

اثر گنادکتومی (برداشتن بیضه‌ها) و تیمار با تستوسترون بر روی رفتار ترس در موشهای صحرائی نر

فاطمه خاکپای^۱، پروین رستمی^۲، علی اصغر پيله وریان^۱

^۱اصفهان، دانشگاه پیام نور اصفهان، گروه زیست‌شناسی

^۲تهران، دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۸۴/۰۷/۰۲ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۴/۰۴

چکیده

درک بموقع نشانه‌های خطر برای بقاء موجودات زنده ضروری است. موجودات زنده هنگام مواجه شدن با خطر، دچار ترس می‌شوند و پاسخهای رفتاری نشان می‌دهند که با استفاده از (ماز + مرتفع)، Elevated plus-maze می‌توان این پاسخهای رفتاری را مورد بررسی قرار داد. افزایش در دو پارامتر، یکی درصد ورود به بازوی باز (OAE%) و دیگری درصد زمان سپری شده در بازوی باز (OAT%)، Elevated plus-maze (ماز + مرتفع) نشان دهنده کاهش ترس می‌باشد. در مطالعه حاضر اثر تستوسترون بر روی رفتار ترس در موشهای صحرائی (رت) گنادکتومی شده بوسیله Elevated plus-maze مورد بررسی قرار گرفته است. تزریق زیر جلدی (SC) دوزهای مختلف تستوسترون ($100, 200, 300, 450 \mu\text{g} / \text{rat}$) موجب افزایش وابسته به دوز OAE% و OAT% گردید. بیشترین پاسخ را دوز $450 \mu\text{g} / \text{rat}$ دارو ایجاد نمود (<0.001). باتوجه به این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تستوسترون موجب کاهش رفتار ترس می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: گنادکتومی، ترس، اضطراب، تستوسترون، درصد ورود به بازوی باز، درصد زمان سپری شده در بازوی باز

مقدمه

میانی (mpfc) و قشر مربوط به حس پیکری بعنوان اجزای نوروئی کلیدی در احساس سیگنالهای ترس معرفی شده‌اند.

این اجزا واکنش اختصاصی فعالیت زیر قشری و اینتگراسیون آن در نواحی پری فرونتال و کورتکس ارتباطی را نشان می‌دهند (۱۸،۲۱). مدارک قابل توجهی وجود دارد که آمیگدال نه فقط ترس، بلکه در جنبه‌های متعدد هیجان دخالت می‌کند (۲،۴،۲۰). آمیگدال نقش اختصاصی در یادگیری ترس بازی می‌کند (۱۶) و نقش مستقیمی در ترس و اضطراب دارد (۱۹). همچنین واحد پردازش مسیر ترس است (۱۳). فعالیت مدارهای نوروئی درون آمیگدال برای پیش بینی و درک کیفیت محرک آزار دهنده مهم است (۳). آمیگدال منطقه ای است که

ترس یک حالت هیجانی آزار دهنده است که بوسیله تهدید و احساس خطر ایجاد می‌شود. در طی این حالت، فرآیندهای درک، بطور اتوماتیک فعال می‌شوند، خطر را تشخیص می‌دهند و رفتارهای حرکتی دفاعی را برای مقابله با آن بکار می‌گیرند. این رفتارها بصورت Freezing (بی حرکتی ناشی از ترس) و رفلکس Startle (یکه خوردن) نمایان می‌شود. برای تعیین ترس و اضطراب مدل‌های جانوری زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مدلی که برای سنجش ترس کارآیی بیشتری دارد و بهمین جهت بیش از سایر مدل‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد Elevated plus-maze است. برخی از ساختارهای مغز مانند آمیگدال، مغز جلویی، هسته Accumbens (NAC)، هیپوکامپ، کورتکس پری فرونتال

گنادکتومی (GDX): حیوانات با تزریق درون صفاقی محلول کتامین هیدروکلراید (7.5mg/kg) و گزاینزین (10mg/kg) بیهوش شدند. 2cm شکاف عرضی در اسکروتوم ایجاد می شد و پوست عقب کشیده شد تا بیضه ها نمایان شوند. بیضه ها با فشار ملایمی در ناحیه لگنی قرار گرفتند. شریان اسپرماتیک فشرده می شد و بیضه ها برداشته شدند. سپس اپی دیدیم و واژدفران به درون اسکروتوم منتقل و محل شکاف با نخ بخیه و سوزن جراحی بخیه زده شد (۵،۱۴).

داروها: داروهای مورد استفاده تستوسترون است که از شرکت داروسازی ابوریحان خریداری شد. تستوسترون در Sesame oil (روغن کنجد) حل و تزریق دارو به طریق زیرجلدی (SC) و یک ساعت قبل از انجام تست رفتاری صورت گرفت.

تست رفتاری: برای سنجش ترس از Elevated plus-maze استفاده می شد. این دستگاه از جنس چوب و دارای دو بازوی باز و دو بازوی بسته است. شکل دستگاه طوری است که دو بازوی باز رو به روی هم قرار دارند. Maze توسط پایه هایی در ارتفاع 50cm از سطح زمین قرار میگیرد (۴،۶). ابعاد بازوهای باز و بسته 49×10cm است، در دو طرف وانتهای بازوی بسته دیواری به بلندی 40cm وجود دارد و برای جلوگیری از افتادن موش در دو طرف و انتهای بازوی باز لبه ای به ارتفاع 1cm از جنس شیشه وجود دارد. چهار بازو، به یک محدوده مرکزی به ابعاد 10×10cm منتهی می شوند.

هر موش قبل از قرار گرفتن در Plus-maze ابتدا در جعبه ای به ابعاد 60×60×35cm بمدت 5 دقیقه قرار می گرفت. مطالعات قبلی نشان دادند که این روش مجموع تعداد داخل شدن حیوان را به قسمتهای مختلف Plus-maze افزایش می دهد. پس از گذشتن زمان لازم حیوان بلافاصله از داخل جعبه به maze منتقل می شد، بطوریکه در مربع مرکزی، رو به یک بازوی بسته قرار می گرفت.

دراکتساب، تثبیت و یادآوری ترس نقش دارد (۲۲). افزایش سروتونین و گلوتامات و کاهش گابا در آمیگدال در افزایش ترس دیده شده است (۹).

هیپوکامپ در ظهور پاسخ هیجانی به بوی شکار چی نقش دارد (۱۷) و در رفتار اضطراب مهم است. ضمناً مکان اصلی عمل آندروژنها برای میانجیگری رفتار اضطراب است. گنادکتومی تحریک پذیری نورونی و تراکم سیناپسی را در هیپوکامپ کاهش می دهد و آسیب پذیری سلول به مرگ را افزایش می دهد، جایگزینی آندروژنها این اثرات را معکوس می کند (۶۸،۱۵). همه آنزیمهای لازم برای متابولیسم تستوسترون در هیپوکامپ وجود دارد. این اطلاعات پیشنهاد می کند که هیپوکامپ هدف تستوسترون و متابولیتهای آن است. هیپوکامپ منطقه مغزی مهم برای اثرات آندروژن احیا شده 5α ، بر رفتار ترس و اضطراب است (۷).

با توجه به اینکه عوامل متعددی در بروز رفتار ترس نقش دارند و تا کنون اثر گنادکتومی در رفتار ترس بررسی نشده است، لذا هدف از این تحقیق تعیین اثر گنادکتومی بر روی رفتار ترس با استفاده از تستوسترون در حیوانات گنادکتومی شده می باشد.

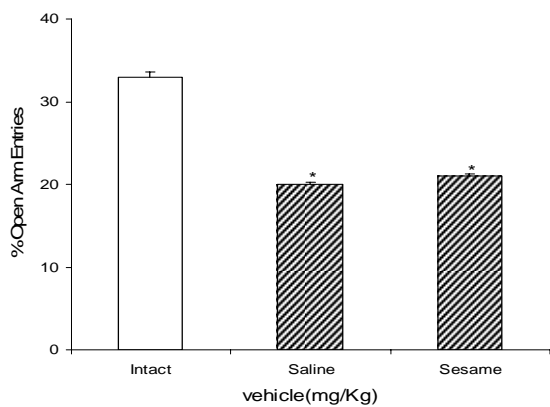
مواد و روشها

حیوانات مورد آزمایش: در این تحقیق از موشهای صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) خریداری شده از انستیتو پاستور کرج به وزن تقریبی 150-200 gr استفاده شد. موشها در گروههای هشت تاایی در قفسهای جدا نگهداری و درجه حرارت اتاق پرورش حیوانات ۲۲-۲۴ درجه سانتی گراد و نور بصورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد. غذای مخصوص موش و آب کافی در تمام مدت نگهداری بجز زمان آزمایش در اختیار حیوان قرار گرفت.

نتایج

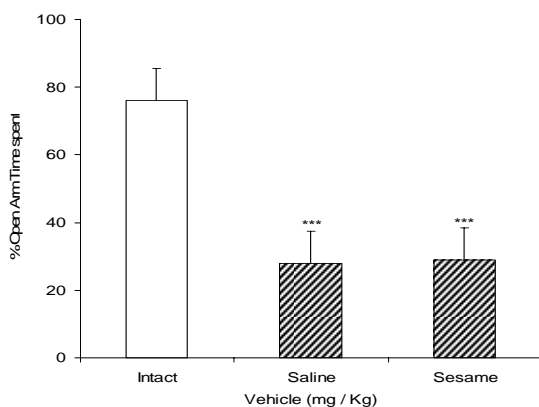
اثر گنادکتومی بر رفتار ترس: در ابتدا برای بررسی تأثیر گنادکتومی بر روی رفتار ترس، گروه کنترل (Intact) را با گروه شام (Sham) جراحی شده و تزریق شده با حامل سالیسین و روغن Sesame با دوز 0.2 mg / Kg ، بصورت زیر جلدی مقایسه کردیم. با توجه به نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می گردد که گنادکتومی موجب کاهش درصد ورود به بازوی باز (% OAE) می شود. تحلیل‌های آماری به طریق آنالیز واریانس یک طرفه صورت گرفت:

$$F(2, 32) = 3.631 \text{ و } (P < 0.05)$$



(%OAE)

±
(P<0.05)



(%OAT)

±
(P<0.001)

نور مناسب توسط یک لامپ 100 واتی که در ارتفاع 120 cm از مرکز maze قرار داشت، تامین میشد. در مدت ۵ دقیقه ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف maze حرکت می کرد، پارامترهای زیر با مشاهده اندازه گیری شد:

- تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز می شود.
- تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی بسته می شود.
- مدت زمانی که حیوان در بازوی باز باقی می ماند.
- مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته باقی می ماند.

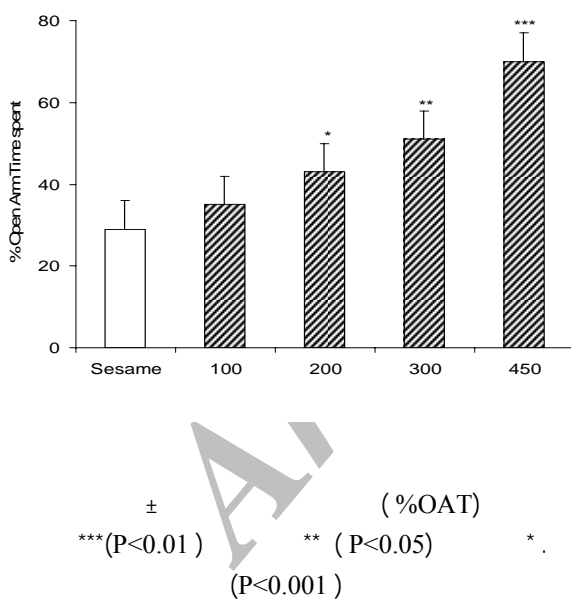
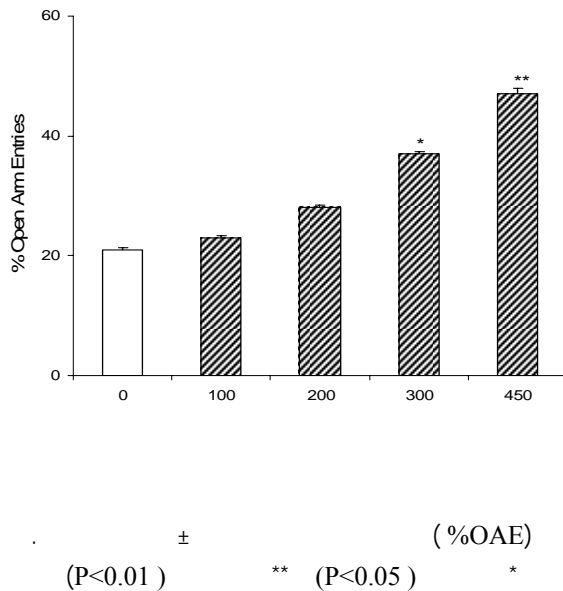
منظور از ورود به بازوی باز یا بسته هنگا می است که هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر قرار می گرفت. زمان سپری شده در هر بازو نیز بر همین اساس محاسبه شده است (۶).

آنالیز آماری: محاسبات به روش آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه انجام شد.

گروه‌های آزمایشی

- ۱- رتهای گروه کنترل (Intact) بدون جراحی و تزریقات دارو
- ۲- رتهای گروه شام (Sham) جراحی شده و با تزریق حامل یا حلال (Vehicle)
- ۱-۲- رتهای شمی با تزریق به آنها سالیسین (Saline) بمقدار 0.2 mg / Kg
- ۲-۲- رتهای شمی با تزریق روغن کنجد (Sesame oil) بمقدار 0.2 mg / Kg
- ۳- رتهای گروه گنادکتومی (GDX) جراحی شده با تزریق دوزهای مختلف تستوسترون ($100, 200, 300 \mu\text{g / rat}$)، 450 ، بصورت زیرجلدی (SC) یک ساعت قبل از آزمایش

همچنین نمودار ۶ نشان می دهد که تزریق تستوسترون فعالیت حرکتی را افزایش می دهد. آنالیز واریانس یک طرفه: $F(۴ و ۳۲) = ۰/۲۷۸$ و $(P > ۰/۰۵)$



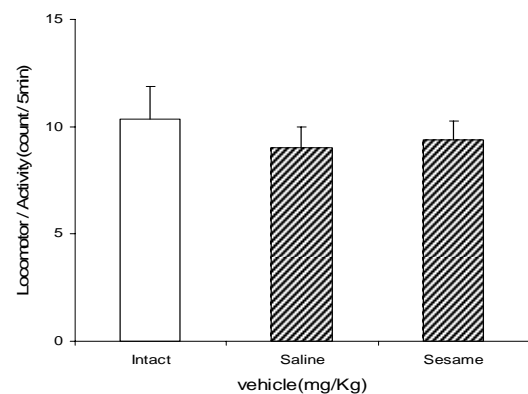
بحث

در این پژوهش اثر گنادکتومی بر روی رفتار ترس مطالعه شده است. تحقیقات قبل نشان داده اند که گنادکتومی (GDX) در رفتار ترس نقش دارد، بطوریکه Edinger K.

همچنین گنادکتومی موجب کاهش درصد زمان سپری شده در بازوی باز (%OAT) می شود. با توجه به نتایج آماری ANOVA یک طرفه:

$$F(۴ و ۳۲) = ۹/۵۱۴ \text{ و } (P < ۰/۰۰۱)$$

مشخص می شود که گنادکتومی موجب افزایش ترس است.



(Locomotor/ Activity)

با توجه به نمودار ۳ مشاهده می گردد که گنادکتومی باعث کاهش فعالیت حرکتی نیز می شود. تحلیل‌های آماری به روش آنالیز واریانس یک طرفه صورت گرفت.

$$F(۴ و ۳۲) = ۰/۱۰۸ \text{ و } (P > ۰/۰۵)$$

اثر تستوسترون بر رفتار ترس: با توجه به نمودارهای ۴ و ۵ مشاهده می‌گردد که تزریق زیر جلدی (SC) تستوسترون با دوزهای (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۵۰ μg / rat) موجب افزایش درصد ورود به بازوی باز (%OAE)، [آنالیز واریانس یک طرفه $F(۴ و ۳۲) = ۴/۰۲$ و $(P < ۰/۰۱)$] و نیز افزایش درصد زمان سپری شده در بازوی باز (%OAT)، [آنالیز واریانس یک طرفه $F(۴ و ۳۲) = ۶/۹۷$ و $(P < ۰/۰۰۱)$] می شود. این اثر وابسته به دوز بوده و بیشترین اثر را در دوز ۴۵۰ μg / rat می توان مشاهده نمود که نشان دهنده اثر ضد اضطرابی تستوسترون می باشد.

که قبلاً نیز اشاره شد، اگر چه درمان با آندروژن، سبب افزایش معنی دار درصد ورود به بازوی باز و نیز درصد زمان سپری شده در بازوی باز (Elevated plus-maze) تقریباً ۷ - ۴ درصد) می شود؛ در موشهای صحرائی درمان شده با آندروژن رفتار اضطرابی کاملاً برطرف نمی شود (۶).

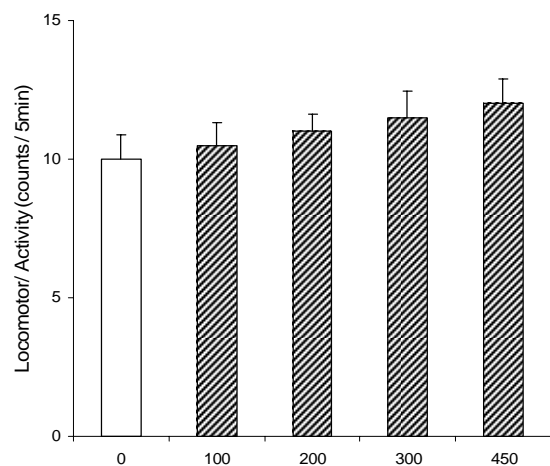
تزریق تستوسترون باعث افزایش درصد ورود به بازوی باز، درصد زمان سپری شده در بازوی باز و نیز افزایش فعالیت حرکتی می شود. این داده ها نشان می دهند که تستوسترون در مهار ترس نقش دارد. این تئوری توسط Aikey J. و همکاران (۱) در سال ۲۰۰۲، تأیید شد که با تزریق تستوسترون کاهش ترس را در Mice های نر مشاهده کردند.

Jones R و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۰۲ اعلام کردند که تستوسترون در بیان ترس و هیجان نقش دارد. تستوسترون در انسان و حیوانات سبب کاهش ترس می شود (۱۰) بعبارت دیگر این هورمون دارای اثرات ضد اضطرابی است (۶).

در تأیید این نظر King J. و همکاران (۱۴) در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که کمبود تستوسترون باعث افزایش معنی دار زمان Freezing و نیز افزایش معنی دار رفتار ترس موشهای صحرائی نر می شود.

بنظرمی رسد، اثر ضد اضطرابی تستوسترون در آمیگدال و هیپوکامپ صورت می گیرد. هیپوکامپ تمام آنزیمهای لازم برای متابولیسم تستوسترون را دارا می باشد. تستوسترون پلاستی سیتی سیناپسی را در هیپوکامپ موشهای صحرائی نر کاهش می دهد، سپس به استروژن تبدیل شده و روی رسپتورهای GABA و NMDA در هیپوکامپ، آمیگدال یا دیگر نواحی مغز قرار می گیرد. با توجه به اینکه GABA نوروترنسمیتر مهاری است، بدین ترتیب روند مهار ترس اتفاق می افتد.

و همکاران در ۲۰۰۴ نشان دادند که موشهای صحرائی GDX در مقایسه با موشهای صحرائی Intact رفتار Freezing بیشتری را نشان می دهند. همچنین موشهای صحرائی GDX نسبت به موشهای صحرائی نر سالم رفتار ترس بیشتری، در پاسخ به خطر نشان می دهند (۶).



(Locomotor/ Activity)

در تأیید این نظر Frye C. and Edinger K. (۸) در سال ۲۰۰۴ و نیز Hume J. و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۵ اعلام کردند که گنادکتومی (GDX) غلظت تستوسترون و نیز رفتارهای تهاجمی نرها را کاهش می دهد. نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز نشان می دهد که گنادکتومی باعث کاهش درصد ورود به بازوی باز (OAE %)، کاهش درصد زمان سپری شده در بازوی باز (OAT %) و نیز کاهش فعالیت حرکتی می شود که نشان دهنده افزایش ترس می باشد. بنظر می رسد، خارج کردن بیضه ها (گنادکتومی، GDX) که منبع اصلی آندروژنهاست، باعث کاهش تستوسترون و در نتیجه افزایش رفتار اضطرابی و ترس می شود. تزریق تستوسترون، برخی از اثرات GDX را اصلاح می کند؛ ورود به بازوی باز را افزایش و رفتار ترس در پاسخ به خطر را کاهش می دهد. ولی همانطور

بنابراین تستوسترون نیز در کاهش رفتار ترس نقش دارد و دارای اثرات ضد اضطرابی می باشد. نتایج بدست آمده از این آزمایشات نیز نشان داد که تستوسترون باعث کاهش ترس در موشهای صحرایی می شود.

بطور کلی، گنادکتومی در رفتار ترس و اضطراب نقش دارد (۶). نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز نشان می دهد که گنادکتومی باعث افزایش رفتار ترس می شود که با تزریق تستوسترون، اثرات گنادکتومی معکوس می شود.

منابع

- 1-Aikey j.l, Nyby j.g, Anmuth D.M, James P.J. 2002. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice. *Hormone and behavior*. 42(4): 448-460
- 2- Applegate C.D,Kapp B.S,Underwood M.D.Mcnall C.L.1983.Autonomic and somatomotor effects of amygdala central nucleus stimulation in awake rabbits .*Physiol. Behav*. 31: 353- 360
- 3- Blair H.T,Soters-Bagon F.2005.The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli.*Neuroscience*.17: 561-569
- 4- Boulton A.,Baker G.1991. *Neuromethods (Animal models in psychiatry)*. Humana press. Clifton, New jersey,U.S.A. vol 19. First edn. 19: 199-223
- 5-Craft R.,Heideman L.,Bartok R.1999.Effect of gonadectomy on discriminative stimulus effect of morphine in female versus male rats. *Drug and alcohol dependence*. 14: 95-109
- 6- Edinger K.L.,Frye C.A.2005.Testosterones anti-anxiety and analgesic effect may be due in part to actions of its 5 α -reduced metabolites in the hippocampus.*Psychoneuroendocrinology*. 22: 418-430
- 7-Edinger K, Lee B.,Frye C.A.2004.Mnemonic effects of testosterone and its 5 α -reduced metabolite in the conditioned fear and inhibitory avoidance tasks.*Pharmacology biochemistry and behavior*.19: 559-568
- 8- Frye C., Edinger K.2004. Testosterones metabolism in the hippocampus may mediate its anti-anxiety effects in male rats.*Pharmacology, biochemistry and behavior*. 34: 473-481
- 9- Gonzalez L.E., Quinonez B.,Rangel A.,Pino S.,Hernandez L. 2004. Tonic and phasic alteration amygdala 5-HT,glutamate and GABA transmission after prefrontal cortex damage in rats. *Brain research*.19: 154-163
- 10- Honk V.J., Peper J.S.,Schutter D.J.2005.Testosterone reduces unconscious fear but not consciously experienced anxiety : implications for the disorders of fear and anxiety. *Biol psychiatry*.review
- 11- Hume J.,Wynne-Edwards K.E.2005. Castration reduces male testosterone, estradiol and territorial aggression but not paternal behavior in biparental dwarf hamsters.*Hormones and behavior*. 9: 1-6
- 12-Jones R.B.,Andrew R.J.2002.Responses of adult domestic cocks and capons to novel and alarming stimuli. *Behavioural processes*. 13: 189-199
- 13-Kim J,Gorman J.2005. The psychobiology of anxiety.*Clinical neuroscience research*. 26: 335-347
- 14- King J,Oliveira L.D.,Washington L.D., Patel N.2005. Deficits in testosterone facilitate enhanced fear response. *Psychoneuroendocrinology*. 19: 333-340
- 15- Kovacs E.G.,Maclusky N.J,Leranth C.2003.Effects of testosterone on hippocampal CA₁ spine synaptic density in the male rat are inhibited by fimbrial/fornix transaction. *Neuro-sciences*. 23: 807- 810
- 16-McEwen B.,Chattarji S.2004. Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of taine ptine.*European neuropsychopharmacology*. 18: 497-502
- 17-Moriceau S.,Roth T.,Okotoghaide T.,Sullivan R.2004.Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups.*Developmental neuroscience*. 31: 415-422
- 18- Pezze M., Feldon J.2004. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning.*Progress in neurobiology*. 20: 301-320
- 19-Salm A.K., Davelko M., Krouse E.M.,Webster W., Kraszpulski M., Birkle D.2004. Lateral amygdaloid nucleus expansion in adult rats is associated with exposure to prenatal stress. *Developmental brain research*. 12: 159-167
- 20-Wang L.,Mccarthy G.,Song A.W.,Labar K.S. 2005.Amygdala activation to sad pictures during high-field(4 tesla)functional magnetic resonance imaging.*Emotion*. 8: 12-22
- 21-Williams L.,Brown K.,Das P.,Boucsein W.,Sokolov E.,Brammer M.J.,Olivieri G.,Peduto A., Gordon E.2004. The dynamic of cortico- amygdala and autonomic activity over the experimental time

course of fear perception Cognitive brain research.
18: 114-123

22-Yokoyama M.,Suzuki E.I.,Sato T.,Maruta
S.,Watanabe S.,Miyaoaka H.2005. Amygdalic levels

of dopamine and serotonin rise upon exposure to
conditioned fear stress without elevation of
glutamate.Neuroscience letters. 9: 37-41

The effect of gonadectomy and treatment with testosterone on fear behavior in gonadectomized rats.

Khakpay F.¹, Rostami P.², Peilevarian A.A.¹

¹ Biology Dept., Payam Noor Univ., Isfahan, I.R. of Iran

² Biology Dept., Science Faculty, Tarbiat Moalem Univ., Tehran, I.R. of Iran

Abstract :

Effective perception of fear signals is crucial for organism survival . When threated the organism indicated defensive behavior responses that can investigate by using elevated plus-maze. The increas in two parameters of % open arm entries (%OAE) and % time spent in the open arm(%OAT) in the elevated plus – maze were considered as anti –fear effect.In this research the effect of testosterone on fear behavior of gonadectomized rats (GDX) ,in the elevated plus – maze investigated. .Subcutaneous (SC) injection of different doses of testosterone (100,200,300,450µg /rat) to rats increased % open arm entries (%OAE) and %open arm time spent (%OAT)with dose dependent response manner. Maximum response was obtained with 450µg/rat of the drug (P<0.001).It is concluded that testosterone decreases fear behavior.

Key words : gonadectomy ,fear,anxiety, testesterone , % Open arm entries , % Time spent in the open arm.