlarına neden oldu.

α,β -metilen ATP (10^{-4} M) EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını etkilemedi.

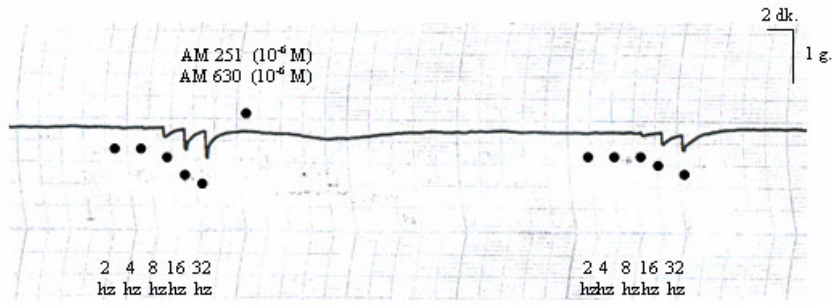
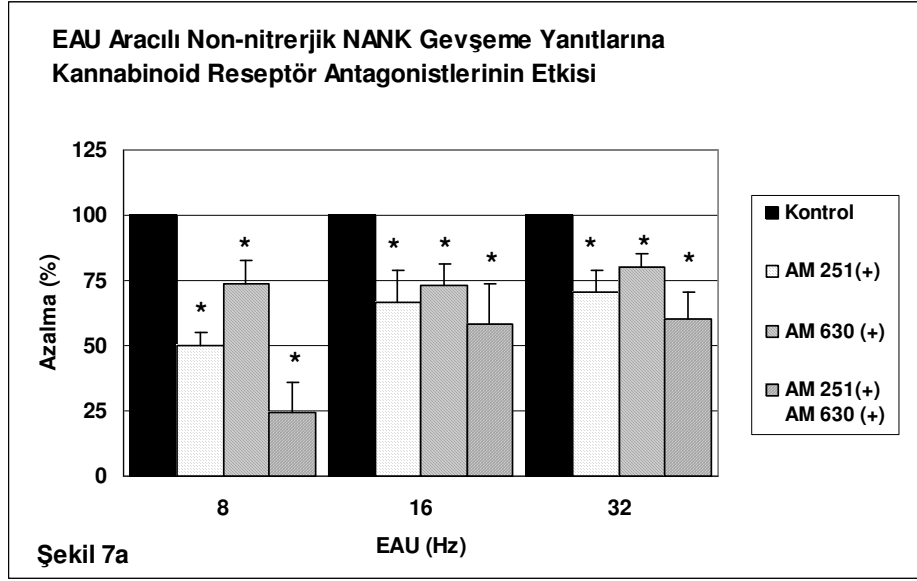
İndometasin (10^{-5} M) uygulanması fenilefrin ile kastırılmış dokularda bazal tonusu azaltırken ($\% 35,00 \pm 5,00$), EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını etkilemedi.

α -kimotripsin dokuların bazal tonusunu aşırı derecede düşürdü (1 unite/ml konsantrasyonda $\%48.50$ ve 2 unite/ml konsantrasyonda $\%62.25$). Oluşan bu tonus kaybından dolayı α -kimotripsinin EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi araştırılamadı.

4.2.EAU Aracılı NANK Non-Nitrerjik Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid ve Vaniloid Reseptör Antagonistlerinin Etkisi:

Ayrı ayrı veya birlikte kullanıldıklarında CB₁ reseptör antagonisti olan AM251 (10^{-6} M) ve CB₂ reseptör antagonisti olan AM630 (10^{-6} M) EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak azalttı. Fakat iki antagonistin azaltıcı etkisi additif değildi (Şekil 7a-7b).

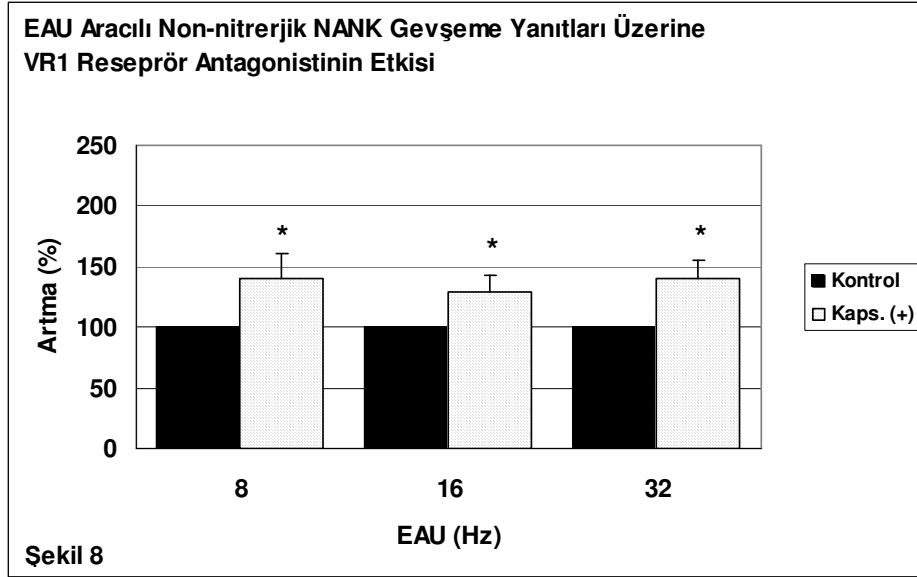
İndometasin AM251 ve AM630'un EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarında oluşturduğu azaltmayı etkilemedi.



Şekil 7b

Şekil-7: Kannabinoid reseptör antagonistlerinin EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi (7a) ve bu etkiyi gösteren tipik bir trase (7b). Gevşeme yanıtları fenilefrinle (10^{-5} M) kastırılmış dokularda guanetidin (10^{-6} M), atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Antagonist uygulanmasından sonra alınan gevşeme yanıtları kontrol gevşeme yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (* , $p < 0.05$; $n=6$).

AM251 ve AM630'un tersine vaniloid reseptör antagonisti olan kapsazepin (3×10^{-6} M) EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak artırdı (Şekil 8) .



Şekil-8: Vaniloid reseptör antagonisti kapsazepin (kaps.)'in EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi. Gevşeme yanıtları fenilefrinle (10^{-5} M) kastırılmış dokularda guanetidin (10^{-6} M), atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Antagonist uygulanmasından sonra alınan gevşeme yanıtları kontrol gevşeme yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (* , $p < 0.05$; $n=6$).

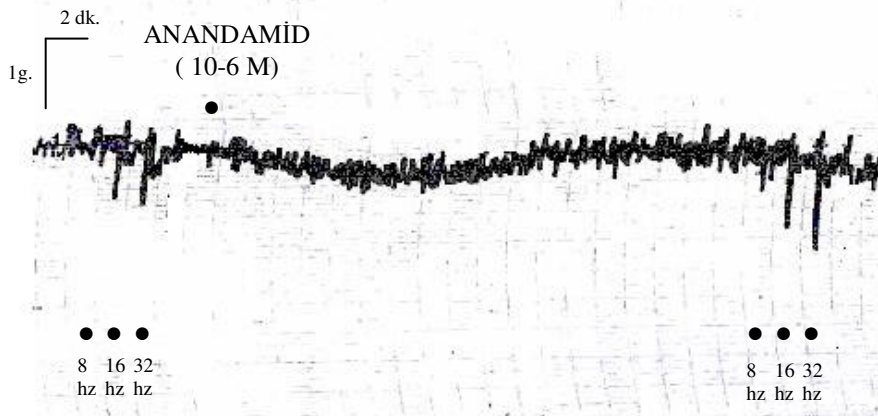
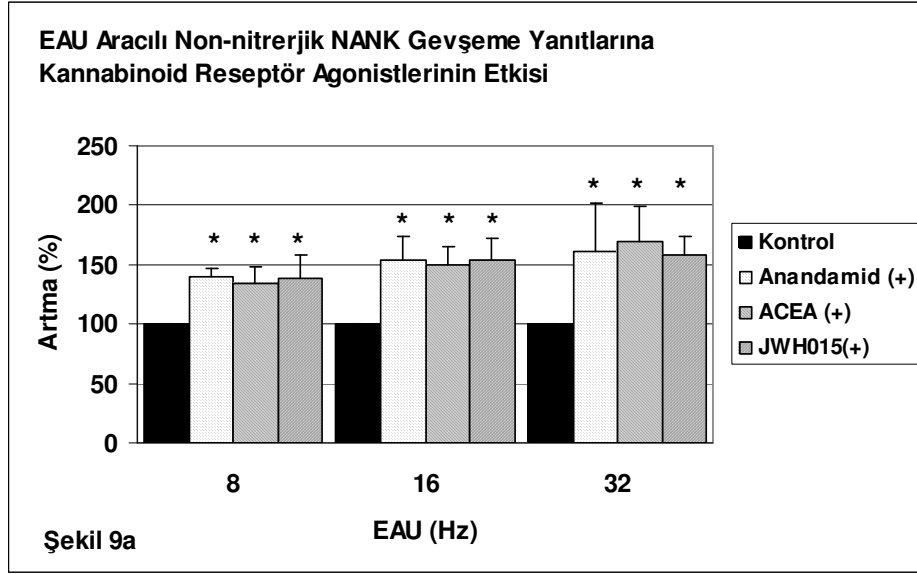
AM251, AM630 ve kapsazepinin çözücüsü olan DMSO EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını etkilemedi. AM251 ve AM630 ayrı ayrı (7.11 ± 1.41 ve 8.86 ± 2.64) veya birlikte (9.51 ± 2.11) uygulandıklarında dokuların bazal tonusunu düşürdü. Çözücülerini olan DMSO'da bazal tonusu benzer oranda (9.53 ± 2.06) düşürdü. Kapsazepin uygulanması ise bazal tonusu DMSO'ya göre anlamlı olarak daha fazla (17.97 ± 2.81) düşürdü. Anandamid, AM251 ve AM630 kapsazepin ile oluşan gevşemeyi etkilemedi.

4.3. EAU Aracılı NANK Non-Nitrerjik Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin Etkisi:

Anandamid EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak arttırdı (Şekil 9a-9b). Benzer şekilde ayrı ayrı olarak uygulandıklarında selektif CB₁ reseptör agonisti olan ACEA (10⁻⁶ M) ve selektif CB₂ reseptör agonisti olan JWH015 (10⁻⁶ M) de EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak arttırdı (Şekil 9a).

Anandamidin bu artırıcı etkisini AM251 (10⁻⁶ M) ve AM630 (10⁻⁶ M) birlikte ortadan kaldırırken, kapsazepin etkilemedi. İndometasin anandamidin EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarında oluşturduğu artırmayı etkilemedi.

10⁻⁶ M konsantrasyonda anandamid % 19,48±5,35, ACEA % 6,80±2,21 ve JWH015 % 7,52±1,94 gevşeme oluşturdu.



Şekil 9b

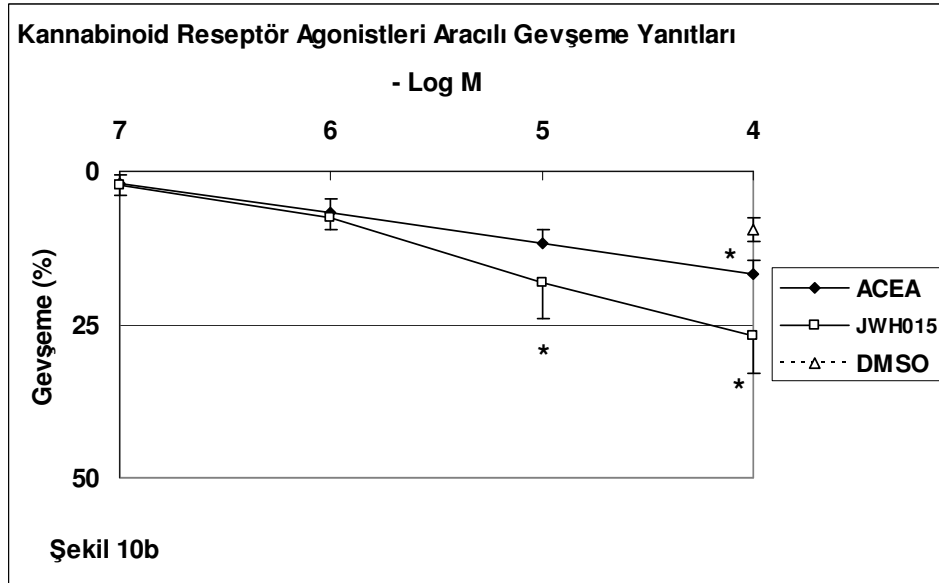
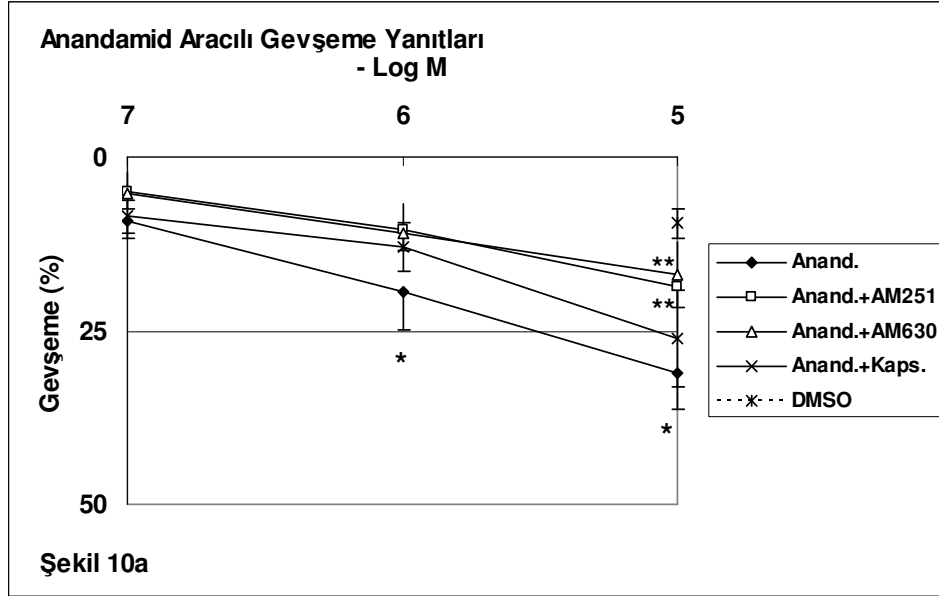
Şekil-9: Kannabinoid reseptör agonistlerinin EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi (9a) ve bu etkiyi gösteren tipik bir trase (9b). Gevşeme yanıtları fenilefrinle (10^{-5} M) kastırılmış dokularda guanetidin (10^{-6} M), atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Agonist uygulanmasından sonra alınan gevşeme yanıtları kontrol gevşeme yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0.05$; $n=6$).

4.4. Fenilefrinle Kastırılmış Dokularda Kannabinoid Reseptör Agonistlerinin

Gevşetici Etkileri:

Guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda fenilefrin ile kastırılmış preparatlarda anandamid doz bağımlı olarak gevşeme yanıtları oluşturdu. Yapılan zaman kontrol deneylerinde bazı dokularda anandamidin gevşetici etkisine taşifilaksi geliştiği görüldü. Farklı preparatlarda yapılan deneylerde, AM251 veya AM630'un ayrı ayrı bulundukları ortamda anandamidin doz bağımlı olarak oluşturduğu gevşeme yanıtları anlamlı olarak azaldı (Şekil 10a). Ortamda kapsazepin, indometasin, TTX ve ω -gonotoksin GVIA bulunması bu gevşeme yanıtlarını etkilemedi.

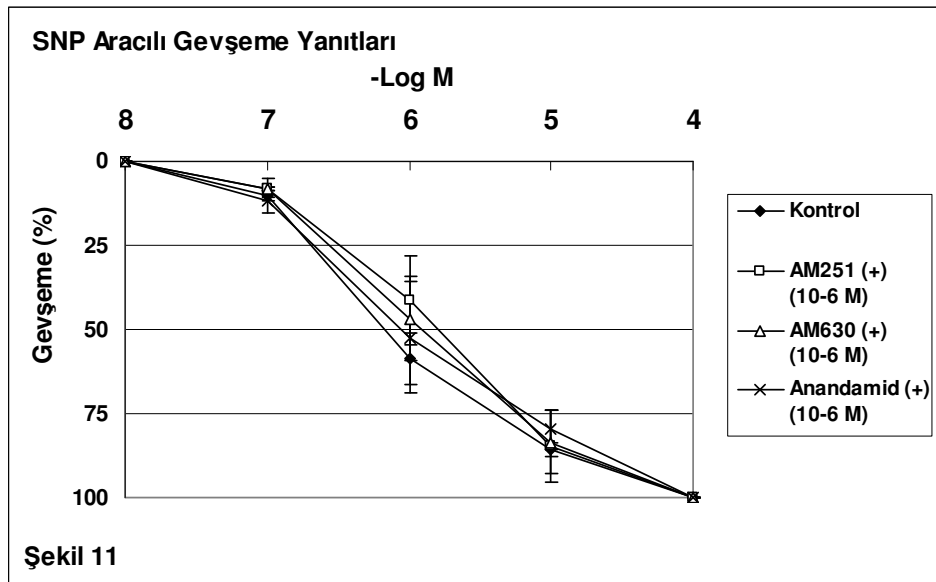
Benzer şekilde guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda fenilefrin ile kastırılmış preparatlarda ACEA ve JWH015 ayrı ayrı uygulandıklarında doz bağımlı olarak gevşeme yanıtları oluşturdu (Şekil 10b). İndometasin, TTX ve ω -gonotoksin GVIA bu iki agonist aracılığı ile oluşan gevşeme yanıtlarını etkilemedi.



Şekil-10: Anandamid (10a) ve ekzojen kannabinoid reseptör agonistlerine (10b) aracılı gevşeme yanıtları. Gevşeme yanıtları guanetidin (10^{-6} M), atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M)'li ortamda fenilefrin (10^{-5} M) ile kастırılmış dokulardan alındı. Gevşeme yanıtları fenilefrin ile oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi (* , $p < 0.05$ DMSO yanıtlarına göre anlamlı ; **, $p < 0.05$ anandamid gevşeme yanıtlarına göre anlamlı $n=6$).

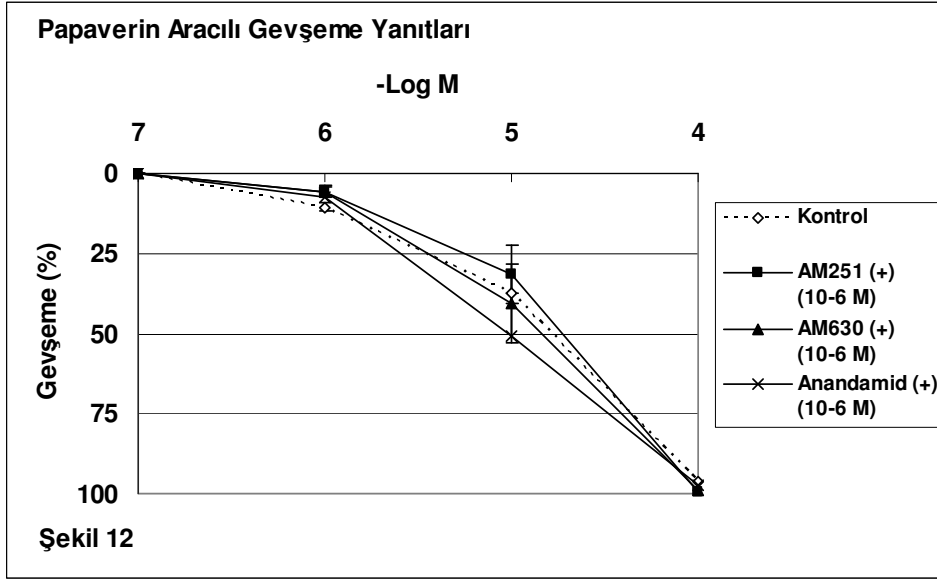
4.6. SNP ve Papaverinle Oluşan Gevşeme Yanıtları Üzerine Kannabinoid Agonist ve Antagonistlerinin Etkileri:

Guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda fenilefrin ile kastırılmış preparatlarda SNP doz bağımlı olarak gevşeme yanıtları oluşturdu. AM251 (10^{-6} M), AM630 (10^{-6} M), veya anandamid (10^{-6} M) SNP aracılığı ile oluşan gevşeme yanıtlarını etkilemedi.



Şekil-11: Kannabinoid reseptör agonist ve antagonistlerinin SNP (10^{-8} - 10^{-4} M) aracılı gevşeme yanıtları üzerine etkisi. Gevşeme yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ,atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M)'li ortamda fenilefrin (10^{-5} M) ile kastırılmış dokulardan alındı. Gevşeme yanıtları fenilefrin ile oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi (* , $p<0.05$; $n=4$).

Guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda fenilefrin ile kastırılmış preparatlarda papaverin doz bağımlı olarak gevşeme yanıtı oluşurdu. Benzer şekilde AM251 (10^{-6} M), AM630 (10^{-6} M), veya anandamid (10^{-6} M) papaverin aracılığı ile oluşan gevşeme yanıtlarını etkilemedi.



Şekil-12: Kannabinoid reseptör agonist ve antagonistlerinin papaverin (10^{-7} - 10^{-4} M) aracılı gevşeme yanıtları üzerine etkisi. Gevşeme yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ,atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M)'li ortamda fenilefrin (10^{-5} M) ile kastırılmış dokulardan alındı. Gevşeme yanıtları fenilefrin ile oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi (* , $p<0.05$; $n=4$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada atropin ve guanetidin varlığında EAU ile oluşan NANK gevşeme yanıtlarını L-NAME düşük frekanslarda (2-4 Hz) ortadan kaldırırken yüksek frekanslarda (8-32 Hz) azalttı. Bu gevşeme yanıtları organ banyosuna TTX (10^{-6} M) uygulanması ile ortadan kalkarken, ω -gonotoksin GVIA (10^{-6} M) yanıtları çok yüksek oranda azaltmıştır. Bu sonuçlar yüksek frekanslarda EAU aracılı gevşeme yanıtlarından NO'nun tek başına sorumlu olmadığını ve bu yanıtların sinirsel uyarıya bağlı olarak pre-sinaptik uca Ca^{+2} girişi ile oluştuğunu düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda korpus kavernozum düz kası gevşemesinden esas olarak NO'nun sorumlu olduğu gösterilmiştir ve NO major erektile nörotransmitter olarak kabul edilmektedir (2,55,64,101). NO'nun korpus kavernozumda nitrejik sinir liflerindeki nöronal NOS (nNOS) ve penil vasküler ve sinüzoidal endotel hücrelerinde bulunan endotelial NOS (eNOS) olmak üzere iki temel kaynağının olduğu belirlenmiştir (14,40). Ereksiyon kontrolünde nNOS'un eNOS'dan daha önemli bir izoform olduğu düşünülmektedir (15). Ignarro ve ark. adrenerjik ve kolinerjik blokaj yapıldığında EAU aracılı gevşeme yanıtları oluştuğunu ve bu yanıtların TTX ile ortadan kalktığını, NOS enzimi inhibitörü olan N^G -nitro-L-arginin (L-NOARG) ve guanilat siklaz inhibitörü olan metilen mavisi ile de büyük oranda azaldığını ve bu azalmanın L-arginin ile geri döndüğünü göstermişlerdir. İndometasinin ise bu NANK gevşeme yanıtlarını etkilemediği rapor edilmiştir (55). Benzer şekilde endoteli sağlam ve hasarlanmış tavşan korpus kavernozumunda NOS enzimi inhibitörü L-NOARG 5,15 ve 40 Hz'de oluşan gevşeme yanıtlarını inhibe etmiş ve bu inhibisyon L-arginin ile geri dönmüştür. Fakat L-NOARG EAU aracılı gevşeme yanıtlarını tam olarak ortadan kaldıramamıştır (64). Klitoral korpora

kavernoz, anokokoksigeus kası, interkavernoz penil arteri, vajina duvarı ve üretra gibi ürogenital sistem dokusunda NANK gevşeme yanıtları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Tavşan klitoral korpora kavernoz dokusunda ve sıçan anokokoksigeus kasında EAU aracılı NANK gevşeme yanıtlarını NOS inhibitörleri tek başlarına ortadan kaldırmıştır ve bu dokularda NO'nun tek başına NANK gevşeme yanıtlarından sorumlu olduğunu düşündürmüştür (16,71). Fakat tavşan korpus kavernozumunda yapılan çalışmalara benzer şekilde at interkavernoz penil arteri, tavşan vajina duvarı ve domuz üretrasında EAU aracılı NANK gevşeme yanıtları NOS enzimi inhibitörleri ile tam olarak ortadan kaldırılamamıştır (11-14). At derin penil arterinde yapılan bir çalışmada L-NOARG, EAU aracılı TTX'e duyarlı NANK gevşeme yanıtlarını düşük frekanslarda (0.5-2 Hz) ortadan kaldırırken yüksek frekanslarda (4-32 Hz) anlamlı olarak azaltmıştır fakat tam olarak ortadan kaldırmamıştır. L-NOARG'ın bu etkisini L-arginin geri çevirmiştir (102). Dişi domuz üretrasında EAU'nun düşük frekanslarda (0.5-2 Hz) tek fazlı yüksek frekanslarda ise (4-32 Hz) iki fazlı gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir. TTX'e duyarlı bu NANK gevşeme yanıtları L-NOARG tarafından düşük frekanslarda (0.5-2 Hz) ortadan kaldırılırken yüksek frekanslarda (4-32 Hz) sadece ilk faz ortadan kaldırılmıştır. Yüksek frekanslarda oluşan ikinci fazın L-NOARG'dan etkilenmediği belirtilmiştir (116).

Bu çalışmada tavşan korpus kavernozumunda yüksek frekanslarda görülen EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını α,β -metilen ATP (10^{-4} M) ve indometasin (10^{-5} M) etkilemedi. Bu sonuçlar tavşan korpus kavernozumunda EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarından ATP'nin ve prostaglandinlerin sorumlu olmadığını düşündürmektedir. α -kimotripsin dokuların bazal tonusunu düşürdü (1 unite/ml konsantrasyonda %48.50 ve 2 unite/ml konsantrasyonda %62.25). Oluşan tonus kaybından

dolayı α -kimotripsinin EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi değerlendirilemedi. Ayrıca indometasin fenilefrin ile kastırılmış dokularda guanetidin, atropin ve L-NAME varlığında bazal tonusu düşürmüştür. Bu da tavşan korpus kavernozumunda daha önceden de gösterildiği gibi bazal bir prostaglandin sentezi olduğunu düşündürmektedir (20). Daha önceden de değinildiği gibi tavşan korpus kavernoza, at interkavernoza penil arteri, tavşan vajina duvarı ve domuz uretrası gibi ürogenital sistem dokularında yapılan çalışmalarda EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtları gösterilmiştir (8,102,116,123,124). Fakat bu gevşeme yanıtlarında hangi nörotransmitter ve/veya nörotransmitterlerin rolü olduğuna dair bir bilgi literatürde bulunmamaktadır. Tavşan vajinal duvarında yapılan çalışmada VIP, histidin metionin peptidi, histidin valin peptidi, helospektin-I ve II gibi peptidler ekzojen olarak uygulandıklarında gevşeme yanıtı oluşturmuşlardır. Fakat α -kimotripsin TTX'e duyarlı EAU aracılı gevşeme yanıtlarını etkilememiştir. Benzer şekilde yine aynı dokuda ATP, ADP, adenozin, UTP ve UDP ekzojen olarak uygulandıklarında gevşeme yanıtı oluştururken, pürinerjik reseptör antagonistleri TTX'e duyarlı EAU aracılı gevşeme yanıtlarını etkilememiştir ve tavşan vajinal duvarında non nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarından peptidlerin, pürinlerin ve pirimidinlerin sorumlu olmadığı belirtilmiştir (123,124). Benzer şekilde daha önceleri yapılan çalışmalarda adenozin, ADP ve ATP'nin tavşan korpus kavernozumunda gevşeme yanıtlarına neden olduğu gösterilmişken (61,63), bu çalışmada α,β -metilen ATP, EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir.

Ayrı ayrı veya birlikte kullanıldıklarında CB₁ reseptör antagonisti olan AM251 (10^{-6} M) ve CB₂ reseptör antagonisti olan AM630 (10^{-6} M) EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak azalttı. Anandamid EAU aracılı

non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak arttırdı. Benzer şekilde ayrı ayrı olarak uygulandıklarında selektif CB₁ reseptör agonisti olan ACEA (10⁻⁶ M) ve selektif CB₂ reseptör agonisti olan JWH015 (10⁻⁶ M) de EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak arttırdı. AM251 ve AM630 birlikte anandamid aracılı EAU ile oluşan gevşeme yanıtlarındaki artışı ortadan kaldırdı. Bu sonuçlar EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarında endokannabinoidlerin CB₁ ve CB₂ reseptörleri aracılığı ile katkılarının olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda CB₁ reseptör antagonistlerinin, santral sinir sisteminde dopaminerjik ve nitrerjik sistemin etkinliğini artırarak sıçanlarda penil ereksiyona neden oldukları gösterilmiştir (24,76). Korpus kavernozumda nitrerjik sinir sonlanmalarından NO salıverilmesinin presinaptik reseptörler aracılığı ile asetilkolin, noradrenalin, ATP ve peptidler gibi birçok nörotransmitter tarafından etkilendiği bilinmektedir (107). Sıçan korpus kavernozumunda yapılan bir çalışmada NO salıverilmesi üzerine kannabinoidlerin de etkili olduğu gösterilmiştir. Anandamidin CB₁ ve vaniloid reseptörleri aracılığı ile NANK gevşeme yanıtlarını artırdığı ve anandamidin bu etkisinin NO aracılı olduğu, nitrerjik sistemin bloke edilmesi ile ortadan kalktığı gösterilmiştir. Ayrıca CB₁, CB₂ ve vaniloid reseptör antagonistlerinin NANK gevşeme yanıtları üzerine direkt olarak etkilerinin olmadığı rapor edilmiştir (41). Tavşan korpus kavernozumunda yapılan bu çalışmada ise antagonistleri EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını inhibe etmişlerdir. Anandamid ise bu gevşeme yanıtları üzerindeki artırıcı etkisini CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden NO'dan bağımsız olarak göstermiştir. Diğer genital sistem dokularında da kannabinoidlerin etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Kannabinoidler değişik türlerde yapılan çalışmalarda vas deferensindeki EAU aracılı kasılma yanıtlarını azaltmışlardır. Fare vas deferensinde bu etkilerini hem CB₁

hem de CB₂ reseptörleri aracılığı ile oluşturdıkları gösterilmiştir (45). Tavşan vas deferensinde ise CB₁ reseptör antagonisti WIN 55,212-2'nin etkisini kısmi olarak geri çevirirken CB₂ reseptör antagonistinin etkisi olmamıştır (5). Ayrıca sıçan vas deferensinde CB₁ reseptörleri üzerinde endojen kannabinoid tonusu olduğu saptanmıştır (21). Sıçan prostat bezinde yapılan başka bir çalışmada da kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2'nin CB₁ reseptörleri üzerinden prostaglandinler aracılığı ile düz kas gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir (108).

Ayrıca tavşan izole korpus kavernozumundaki bu çalışmada fenilefrinle kastırılmış dokularda ekzojen olarak uygulandıklarında kannabinoid reseptör agonistleri anandamid, ACEA ve JWH015 doz bağımlı olarak gevşeme yanıtları oluşturdu. AM251 ve AM630 anandamid ile oluşan gevşeme yanıtlarını azalttı. Bu sonuç anandamidin etkisini CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden oluşturduğunu göstermektedir. TTX ve ω -gonotoksin GVIA anandamid, ACEA ve JWH015 aracılı gevşeme yanıtlarını etkilemedi. Tetrodotoksin ve ω -gonotoksin GVIA anandamid, ACEA ve JWH015 aracılı gevşeme yanıtlarını etkilememesi bu yanıtların pre-sinaptik reseptörler aracılığı ile nörotransmitter salıverilmesi aracılı oluşmadıklarını ve bu yanıtlarda pre-sinaptik Ca⁺² kanallarının da rolü olmadığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar literatürden farklı olarak kannabinoid reseptör agonistlerinin etkilerini post-sinaptik uçta da oluşturduğunu göstermektedir. Yine bu çalışmada kannabinoid reseptör antagonistleri ve anandamidin atropin, guanetidin ve L-NAME varlığında, SNP ve papaverin ile oluşan gevşeme yanıtlarını etkilememesi, kannabinoidlerin post-sinaptik düzeydeki etkilerini dokunun gevşeyebilirliğini veya NO'ya cevap verebilirliğini değiştirmeden gösterdiğini düşündürmektedir. Hem Santral sinir sisteminde hem de periferde kannabinoidlerin birçok farklı nörotransmitterin salıverilmesini pre-sinaptik CB₁ ve CB₂

reseptörleri üzerinden etkiledikleri gösterilmiştir. Santral sinir sisteminde, endokannabinoidler post-sinaptik hücrelerden salıverilirler ve etkilerini pre-sinaptik uçta gösterirler. Pre-sinaptik uçta CB₁ reseptörleri üzerinden klasik nörotransmitterlerin salıverilmesini etkilerler (36). Sıçanlarda korteks, hipokampus, nukleus accumbens ve ventral tegmental alan gibi Santral sinir sistemi bölgelerinde yapılan çalışmalarda CB₁ reseptör aktivasyonunun farklı nörotransmitterlerin salıverilmelerini etkilediği gösterilmiştir (38,39,82,88,89,103,112). Sıçan prefrontal korteksinde yapılan bir çalışmada THC hücre dışı GABA seviyesini azaltırken, glutamat ve dopamin seviyelerini artırmaktadır (89). Benzer şekilde THC ve sentetik analogları frontal korteksde noradrenalin salıverilmesini artırmış, asetilkolin salıverilmesini uzun süreli azaltmıştır (82,88). Başka bir çalışmada ise THC ve WIN 55,212-2'nin yine prefrontal korteksde endojen opioid salıverilmesini artırarak asetilkolin salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir (39). Periferde santral sinir sisteminden farklı olarak endokannabinoidlerin endotel hücrelerinden ve pre-sinaptik uçtan salıverildikleri, etkilerini de hemen bu uçta gösterdikleri düşünülmektedir (91). CB₂ reseptörleri ilk olarak immün sistem hücrelerinde saptanmıştır (80). Daha sonra yapılan çalışmalarda periferde değişik dokularda CB₁ reseptörleri gibi CB₂ reseptörlerinin de nörotransmitter salıverilmesini etkilediği gösterilmiştir. Başta kardiyovasküler sistemde olmak üzere sentetik ve endojen kannabinoidlerin periferik etkileri birçok dokuda araştırılmıştır. Birçok farklı damar yatağında kannabinoidlerin farklı mekanizmalar ile vazodilatasyon yaptıkları gösterilmiştir. Anandamidin tavşan böbrek arteriollerinde NO aracılığı ile, sıçan mezenter arterinde hiperpolarizasyon oluşturarak, sıçan hepatik arter düz kasında hücre içi Ca⁺² depolarını etkileyerek, koyun koroner arterinde araşidonik asit ürünleri aracılığı ile, mezenterik arterlerde ise vaniloid reseptörleri üzerinden gevşemeye neden oldukları gösterilmiştir

(29,44,92,126,127). Çeşitli hayvanların solunum yollarında yapılan çalışmalarda kannabinoid agonistlerinin bronkokonstriksiyon yapan ajanların salıverilmesini azalttığı gösterilmiştir. Kobaylarda bu etkilerini CB₂ reseptörleri aracılığı ile (121), kemirgenlerde ise CB₁ reseptörleri aracılığı ile (12) oluşturdukları gösterilmiştir. Anandamid ve WIN 55,212-3 sıçan trakeasında yapılan başka bir çalışmada EAU aracılı kasılma yanıtlarını CB₂ reseptörleri aracılığı ile azaltmıştır (122). Gastrointestinal sistemde kannabinoidler kolinerjik aşırımı etkilemekte olduğu ve asetilkolin salıverilmesini azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (23,52,57,106). İnsan kolonsirküler düz kasında ve kobay myenterik plexusunda yapılan çalışmalarda kannabinoidlerin CB₁ reseptörleri aracılığı ile asetilkolin salıverilmesini azalttığı rapor edilmiştir. (23,52). Sıçan mide fundusunda yapılan başka bir çalışmada ise kannabinoidlerin asetilkolin salıverilmesi üzerinde olan azaltıcı etkilerinden CB₂ reseptörlerinin de sorumlu olduğu gösterilmiştir (106). Hem santral sinir sisteminde hem de periferde yapılan bütün bu çalışmalarda kannabinoidlerin etkilerini pre-sinaptik uçta gösterdikleri saptanmıştır. Fakat izole tavşan korpus kavernozumunda yapılan bu çalışmadaki sonuçlar kannabinoidlerin etkilerini post-sinaptik uçta da CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden oluşturduğunu göstermektedir. Fakat daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Endojen kannabinoid olan anandamidin vaniloid reseptörler (VR₁) aracılığı ile de etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (42,127). Daha önceden de bahsedildiği gibi sıçan korpus kavernozumunda yapılan bir çalışmada anandamidin CB₁ reseptörleri yanı sıra vaniloid reseptörleri aracılığı ile de NO aracılı NANK gevşeme yanıtlarını artırdığı gösterilmiştir (41). İzole kobay baziller arterinde, sıçan hepatik ve mezenterik arterlerinde yapılan bir çalışmada anandamidin VR₁ reseptörlerini aktive ederek ve kalsitonin gen ile ilişkili peptid (CGRP) salıverilmesini sağlayarak bu izole damar preparatlarında gevşemeye

neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca anandamidin rekombinant sıçan VR₁ reseptörlerinde agonistik etki gösterdiği bildirilmiştir (127). Sirotik sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise anandamidin CB₁ ve VR₁ aracılı mekanizmalar ile hiperdinamik sirkülasyon ve mezenterik hiperemi gelişimine katkısı olabileceği gösterilmiştir (78). Anestezi edilmiş sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada da anandamidin kan basıncı ve kalp atım hızı üzerindeki etkilerini CB₁ ve VR₁ reseptörleri üzerinden oluşturdukları gösterilmiştir. VR₁ reseptörleri ilk başta ani olarak oluşan bradikardi ve hipotansiyondan sorumlu iken CB₁ reseptörleri ise daha sonra uzun süreli olarak oluşan hipotansiyondan sorumludur (73). Fakat izole sıçan koroner arterlerinde yapılan başka bir çalışmada ise anandamidin gevşetici etkisinde CB₁, CB₂ ve VR₁ reseptörlerinin etkisi olmadığı gösterilmiştir (117). Bu çalışmada ise VR₁ reseptör antagonisti kapsazepin izole tavşan korpus kavernozumunda CB₁ ve CB₂ reseptörleri antagonistlerinin aksine EAU aracılı non-nitrat NANK gevşeme yanıtlarını artırmıştır. Ayrıca fenilefrinle kastırılmış dokularda kapsazepin kendisi gevşeme yanıtı oluştururken ekzojen anandamid ile oluşan gevşeme yanıtlarını etkilememiştir. Kapsazepin'in oluşturduğu gevşeme yanıtını anandamid, AM251 ve AM630 etkilememiştir. Bu sonuçlar kannabinoidlerin izole tavşan korpus kavernozumundaki etkilerinde VR₁ reseptörlerinin etkili olmadığını düşündürmektedir. Kapsazepin'in gösterdiği etkilerde kannabinoidlerden bağımsızdır.

Bu çalışmada kannabinoidlerin etkilerini tavşan korpus kavernozumunda NO ve siklooksijenaz yolağı aracılığı ile oluşturmadığı gösterilmiştir. Daha önce sıçan korpus kavernozumunda yapılan bir çalışmada anandamid EAU aracılı NANK gevşeme yanıtlarını CB₁ ve VR₁ reseptörleri üzerinden NO'nun etkisini artırarak göstermiş fakat CB₁ ve VR₁ reseptör antagonistleri tek başına kullanıldıklarında EAU aracılı NANK gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir (41). Birçok farklı damar yatağında anandamidin farklı mekanizmalar ile

vazodilatasyon yaptıkları gösterilmiştir. Benzer şekilde anandamid tavşan böbreğinde NO aracılığı ile arteriollerde gevşemeye neden olmakta ve mikrosirkülasyonu etkilemektedir (29). Sığır oftalmik arterinde yapılan başka bir çalışmada ise anandamidin CB₁ reseptörleri aracılığı ile endotel hücrelerinden NO salıverilmesini artırarak gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada anandamid endoteli hasarlanmış arterlerde K⁺ kanallarını açarak endotel bağımsız gevşeme yanıtları oluşturmuştur (93). İnsan umbilikal ven endotel hücre kültüründe yapılan bir çalışmada da anandamidin CB₁ reseptörleri aracılığı ile endotel hücrelerinde NO yapımını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca anandamid bu hücrelerde CB₁ reseptörlerinden bağımsız olarak ET-1 yapımını azaltmıştır (94). İnsan safenöz arter ve veninde de endojen kannabinoid olan 2-AG'nin CB₁ reseptörleri aracılığı ile NO salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir (105). Daha önceleri yapılan çalışmalarda kannabinoidlerin etkilerini prostaglandinler aracılığı ile de gösterdikleri saptanmıştır (44,108). THC'nin fare ve sıçan beyinde prostaglandin E₂ seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (54). Bu çalışmada indometasin (10⁻⁵M) fenilefrin ile kastırılmış izole korpus kavernozum preparatlarında guanetidin, atropin ve L-NAME varlığında bazal tonusu düşürürken EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını etkilememiştir. Bu sonuçlar daha önceden de gösterildiği gibi tavşan korpus kavernozumunda EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarından prostaglandinlerin sorumlu olmadığını (55) ve tavşan korpus kavernozumunda bazal bir prostaglandin sentezi olduğunu (20) düşündürmektedir. Ayrıca bu çalışmada indometasin anandamid, ACEA ve JWH015 aracılı gevşeme yanıtlarını etkilememiştir. Koyun koroner arterinde yapılan bir çalışmada anandamid aracılı gevşeme yanıtları endoteli hem sağlam hem de hasarlı preparatlarda siklooksijenaz enzimi inhibitörü indometasin ile azalmıştır (44). Başka bir çalışmada da anandamid ve THC tavşan serebral arterinde doz

bağımlı olarak gevşeme yanıtı oluşturduğu ve bu yanıtların ortama L-NAME eklenmesinden etkilenmediği fakat ortama indometasin eklenmesi ile ortadan kalktığı gösterilmiştir (35). Sıçan prostat bezinde yapılan bir başka çalışmada da kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2'nin epitelyal CB₁ reseptörleri aracılığı ile epitel hücrelerinden prostaglandin salıverilmesine neden olduğu ve sonuçta düz kas gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir (108). Fakat sıçan korpus kavernozumunda anandamid aracılı NANK gevşeme yanıtlarındaki artışta prostaglandinlerin rolü olmadığı gösterilmiştir (41). Ayrıca tavşan mezenterik arterinde yapılan başka bir çalışmada endoteli hem sağlam hem de hasarlı preparatlarda anandamid aracılı gevşeme yanıtlarında siklooksijenaz yolağının ve NO'nun rolü olmadığı gösterilmiştir (17).

Pre-sinaptik kanabinoid reseptörler üzerinde endojen bir tonus olduğu daha önce farklı dokularda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. CB₁ reseptör antagonisti olan SR141716A'nın kobay myenterik plexus longitudinal kas preparatlarında EAU aracılı kasılma yanıtlarını artırdığı gösterilmiştir (86). Benzer şekilde SR141716A kobay myenterik plexusundan asetilkolin salıverilmesini artırmıştır (23). SR141716A kobay ileumunda yapılan başka bir çalışmada da EAU aracılı kolinerjik ve NANK kasılma yanıtlarını artırmış fakat ekzojen asetilkolin ve P maddesi aracılı kasılma yanıtlarını etkilememiştir (57). SR141716A fare mesanesinde yapılan başka bir çalışmada da EAU aracılı kasılma yanıtlarını artırmıştır (85). Benzer şekilde sıçan vas deferensinde yapılan başka bir çalışmada CB₁ reseptörleri üzerinde endojen bir tonus olduğu gösterilmiştir (21). Fare kolonunda yapılan başka bir çalışmada ise kannabinoidlerin CB₁ reseptörleri üzerinden EAU aracılı NANK kasılma yanıtlarını azalttığı ama bu yanıtlar üzerinde endojen bir kannabinoid tonusu olmadığı gösterilmiştir (79). Sıçan mide fundusunda yapılan bir çalışmada ise CB₂ reseptör antagonisti olan AM630'un EAU

aracılı NANK gevşeme yanıtları ve kolinerjik kasılma yanıtları üzerine olan etkisi araştırılmıştır. AM630 EAU aracılı NANK gevşeme yanıtlarını artırırken ve kolinerjik kasılma yanıtlarını etkilememiştir (106). İzole tavşan korpus kavernozumunda yapılan bu çalışmada ayrı ayrı veya birlikte kullanıldıklarında CB₁ reseptör antagonisti olan AM251 ve CB₂ reseptör antagonisti olan AM630 EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını kontrol yanıtlarına göre anlamlı olarak azaltmıştır. Bütün bu sonuçlar doğrultusunda kannabinoid reseptörleri üzerinde endojen bir tonusun olduğu söylenebilir. Fakat izole sıçan korpus kavernozumunda ise AM251 ve AM630'un EAU aracılı NANK gevşeme yanıtlarını etkilemediği gösterilmiştir (41).

Kenevir bitkisi milattan önceki yıllardan itibaren Asya'da tedavi amacı ile kullanılıyordu. 19. yüzyılda batı tıbbında kullanılmaya başlandı. Çok sayıdaki yan etkisinden dolayı 20. yüzyılda tıpta kullanımı anlamlı derecede azaldı (97,125). Endojen kannabinoiderjik sistemin ve spesifik kannabinoid reseptörlerinin saptanmasından sonra, kannabinoidler tedavi ajanı olarak tekrar gündeme gelmiş ve değişik hastalıklarda değişen sayıda hasta grupları ile birçok çalışma yapılmıştır. Kimyasal olarak sentezlenen kannabinoid türevlerinin etkinliği ve güvenilirliği bilimsel olarak gösterilenlerin tedavide kullanıma girmeleri beklenmektedir. Özellikle kemoterapiye bağlı bulantı ve kusmanın önlenmesinde etkili oldukları düşünülmektedir. Ağrı, multiple skleroz, spinal kord hasarı, epilepsi, Parkinson hastalığı, glokom, anoreksi ve AIDS'e bağlı kilo kaybı kabul edilen olası diğer tedavi endikasyonlarıdır. (7,97,125). Eretil disfonksiyon patofizyolojisinde birçok sebep olduğu bilinmektedir. Penil düz kas gevşemesindeki bozukluklar eretil disfonksiyona neden olmaktadır. Sinir hasarı, endotel hasarı, reseptörlerin yapısı ve fonksiyonundaki değişiklikler düz kas gevşeme bozukluklarının nedenleri arasında sayılmaktadır (2). Eretil disfonksiyon

tedavisinde birçok farmakolojik ajan kullanılmaktadır. Penil düz kas gevşemelerinde major yolak olan NO-guanilat siklaz-cGMP yolağını etkileyen fosfodiesteraz-5 inhibitörleri, L-arginin, NO donörleri, guanilat siklaz aktivatörleri erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca düz kas kasılmasını engelleyen α -adrenoreseptör antagonistleri, Rho-kinaz inhibitörleri ve düz kas gevşemesine neden olan VIP, prostaglandin E₁ papaverin gibi ajanlar da erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmaktadırlar (2,107). Endokannabinoidlerin penil düz kas gevşemesindeki rolünün ve hangi mekanizmalar üzerinden gevşemeye katkıda bulunduğu tam olarak açıklanması erektil disfonksiyon tedavisine katkı sağlayabilir. Kimyasal olarak sentezlenen kannabinoid türevlerinin etkinliği ve güvenirliliği bilimsel olarak gösterilenler endokannabinoidlerin penil düz kas gevşemesindeki rolü tam olarak açıklandıktan sonra erektil disfonksiyon tedavisinde yardımcı ajan olarak kullanılabilirler.

Sonuç olarak izole tavşan korpus kavernozumunda CB₁ reseptör antagonisti AM251 ve CB₂ reseptör antagonisti AM630 tek tek veya birlikte EAU aracılı non nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarını azaltırken endojen kannabinoid olan anandamid, CB₁ reseptör agonisti ACEA ve CB₂ reseptör agonisti JWH015 bu gevşeme yanıtlarını artırdı. Bu sonuçlar izole tavşan korpus kavernozumunda non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarında endokannabinoidlerin veya kannabinoid benzeri nöronal bir faktörün CB₁ ve CB₂ reseptörleri aracılığı ile katkılarının olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca fenilefrinle kastırılmış dokularda guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda ekzojen anandamid, ACEA ve JWH015 doz bağımlı olarak gevşeme yanıtları oluşturdu. AM251 ve AM630 anandamid ile oluşan gevşeme yanıtlarını azaltırken VR₁ reseptör antagonisti kapsazepin bu yanıtları etkilemedi. Tetrodotoksin, ω -gonotoksin GVIA ve indometasin anandamid, ACEA ve JWH015 gevşeme

yanıtlarını etkilemedi. Bu sonuçlar ise literatürden farklı olarak endojen ve sentetik kannabinoid reseptör agonistlerinin etkilerini tavşan izole korpus kavernozumunda CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinden pre-sinaptik uçta değil de post-sinaptik uçta gösterdiklerini düşündürmektedir. Ayrıca bu sonuçlara göre kannabinoidler etkilerini NO ve siklooksijenaz yolağı ile etkileşmeden göstermektedir. Endokannabinoidlerin penil düz kas gevşemesindeki etkilerini nöromodülatör mü yoksa nöronal faktör olarak mı gösterdiklerinin saptanması ve etki mekanizmalarının tam olarak açıklanması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

Endokannabinoidler Aracılı Non-Nitrerjik Non-Adrenerjik Non-Kolinerjik
Nörotransmitter Salıverilmesinin Fonksiyonel Olarak Tanımlanması: Tavşan Korpus
Kavernozumunda İnvitro Çalışma

Dr. İsmail Mert Vural

Korpus kavernozum düz kası gevşemesinden esas olarak nitrik oksit (NO)'ın sorumlu olduğu gösterilmiştir. Fakat NO bu gevşemeden tek başına sorumlu değildir. Bu çalışmada izole tavşan korpus kavernozumunda EAU aracılı non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarının tanımlanması ve bu yanıtlarda endokannabinoidlerin nöromodülatör veya nöronal faktör olarak rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneylerde 4-6 aylık 3-3,5 kg. ağırlığında albino erkek tavşanlar kullanıldı. Tavşanlardan izole edilen korpus kavernozum dokuları longitudinal olarak eşit boyuttaki dört şeride kesildi ve organ askısı yardımıyla Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kayıt etmek için Grass izometrik kuvvet transdüserine bağlı olacak şekilde yerleştirildi. Guanetidin ve atropinli ortamda fenilefrin ile kastırılmış dokularda L-NAME EAU ile oluşan gevşeme yanıtlarını düşük frekanslarda (2-4 Hz) ortadan kaldırırken yüksek frekanslarda (8-32 Hz) azalttı. CB1 reseptör antagonisti AM251 ve CB2 reseptör antagonisti AM630 tek tek veya birlikte guanetidin, atropin ve L-NAME'li ortamda EAU ile oluşan gevşeme yanıtlarını azaltırken endojen kannabinoid anandamid, CB1 reseptör agonisti ACEA ve CB2 reseptör agonisti JWH015 gevşeme yanıtlarını artırdı. Ortama indometasin eklenmesi bu agonist ve

antagonistlerin etkisi değiştirmedi. Ayrıca kapsazepinde bu yanıtları artırdı. L-NAME, guanetidin ve atropinli ortamda fenilefrinle kastırılmış dokularda anandamid, ACEA ve JWH015 doz bağımlı olarak gevşeme yanıtları oluşturdu. AM251 ve AM630 anandamid ile oluşan gevşeme yanıtlarını azaltırken kapsazepin bu yanıtları etkilemedi. Tetradotoksin, ω -gonotoksin GVIA ve indometasin anandamid, ACEA ve JWH015 gevşeme yanıtlarını etkilemedi. Bu sonuçlar, endokannabinoidlerin CB1 ve CB2 reseptörleri aracılığı ile tavşan korpus kavernosumunda non-nitrerjik NANK gevşeme yanıtlarına katkısı olduğunu gösterir.

7. YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)

Functional characterisation of non-nitrgergic non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter release via endocannabinoids: An in vitro study in rabbit corpus cavernosum.

Dr. İsmail Mert Vural

Corporal smooth muscle relaxation is mediated mainly but not completely by nitric oxide. In this study possible role of endocannabinoids on non-nitrgergic non-adrenergic non-cholinergic (NANC) -mediated relaxations was investigated. A total of 30 New Zealand albino male adult rabbits (4-6 months old; 3–3.5 kg body weight) were used for this study. Penises were isolated and the corpora cavernosa were then cut longitudinally into four equal strips and placed in an organ bath. The responses of tissues were recorded by isometric force displacement transducers. L-NAME abolished EFS induced relaxation responses at the lower frequencies (2-4 Hz) and inhibited the relaxation responses at higher frequencies (8-32 Hz) in the presence of atropine and guanetidine. AM251 and AM630 either together or separately inhibited whereas anandamide, ACEA and JHW015 enhanced EFS induced non-nitrgergic NANC relaxation responses. Indomethacine had not any effect on AM251, AM630, anandamide, ACEA and JHW015 induced alternations. Anandamide, ACEA and JHW015 induced relaxation responses separately in pre-contracted tissues. While AM251 and AM630 inhibited anandamide-induced relaxations, capsazepine, TTX ω -conotoxin GVIA and indomethacine did not alter anandamide-induced responses. These results suggest that non-

nitroergic NANC relaxations may be mediated partially by cannabinoid-like neuronal factors acting at both CB1 and CB2 receptors.

8. KAYNAKLAR

1. Abrahamsohn PA: The Male Reproductive System, Penis: Basic Histology 10. baskı Junqueira LC, Carneiro J (ed) (Lange, New York) 2003, S:446.
2. Andersson KE: Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* 53:417-450, 2001.
3. Andersson KE, Wagner G: Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 75:191-236, 1995.
4. Azadzoi KM, Kim N, Brown ML, Goldstein I, Cohen RA, Saenz de Tejada I: Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J Urol* 147:220-225, 1992.
5. Barun, S., Vural, I.M., Dilekoz, E., Ercan, Z.S., Sarioglu, Y., 2005. Effects of cannabinoid receptor activation on rabbit bisected vas deferens strips. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 702-707, 2005.
6. Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Hartman U, Sohn M, Jonas U: Systemic and cavernous plasma levels of endothelin 1 in healthy males during different functional conditions of the penis. *World J Urol* 18:227-31, 2000.
7. Ben Amar M: Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* 105:1-25, 2006.
8. Bozkurt NB, Vural IM, Sarioglu Y, Pekiner C: Nicotine potentiates the nitrenergic relaxation responses of rabbit corpus cavernosum tissue via nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* 558:172-178, 2007.

9. Brown AJ: Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 152:567-575, 2007.
10. Bush PA, Aronson WJ, Buga GM, Rajfer J, Ignarro LJ: Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol* 147:1650-1655, 1992.
11. Bush PA, Gonzalez NE, Ignarro LJ: Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* 186:308-314, 1992.
12. Calignano A, Kátóna I, Désarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, Freund TF, Piomelli D: Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* 408:96-101, 2000.
13. Calignano A, La Rana G, Beltramo M, Makriyannis A, Piomelli D: Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404. *Eur J Pharmacol* 337:R1-2, 1997.
14. Cartledge J, Minhas S, Eardley I: The role of nitric oxide in penile erection. *Expert Opin Pharmacother* 2:95-107, 2001.
15. Cashen DE, MacIntyre DE, Martin WJ: Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 136:693-700, 2002.
16. Celtek S, Moncada S: Nitrergic neurotransmission mediates the non-adrenergic non-cholinergic responses in the clitoral corpus cavernosum of the rabbit. *Br J Pharmacol* 125:1627-1629, 1998.
17. Chaytor AT, Martin PE, Evans WH, Randall MD, Griffith TM: The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J Physiol* 520:539-550, 1999.

18. Cheer JF, Wassum KM, Heien ML, Phillips PE, Wightman RM: Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats. *J Neurosci* 24:4393-4400, 2004.
19. Christ GJ, Lerner SE, Kim DC, Melman A: Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: I. Characteristics of contraction of isolated corporal tissue strips. *J Urol* 153:1998-2003, 1995.
20. Christ GJ, Maayani S, Valcic M, Melman A: Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in alpha-adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. *Br J Pharmacol* 101:375-381, 1990.
21. Christopoulos A, Coles P, Lay L, Lew MJ, Angus JA: Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 132:1281-1291, 2001.
22. Comiter CV, Sullivan MP, Yalla SV, Kifor I: Effect of angiotensin II on corpus cavernosum smooth muscle in relation to nitric oxide environment: in vitro studies in canines. *Int J Impot Res* 9:135-40, 1997.
23. Coutts AA, Pertwee RG: Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* 121:1557-1566, 1997.
24. da Silva GE, Fernandes MS, Takahashi RN: Potentiation of penile erection and yawning responses to apomorphine by cannabinoid receptor antagonist in rats. *Neurosci Lett* 349: 49-52, 2003.

25. Daley JT, Brown ML, Watkins T, Traish AM, Huang YH, Moreland RB, De Tejada IS: Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum: I. regulation by oxygen tension. *J Urol* 155:1482-1487, 1996.
26. Daley JT, Watkins MT, Brown ML, Martinez V, Cuevas P, Saenz de Tejada I: Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum. II. Inhibition by oxidative stress. *J Urol* 156:1169-1173, 1996.
27. Dean RC, Lue TF: Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 32: 379-403.
28. Degroot, A., Nomikos, G.G., 2007. In vivo neurochemical effects induced by changes in endocannabinoid neurotransmission. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 62-68.
29. Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, Moore LC: Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest* 100:1538-1546, 1997.
30. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC: Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613, 1988.
31. Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA, Kunos G: Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem* 264:258-267, 1999.
32. Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A: Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* 316: 977-984, 1996.

33. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D: Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-691, 1994.
34. Do Y, McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF-kappaB-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *J Immunol* 173:2373-2382, 2004.
35. Ellis EF, Moore SF, Willoughby KA: Anandamide and delta 9-THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin. *Am J Physiol* 269:H1859-1864, 1995.
36. Elphick MR, Egertová M: The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:381-408, 2001.
37. Escrig A, Marin R, Mas M: Repeated PGE1 treatment enhances nitric oxide and erection responses to nerve stimulation in the rat penis by upregulating constitutive NOS isoforms. *J Urol* 162:2205-2210, 1999.
38. Fujiwara M, Egashira N: New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: abnormal behaviors associate with CB1 cannabinoid receptor and development of therapeutic application. *J Pharmacol Sci* 96:362-366, 2004.
39. Gessa GL, Casu MA, Carta G, Mascia MS: Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 355:119-124, 1998.
40. Ghalayini IF: Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. *Int J Impot Res* 16:459-469, 2004.

41. Ghasemi M, Sadeghipour H, Mani AR, Tavakoli S, Hajrasouliha AR, Ebrahimi F, Dehpour AR: Effect of anandamide on nonadrenergic noncholinergic-mediated relaxation of rat corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 544, 138-45, 2006.
42. Glass J: Male Reproductive System, Penis: Gray's Anatomy 39. baskı Standrings S (ed) (Elsevier,Londra) 2005, S:1315-1317.
43. Gokce G, Bagcivan I, Kilicarslan H, Yildirim S, Gultekin YE, Sarioglu Y: Relaxation effects of adrenomedullin in isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *BJU Int* 93:859-862, 2004.
44. Grainger J, Boachie-Ansah G: Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol* 134:1003-1012, 2001.
45. Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford ML, Shire D, Huffman JW, Yu S, Lainton JA, Pertwee RG: Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 339:53-61, 1997.
46. Harkany T, Guzman M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA Mackie, K: The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* 28:83-92, 2007.
47. Hedlund H, Andersson KE: Comparison of the responses to drugs acting on adrenoceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J Auton Pharmacol* 5: 81-88, 1985.
48. Hedlund H, Andersson KE: Contraction and relaxation induced by some prostanoids in isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *J Urol* 134:1245-1250, 1985.

49. Hedlund P, Alm P, Andersson KE: NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* 127:349-360, 1999.
50. Hedlund P, Aszodi A, Pfeifer A, Alm P, Hofmann F, Ahmad M, Fassler R, Andersson KE: Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2349-2354, 2000.
51. Hiley CR, Ford WR: Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:187-205, 2004.
52. Hinds NM, Ullrich K, Smid SD: Cannabinoid 1 (CB1) receptors coupled to cholinergic motoneurons inhibit neurogenic circular muscle contractility in the human colon. *Br J Pharmacol* 148:191-199, 2006.
53. Hsu SS, Huang CJ, Cheng HH, Chou CT, Lee HY, Wang JL, Chen IS, Liu SI, Lu YC, Chang HT, Huang JK, Chen JS, Jan CR: Anandamide-induced Ca²⁺ elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicology* 231:21-29, 2007.
54. Hunter SA, Audette CA, Burstein S: Elevation of brain prostaglandin E₂ levels in rodents by delta 1-tetrahydrocannabinol. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 43:185-190, 1991.
55. 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* 170:843-850, 1990.

56. Italiano G, Calabrò A, Spini S, Ragazzi E, Pagano F: Functional response of cavernosal tissue to distension. *Urol Res* 26:39-44, 1998.
57. Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F: Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptors. *Br J Pharmacol* 124:1363-1368, 1998.
58. Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, Dowell S, Staton PC, Green P, Shabon U, Bao W, Aiyar N, Yue TL, Brown AJ, Morrison AD, Douglas SA: The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol* 152:825-831, 2007.
59. Kaminski NE: Inhibition of the cAMP signaling cascade via cannabinoid receptors: a putative mechanism of immune modulation by cannabinoid compounds. *Toxicol Lett* 102-103:59-63, 1998.
60. Kaminski NE: Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol* 83:124-132, 1998.
61. Kaya T, Sarioglu Y, Göksu OC, Yildirim S, Yildirim K: Effect of additional testosterone on purinergic responses in isolated rabbit corpus cavernosum strips. *Pharmacol Res* 37:227-232, 1998.
62. Kifor I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, Dluhy RG: Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol* 157:1920-1925, 1997.

63. Kilicarslan H, Yildirim S, Bagcivan I, Ayan S, Sarac B, Sarioglu Y: Effect of chronic renal failure on the purinergic responses of corpus cavernosal smooth muscle in rabbits. *BJU Int* 90:596-600, 2002.
64. Kim YC, Davies MG, Hagen PO, Carson CC 3rd: Experimental evidence for endothelium dependent relaxation and neuronal nitric oxide in corpus cavernosum. *Yonsei Med J* 35:308-313, 1994.
65. Kim YC, Kim JH, Davies MG, Hagen PO, Carson CC 3rd: Modulation of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-mediated relaxation by nitric oxide and prostanoids in the rabbit corpus cavernosum. *J Urol* 153: 807-810, 1995.
66. Krylatov AV, Maslov LN, Ermakov SY, Barzakh EI, Lasukova OV, Crawford D, Ghadessy R, Serebrov VY: Negative chronotropic effect of cannabinoids and their water-soluble emulsion is related to activation of cardiac CB1 receptors. *Bull Exp Biol Med* 142:450-453, 2006.
67. Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M: Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283:401-404, 1999.
68. Lépicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D: Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* 139:805-815, 2003.
69. Lépicier P, Lagneux C, Sirois MG, Lamontagne D: Endothelial CB(1)-receptors limit infarct size through NO formation in rat isolated hearts. *Life Sci* 81:1373-1380, 2007.
70. Levin RM, Wein AJ: Adrenergic alpha receptors outnumber beta receptors in the human penile corpus cavernosum. *Investigate Urol* 18: 225-226, 1980.

71. Li CG, Rand MJ: Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16:933-938, 1989.
72. Maccarrone M: CB(2) receptors in reproduction. *Br J Pharmacol* 2007 Sep 10; [Epub ahead of print] (www.pubmed.com).
73. Malinowska B, Kwolek G, Göthert M: Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1- and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364:562-569, 2001.
74. Malone DT, Taylor DA: Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following Delta9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats. *Br J Pharmacol* 128:21-26, 1999.
75. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI: Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564, 1990.
76. Melis MR, Succu S, Mascia MS, Sanna F, Melis T, Castelli MP, Argiolas A: The cannabinoid receptor antagonist SR-141716A induces penile erection in male rats: involvement of paraventricular glutamic acid and nitric oxide. *Neuropharmacology* 50, 219-228, 2006.
77. Minhas S, Cartledge J, Eardley I: The role of prostaglandins in penile erection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62: 137-146, 2000.

78. Moezi L, Gaskari SA, Liu H, Baik SK, Dehpour AR, Lee SS: Anandamide mediates hyperdynamic circulation in cirrhotic rats via CB(1) and VR(1) receptors. *Br J Pharmacol* 149:898-908, 2006.
79. Mulè F, Amato A, Baldassano S, Serio R: Evidence for a modulatory role of cannabinoids on the excitatory NANC neurotransmission in mouse colon. *Pharmacol Res* 56:132-139, 2007.
80. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65, 1993.
81. Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N: Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers* 4:1842-1857, 2007.
82. Oropeza VC, Page ME, Van Bockstaele EJ: Systemic administration of WIN 55,212-2 increases norepinephrine release in the rat frontal cortex. *Brain Res* 1046:45-54, 2005.
83. Park JK, Kim SZ, Kim SH, Park YK, Cho KW: Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: functional characterization of angiotensin II receptors. *J Urol* 158:653-658, 1997.
84. Parkkisenniemi UM, Palkama A, Virtanen I, Klinge E: The endothelin ET(B) receptor agonist [125I]BQ-3020 binds predominantly to nerves in the bovine retractor penis muscle and penile artery. *Pharmacol Toxicol* 87: 234-241, 2000.
85. Pertwee RG, Fernando SR: Evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse urinary bladder. *Br J Pharmacol* 118:2053-2058, 1996.
86. Pertwee RG, Fernando SR, Nash JE, Coutts AA: Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 118:2199-2205, 1996.

87. Pisanti S, Borselli C, Oliviero O, Laezza C, Gazzerro P, Bifulco M: Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: correlation to its tumor-suppressor efficacy. *J Cell Physiol* 211:495-503, 2007.
88. Pisanu A, Acquas E, Fenu S, Di Chiara G: Modulation of Delta(9)-THC-induced increase of cortical and hippocampal acetylcholine release by micro opioid and D(1) dopamine receptors. *Neuropharmacology* 50:661-670, 2006.
89. Pistis M, Ferraro L, Pira L, Flore G, Tanganelli S, Gessa GL, Devoto P: Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 948:155-158, 2002.
90. Porter AC, Felder CC: The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90:45-60, 2001.
91. Ralevic V: Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 472:1-21, 2003.
92. Randall MD, Alexander SP, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA: An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 229:114-120, 1996.
93. Romano MR, Lograno MD: Cannabinoid agonists induce relaxation in the bovine ophthalmic artery: evidences for CB1 receptors, nitric oxide and potassium channels. *Br J Pharmacol* 147:917-925, 2006.
94. Ronco AM, Llanos M, Tamayo D, Hirsch S: Anandamide inhibits endothelin-1 production by human cultured endothelial cells:a new vascular action of this endocannabinoid. *Pharmacology* 79:12-16, 2007.

95. Saenz de Tejada I: Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility. *Int J Impot Res* 14:S6-S10, 2002.
96. Saenz de Tejada I, Carson MP, de las Morenas A, Goldstein I, Traish AM: Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *Am J Physiol* 261: H1078-1085, 1991.
97. Schlicker E, Kathmann M: Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 565-572, 2001.
98. Shmish YA, Goncharov I, Eichler M, Shneyvays V, Isaac A, Vogel Z, Shainberg A: Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol Cell Biochem* 283:75-83, 2006.
99. Siegmund SV, Seki E, Osawa Y, Uchinami H, Cravatt BF, Schwabe RF: Fatty acid amide hydrolase determines anandamide-induced cell death in the liver. *J Biol Chem* 281:10431-10438, 2006.
100. Simonsen U, Prieto D, Hernández M, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A: Adrenoceptor-mediated regulation of the contractility in horse penile resistance arteries. *J Vasc Res* 34: 90-102, 1997.
101. Simonsen U, Prieto D, Hernández M, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A: Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitrergic neurotransmission in horse penile resistance arteries. *J Urol* 157: 2356-60, 1997.
102. Simonsen U, Prieto D, Saenz De Tejada I, Garcia-Sacristan A: Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K(+)-channels. *Br J Pharmacol* 116:2582-2590, 1995.

103. Solinas M, Zangen A, Thiriet N, Goldberg SR: Beta-endorphin elevations in the ventral tegmental area regulate the discriminative effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol. *Eur J Neurosci* 19:3183-3192, 2004.
104. Spicuzza L, Haddad EB, Birrell M, Ling A, Clarke D, Venkatesan P, Barnes PJ, Belvisi MG: Characterization of the effects of cannabinoids on guinea-pig tracheal smooth muscle tone: role in the modulation of acetylcholine release from parasympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 130:1720-1726, 2000.
105. Stefano GB, Bilfinger TV, Rialas CM, Deutsch DG: 2-arachidonyl-glycerol stimulates nitric oxide release from human immune and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1. *Pharmacol Res* 42:317-322, 2000.
106. Storr M, Gaffal E, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD: Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* 80:67-76, 2002.
107. Toda N, Ayajili K, Okamura T: Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther* 106:233-266, 2005.
108. Tokanovic S, Malone DT, Ventura S: Stimulation of epithelial CB1 receptors inhibits contractions of the rat prostate gland. *Br J Pharmacol* 150:227-234, 2007.
109. Traish AM, Carson MP, Kim N, Goldstein I, Saenz de Tejada I: Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in human penile corpus cavernosum: studies on whole tissue and cultured endothelium. *J Urol* 144:1036-1040, 1990.
110. Traish AM, Palmer MS, Goldstein I, Moreland RB: Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. *Receptor* 5:159-76, 1995.

111. Ullrich O, Merker K, Timm J, Tauber S: Immune control by endocannabinoids - new mechanisms of neuroprotection? *J Neuroimmunol* 184:127-135, 2007.
112. Valverde O, Noble F, Beslot F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Roques BP: Delta9-tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur J Neurosci* 13:1816-1824, 2001.
113. Varga K, Lake KD, Huangfu D, Guyenet PG, Kunos G: Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension* 28:682-686, 1996.
114. Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G: Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol* 278:279-283, 1995.
115. Vizi ES, Katona I, Freund TF: Evidence for presynaptic cannabinoid CB(1) receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea pig lung. *Eur J Pharmacol* 431:237-244, 2001.
116. Werkstrom V, Persson K, Ny L, Bridgewater M, Brading AF, Andersson KE: Factors involved in the relaxation of female pig urethra evoked by electrical field stimulation. *Br J Pharmacol* 116:1599-1604, 1995.
117. White R, Ho WS, Bottrill FE, Ford WR, Hiley CR: Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol* 134:921-929, 2001.
118. www.biol.unt.edu/~chapman/images/nae/cannabinoidsig.jpg
119. www.medwave.cl/medios/2007/nayo/RCHCUH/CannabisFig1.jpg

120. Yildirim S, Ayan S, Sarioglu Y, Gultekin Y, Butuner C: The effects of long-term oral administration of L-arginine on the erectile response of rabbits with alloxan-induced diabetes. *BJU Int* 83:679-685, 1999.
121. Yoshihara S, Morimoto H, Yamada Y, Abe T, Arisaka O.:Cannabinoid receptor agonists inhibit sensory nerve activation in guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med* 170:941-946, 2004.
122. Yousif MH, Oriowo MA: Inhibitory effects of cannabinoid receptor ligands on electrically-evoked responses in rat isolated tracheal ring segments. *Pharmacol Res* 40:415-421, 1999.
123. Ziessen T, Celtek S: Purines and pyrimidines are not involved in NANC relaxant responses in the rabbit vaginal wall. *Br J Pharmacol* 137:513-521, 2002.
124. Ziessen T, Moncada S, Celtek S: Characterization of the non-nitroergic NANC relaxation responses in the rabbit vaginal wall. *Br J Pharmacol* 135:546-554, 2002.
125. Zuardi AW: History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr* 28:153-157, 2006.
126. Zygmunt PM, Högestätt ED, Waldeck K, Edwards G, Kirkup AJ, Weston AH: Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery. *Br J Pharmacol* 122:1679-1686, 1997.
127. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED: Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457, 1999.