

بررسی اثر هورمونهای جنسی آندوژن بر حساسیت به درد در موشهای صحرایی ماده

چکیده

دکتر حمیدرضا صادقی پور و دوسری*

علیرضا کرد**

به منظور نشان دادن اثر هورمونهای جنسی در تنظیم ترشح اویپوئیدهای آندوژن و بتا آندورفینها مطالعه حاضر صورت گرفته است. در این بررسی در مراحل مختلف سیکل استروس با استفاده از تست فرمالین و تست صفحه داغ (Hot plate) زمان پاسخ به درد مورد سنجش قرار گرفت. همچنین با برداشتن تخمدانها که منجر به افزایش قابل ملاحظه LH می گردد نقش این هورمون نیز بر روی درد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در تست درد حاد و مزمن در مرحله مت استروس میزان پاسخ به درد از بقیه مراحل سیکل کمتر و در مرحله پرواستروس بیشتر بوده بطوری که زمان لیسیدن در تست فرمالین و در مرحله استروس $15/84 \pm 0/35$ ثانیه در مرحله اول و $45/32 \pm 0/35$ ثانیه در مرحله دوم بود ($P < 0.001$)، در حالی که در پرواستروس این زمان در مرحله اول $60/75 \pm 0/2$ ثانیه و در مرحله دوم $45/32 \pm 0/35$ ثانیه شد. ضمناً پس از برداشتن تخمدانها با گذشت زمان پاسخ به محرک دردزا نیز شدیدتر گردید ($P < 0.001$).

کلید واژه‌ها: ۱- هورمونهای جنسی آندوژن
۲- درد
۳- سیکل استروس
۴- تست فرمالین

مقدمه

در مراحل مختلف سیکل جنسی ترشح اویپوئیدهای آندوژن و پاسخ به درد تغییر می یابد. درد نوعی حس ناخوشایند است که در غالب موارد زیان آور بوده و با آسیب بافتی همراه می باشد. از لحاظ مکانیسم ایجاد درد را به دو دسته تقسیم می کنند: ۱- درد حاد، سریع یا درد سوزنی که در مدت یک دهم ثانیه بعد از وارد آمدن یک محرک دردزا بوجود می آید. ۲- درد آهسته یا درد سوزشی که یک ثانیه یا بیشتر بعد از وارد آمدن یک محرک دردزا شروع شده و سپس شدت آن به آهستگی در طی ثانیه ها و یا حتی دقیقه ها افزایش می یابد و معمولاً با انهدام بافت همراه است.

برای پی بردن به نقش هورمونهای جنسی در پاسخ به درد، مدل حیوانی رایج متکی به حذف غدد جنسی و سپس تزریق هورمونهای مربوطه می باشد که عملاً تنظیم غلظت فیزیولوژیک این هورمونهای غیرممکن است. در این پژوهش مدل حیوانی جدیدی را معرفی می کنیم که نه تنها تخمدانها حذف نشدند بلکه با انجام آزمایش در مراحل مختلف سیکل استروس به نقش فیزیولوژیک تعدادی از هورمونهای جنسی در پاسخ به درد پی می بریم. استروس در لغت به معنی هیجان و التهاب شدید بویژه از نظر جنسی است و این دوره را بعلت التهاب شدید جنسی در زمان تخمک گذاری که بطور طبیعی

* دانشیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

** کارشناس ارشد فیزیولوژی

تنها زمانی است که میل جنسی حیوان ماده برانگیخته می شود، دوره استروس (*Estrous cycle*) نامیده اند،^(۳) که حدوداً ۴-۵ روز طول می کشد و شامل مراحل زیر است:

۱- پرواستروس (*Proestrous*):

مدت آن ۱۷-۱۲ ساعت می باشد^(۴) در ابتدای صبح یعنی زمان انجام تجربیات غلظت هورمونهای *LH* و *FSH* بسیار پائین بوده و تغییرات معنی داری را نشان نمی دهد. در این مرحله از سیکل میزان استروژن بالا و غلظت پروژسترون پائین می باشد،^(۱۴) همچنین در دوره سیکل استروس آنکفالین ها، بتا آندورفین ها و سایر پپتیدهای اوپیوئیدی نیز دچار تغییراتی در هیپوتالاموس میانی قاعده ای و هیپوفیز می شود.^(۱۲)

۲- استروس (*Estrous*):

در این مرحله در صبح زود غلظت پروژسترون پائین می باشد. استروژن تا حدودی افزایش غلظت نشان می دهد اما نسبت به مرحله پرواستروس پائین تر است.^(۱۴)

۳- مت استروس (*Metestrous*):

در این مرحله پروژسترون دارای حداکثر میزان ترشح در صبح می باشد و در همین زمان استروژن دارای غلظت پائینی است.

۴- دی استروس (*Diestrous*):

غلظت هورمون پروژسترون پائین می باشد و در همین زمان استروژن غلظت بالائی دارد. لازم به تذکر است که در زمان فوق غلظت پلاسمائی استروژن کمتر از مرحله پرواستروس و غلظت پروژسترون بیشتر می باشد^(۱۴).

روش بررسی

گروههای تجربی: موشهای صحرایی ماده از نژاد *Ratus-Ratus* با سن تقریبی ۳۰ روز و وزن متوسط ۷۵ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری و در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده پزشکی تهران تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای $22 \pm 2^\circ C$ نگهداری نمودیم تا به وزن مناسب بیش از ۱۶۰ گرم برسد. در شرایط فوق موشها به سن بلوغ رسیده و به شرایط آزمایشگاه نیز سازش حاصل نمودند و در این مدت یک روز در میان وزن حیوانات کنترل شده و

آنهائی که وزنشان ثابت مانده و یا کاهش وزن داشته اند حذف نمودیم. سپس موشها را به دو دسته کلی تقسیم کردیم:

الف - موشهایی که تخمدان آنها را خارج نموده بودیم (*Ovariectomy*) که پس از ۱۰، ۲۰، ۳۰ روز آزمایشات مربوطه را انجام دادیم (هر گروه ۷ عدد).

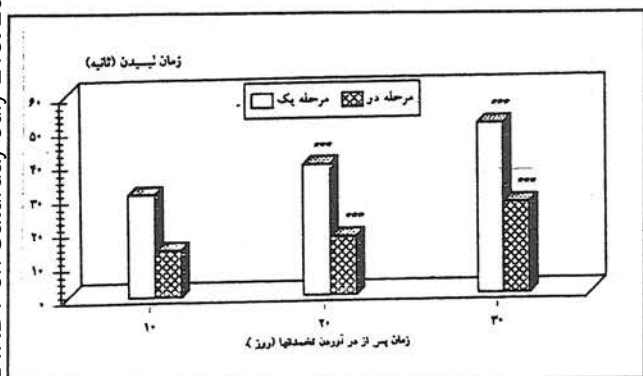
ب: موشهای این گروه به عنوان شاهد بوده و ماده ای به آنها تزریق نکردیم. از این موشها ابتدا اسمیرواژن تهیه تا مراحل مختلف سیکل استروس را مشخص نمائیم سپس آنها را در هر مرحله از سیکل به گروههای ۷ تائی تقسیم نمودیم. قابل ذکر است که فقط از موشهایی استفاده کردیم که حداقل سه دوره متوالی سیکل را بطور منظم طی کرده بودند.

تهیه اسمیرواژن: این عمل برای تشخیص مراحل مختلف سیکل استروس بکار می رود در این روش به کمک قطره چکان سرم فیزیولوژی را در واژن موش بالغ تخلیه نموده و با مکش مجدد محتویات واژن و سلولهای مخاطی را بر روی لام قرار دادیم تا با استفاده از میکروسکوپ و مشاهده سلولها، مرحله سیکل را مشخص کنیم.

حذف تخمدانها (*Ovariectomy*): موشهای دسته الف را با اتر بیهوش نموده سپس حیوان را به پهلو خواباندیم. موهای محل جراحی تراشیده و پس از ضدعفونی محل (زیر آخرین دنده بفاصله $1/5\text{ cm}$ از ستون مهره ها) و ایجاد شکافی کمتر از یک سانتیمتر با استفاده از پنس، پوست ناحیه جراحی را بلند نموده با کمک قیچی پوست را از غلاف و عضلات دیواره شکم و صفاق جدا نمودیم. پس از آن تخمدان را خارج کرده و رگهای خونی تخمدان بوسیله نخ مسدود شد تا پس از برداشت تخمدان خونریزی رخ ندهد. آنگاه محل شکاف با گراف فلزی بسته شد.

تست فرمالین (*Formalin-test*): در این تست حیوان در جایگاه مخصوص که شامل یک چهارپایه آلومینیومی که روی آن صفحه شیشه ای قرار دارد مستقر می شود بر روی صفحه شیشه ای قیفی با دهانه گشاد قرار می گیرد، در زیر صفحه شیشه ای، آئینه ای با زاویه 45° قرار گرفته است که مشاهدات را آسانتر می کند. قبل از هر آزمایش حیوان مدتی زیر قیف قرار

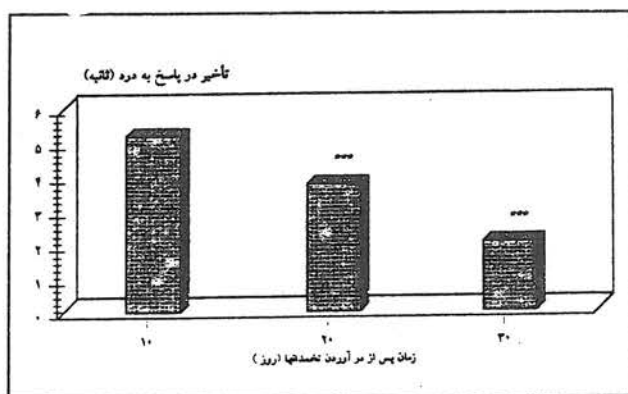
در موشهای فاقد تخمدان (OVX) میزان حساسیت به درد (بصورت لیسیدن) در مرحله اول بیشتر از مرحله دوم می شود هرچه از مدت زمان حذف تخمدان می گذرد حساسیت نسبت به درد در هر دو مرحله افزایش می یابد. همانطور که در نمودار شماره یک مشخص است در هر دو مرحله با گذشت زمان پاسخ به درد افزایش می یابد ($P < 0.001$).



نمودار ۱- مدت زمان پاسخ به درد (عمل لیسیدن) در موشهای فاقد تخمدان (تست فرمالین - مراحل یک و دو)

$n = 8$ Mean \pm SEM *** ($P < 0.001$)

الف - ۲: تست صفحه داغ (Hot plate test): این آزمون نشان می دهد که هرچه زمان حذف تخمدانها بیشتر می شود تحمل نسبت به حرارت صفحه داغ کاهش می یابد یا بعبارتی زمان تأخیر در پاسخ به درد (Response latency) کمتر خواهد بود (نمودار شماره ۲).



نمودار ۲- مدت زمان تأخیر در پاسخ به درد پس از حذف تخمدانها (تست صفحه داغ در زمانهای مختلف)

$n = 8$ Mean \pm SEM *** ($P < 0.001$)

می گیرد، سپس محلول تزریقی فرمالین ۵ درصد به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان عامل ایجادکننده درد بکار می رود که توسط سرنگ انسولین به طریق زیرجلدی به کف پای راست حیوان تزریق می گردد بلافاصله پس از تزریق، پاسخ به درد در محدوده زمانی ۴۰ دقیقه ثبت می شود. پاسخ عبارت از مجموع زمانهایی که بصورت لیسیدن، گازگرفتن پای تزریق شده و یا پریدن است. تست فرمالین دارای دو مرحله می باشد از ۵-۰ دقیقه مرحله اول که بیانگر درد حاد و از دقیقه ۴۰-۱۵ که نشان دهنده درد مزمن است که آن را مرحله دوم می گویند. در این دو دوره مدت زمانی که حیوان عمل لیسیدن پا را انجام می داد ثبت می گردید (۱۲).

تست صفحه داغ (Hot-plate-test): این تست نیز مانند تست فرمالین باید در محیطی کاملاً آرام صورت گیرد، موشها را بر روی یک صفحه داغ که به طور الکتریکی دمای آن کنترل می شود قرار دادیم. دمای مناسب جهت انجام تست صفحه داغ $55 \pm 0.5^\circ C$ می باشد همزمان با قرار دادن موش بر روی صفحه درپوش شیشه ای را بر روی آن قرار داده و با استفاده از کرونومتر زمان تأخیر در اولین پاسخ آنها که بصورت لیسیدن پاها، پرش یا کوبیدن سریع پاها می باشد ثبت گردید (۲).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با کمک کامپیوتر و نرم افزار SPSS صورت گرفت و جهت آزمون فرضیه ها ملاک های X^2 و T-Test و روش Anova مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج بدست آمده از تجربیات را می توان به شرح زیر بیان کرد:

الف - اثر حذف تخمدان بر روی درد در موش صحرایی ماده (تست فرمالین و تست صفحه داغ):

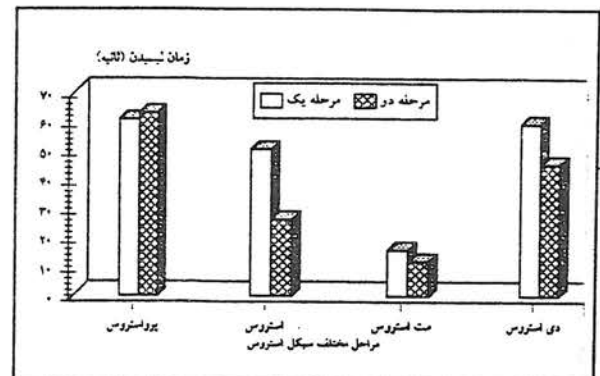
این تجربیات بر روی موش های دسته الف صورت گرفته است.

الف - ۱- تست فرمالین (Formalin test):

ب - اثر هورمونهای جنسی فیزیولوژیک (درونزا) بر روی

درد در موش صحرایی ماده:

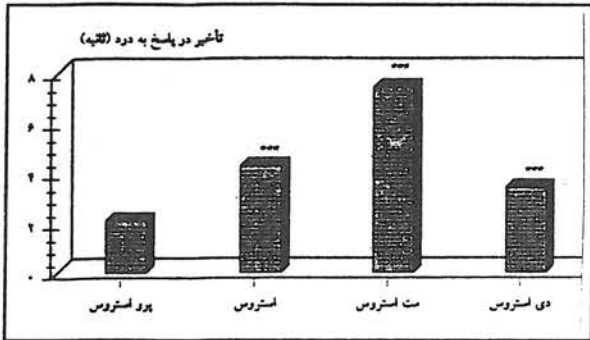
ب-۱- تست فرمالین: تجربیات بر روی موشهای دسته ب انجام گردید این مقایسه بین مراحل مختلف سیکل استروس صورت گرفت مقایسه زمان لیسیدن بر حسب ثانیه در مراحل مختلف سیکل نشان داد که در مرحله پرواستروس از همه بیشتر (مرحله دوم) و در مرحله مت استروس (۶۰/۷۵±۰/۲) ثانیه در مرحله اول و ۶۲/۹۵±۰/۲۱ در مرحله اول و ۴۵/۳۲±۰/۳۵ ثانیه در مرحله دوم) از بقیه مراحل پائینتر می باشد یا به عبارتی تحمل نسبت به درد در مرحله پرواستروس از همه کمتر و در مرحله مت استروس از بقیه بیشتر می باشد. بعد از مرحله پرواستروس به ترتیب مراحل دی استروس و استروس بالاترین میزان شدت درد را نشان دادند. همانطور که در نمودار شماره ۳ مشخص می باشد در مرحله پرواستروس شدت میزان درد در مرحله دوم بیشتر از مرحله اول و در بقیه مراحل سیکل، میزان شدت درد در فاز اول بیشتر از فاز دوم است. آنالیزهای آماری نشان می دهد که زمان مرحله اول در مراحل مختلف سیکل با یکدیگر بطور معنی دار تفاوت دارند ($P < 0.001$).



نمودار ۳- مدت زمان پاسخ به درد (عمل لیسیدن) در مراحل مختلف سیکل استروس (تست فرمالین - مراحل یک و دو) کلیه مراحل در هر دو دوره با $P < 0.001$ پرواستروس با دی استروس در مرحله اول با $Mean \pm SEM$ ($n = 8$, $P < 0.01$)

ب - ۲: تست صفحه داغ (Hot plate): مقایسه میزان درد حاد بین مراحل مختلف سیکل استروس نتایج نشان می دهد که تأخیر

در لیسیدن پنجه های پا در مرحله پرواستروس و دی استروس بسیار پائین و در مرحله مت استروس بسیار بالاست. نتایج منطبق بر همان نتایج حاصله از تست فرمالین است. بنابراین در هر دو تست به ترتیب میزان پاسخ به درد در $M < E < D < P$ می باشد (نمودار شماره ۴).



نمودار ۴- مدت زمان تأخیر در پاسخ به درد در مراحل مختلف سیکل استروس (تست صفحه داغ) در همه گروهها ($P < 0.001$) $Mean \pm SEM$ ($n = 8$)

بحث و نتیجه گیری

با توجه به مطالعات انجام شده مشخص گردیده است که در زمان پرواستروس هورمون استروژن بالا بوده و در مرحله مت استروس به حداقل میزان در طی سیکل استروس خواهد رسید در حالی که در این مرحله غلظت پروژسترون بالاتر از سایر مراحل می باشد. (۱۳۱۴) با توجه به زمان انجام آزمایش که در اوایل ساعات صبح انجام گردید به ترتیب در مراحل مت استروس، استروس و دی استروس تحمل به درد نسبت به پرواستروس بالا می باشد. بنابراین می توان به نقش فیزیولوژیک استروژنهای مترشحه از تخمدانها در افزایش پاسخ به درد و اهمیت ترشح فیزیولوژیک پروژسترون در کاهش پاسخ به درد پی برد.

در مورد موشهایی که تخمدانهای آنها خارج شده بود (OVX) با توجه به فیدبک منفی ایجاد شده غلظت LH و FSH افزایش می یابد ولی با در نظر گرفتن نیمه عمر این دو هورمون غلظت LH در پلاسما سه برابر FSH می باشد بنابراین هرچه از زمان برداشت تخمدانها می گذرد تحمل به درد نیز کمتر خواهد شد. چون LH می تواند منجر به افزایش پروستاگلاندین ها گردد

و یکی از عوامل ایجادکننده درد پروستاگلاندین و هیپرالژزیای ناشی از آن می باشد. (۱۵) علت این امر را می توان به افزایش LH نسبت داد. قابل ذکر است که تزریق پوستی PGE₂ منجر به افزایش هیپرالژزیای می گردد که بوسیله گیرنده مهار می شود. شواهدی در دست است که نشان می دهد التهاب حاصل از هیپرالژزیای نه تنها مستقیماً با تأثیر بر روی ترمینالهای محیطی اعصاب آوران، درد ایجاد می کند بلکه بطور غیرمستقیم نیز بوسیله تحریک نورونهای پس گانگلیونی سمپاتیک بعلت آزادسازی موادی که می توانند بر روی فیبرهای آوران اثر نمایند بر تحمل به درد تأثیر می گذارد. ثابت شده که تولید پروستاگلاندین بوسیله برادی کینین بوده و توسط یک G پروتئین تحریکی (Gs) تنظیم می شود که فسفولیپاز A₂ را جهت آزادسازی اسید آراشیدونیک فعال می کند. (۱۵)

بررسی ها و تجربیات ما نشان داد که هرچه از زمان برداشتن تخمدانها می گذرد شدت درد در تست درد حاد و مزمن افزایش می یابد. یکی از عوامل دخیل در این امر ترشح بالای LH در حیوانات بدون تخمدان می باشد زیرا بین میزان ترشح و اویپوئیدها و LH ارتباط وجود دارد. ترشح هورمونهای هیپوفیزی نظیر گنادوتروپین ها از طریق تحریک هیپوتالاموس و نیز از طریق نوروترانسمیتر کلاسیک مانند نوراپی نفرین، دوپامین، سروتونین و سایر پپتیدها تنظیم می گردد (۷). ضمناً سیستم اویپوئیدی واقع شده در هیپوتالاموس در بروز اثرات مهاری یا تحریکی ناشی از استروئیدهای جنسی در ترشح LH دخیل است. مشخص گردیده است که در بعد از ظهر روز پرواستروس کاهش چشمگیر غلظت متانکفالین سبب ترشح بالای LH می گردد، (۵،۸) بنابراین می توان گفت اویپوئیدهای درونزا سبب برقراری ترشح نرمال هورمونهای محور هیپوتالاموس - هیپوفیز و تخمدانها می گردد. نتیجه آنکه کاهش اویپوئید توأم با افزایش LH در نهایت با افزایش حساسیت به درد همراه است (۶). این تجربیات نشان می دهد که LH می تواند در روند ایجاد دردهای مختلف در خانمهای یائسه نقش داشته باشد.

با توجه به تغییرات میزان هورمونهای جنسی در سیکل

استروس و نقش این ترکیبات در تنظیم ترشح اویپوئیدهای آندوژن و تنظیم بتا - آندورفینها (۹) بر آن شدیم تا اثر این هورمونها را در پاسخ به درد مورد بررسی قرار دهیم.

در تجربیات انجام شده مشخص شد که درد حاد و مزمن در مرحله پرواستروس و دی استروس بسیار شدید بوده که می توان آن را به بالا بودن میزان استروژن و پائین بودن غلظت پروژسترون در این مراحل نسبت داد و از طرفی در مت استروس غلظت بالای پروژسترون منجر به کاهش پاسخ به درد می گردد، زیرا استروژن می تواند غلظت بتا آندورفین را در هیپوتالاموس موشهای فاقد تخمدان کاهش دهد. (۱۳) استرادیول غلظت بتا آندورفین را در تالاموس، آمیگدال و مغز میانی نیز کاهش می دهد زیرا استروژن فعالیت ژنومیک بر روی سیستم اویپوئیدی در مغز دارد بطوری که سبب افزایش فعالیت آنزیم RNA پلی مرز و سنتز پروتئین ها در هیپوتالاموس می شود. همچنین استروژن از طریق باند شدن با گیرنده های اویپوئیدی در مغز قادر به تعدیل اثرات اویپوئیدی است این احتمال وجود دارد که اثر استرادیول بر روی بتا - آندورفین هیپوتالاموس از طریق دوپامین میانجیگری شود. (۱۰) از طرفی اویپوئیدها نقش فیزیولوژیکی مهمی را در سیکل قاعدگی بازی می کنند. در تحت شرایط فیزیولوژیک تغییری در فعالیت سیستم اویپوئیدی در مراحل مختلف سیکل جنسی و در طی یائسگی مشاهده می شود، بطوری که بیشترین فعالیت اویپوئیدی در فاز لوتئال و کمترین آن در زمان قاعدگی دیده می شود. این امر نشان می دهد که اویپوئیدها در مکانیسم تخمک گذاری دخالت دارند. همچنین مهار ترشح گنادوتروپین ها در زنان در هنگام مصرف قرص های ضد بارداری ممکن است با افزایش فعالیت اویپوئیدها، و یا در زنان یائسه افزایش ترشح گنادوتروپین ها با کاهش فعالیت اویپوئیدی همراه باشد، تمامی این نتایج بیانگر آن است که هورمون پروژسترون که میزان آن در فاز لوتئال و نیز بهنگام استفاده از قرص های ضد حاملگی افزایش می یابد سبب بالارفتن مقدار بتا آندورفین هیپوتالاموس و در نتیجه کاهش میزان درد می شود. (۱۱)

References

- 1) Butcher. R.L and Fugo.N.W; plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesteron and estradiol- 17-B throughout 4-day estrous cycle of the rat; *Endocrinology* 1974, 94(6) PP: 1704-8
- 2) Carler. Richard.B; Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate; pain, 1991, 47; PP: 211-20
- 3) Ganong william F: *Review of Medical physiology*; 16 ed, Appleton and lange 1993; PP: 398-399
- 4) Guasti.A. Fernandez and pieozo, O; Changes in Burying behavior during the estrous cycle. *Psychoneuro endocrinology* 1992; 17(6); PP: 681-9
- 5) Jing-Ying in and JENN-TSER PAN; Effects of endogenous opioid peptides and their analogs on the Activities of hypothalamic arcuate neurons in brain slices from diestrous and ovariectomized rats; *Brain research bultein*; 1995 (36,3) PP: 225-233
- 6) Kimura, fukuko and Jinnai, Kayako; Bicacaline in fusions advance the timing of LH surge an proestrus rats, comparison with naloxane effects; *Hormones and Behavior* 1994; 28: 424-30
- 7) Kumar; M.S.A and chen; Changes in the pituitary Hypothalamic of met-enkephalin during the estrous cycle of rat; *life scince*; 1979(25) PP: 1687-1696
- 8) Maggi-R; Modulation of binding charactristic of hypothalamic μ -opioid receptor in rats by gonadal steroide; *Steroid-Bioche-biol*-1991 (40) 113-21
- 9) Ratka, A. and simpkins. J.W; Effect of estradiol and progestrone on the sensitivity to pain and morphine induce antinociception in female rats; *Hormone and Behav* 1991 (45) 217-27

EVALUATION OF ENDOGENOUS SEXUAL HORMONES EFFECTS ON PAIN PERCEPTION IN FEMALE RATS

H.R. Sadeghipour Roudsari, Ph.D. A.R. Kord, MSC. ***

ABSTRACT

In this research the effect of endogenous sexual hormones on pain perception during the estrus cycle in female rats has been evaluated, different stages of estrus cycle has been determined by vaginal smears, and the rate of pain responses and susceptibility tests has been determined with formalin and hot plate tests.

In this regard, the increase and decrease of response to pain is an indication of female sexual hormones activity. Meantime, with the help of ovariectomy we succeeded to increase the rate of LH notably, and as a result, we could succeed in evaluation of LH effect on pain response too. Our results showed that, in respect to female sexual hormones activity the acute and chronic pain decreased during the metestrus cycle and increased in proestrus stage. (Licking time in formalin test during the stage of estrus were 15.74 ± 0.35 seconds in the first step and 75.32 ± 0.35 seconds in the subsequent step, ($P < 0.001$). Meanwhile these values were 60.75 ± 0.2 and 45.32 ± 0.35 seconds respectively during the proestrus. We could state that as far as the ovariectomy lasts longer, the responses to pain producing factors intensifies.

Key Words: 1) Pain

2) Endogenous sexual hormones

3) Estrus cycle

4) Rat

* Faculty Member of Tehran University of Medical Sciences and Health Services

** Master of Science in Physiology