

بررسی اثرات حاصل از کاهش سطح سرمی هورمون تستوسترون بر آستانه درد

در موشهای صحرایی نر

رحیم احمدی* (عهده دار مکاتبات: Rahahmadi2001@yahoo.com)، نوشین فرهمندلو

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان

Effects of decreased serum testosterone level on pain threshold in male rats

Ahmadi R*, Farahmandloo N
Department of Biology, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Iran.
*Corresponding
Author:Rahahmadi2001@yahoo.com

Abstract

Background & Aim: Various studies indicate that gonadal hormones exert modulatory effects on pain threshold. The aim of this study was to investigate the role of testosterone in the response by male rats to thermal nociceptive stimulation.

Materials and Methods: 7 week old albino (Wistar) rats were randomly divided into control, sham and orchidectomized groups. Thermal pain threshold was measured through tail immersion test (55°C water bath). The pain threshold was measured as the time required eliciting a flick of the tail which called analgesia time. Serum testosterone and prolactin level was also measured.

Results: Serum testosterone level as well as analgesia time were not significantly changed 10 days after orchidectomy; however, decreased 20 or 40 days after orchidectomy compared with control male rats ($p < 0.01$). Serum prolactin level was not significantly changed 10 or 20 days after orchidectomy; however, was decreased 40 days after operation compared with 20 days after orchidectomy ($p < 0.01$).

Conclusion: Our findings clearly indicate that depletion of testosterone 20 or 40 days after orchidectomy modulates the pain-induced behavioral responses related to thermal nociception in male animals.

Keywords: Testosterone, Thermal Pain, Rat

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرمسار، ۱۳۸۸، دوره ۴، شماره ۳، ۴۶-۴۱

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات گوناگونی نشانگر اثرات هورمون های جنسی بر آستانه درد می باشند. هدف از این مطالعه، بررسی نقش هورمون تستوسترون در پاسخ به تحریک گیرنده های حرارتی در موشهای نر می باشد.

روش مطالعه: موشهای صحرایی نر ۷ هفته ای به گروه های شاهد، sham و ارکیدکتومی شده، تقسیم گردیده و آستانه درد حرارتی از طریق قرار دادن دم حیوان در آب ۵۵ درجه سانتیگراد، اندازه گیری شد. در این راستا، مدت زمانی که حیوان قادر به نگهداری دم در آب گرم بود، به عنوان شاخص زمان بی دردی در نظر گرفته شد. از سوئی و همزمان، میزان هورمونهای تستوسترون و پرولاکتین سرم نیز مورد اندازه گیری قرار گرفتند.

یافته ها: زمان بی دردی به همراه میزان هورمون تستوسترون، ۱۰ روز پس از ارکیدکتومی، تغییر معناداری پیدا نکرد، اما ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی، زمان بی دردی و نیز میزان تستوسترون سرم نسبت به گروه شاهد، کاهش معناداری پیدا کرد ($P < 0/01$). از طرفی، میزان پرولاکتین سرم نیز ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی در مقایسه با گروه شاهد تغییر معناداری پیدا نکرد، گرچه ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی دچار کاهش معناداری در مقایسه با ۲۰ روز پس از ارکیدکتومی شد ($P < 0/01$).

نتیجه گیری: کاهش سطح هورمون تستوسترون (۲۰ یا ۴۰ روز بعد از ارکیدکتومی) در پاسخ به درد حرارتی در حیوان نر، تاثیرگذار است.

واژه های کلیدی: تستوسترون، درد حرارتی، موش صحرایی

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرمسار، ۱۳۸۸، دوره ۴، شماره ۳، ۴۶-۴۱

مقدمه

هورمونهای جنسی نر اثرات وسیع الطیفی بر همه اندامهای بدن، به ویژه دستگاه عصبی دارند. برای مثال، این هورمونها نورونهای مترشحه انکفالین ها در ستون مهره ها و نورونهای مترشحه کاتکول آمین ها در ساقه مغزی و مغز میانی را تنظیم می نمایند. این مناطق، در فرآیند درد شرکت دارند (۱۷). اطلاعات آزمایشگاهی و بالینی نیز بیانگر ارتباط بسیار نزدیک بین استروئیدهای جنسی و تعدیل درد است (۱۸). از سویی، تجویز استرادیول در موشهای صحرایی نر می تواند باعث ایجاد رفتارهای شبه ماده در پاسخ به درد شود (۱). همچنین، مطالعات بیانگر آنند که هورمون تستوسترون نقش اساسی در تعدیل درد دارد (۲۱). اخیراً اثرات تستوسترون در درمان سندرم دردهای مزمن بعد از وازکتومی، مشاهده گردیده و نیز نقش حفاظتی تستوسترون در بهبود برخی دردها ثابت شده است (۱۱).

علیرغم مطالعات انجام یافته در خصوص اثرات گنادکتومی بر آستانه درد (۲، ۴، ۱۹، ۲۱ و ۲۲) و نیز تجربیات انجام یافته در مورد اثرات استروئیدهای جنسی بر تعدیل درد توسط انواع مختلفی از تحریکات دردناک (۲۷، ۷۶)، اما هنوز نتایج ضد و نقیض و پیچیده (۱ و ۵) در این حوزه مطالعاتی وجود دارند. بر این مبنا، مطالعه حاضر جهت تعیین نحوه اثرات ارکیدکتومی و کاهش تستوسترون سرم بر درد حرارتی متعاقب ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز پس از برداشت بیضه ها و نیز بررسی همزمان تغییرات هورمون تستوسترون، انجام گرفته است.

از طرفی، میزان ترشح هورمون پرولاکتین می تواند به عنوان شاخص مهمی جهت تعیین وجود استرس، به ویژه استرس گرما، مطرح باشد (۱۶). مطالعات قبلی نشان می دهند که استرس به شکلهای مختلف و در شماری از گونه ها، می تواند سبب افزایش پرولاکتین در گردش خون شود (۱۰ و ۲۳). تجربیات بیانگر آنند که استرس گرما اثرات متعددی بر دستگاه تولید مثل برجای می گذارد

(۲۴) که بدان واسطه می تواند در تعدیل درد نیز موثر باشد. در مطالعه حاضر، اندازه گیری پرولاکتین سرم خون جهت مشخص نمودن وجود یا عدم وجود تاثیر استرس گرما بر تعدیل درد، مورد استفاده قرار گرفته شده است.

مواد و روش ها

الف: حیوانات

موش های صحرایی نر از انستیتو پاستور خریداری گردیده و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. دمای نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد بوده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی در ساعت ۸ صبح) در مورد نمونه ها اعمال گردید. حیوانات در طول تجربیات دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد داشتند. همچنین نمونه ها از نظر هرگونه علائم پاتولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت مشاهده علائم پاتولوژیک از پهنه تجربیات خارج گردیدند. از طرفی، ۱۲ ساعت قبل از عمل جراحی، غذا از دسترس نمونه ها خارج می شد. تمامی تجربیات بر مبنای رعایت اصول اخلاقی مرتبط با آزمایش های تجربی در مورد حیوانات انجام گرفت (۳۱).

ب: روند جراحی

ارکیدکتومی به روش Waynforth (۲۹) انجام شد. بیهوشی توسط تزریق عضلانی کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ تا ۱۲۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن) و گزین هیدروکلراید (۲۴ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن) صورت گرفت. جهت انجام ارکیدکتومی، کیسه بیضه توسط الکل، ضد عفونی شده، برش کوچکی در حد ۲ سانتی متر در قسمت میانی دیواره کیسه بیضه ایجاد گردیده و متعاقباً بیضه ها به دقت از کیسه بیضه خارج گردیده و از طناب اسپرمی جدا شدند. در نهایت محل برش ها بخیه شده و ترمیم گردیدند. در مورد گروه sham نیز مجموعه روندهای جراحی همانند گروه ارکیدکتومی شده اجرا گردید، اما بیضه ها جدا نشده و مجدداً در کیسه بیضه قرار گرفتند و برشهای ایجاد شده، بخیه گردیده و ترمیم شدند. موشهای جراحی شده به

مدت ۷ تا ۸ روز استراحت نموده و متعاقباً در روند آزمایش قرار گرفتند.

بررسی آماری

همه نتایج به دست آمده، در محدوده انحراف معیار از میانگین بیان شدند و با استفاده از آزمون آماری (ANOVA)، تفاوت معناداری بین گروهها مورد ارزیابی قرار گرفت و معناداری اختلاف میان گروهها با استفاده از آزمون فیشر تعیین گردید.

ج: برنامه اجرایی و گروه بندی ها

طی این پژوهش، موشها به طور تصادفی به گروههای شاهد، sham و ارکیدکتومی شده تقسیم شدند. هر گروه مشتمل بر ۱۰ نمونه بود. همه گروهها، قبل از ارکیدکتومی و ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی، توسط آزمون «دم از آب بیرون کشی» (Tail withdrawal test) جهت تعیین آستانه درد حرارتی، مورد سنجش قرار گرفتند. در پایان تجربیات، جمع آوری نمونه خونی از طریق خونگیری از آئورت شکمی انجام گرفت و متعاقباً میزان هورمونهای تستوسترون و پرولاکتین سرم در تمامی گروه ها اندازه گیری گردید (۳۰). سنجش هورمونی با روش رادیوایمونواسی انجام گرفت.

د: آزمون دم از آب کشی

آزمون دم از آب کشی به مدت ۲ روز در نور (ساعت ۱۰ تا ۱۲ صبح و ۲ تا ۴ بعد از ظهر) به منظور کاهش اثر سیکل سیرکادیان و منطبق با تحقیقات قبلی انجام گردید (۲۵ و ۱۵). نمونه ها در طی آزمایش در محدودکننده استاندارد (Cloth restrainer) قرار گرفتند و متعاقباً ۵ سانتی متر انتهایی دم در آب گرم ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۱۴). در این راستا، مدت زمانی که حیوان قادر به نگهداری دم در آب گرم بود، به عنوان شاخص زمان بی دردی در نظر گرفته شد.

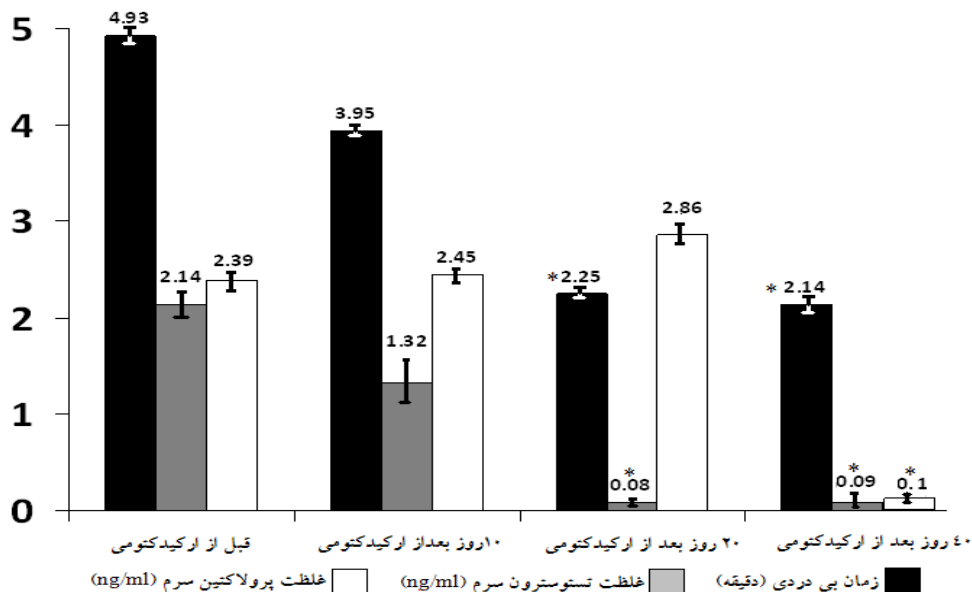
یافته ها

جدول ونمودار ۱ نشانگر یافته های پژوهش حاضر می باشد. مطابق نتایج حاصل از این تحقیق، زمان بی دردی در گروههای شاهد و sham تفاوت معناداری نداشت. از سویی، زمان بی دردی ۱۰ روز پس از ارکیدکتومی، با زمان قبل از جراحی تفاوت معناداری از خود نشان نداد. از سوی دیگر، زمان بی دردی در حیوانات ارکیدکتومی شده ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی نسبت به گروه شاهد دچار کاهش معناداری گشت ($P < 0/01$). زمان بی دردی بین ۲۰ و ۴۰ روز پس از جراحی نسبت به هم، تفاوت معناداری از خود نشان نداد.

میزان هورمون تستوسترون یا پرولاکتین بین گروه های sham، شاهد و ۱۰ روز پس از ارکیدکتومی، تفاوت معناداری نداشت. در مقابل، میزان هورمون تستوسترون ۲۰ روز پس از ارکیدکتومی کاهش معنادار یافته ($P < 0/05$)، اما میزان هورمون پرولاکتین تغییر معناداری پیدا نکرد. همچنین، تفاوت معناداری میان میزان تستوسترون سرم در ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی مشاهده نگردید، هر چند، میزان هورمون پرولاکتین ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی نسبت به ۲۰ روز پس از ارکیدکتومی، کاهش معناداری پیدا کرد ($P < 0/01$).

حیوانات	زمان بی دردی min±SD	P	تستوسترون ng/ml±SD	P	پرولاکتین ng/ml±SD	P
گروه کنترل	0.32 4.93 ±	-	2.14 ± 0.60	-	2.39 ± 0.31	-
Sham	4.53 ± 0.22	NS	1.98 ± 0.83	NS	2.02 ± 0.48	NS
۱۰ روز بعد از ارکیدکتومی	3.95 ± 0.15	NS	1.32 ± 0.91	NS	2.45 ± 0.11	NS
۲۰ روز بعد از ارکیدکتومی	2.25 ± 0.07	0.01	0.08 ± 0.01	0.05	0.25 2.86 ±	NS
۴۰ روز بعد از ارکیدکتومی	2.14 ± 0.43	*NS	0.09 ± 0.21	*NS	0.08 0.10 ±	0.01

جدول ۱: زمان بی دردی، میزان تستوسترون و پرولاکتین سرم در موشهای صحرایی نر شاهد، sham و ارکیدکتومی شده قبل از جراحی و ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی. داده ها برحسب « \pm میانگین» بیان شده اند. مقادیر P و NS در برابر شاهد مقایسه شده اند و *NS بیانگر مقایسه در برابر گروه ارکیدکتومی شده، می باشد. NS بیانگر اختلاف غیرمعنادار می باشد.



نمودار ۱: مقایسه زمان بی دردی، میزان تستوسترون و پرولاکتین سرم در موشهای صحرایی نر شاهد و ارکیدکتومی شده قبل از جراحی و ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی. علامت * بیانگر اختلاف معنادار در مقایسه با گروه شاهد می باشد.

بحث

گنادکتومی دچار کاهش می گردد (۲۵ و ۲۶). در مجموع، مطالعات نشان می دهند که کاهش هورمونهای جنسی و گنادکتومی سبب کاهش اندورفین ها و انکفالین ها شده، از این طریق مقاومت به درد دچار کاهش می گردد (۳، ۱۲، ۱۳، ۱۶، ۲۰ و ۲۸).

از طرفی، در تحقیق حاضر مشاهده شد که ۱۰ روز پس از گنادکتومی آستانه درد حرارتی دچار کاهش معناداری نگردید، همزمان، میزان هورمون تستوسترون نیز دچار کاهش معناداری نگشت. این امر، اثبات کننده اثر هورمون تستوسترون بر آستانه درد حرارتی می باشد. در واقع، مقادیر قابل توجهی از هورمونهای جنسی به صورت ذخیره در بافت چربی وجود دارند (۹) که زمان کافی جهت تخلیه این ذخیره و کاهش آن مورد نیاز می باشد. به نظر می آید، ۲۰ روز پس از گنادکتومی، تخلیه کافی از هورمونهای جنسی نر به ویژه تستوسترون فراهم گردیده و میزان ذخیره

طی تجربیات حاضر، از آنجا که افزایش میزان پرولاکتین، که شاخص مهم استرس است (۲۹ و ۳۱)، در گروههای مورد بررسی روی نداده، می توان استنتاج نمود که استرس حرارت یا دیگر استرسهای احتمالی مرتبط، روند تجربیات را تحت تاثیر قرار ندادند. از سویی، طی مطالعه حاضر، کاهش میزان پرولاکتین ۴۰ روز پس از گنادکتومی، مشاهده گردیده است. کاهش میزان پرولاکتین پس از گنادکتومی در مطالعات قبلی نیز دیده شده است که این امر می تواند ناشی از کاهش اندورفین های مغزی یا کاهش میزان هورمونهای جنسی باشد (۸).

همچنین، نتایج پژوهش حاضر بیانگر کاهش زمان بی دردی و نیز کاهش همزمان هورمون تستوسترون ۲۰ و ۴۰ روز پس از ارکیدکتومی می باشد. این یافته منطبق بر مطالعاتی است که نشان داده اند آستانه درد متعاقب

- of rat genotype, nociceptive stimulus intensity, and efficacy at the mu opioid receptor. *Psycho pharmacology (Berl)* 2000; 150:430-442.
- 9- Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:564-570.
- 10- El Halawani ME, Silsby JL, Behnke EJ, Fehrer SC. Effect of ambient temperature on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the reproductive life cycle of the female turkey (*Meleagis gallopavo*). *Biol Reprod* 1984; 30:809-815.
- 11- Fischer L, Clemente JT, Tambeli CH. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. *J Pain* 2007; 8:437-42.
- 12- Forman LJ, Estilow S. The effects of immobilization stress on beta-endorphin levels are modulated by testosterone. *Brain Bulletin* 1988; 21:7-12.
- 13- Gudelsky GA, Nansel DD, Proter JC. Role of strogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* 1981; 108:440-444.
- 14- Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E. Lactoferrin enhances opioid-mediated analgesia via nitric oxide in the rat spinal cord. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R306-R312.
- 15- Kest B, Wilson SG. and Mogil JS. Sex Differences in Supraspinal Morphine Analgesia Are Dependent on Genotype 1999; 289: 1370-1375.
- 16- Ma W, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y, Radhakrishnan V, Cuello AC, Henry JL. Substance P and enkephalin immunoreactivities in axonal boutons presynaptic to physiologically identified dorsal horn neurons. An ultrastructural multiple-labelling study in the cat. *Neuroscience* 1997; 77:793-811.
- 17- McEwen BS, Alves SE, Bulloch K, Weiland NG. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 1997; 48:S8-15.
- 18- Mensah-Nyagan AG, Meyer L, Schaeffer V, Kibaly C, Patte-Mensah C. Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 62-75.
- 19- Negus SS, Mello NK. Effects of gonadal steroid hormone treatments on opioid antinociception in ovariectomized rhesus
- ای آن دچار کاهش شده و بدین ترتیب، میزان تستوسترون در سرم، کاسته می گردد.

نتیجه گیری

با کاهش هورمون تستوسترون پس از ارکیدکتومی، آستانه درد حرارتی دچار کاهش می گردد. بر این مبنای، در نظرگیری نقش کلیدی هورمون تستوسترون در تعدیل درد، به ویژه درد حرارتی، می تواند کاربردهای بالینی متعددی در حوزه سبب شناسی و درمان درد به همراه داشته باشد.

قدردانی

پژوهش حاضر با بهره گیری از مساعدت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان اجرا گردیده و بدینوسیله از زحمات همکاران این حوزه، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

References

- 1- Aloisi AM, Ceccarelli I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. *Neuroscience* 2000; 95:559-566.
- 2- Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1007:232-7.
- 3- Amandusson A, Hallbeck M, Hallbeck AL, Hermanson O, Blomqvist A. Estrogen-induced alterations of spinal cord enkephalin gene expression. *Pain* 1999; 83:243-248.
- 4- Beatty WW, Fessler RG. Gonadectomy and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiol Behav* 1977; 19:1-6.
5. Cairns BE, Gazerani P. Sex-related differences in pain. *Maturitas* 2009; 63:292-6.
- 6- 8. Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Massafra C, Aloisi AM. The behavioral and neuronal effects induced by repetitive nociceptive stimulation are affected by gonadal hormones in male rats. *Pain* 2003; 104:35-47.
- 7- Ceccarelli I, Fiorenzani P, Massafra C, Aloisi A M. Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 24.
- 8- Cook CD, Barrett AC, Roach EL, Bowman JR, Picker MJ. Sex-related differences in the antinociceptive effects of opioids: importance

- monkeys. *Psychopharmac. (Berl)* 2000; 159:275-83.
- 20- Petraglia F, Penalva A, Locatelli V, Cocchi D. Effect of gonadectomy and gonadal steroid replacement on pituitary and plasma beta-endorphin levels in the rat. *Endocrinology* 1982; 111:1224-1229.
- 21- Pienkos EJ. The use of testosterone in the treatment of chronic postvasectomy pain syndrome: case report and review of the literature. *Mil Med* 2007; 172:676-9.
- 22- Romero MT, Kepler K, Cooper ML, Komisaruk BR, Bodnar C: Modulation of gender-specific effects upon swim analgesia in gonadectomized rats. *Physiology and Behavior* 1987; 40:39-45.
- 23- Rozenboim I, Mobarky N, Heiblum R, Chaiseha Y, Kang SW, Biran I, Rosenstrauch A, Sklan D, El Halawani ME. The role of prolactin in reproductive failure associated with heat stress in the domestic turkey. *Biol Reprod* 2004 71:1208–1213.
- 24- Rozenboim I, Tako E, Gal-Garber O, Proudman JA, Uni Z. Effect of Heat Stress on Ovarian Function of Laying Hens. *Poult Sci* 2007; 86:1760-1765.
- 25- Sewell RD, Spencer PS. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats. *Neuropharmacology* 1976; 15: 683–688.
- 26- Shibata M, Wakisaka S, Inoue T, Shimizu T, Yoshiya I. The effect of electroconvulsive treatment on thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Anesth Analg* 1998; 86:584–587.
- 27- Stoffel EC, Ulibarri CM, Folk JE, Rice KC, Craft RM. Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats. *J Pain* 2005; 6: 261-74.
- 28- Wardlaw SL: Effect of sex steroids on beta-endorphin in hypophysial portal blood. *J Clin Endocrin Metab* 1982; 55: 877-88.
- 29- Waynforth HB. *Experimental and Surgical Techniques in the Rat*. Academic Press London, 1980
- 30- Yoshinaga K. Gonadotrophin-induced hormone secretion and structural changes in the ovary during the nonpregnant reproductive cycle. *Handbook of Physiology. Endocrinology II, Part 1*, 1973
- 31- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16:109–110.