

ارزیابی اثر تستوسترون بر التهاب القاء شده به وسیله کاراگون در موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده

چکیده:

مقدمه و هدف: میزان حس درد و پاسخ التهابی در زنان و مردان متفاوت می‌باشد. مطالعه‌های انجام شده نتایج قطعی دال بر اثرات هورمون‌های استروئیدی گنادی که عامل اصلی تفاوت‌های جنس نر و ماده است را بر التهاب به دست نمی‌دهد. تحقیقاتی چند در رابطه با اثر استروژن‌ها و آندروژن‌ها بر التهاب صورت گرفته و نتایج متناقضی ارائه گردیده است. هدف از این پژوهش ارزیابی اثر تستوسترون بر التهاب القاء شده به وسیله کاراگون در موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده بود.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۵، در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

تاریخ وصول: ۱۳۸۷/۱۲/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۲۱

مؤلف مسئول: اسداله ظریف کار
پست الکترونیک: zarifkara@sums.ac.ir

با وزن تقریبی 10 ± 190 گرم انتخاب و به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند؛ گروه کنترل که هیچ دارویی دریافت نکردند، گروه شاهد که در آنها جراحی انجام می‌شد، ولی بیضه‌ها خارج نمی‌گردید، گروه گنادکتومی که $0/5$ میلی‌لیتر حلال (روغن زیتون) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و گروه گنادکتومی که تستوسترون انانتات (۶ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در $0/5$ میلی‌لیتر حلال به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. روز ششم بعد از گنادکتومی با تزریق کاراگون ۱ درصد به کف پای راست موش‌ها التهاب ایجاد شد. میزان التهاب بر اساس حجم پای متورم با فرو کردن پا در جیوه و اندازه‌گیری وزن آن (با استفاده از رابطه بین وزن، حجم و چگالی) در مورد همه نمونه‌ها تعیین گردید. داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تستوسترون به طور معنی‌دار باعث کاهش حجم پای ملتهب در موش‌های گنادکتومی شده در مقایسه با گروه شاهد گردید ($p < 0/01$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق تستوسترون موجب کاهش پاسخ التهابی القاء شده به وسیله کاراگون می‌گردد. این اثر تستوسترون احتمالاً از طریق مهار تولید عوامل التهابی مثل اینترلوکین‌ها و یا کاهش گیرنده‌های عوامل التهابی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تستوسترون، التهاب، کاراگون، رت

دکتر اسداله ظریف کار *

دکتر علی رفعتی *

آزاده جامعی **

* دکترای فیزیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
** کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

تاریخ وصول: ۱۳۸۷/۱۲/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۲۱

مؤلف مسئول: اسداله ظریف کار

پست الکترونیک: zarifkara@sums.ac.ir

مقدمه

بر اساس گزارش‌های مختلف التهاب‌های مزمن نظیر روماتیسم مفصلی و فیبرومیا لژیا^(۲) با میزان شیوع کمتری در بین آقایان در مقایسه با خانم‌ها دیده می‌شود که این می‌تواند به لحاظ اختلاف هورمونی در بین دو جنس باشد (۷-۹). شواهد متعددی نیز دال بر نقش تستوسترون در پاسخ‌های ایمنی و تأثیر بر ترمیم سلول‌های عصبی متعاقب آسیب وجود دارد (۱۰)، مطالعه‌های جی و همکاران^(۳) (۲۰۰۸) نیز مؤید ارتباط معنی‌دار سطح سرمی تستوسترون با پاسخ‌های التهابی متعاقب تروما می‌باشد (۱۱). در مطالعه‌ای دیگر بر روی بیماران انسدادی مزمن ریوی^(۴)، مشاهده شد که سطح سرمی تستوسترون و دی‌هیدرواپی‌اندسترون سولفات در این بیماران در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (۱۲). هدف از این پژوهش ارزیابی اثر تستوسترون بر التهاب القاء شده به وسیله کاراگون در موش‌های صحرایی نر گنادکتومی‌شده بود.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۵، در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گرفت و تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 190 ± 10 گرم با رعایت اصول منظور شده در پروتکل هلسینکی کار بر روی

میزان حس درد و پاسخ التهابی در زنان و مردان متفاوت است (۱). آزمایش‌های مختلفی برای پی بردن به علت اختلاف‌های موجود در التهاب و پاسخ التهابی در دو جنس نر و ماده انجام گرفته است. طی این آزمایش‌ها نتایج قطعی دال بر اثرات هورمون‌های استروئیدی گنادی که عامل اصلی تفاوت‌های جنس نر و ماده است، بر التهاب به دست نیامده است. مهم‌ترین هورمون استروئیدی در جنس نر تستوسترون می‌باشد. تحقیقاتی چند در رابطه با اثر هورمون‌های استرادیول و تستوسترون بر میزان التهاب صورت گرفته و نتایج متناقضی ارائه گردیده است.

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که هورمون‌های استروئیدی گنادی باعث تعدیل پاسخ التهابی می‌شوند (۲). فلاک و همکاران^(۱) (۲۰۰۶) در مطالعه‌های خود بر روی موش نشان داده‌اند که تستوسترون و استروژن اثرات متضادی بر التهاب دارند (۳). نتایج تحقیقات بر روی موش‌های ماده بیانگر این است که استرادیول واسطه اجرایی پاسخ التهابی به وسیله فرمالین می‌باشد (۴). نتایج به دست آمده از مطالعه بر روی موش‌های نر و ماده نیز دال بر اختلاف جنسی در ورم مفاصل و پاسخ‌های ایجادی به وسیله اپیوئدها در بین رت‌های نر و ماده می‌باشد (۵). در بررسی‌های انسانی هم محققان طی پژوهش‌های مختلف به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از هورمون‌های استروژن و آندروژن‌ها به منظور کاهش التهاب ناشی از سوختگی مؤثر بوده است (۶).

1-Flake et al
2-Fibromyalgia
3-Jee et al
4-Chronic Obstructive Pulmonary Disease(COPD)

طولی در راستای خط میانی دو بیضه، از اسکروتوم بیرون آورده و سپس محل جراحی با سرم فیزیولوژی شسته و بخیه می‌شد. عمل جراحی بر روی گروه شاهد به همین ترتیب انجام پذیرفت، اما بیضه‌ها بیرون آورده نشد.

روز ششم بعد از عمل گنادکتومی، آزمایش القاء التهاب روی تمامی گروه‌ها انجام شد.

برای القاء التهاب، مقدار ۵ میکرولیتر کاراگونون ۱ درصد به وسیله سرنگ هامیلتون، به صورت زیر جلدی به کف پای راست حیوان^(۱) تزریق گردید و بعد از ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه حجم پای متورم شده اندازه‌گیری شد.

برای این کار ۳۰۰ گرم جیوه را در یک بشر ریخته و روی ترازوی دیجیتال قرار داده و ترازو صفر می‌شود. برای اندازه‌گیری حجم پا موش را محکم در دست چپ گرفته با دست راست پای راست موش وارد ظرف حاوی جیوه می‌شد. برای این که این آزمون هم با کمترین خطا همراه باشد پای همه موش‌ها را تا قوزک در جیوه فرو و عدد مربوط به نیروی اعمال شده یادداشت می‌شد. این عدد، وزن بر حسب گرم را نشان می‌دهد. برای محاسبه حجم پا از فرمول استفاده شد (۱۴).

$$\text{حجم پا در جیوه} = \frac{\text{وزن پا در جیوه}}{\text{چگالی جیوه}}$$

در این فرمول چگالی جیوه ۱۳/۶ گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در پایان آزمایش خون‌گیری از

حیوانات آزمایشگاهی انتخاب شدند و به طور تصادفی در چهار گروه تقسیم‌بندی شدند؛ گروه کنترل که عمل جراحی روی آنها انجام نشد و هیچ دارویی دریافت نکردند، گروه شاهد که در آنها عمل جراحی انجام می‌شد، ولی بیضه‌ها خارج نمی‌گردید و دارو دریافت نکردند، گروه گنادکتومی که یک روز بعد از عمل جراحی ۰/۵ میلی‌لیتر حلال (روغن زیتون) به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند و گروه گنادکتومی که یک روز بعد از عمل جراحی، تستوسترون انانتات (۶ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در ۰/۵ میلی‌لیتر حلال به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند. تزریق این دوز تستوسترون انانتات (به دلیل طولانی اثر بودن نسبت به سایر ترکیبات آندروژنی) تا بیش از ۷ روز همچنان موجب بالا ماندن غلظت تستوسترون پلازما می‌شود (۱۳).

حیوانات در قفس‌های استاندارد و در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به غذا و آب کافی نگهداری شدند.

برای عمل گنادکتومی، ابتدا حیوان با کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و با تزریق درون ماهیچه‌ای) همراه بیهوشی سبک به وسیله اتر بیهوش می‌شد، سپس حیوان بیهوش شده به پشت بر روی تشک جراحی گذاشته، دست‌ها و پاهای حیوان ثابت می‌گردید. پوست اسکروتوم، به طور کامل تراشیده شده و بیضه‌ها، با یک شکاف

1-Hind paw

گنادکتومی در مقایسه با گروه کنترل و شاهد پایین است، ولی در گروه دریافت کننده تستوسترون انانتات به طور معنی دار بالاست ($p < 0.01$).

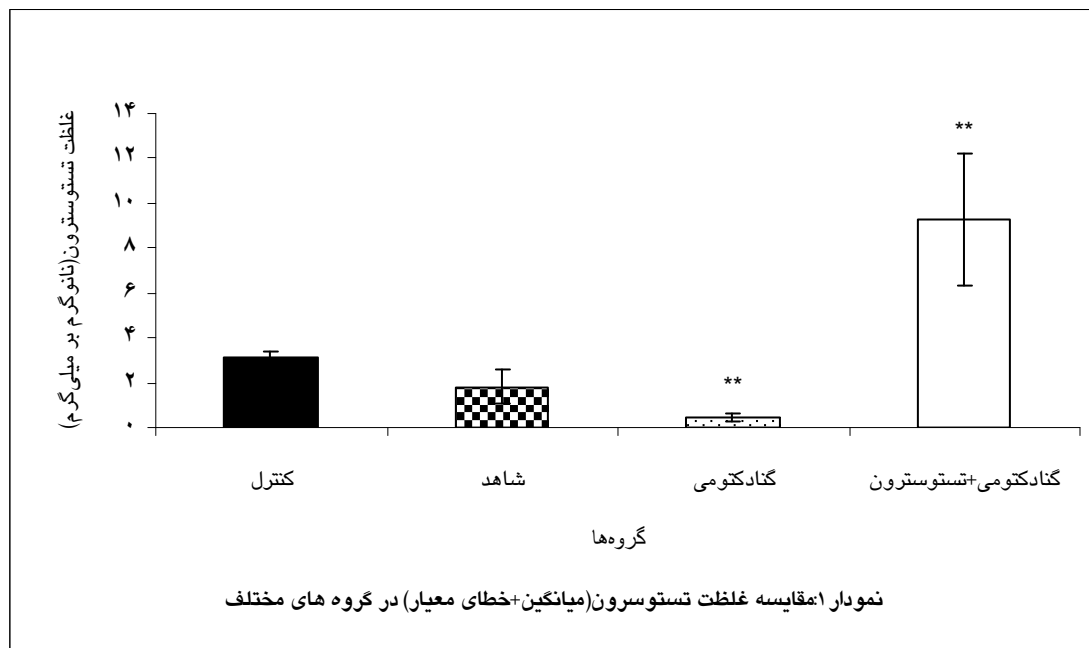
مقایسه میانگین حجم پای متورم در ۴ گروه در نمودار ۲ نشان داده شده است. بررسی آماری نشان از کاهش معنی دار التهاب القاء شده به وسیله کاراگون در گروه آزمایشی که بعد از گنادکتومی تستوسترون دریافت کردند نسبت به گروه شاهد دارد ($p < 0.01$). میانگین التهاب در گروه آزمایشی گنادکتومی که تستوسترون دریافت نکردند، به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه‌هاست ($p < 0.05$) و در گروه ۴ کمتر از سایر گروه‌هاست.

دم حیوان برای تهیه سرم و اندازه‌گیری غلظت تستوسترون به روش الیزا^(۱) صورت گرفت.

اندازه‌گیری‌ها و ثبت پاسخ التهابی به صورت دو سو کور انجام گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS^(۲) و آزمون آماری آنالیز واریانس^(۳) تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

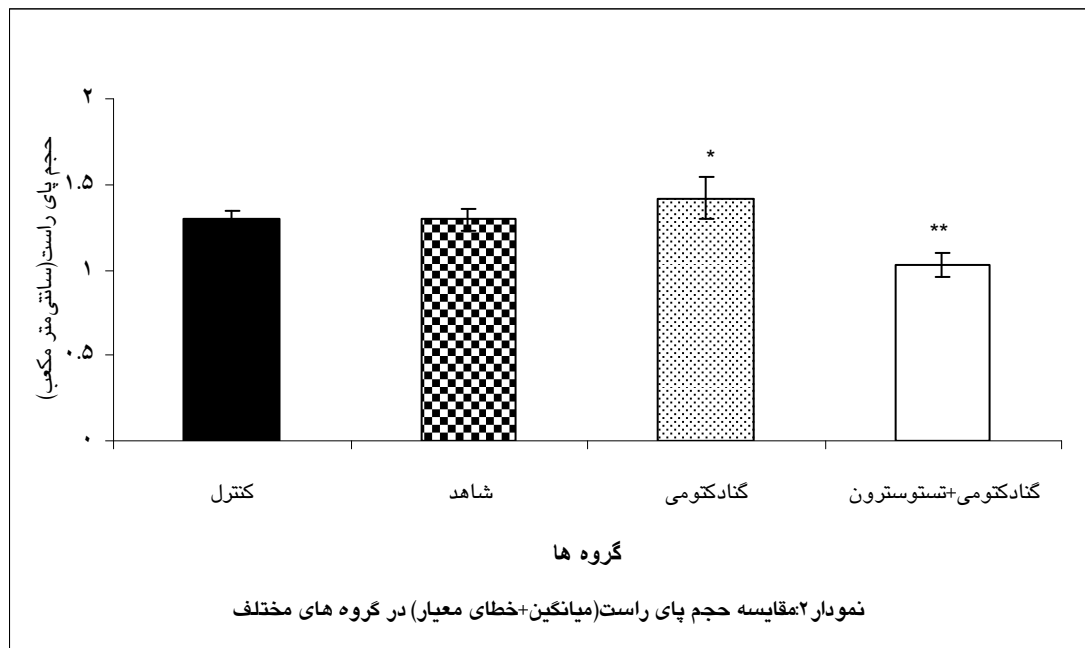
غلظت سرمی تستوسترون در گروه‌های مختلف در نمودار ۱ مقایسه شده است، همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان تستوسترون در گروه



1-ELISA

2-Statistical Package for Social Sciences

3-One-Way Analysis of Variance. (ANOVA)



بحث و نتیجه گیری

از آنجا که پاسخ التهابی در دو جنس نر و ماده متفاوت است (۱)، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر تستوسترون به عنوان هورمون اصلی جنس نر بر التهاب در موش صحرایی می باشد. در این تحقیق برای بررسی اثرات تستوسترون بر میزان التهاب از گاراگون استفاده شد، زیرا القاء التهاب به وسیله کاراگون به عنوان یک مدل معتبر تحقیقاتی شناخته شده است (۹).

نتایج به دست آمده در این تحقیق حاکی از کاهش التهاب القاء شده به وسیله کاراگون در موش های صحرایی نر گنادکتومی شده با تزریق تستوسترون است. این داده ها با نتایج به دست آمده از مطالعه فلاک و همکاران (۲۰۰۶) که با استناد به میزان شیوع و شدت بیشتر آسیب های مفصل تمپورومندیولار^(۱) در بین خانمها نشان دادند که

تستوسترون می تواند آسیب های وارد شده به این مفصل را کاهش دهد و بر عکس استروژن باعث افزایش این آسیب ها می شود مطابقت داشت (۳)، همچنین نتایج این تحقیق با نتایج نوراتا و همکاران^(۲) (۲۰۰۶) همخوانی دارد (۱۵). نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج حاصل از تحقیقات استراب و کوتولو^(۳) (۲۰۰۱) نیز تطابق داشته که این محققین در یک مطالعه کلینیکی به این نتیجه رسیده اند که مردانی که دچار روماتیسم مفصلی می باشند در مقایسه با مردان سالم سطح سرمی تستوسترون کمتری دارند (۱۶)، از طرف دیگر این نتایج با نتایج کوبا و همکاران^(۴) (۲۰۰۵) و کاندا و واتانابه^(۵) (۲۰۰۵) مغایرت دارد (۱۷ و ۴). دلایل این تضاد که بعضی از محققین به

1-Temporomandibular
2-Norata et al
3-Strab & Cutolo
4-Kuba et al
5-Kanda & Watanabe

تأثیر هورمون‌های جنسی بر روند التهاب به زمان وجود دارد (۲۲).

در مجموع چنین به نظر می‌رسد که رابطه‌ای بین میزان تستوسترون و عوامل التهابی مثل اینترلوکین ۶ و $TNF \alpha$ وجود دارد. احتمالاً تستوسترون از طریق مهار تولید اینترلوکین‌ها و سایر فاکتورهای التهابی از یک سو و از سوی دیگر با کاهش گیرنده‌های این عوامل موجب کاهش پاسخ التهابی و در نتیجه کاهش حجم پای موش‌های صحرایی نر به دنبال تزریق تستوسترون شده است. در نهایت با توجه به گزارش‌های متضادی که در این زمینه وجود دارد، پیشنهاد می‌شود مطالعه‌های کامل‌تری در سطح تغییرات سلولی در گونه‌های مختلف صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی گروه فیزیولوژی دانشگاه پزشکی که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌گردد.

این نتیجه رسیده‌اند، تستوسترون باعث افزایش التهاب و بعضی اعتقاد دارند که باعث کاهش التهاب می‌شود؛ یکی این است که تستوسترون پروسه‌های مختلفی را در روند التهاب تحت تأثیر قرار می‌دهد، به عنوان مثال با مهار محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی و به دنبال آن سرکوب کردن غده آدرنال باعث کاهش سطح سرمی اپی‌نفرین و کورتیکواستروئیدها شده که می‌تواند دخیل در افزایش میزان التهاب باشد (۱۸)، از طرف دیگر تستوسترون از طریق سرکوب تولید سیتوکین‌های التهاب‌زا از سلول‌های ایمنی می‌تواند دلیل بر کاهش التهاب باشد (۱۹)، همچنین یافته‌های ماگیو و همکاران^(۱) (۲۰۰۶) نشان داد که یک رابطه عکس بین میزان تستوسترون و گیرنده‌های اینترلوکین ۶ محلول وجود دارد، بنابراین به نظر می‌رسد که تستوسترون با کاهش تراکم گیرنده‌های اینترلوکین‌ها موجب کاهش پاسخ‌های التهابی می‌گردد (۲۰). با تحقیق انجام شده به وسیله مالکین و همکاران^(۲) (۲۰۰۴) نیز مشخص گردید که جایگزینی تستوسترون در مردان هیپوگناد منجر به کاهش سیتوکین‌های التهابی درونی مثل اینترلوکین ۶ و $TNF \alpha$ شده است، در حالی که موجب افزایش عامل ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ می‌گردد (۲۱)، لذا با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر این گمان می‌رود که در این تحقیق پروسه سرکوب تولید سیتوکین‌های التهاب‌زا غالب باشد. علت دیگر این اختلاف می‌تواند مربوط به زمان اندازه‌گیری میزان التهاب باشد، زیرا شواهدی مبنی بر وابستگی

1-Maggio et al
2-Malkine et a

Effect of Testosterone on Carrageenone Induced Inflammation in Gonadectomized Male Rats

Zarifkar A^{*},
Rafati A[‡],
Jamei A^{*}

*Associate Professor of Physiology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

**MSc in Physiology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 20/02/2009

Accepted: 11/05/2009

Corresponding Author: Zarifkar A
E-mail: zarifkara@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Different nociceptive and inflammatory responses to noxious stimuli in male and female animals imply that sex hormones may affect on inflammatory factors, induction and intensity of the inflammation. The aim of the current study was to evaluate the effect of testosterone administration on carrageenone induced inflammation in gonadectomized male rats.

Materials & methods: Forty male Wistar rats were divided into four groups (n=8). 1-The control rats without receiving any drug or surgical operation. 2-The sham – operated animals with surgical stress. 3-The gonadectomized rats, receiving 0.5 ml vehicle (olive oil) i.p. 4-The gonadectomized rats, receiving testosterone enantate (6 mg/100 gr body weight in 0.5 ml vehicle i.p.). At the sixth day of gonadectomy operation, inflammation was induced by injection of 1% carrageenone in the right hind paw of rats. Edematous paw volume as an index of inflammation was determined by immersing it into the mercury container. Weight of paw in the mercury was measured and then the paw volume was calculated in relation to specific gravity of mercury (13.6gm/ml). Data were statistically analyzed by SPSS software using ANOVA.

Results: The results showed that edematous paw volume significantly was reduced in testosterone enantate administrated gonadectomized rats compared to the control group ($P<0.01$).

Conclusion: It can be concluded that high dose of testosterone causes attenuation of inflammatory response. The testosterone anti-inflammatory effect is probably due to inhibition of inflammatory factors (Interleukins) production or decrease in receptors of inflammatory factors.

Keywords: Testosterone, Carrageenone, Inflammation, Rats

REFERENCES:

1. Aloisi AM, Bonifazi M. sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behave* 2006; 50(1): 1-7.
2. Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P, De Padova AM, Massafra C. Testosterone affects formalin-induced responses differently in male and female rats. *Neurosci Lett* 2004; 361(1-3): 262-4.
3. Flake NM, Hermanstynne To, Gold MS. Testosterone and estrogen have opposing actions on inflammation – induced plasma extravasation in the rat temporomandibular joint. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291(2): 343-8.
4. Kuba T, Kemen LM, Quinones-Jenab V. Estradiol administration mediates the inflammatory response to formalin in female rats. *Brain Res* 2005; 1047(1): 119-22.
5. Cook CD, Nickerson MD. Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313(1): 449-59.
6. Ozveri ES, Bozkurt A, Haklar G, Cetinel S, Arbak S, Yeğen C, et al. Estrogens ameliorate remote organ inflammation induced by burn injury in rats. *Inflamm Res* 2001; 50(12): 585-91.
7. Sandroni PL, Benrud-Larson M, McClelland R. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted County: a population-based study. *Pain* 2003; 103: 199–207.
8. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 130–6.
9. Borzan J, Fuchs PN. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. *Neuroscience* December 2006; 143(3): 885-93.
10. Shuster EA. Hormonal influences in multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 318: 267-311.
11. Gee Ac, Sawai RS, Differding J. The influences of sex hormones on coagulation and inflammation in the trauma patient. *Shock* 2008; 29(3): 334-41.
12. Karadag F, Ozcan H, Karul AB, Yilmaz M, Cildag O. Sex hormone alterations and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Clin Pract* 2009; 63(2): 275-81.
13. Gilliver SC, Ashworth JJ, Mills SJ, Hardman MJ, Ashcroft GS. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *J Cell Sci* 2006; 119 (4): 722-32.
14. Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnani S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000; 43(1):11-4.
15. Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, Poletti A. Dihydrotestosterone decrease tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide- induced inflammatory response in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(2): 546-54.
16. Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic-pituitaryadrenal/ gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: Viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 493–507.
17. Kanda N, Watanabe S. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. *J Dermatol Sci* 2005; 38(1):1-7.
18. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitaryadrenal axis. *Horm Behav* 1994; 28: 464–76.
19. Dillon JS. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4(3): 377-85.
20. Maggio M, Basaria S, Ceda GP, Ble A, Ling SM, Bandinelli S. The relationship between testosterone and molecular markers of inflammation in older men. *J Endocrinol Invest* 2005; 28(11 Suppl Proceedings):116-9.
21. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(7): 3313-8.
22. Harbuz MS, Perveen-Gill Z, Lightman SL, Jessop DS. A protective role for testosterone in adjuvant-induced arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34:1117–22.