پژوهنده (مجله پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي)
سال دوازدهم, شماره ۴, پي در پي ۵۸ ، صفحات ۲۷۳ تا ۲۸۱
مهر و آبان ۱۳۸۶

تاريخ دريافت مقاله ۸۵/۱۱/۲۸
تاريخ تجديد نظر ۸۶/۵/۱۳
تاريخ پذيرش مقاله ۸۶/۶/۶

بررسي نقش هورمون هاي استروئيدي جنسي گنادال بر بيان ژن $GIRK_2$ در نخاع موش صحرايي

دكتر نعمت الله آهنگر[۱]، دكتر بهرام كاظمي[۲]، دكتر معصومه جرجاني[۳*]

چكيده

سابقه و هدف: *مطالعات متعـددي وجـود دارد كه تفاوت بين دو جنس نر و ماده را در پاسخ به درد و اثرات ضد دردي داروهاي اپيوئيـدي نشان مي دهد. در اغلب موارد، اپيوئيدها در جنس نر داراي اثرات ضـد دردي بيش تري نسبت به جنس ماده بوده اند. در اين مطالعه، ما تأثير هورمون هاي استروئيدي گنادال را بر بيان ژن $GIRK_2$ ، فكتور پس سيناپسي اصلي و مهم داروهاي اپيوئيدي در سيستم عصبي مركزي، بررسي نموديم.*

مواد و روش ها: *اين مطالعه بر روي موش هاي صحرايي نر و ماده نژادWistar در گروه هاي بالغ و نوزاد صورت گرفت. حيوانات بالغ خود شامل زيرگروه هاي دست نخورده، GDX، Sham، GDX+Testosterone بودند. از تكنيک RT-PCR نيمه كمي، جهت تعيين بيان ژن $GIRK_2$ در بافت نخاعي حيوانات استفاده شد.*

يافته ها: *بر اساس نتايج حاصله، در جنس نر بيان ژن $GIRK_2$ در بافت نخاعي حيوانات نابالغ (نوزاد) با ميزان بيان اين ژن در حيوانات بالغ دست نخورده يا گنادكتومي شده تفاوتي نداشت. حذف هورمون هاي گنادال در گروه نر مشخصاً موجب كاهش ميزان بيان اين ژن گرديد. اين تغييرات با جانشين درماني حيوان تستكتومي شده با تستوسترون به حالت اوليه باز نگشت. اما در جنس ماده بيان ژن $GIRK_2$ در حيوانات بالغ، اعم از دست نخورده يا گنادكتومي شده در مقايسه با حيوانات نابالغ (نوزاد) بسيار بالاتر بود. اواريكتومي حيوان ماده تغيير قابل توجهي در سطوح mRNA ژن $GIRK_2$ ايجاد ننمود. همچنين هيچ گونه تفاوت جنسي در بيان ژن مذكور بين گروه هاي بالغ دست نخورده، و نابالغ (نوزاد) مشاهده نشد.*

نتيجه گيري: *به نظرمي رسد تنظيم نسخه برداري ژن $GIRK_2$ در جنس نر بيش از جنس ماده تحت تأثير هورمون هاي گنادال قرار مي گيرد در حالي كه در جنس ماده ساير فاكتورهاي تكاملي و تغـييرات دوره بلـوغ روي بيان اين ژن تأثيـرگذار مي باشند. مطالعات بيش تري براي روشن شدن مكانيسم دقيق اين تغييرات بايستي انجام گيرد.*

واژگان كليدي: ***$GIRK_2$*** *، هورمون هاي استروئيدي گنادال ، تفاوت جنسي ،* ***RT-PCR*** *، موش صحرايي*

مقدمه

شواهد بسيار زيادي وجود دارد كه نشان دهنده تفاوت دو جنس نر و ماده را در پاسخ به درد و اثر ضد دردي داروهاي اپيوئيدي بر روي آن ها است. در اغلب مطالعات باليني، آستانه درد در خانم ها پايين تر از آقايان بوده و داروهاي ضد درد اپيوئيدي اثر بخشي متفاوتي را در خانم ها و آقايان بروز داده اند (۵-۱). اين تفاوت جنسي در حيوانات آزمايشگاهي و از جمله در جوندگان نيز مشاهده شده است. به عنوان مثال، اثر ضد دردي مرفين در موش سوري و موش سفيد آزمايشگاهي نر، به ميزان معني داري بيش تر از جنس ماده بوده است (۶و۷). فاكتورهاي متعددي از عوامل رواني- اجتـماعي تا عوامل فيـزيولـوژيک، در بروز اين تفـاوت ها نقـش دارند (۸ و۹). در سال هاي اخيـر، بيـش ترين توجـه به نقش هورمون هاي

۱ . استاديار، گـروه فارماكولوژی و مركز تحقيقات علوم اعصاب، دانشـگاه علـوم پزشكي شهيـد بهشتي
۲ . دانشيار، گروه انگل شناسي، مركز تحقيقات بيولوژی سلولی و مولكولی، دانشـگاه علـوم پزشكي شهيـد بهشتي
۳ * . نويسنـده مسؤول: استـاد، گـروه فارمـاكولوژی و مـركز تحقيـقات علـوم اعصاب، دانشـگاه علـوم پزشكي شهيـد بهشتي. آدرس برای مكاتبـه: تهـران، اويـن، دانشگاه علوم پزشكی شهيد بهشتي، گروه فارماكولوژی دانشكده پزشكی و مركز تحقيقات علوم اعصاب. صندوق پستي: ۱۸۱-۱۹۸۳۵. تلفن : ۲۲۴۲۹۷۶۸-۰۲۱ . نمابر: ۲۲۴۳۲۰۴۷-۰۲۱ . پست الكترونيک: **mjorjani@sbmu.ac.ir**

استروئيدي جنسي معطوف بوده است (۱۳-۱۰). تفاوت جنسي در پاسخ دهي به اثرات ضد دردي اپيوئيدها، عمدتاً ناشي از نقش تعديل كننده هورمون هاي استروئيدي جنسي، چه به صورت ساختاري و چه به صورت عملكردي مي باشد (۱۴و۱۵). در مورد اثرات ساختاري، عقيم سازي نرها و تزريق تستوسترون به جنس ماده در نوزاد موش سفيد آزمايشگاهي، سبب حذف اين تفاوت اثر مرفين شده است (۱۴). اما در مورد نقش عملكردي هورمون هاي استروئيدي جنسي در حيوانات بالغ، نتايج ضد و نقيضي ارائه شده است (۸). همچنين مطالعاتي كه حذف گنادها و به دنبال آن جايگزيني هورمون هاي استروئيدي جنسي را در موش صحرايي بالغ انجام داده اند، نتايج متغيري گزارش كرده اند (۸). اگرچه مكانيسم هايي كه سبب بروز اين تفاوت ها مي شود، هنوز كاملاً شناخته نشده اند، اما به نظر مي رسد كه تفاوت در اجزاي سلولي مسيرهاي نشانه پردازي اپيوئيدها، مي تواند به عنوان يک عامل مهم در بروز اين تفاوت جنسي تلقي گردد (۲۰-۱۶).

مسيرهاي نشانه پردازي اپيوئيدها مشتمل بر مسيرهاي پيش سيناپسي و پس سيناپسي مي باشد كه مهم ترين آن ها شامل مهار آزاد سازي واسطه هاي عصبي از طريق مهار كانال هاي كلسيمي وابسته به ولتاژ و فعال شدن كانال هاي پتاسيمي وابسته به ولتاژ در نورون پيش سيناپسي و كاهش تحريک پذيري نروني از طريق فعال كردن كانال هاي پتاسيمي متصل به پروتئين G موسوم به GIRK در نورون پس سيناپسي مي شوند (۲۱و۲۲). چهار زير واحد تحت عنوان $GIRK_{1-4}$ براي GIRK در پستانداران شناسايي شده است كه از بين اين ها $GIRK_2$ به عنوان ِافكتور پس سيناپسي اصلي اپيوئيدها در سيستم عصبي مركزي مطرح مي باشد (۲۵-۲۲).

Mitrovic و همكاران به نقش برجسته $GIRK_2$ در اثر ضد دردي مرفين اشاره كرده و يافته اند كه حذف ژن $GIRK_2$، سبب از بين رفتن تفاوت پاسخ دهي موش سوري نر و ماده به مرفين شده، همچنين آستانه درد را در موش هاي سوري نر و نه ماده كاهش مي دهد (۲۵). لذا احتمال مي رود هورمون هاي استروئيدي جنسي، بيان ژن $GIRK_2$ را در سيستم عصبي مركزي تحت تأثير قرارداده و تفاوت جنسي مشاهده شده، نشأت گرفته از تفاوت بيان ژن اين كانال باشد. مطالعه حاضر با هدف تعيين نقش و تأثير هورمون هاي استروئيدي گنادال بر بيان ژن $GIRK_2$ در نخاع موش هاي صحرايي نر و ماده انجام شده است.

مواد و روش ها

از موش هاي صحرايي نژاد Wistar نوزاد (سن كم تر از ۱۰ روز، محدوده ی وزني ۲۵-۲۰ گرم) و بالغ (محدوده ی وزني ۲۴۰-۲۰۰ گرم) و از هر دو جنس نر و ماده استفاده شد. حيوانات با توجه به جنسيت و گروه آزمايشي در قفسه هاي جداگانه و در شرايط ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاريكي، دماي ۲۳±۱°C و رطوبت ۵۵% نگهداري مي شدند و به جز زمان آزمايش در تمامي اوقات به آب و غذا دسترسي كافي داشتند. تمامي آزمايشات اين تحقيق، مطابق با قواعد اخلاقي انجمن بين المللي مطالعه درد و كميته اخلاق دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي انجام شد. براي انجام مطالعه، حيوانات به دو گروه كلي بالغ و نوزاد تقسيم شدند كه حيوانات بالغ خود شامل چهار زير گروه دست نخورده (intact)، گنادكتومي (GDX)، Sham و گنادكتومي+ تستوسترون درماني (GDX+T) بودند. تعداد حيوانات در هر گروه حداقل ۶ عدد بود.

جهت انجام جراحي، ابتدا حيوان با تزريق داخل صفاقي پنتوباربيتال (۵۰ mg/kg) بيهوش شد. در جنس نر با كمک قيچي پوست ناحيه اسكروتوم شكافته و به تدريج لايه هاي زير پوست برش داده شد تا اين كه بيضه ها از اسكروتوم خارج شدند. سپس با استفاده از قيچي بيضه ها كاملاً از بدن حيوان جدا شده و پوست اسكروتوم با نخ جراحي۳/۰ دوخته شد. در گروه Sham پس از شكافت پوست ناحيه ی اسكروتوم و مشاهده‌ی بيضه ها، پوست اسكروتوم مجدداً دوخته شد (۲۶).

در جنس ماده پس از تراشيدن موي ناحيه شكم، ابتدا شكافي به طول ۱ سانتي متر در ناحيه شكمي حيوان داده شده، پوست، بافت همبند و عضلات كاملاً شكافته شد تا حفره ی شكمي نمايان شود. پس از مشاهده تخمدان ها، لوله هاي فالوپ و شيپور رحم، با كمک گره اي، جريان خون هر يک از تخمدان ها مسدود گرديد. سپس از قسمت فوقاني آن گره، لوله فالوپ را بريده و تخمدان، بافت چربي و ضمايم اطراف آن خارج گرديد. در گروه Sham تخمدان ها، لوله هاي فالوپ و شيپور رحم را از شكم خارج شده و مجدداً به پريتوئن برگردانده شد. در انتها بافت ماهيچه و پوست، به طور جداگانه با نخ جراحي۳/۰ دوخته شد (۲۷).

در حيوانات نر بعد از گذشت ۴ هفته از انجام گنادكتومي و رسيدن سطح هورمون هاي استروئيدي جنسي به سطوح ناچيز، تزريق داخل صفاقي تستوسترون انانتات ساخت شركت ايران هورمون به مدت ۳ روز متوالي و به ميزان ۱ mg/kg انجام شد. گروه Sham نيز حلال تستوسترون انانتات يعني روغن كرچک استريل دريافت كردند (۲۶).

به دليل وجود گزارشات متعدد مبني بر نقش اندک مراحل مختلف سيكل استروس در آستانه درد و اثرات ضد دردي اپيوئيدها، از انجام سيتولوژي واژن و تعيين مرحله سيكل جنسي در حيوانات ماده ی بالغ دست نخورده و Sham چشم پوشي شد (۶ و۹و۲۷).

پس از طي زمان مورد نظر جهت انجام آزمايشات، حيوانات متعاقب حدود۲۰ ثانيه مواجهه با گاز CO_2 در محفظه شيشه اي بيهوش شده، سپس سر حيوان توسط گيوتين قطع گرديد. جهت جداسازي بافت نخاع، پس از باز كردن و كنار زدن پوست ناحيه پشت حيوان، دو طرف، بالا و انتهاي ستون مهره ها بريده شده، سپس با تزريق نرمال سالين و فشار وارده از قسمت انتهاي ستون مهره ها، نخاع خارج شد. پس از جدا كردن رشته هاي عصبي، ناحيه كمري نخاع جهت انجام آزمايش بريده شد. نمونه هاي بافت نخاع پس از جداسازي به ميكروتيوب استريل منتقل و تا زمان استخراج RNA در نيتروژن مايع (دماي ۱۸۰°C-) نگهداري شدند.

توالي و دماي annealing پرايمرهاي اختصاصي PCR براي $GIRK_2$ و β-actin (استاندارد داخلي) در جدول ۱ نشان داده شده اند. پرايمرهاي اختصاصي $GIRK_2$ و β-actin با استفاده از نرم افزار Primer3 در سايت http://www.genome.wi.mit.edu طراحي شده و توسط نرم افزار BLAST در سايت NCBI به آدرس http://www.ncbi.nlm.nih.gov مورد تأييد مجدد قرار گرفتند. محصول PCR توليد شده توسط هر يک از پرايمرهاي $GIRK_2$ و β-actin جهت تأييد، تعيين توالي شده (VBC biotech, Austria) و نتايج آن در GenBank ايندكس شد. كليه پرايمرها ساخت شركت سيناژن ايران بودند.

از يک روش نيمه كمي RT-PCR، به منظور ارزيابي تغيير در ميزان بيان ژن $GIRK_2$ استفاده شد. بدين منظور ۱µg از RNA استخراج شده به همراه مخلوط واكنشي كه در ادامه مي آيد، در حجم نهايي ۲۰µl جهت واكنش RT و سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت: بافر 1X واكنشRT

جدول ۱- توالي ها و مشخصات پرايمرهاي استفاده شده در RT-PCR

Gene	Sequence	position	Anneal temperature(°C)	PCR product size (bp)	Gene Bank accession nos.
$GIRK_2$	F 5′-tgggaaactatgcctgatgt-3′ R 5′-ttcttccgggttcttctctt-3′	862-881 1435-1416	53	574	EF156275
β-Actin	F 5′-gaagtaccccattgaacacg-3′ R 5′-gacagtgaggccaggataga-3′	282-301 1130-1111	55	849	EF156276

(50mM DTT, 20mM $MgCl_2$, 250mM KCl, 250mM Tris HCl pH 8.3 @ 25ºC) به ميزان ۵µl ، آنزيم M-Mulv 20iu/µl (Fermentas) به ميزان ۱µl، Rnasin 40iu/ µl (Fermentas) به ميزان۰/۵ µl ، dNTP 25mM (سيناژن) به ميزان ۱/۵ µl، DEPC Water به ميزان ۶/۵µl و ۰/۵ µg/µl Oligo dT (Fermentas) به ميزان ۱µl. واكنش RT در داي ۴۲ºC به مدت ۶۰ دقيقه انجام و در انتها براي غير فعال كردن آنزيم M-Mulv از داي ۷۰ºC به مدت ۱۰ دقيقه استفاده شد.

از cDNA به دست آمده از هـر Rat، جـهت انجام دو سري واكنش PCR جداگانه استفاده شد. هر واكنش PCR با استفاده از پرايمرهاي اختصاصي مربوط به $GIRK_2$ يا β-actin انجام پذيرفت. اندازه ی قطعه مورد انتظار براي هركدام از پرايمرها در جدول ۱ آمـده است. جهت انجام PCR از cDNA به ميزان ۵µl به همراه مخلوط واكنـشي زير در حجـم نهـايي ۵۰µl استـفاده شـد: ۲µl dNTP 25mM، ۱/۵ µl $MgCl_2$ ،۰/۵ µl Taq 5iu/µl (سيـناژن)، ۵ µl 10X PCR buffer ،۱µl 10µM از هركـدام از پرايمرهاي پيش رو و پس رو و در نهايت آب مقطر استريل تا حجم نهايي ۵۰µl.

واكنش PCR با استفاده از دستگاه Touchgene Gradient thermocycler (Techne, UK) و با شرايط زير انجام گرفت:

۱. ۹۴Cº به مدت ۵ دقيقه (۱ سيكل) .

۲. ۳۰ سيكل شامل : ۹۴Cº ، ۳۰ ثانيه، داي annealing مناسب هر پرايمر، ۳۰ ثانيه و ۷۲Cº ، ۳۰ ثانيه.

۳. ۷۲Cº به مدت ۵ دقيقه (۱ سيكل).

شرايط واكنش PCR شامل تعداد سيكل ها و ميزان cDNA استفاده شده، به گونه اي تنظيم شد تا ميان تعداد سيكل ها و محصول PCR و نيز ميزان cDNA ورودي و محصول PCR رابطـه اي خطـي برقرار باشـد. جهت تأييد بيش تر، از يک واكنش كنترل شامل تمام اجزاي واكنش به غير از cDNA، نيز استفاده شد. همان طور كه در تصوير ۱ ديده مي شود واكنش كنترل منجر به تكثير هيچ قطعه اي نشده است.

۵µl از محصول هر PCR پس از مخلوط شدن با بافر مخصوص loading به چاهک هاي ژل آگارز ۱/۵% اضافه شدند. در دو طرف نمونه ها، دو نمونه ازDNA ladder با فواصل ۱۰۰ bp اضافه گرديد. الكتروفورز به مدت ۶۰ دقيقه با ولتاژ ثابت ۵۰ ولت و در داي آزمايشگاه انجام و ژل مورد استفاده در هنگام ساخت توسط اتيديوم بروماید رنگ آميزي گرفت. پس از پايان الكتروفورز، ژل در دستگاه Gel documentation قرار گرفتـه و تحت نور UV با زمان acquisition ۱ ثانيه، از آن عكس برداري و تصوير به دست آمده ذخيـره گرديد.

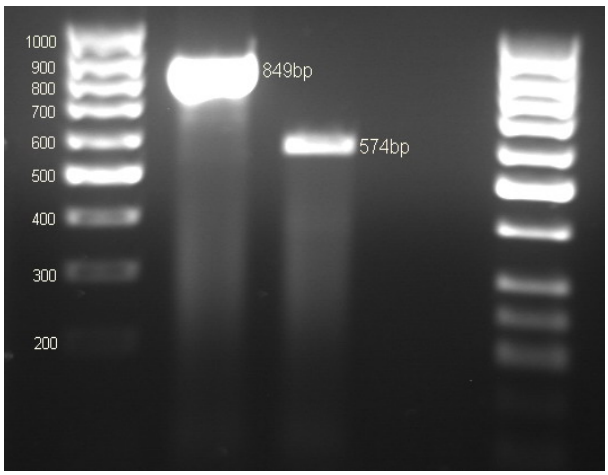
با استفـاده از نرم افزار Lab works (UVP,UK) دانسيتـه ی باند مربـوط به $GIRK_2$ محاسبه و براي آناليز مورد استفاده قرار گرفت.

مقايسه بين ميانگين گروه ها در دو جنس با آزمون آناليز واريانس دو طرفه انجام گرديد. همچنين از آزمون t-test براي مقايسه بين گروه ها در هر جنس استفاده شد. در اين مطالعه $P<۰/۰۵$ به عنوان حداقل سطح معني داري در نظر گرفته شده است.

يافته ها

آشكار سازي محصولات PCR، يک باند منفرد را براي هركـدام از ژن ها نشان داد: ۵۷۴bp براي $GIRK_2$ و ۸۴۹bp براي β-actin (تصوير۱). هم چنين نتـايج ما نشان داد كه كانال هاي پتاسيمي از نوع زير واحد $GIRK_2$ در نخـاع موش هاي صحرايي نر و ماده بيان مي شوند.

در حيوانات نر، ميزان mRNA ژن $GIRK_2$ در حيوانات نابالغ تفاوت چنداني با حيوانات بالغ دست نخورده (Intact) يا گنادكتومي شده نداشت.

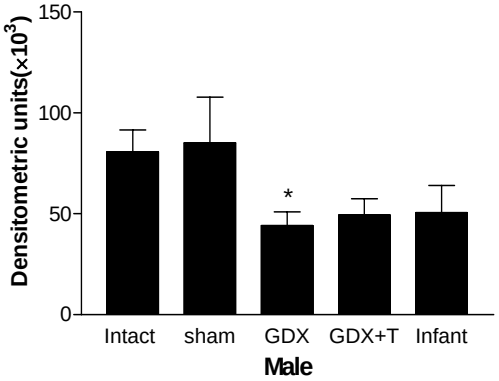


تصوير ۱- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژنهاي $GIRK_2$ و β-actin . رديف ۱ و ۵ : 100 bp DNA ladder، رديف ۲: قطعهٔ تکثير شدهٔ ۸۴۹ bp براي ژن β-actin ، رديف ۳: قطعهٔ تکثير شدهٔ ۵۷۴bp براي ژن $GIRK_2$ و رديف ۴: واکنش کنترل منفي که حاوي همهٔ اجزاي واکنش PCR به غير از cDNA بوده که منجر به تکثير قطعه اي نشده است.

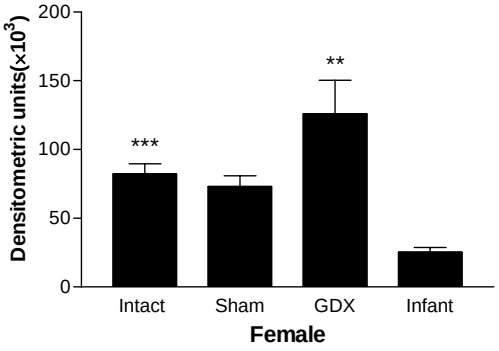
جانشين درماني موش هاي گنادکتومي شده با تستوسترون انانتات به ميزان mg/kg ۱ به صورت تزريق داخل صفاقي و به مدت ۳ روز متوالي نتوانست مقادير mRNA ژن $GIRK_2$ را به حد اوليه قبل از گنادکتومي برگرداند (نمودار۱).

در حيوانات ماده، سطوح mRNA ژن $GIRK_2$ در حيوانات بالغ دست نخورده افزايش معني داري نسبت به حيوانات نابالغ نشان داد ($P <$ ۰/۰۰۰۱). به طور مشابه در حيوانات بالغ گنادکتومي شده نيز، ميزان mRNA به طور معني داري بيش از حيوان نابالغ بود ($P <$ ۰/۰۰۲). برداشتن تخمدان هاي حيوان ماده تغيير قابل توجهي را در ميزان mRNA ژن $GIRK_2$ ايجاد نکرد (نمودار۲).

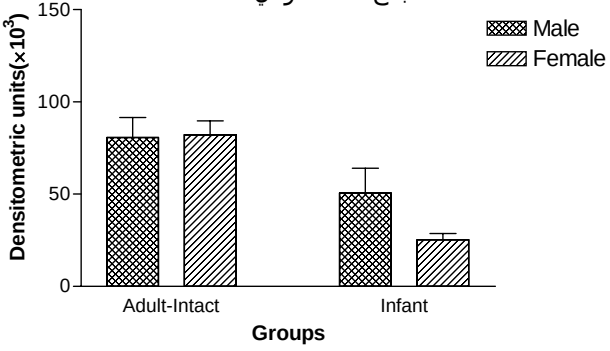
به علاوه با مقايسه يافته ها در دو جنس، هيچ گونه تفاوت معني داري بين گروه هاي نابالغ و بالغ مشاهده نگرديد (نمودار ۳).



نمودار ۱- مقايسه بيان ژن $GIRK_2$ در نخاع موشهاي صحرايي نر نابالغ و بالغ . داده ها به صورت Mean ± S.E.M ارائه شده اند. تعداد حيوانات در هر گروه حداقل ۶ عدد بود. * P <۰/۰۱ در مقايسه با گروه بالغ دست نخورده . GDX: گنادکتومي. GDX+T: گنادکتومي و متعاقب آن پس از ۴ هفته ، تزريق داخل صفاقي تستوسترون ۱mg/kg ، به مدت سه روز متوالي.



نمودار ۲- مقايسه بيان ژن $GIRK_2$ در نخاع موشهاي صحرايي ماده نابالغ و بالغ . داده ها به صورت Mean ± S.E.M ارائه شده اند. تعداد حيوانات در هر گروه حداقل ۶ عدد بود. *** ۰/۰۰۰۱> P در مقايسه با گروه نابالغ. ** ۰/۰۰۲ >P در مقايسه با گروه نابالغ . گنادکتومي: GDX .



نمودار ۳- مقايسه بيانmRNA ژن $GIRK_2$ در نخاع موشهاي صحرايي نر و ماده . داده ها به صورت Mean ± S.E.M ارائه شده اند . تعداد حيوانات در هر گروه حداقل شش عدد بود .

بحث

هدف از انجام تحقيق حاضر بررسي تأثير هورمون هاي استروئيدي جنسي گنادال بر بيان ژن $GIRK_2$ در نخاع موش صحرايي بوده است. در مطالعات متعدد به نقش هورمون هاي استروئيدي جنسي در پاسخ دهي متفاوت دو جنس نر و ماده به اثرات ضد دردي اپيوئيدها اشاره شده است (۲۸). Craft در مقاله اي مروري به طور جداگانه به بررسي اين تفاوت پرداخته و به پاسخ دهي بيش تر حيوانات نر به اپيوئيدها اشاره كرده است (۲۹). Fillingim و Ness نيز كاهش اثر ضد دردي اپيوئيدها در جنس ماده نسبت به نر را، با مقادير بالاي استروژن در جنس ماده مرتبط دانسته اند (۳۰). از آن جا كه كانال هاي پتاسيمي موسوم به GIRKs و بالاخص زير واحد $GIRK_2$، به عنوان يكي از افكتور هاي مهم پس سيناپسي اپيوئيدها در سيستم عصبي مركزي، مسؤول بخشي از تفاوت جنسي پاسخ دهي به مرفين در موش سوري شناخته شده است (۲۲و۲۴و۲۵)، لذا بررسي رابطه ميان هورمون هاي استروئيدي جنسي و $GIRK_2$ منطقي به نظر مي رسد. از آنجا كه استروئيدهاي جنسي عمدتاً اثرات خود را به طريقه ی ژنوميک اعمال مي نمايند، لذا بيان ژن و يا سنتز پروتئين اين نوع كانال پتاسيمي نيز ممكن است تحت تأثير استروئيدهاي جنسي قرار گيرد. در عين حال باتوجه به آثار غير ژنوميک شناخته شده استروئيدها، احتمال تأثير گذاري هورمون به روش غير ژنوميک و تغيير فعاليت و عملكرد كانال نيز نبايد ناديده گرفته شود.

استروژن با اثرات غير ژنوميک مي تواند اتصال گيرنده هاي متصل به پروتئين G مانند گيرنده هاي اپيوئيدي (هم μ و هم κ)، $GABA_B$ و D_2 دوپاميني را به سيستم هاي افكتور مربوطه تغيير دهد (۳۱و۳۲). يكي از اين سيستم ها GIRK است كه استروژن در مدت زمان كم تر از ۲۰ دقيقه سبب كاهش قدرت آگونيست اين گيرنده ها در فعال كردن GIRK مي شود (۳۳). ثابت شده كه اين تأثير منفي استروژن در اتصال گيرنده هاي μ و $GABA_B$ به كانال هاي GIRK، ناشي از افزايش فعاليت PKA مي باشد (۳۳). اما مطالعه خاصي كه به بررسي تأثير هورمون هاي استروئيدي جنسي بر بيان ژن $GIRK_2$ بپردازد، گزارش نشده است.

بر اساس يافته هاي اين تحقيق، سطوح mRNA ژن $GIRK_2$، تنها در جنس ماده بالغ نسبت به حيوان نابالغ افزايش معني داري داشت. اين بدان معناست كه اثرات تكاملي و به ويژه تكامل دوران بلوغ بر روي بيان ژن $GIRK_2$ در دو جنس نر و ماده متفاوت است. عدم تفاوت معني دار در بيان ژن كانال مذكور، بين حيوانات ماده بالغ دست نخورده با حيوانات بالغ اواريكتومي شده، حاكي از نقش كم رنگ استروئيدهاي تخمداني در بروز اين گونه تغييرات وابسته به تكامل مي باشد. تغيير مهم ديگري كه در حيوانات بالغ نسبت به گروه نابالغ ايجاد شده است، تغييرات فيزيولوژيک مربوط به دوران بلوغ است كه متأسفانه اطلاعات چنداني در خصوص تغييرات تكاملي ناشي از بلوغ، بر بيان ژن $GIRK_2$ يا ژن هاي حساس به استروئيدهاي جنسي در موش هاي صحرايي ماده يا ساير جوندگان وجود ندارد كه بر اساس آن بتوان علت ايجاد و افزايش mRNA اين كانال را در حيوان بالغ نسبت به حيوان نابالغ مشخص كند. اثرات ساختاري استروئيدهاي جنسي سبب تمايز جنسي مورفولوژي و نوروبيولوژي سيستم عصبي مركزي موش صحرايي در دوره كوتاه پس از تولد مي شود. نتيجه اين فعاليت ها، فيزيولوژي و رفتار اختصاصي جنسي نر و ماده را مشخص ساخته، سيستم عصبي مركزي را به اثرات ناشي از تحريک و فعال شدن رسپتور استروئيدهاي جنسي در طي بلوغ حساس تر كرده و مسؤول تكامل جنسي مي باشد (۱۴و۱۵). لذا سؤال اينست كه در نوزاد موش صحرايي كه هنوز به مرحله بلوغ نرسيده و سطوح اندوژن اين هورمون ها ناچيز است، وضعيت بيان ژن $GIRK_2$ در نخاع بين دو جنس نر و ماده چگونه است و عدم مشاهده تفاوت معني دار، بار ديگر تأثير ساختاري اين هورمون ها بر بيان ژن مذكور را رد مي كند.

بيان ژن $GIRK_2$ در حيوانات بالغ نيز در هر دو جنس تفاوت معني داري نداشت. اين بدان معناست كه حداقل در شرايط نرمال فيزيولوژيک بيان ژن اين كانال تحت تأثير استروئيدهاي جنسي گنادال قرار نمي گيرد و يا آن كه تغييرات ايجاد شده به قدري كوچک است كه قابل شناسايي نيست. تحقيقات Mitrovic و همكاران در جهت اثبات نقش ژن $GIRK_2$ در پاسخ دهي متفاوت دو جنس نر و ماده به مرفين روي موش سوري انجام شده است (۲۵). با توجه به نقش فاكتورهاي ژنتيكي و تفاوت هاي نژادي جوندگان كه در مقالات متعدد به آن اشاره شده است (۳۴و۳۵)، نتايج اين تحقيق كه بر روي موش صحرايي و نژاد Wistar انجام شده، شايد به گونـه اي مطـرح كننـده مكانيـسم هاي متـفاوت هورمون هاي استروئيدي جنسي در گونه و نژاد هاي مختلف جوندگان باشد.

از آنجا كه در اغلب مطالعات انجام شده جنس نر بي دردي بيش تري نسبت به مـاده نشـان مي دهد برخي از محققين اين پديده را به تستوسترون نسبت داده اند (۸). در واقع امكان دارد تستوسترون بتواند مسير سيگنالينگ اپيوئيدها و از جمله $GIRK_2$ را تحت تأثير قرار دهد. كاهش مشخص سطوح mRNA ژن $GIRK_2$ ،پس از حذف منبع گنادال تستوسترون در حيوانات نر، نشان دهنده دخالت تستوسترون در بخشي از تغييرات مشاهده شده است اما جانشين درماني با تستوسترون نتوانست سطوح mRNA را در حيوانات گنادكتومي شده به حالت اوليه برگرداند. بنابراين ممكن است گنادكتومي حيوان با مكانيسمهاي متفاوت و جديدي بر روي بيـان اين ژن تأثيـرگـذار باشـد. احتـمال دارد دوز تجـويزي تستوسترون نيز به اندازه كافي نبوده و لذا نتوانسته تغييرات ايجـادي در حيـوانات نر GDX را به حالت اول برگرداند. تحقيقات بيش تر، به اثبات صحت يا سقم اين فرضيات كمک خواهـد كرد. از طرف ديگر هورمون هاي استروئيدي گنادال ممكن است اثرات خود را در مسير سيگنالينگ اپيوئيدها با روش هاي شناخته شده ژنوميک اعمال نكنند، بلكه با اثرات غير ژنوميک بر روي آبشار سيگنالينگ اپيوئيدها اثر تعديلي داشته باشند.

نتيجه گيري

به نظر مي رسد هورمون هاي استروئيدي گنادال، اثرات تنظيمي خود را روي ژن $GIRK_2$ در جنس نر به طور آشكارتري اعمال مي نمايند در حالي كه در جنس ماده، اثر ساير فاكتورهاي تكاملي وابسته به جنس بر روي بيان اين ژن در دوران بلوغ، غالب است.

تشكر و قدرداني

مطالعـه ی حاضـر بخـشي از يافتـه هاي پژوهـشي طرح تحقيقاتي مصوب در مـركـز تحقيقات علوم اعصاب دانشـگاه علـوم پزشـكي شهيد بهشتي مي باشد. ضمن تشـكر از مسؤولين محتـرم اين مركز، از رهنمودهاي ارزشمند جناب آقاي دكتـر نادر مقصودي و جناب آقاي دكتر انوشيروان كاظم نژاد و نيز همكاري خوب آقاي صفر علي غفاري (تكنسين گروه فارمـاكولوژي دانشـگاه علوم پزشكي شهيـد بهشتي) و همه ی همـكاران گـروه فارماكولوژي صميمانه قدرداني مي نماييم.

REFERENCES

1. Feine JS, Bushnell MC, Miron D, Duncan GH. Sex differences in the perception of noxious heat stimuli. Pain 1991; 44: 255-62.
2. Fillingim RB, Edwards RR, Powell T. The relationship of sex and clinical pain to experimental pain responses. Pain 1999; 83: 419-25.

3. Maixner W, Humphrey C. Gender differences in pain and cardiovascular responses to forearm ischemia. Clin J Pain 1993; 9: 16-25.

4. Terner JM, Lomas LM, Picker MJ, Influence of estrous cycle and gonadal hormones depletion on nociception and opioid antinociception in female rats of four strains. J Pain 2005; 6: 372-83.

5. Riley JL, Robinson ME, Wise EA, Myers CD, Fillingim RB. Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis. Pain 1998; 74: 181-7.

6. Mogil JS, Chesler EJ, Wilson SG, Juraska JM, Sternberg WF. Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. Neurosci Biobehav Rev 2000; 24: 375-389.

7. Craft RM. Sex differences in drug- and non-drug-induced analgesia. Life Sci 2003; 72: 2675-588.

8. Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. Eur J Pain 2004; 8: 397-411.

9. Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. Brain Res 2005; 1052: 105-11.

10. 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.

11. Terner JM, Barrett AC, Grossell E, Picker MJ. Influence of gonadectomy on the antinociceptive effects of opioids in male and female rats. Psychopharmacology 2002; 163: 183-93.

12. Cicero T, Nock B, Meyer E. Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. J Pharmacol Exp Ther 1996; 279: 767-73.

13. Craft RM, Stratmann JA, Bartok RE, Walpole TI, King SJ. Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. Psychopharmacology 1999; 143: 1-7.

14. Cicero T, Nock B, Meyer E. Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: Activational and organizational effects. J Pharmacol Exp Ther 2002; 300: 695-701.

15. Krzanowska EK, Ogawa S, Pfaff DW, Bodnar RJ. Reversal of sex differences in morphine analgesia elicited from the ventrolateral periaqueductal gray in rats by neonatal hormone manipulations. Brain Res 2002; 929: 1-9.

16. Dondi D, Limonta P, Maggi R, Piva F. Effects of ovarian hormones on brain opioid bindig sites in castrated female rats. Am J Physiol 1992; 263: E507-11.

17. Eckersell CB, Popper P, Micevych PE. Estrogen-induced alteration of μ-opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdale. J Neurosci 1998;18:3967-76.

18. Sinchank K, Micevych PE. Progestrone blockade of estrogen activation of μ-opioid receptors regulates reproductive behavior. J Neurosci 2001; 21: 5723-9.

19. Holtzman DA, Brooks PJ, Pfaff DW, Schwartz-Giblin S. Preproenkephalin mRNA is regulated by an interaction between steroid hormones and nociceptive stimulation. J Neuroendocrinol 1997; 9: 913-22.

20. Blednov YA, Stoffel M, Alva H, Harris RA. A pervasive mechanism for analgesia: Activation of $GIRK_2$ channels. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:277-82.

21. Yaksh TL. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. Acta Anaesthesiol Scand 1997; 41:94-111.

22. Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K. Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of μ- and δ- but not κ-opioids. J Neurosci 2005; 25: 3551-9.

23. Sadja R, Alagem N, Reuveny E. Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. Neuron 2003; 39: 9-12.

24. Marcker CL, Stoffel M, Wickman K. Spinal G-protein-gated K^+channels formed by $GIRK_1$ and $GIRK_2$ subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia. J Neurosci 2004; 25: 2806-12.

25. Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bader S, Stoffel M, Jan LY, Basbaum A. Contribution of $GIRK_2$ –mediated postsynaptic signaling to opiate and α_2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 271-6.

26. Nayebi AM, Rezazadeh H. Involvement of serotonergic mechanism in analgesia by castration and flutamide, a testosterone antagonist, in the rat formalin test. Pharmacol Biochem Behav 2004; 77: 9-14.

27. Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM. Gonadal hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. Pain 2003; 103: 285-302.

28. Fillingim RB, Gear RW. Sex differences in opioid analgesia: Clinical and experimental findings. Eur J Pain 2004; 8: 413-25.

29. Craft RM. Sex differences in opioid analgesia: from mouse to man. Clin J Pain 2003; 19: 175-86.

30. Fillingim RB, Ness TJ. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. Neurosci Biobehav Rev 2000; 24: 485-501.

31. Kelly MJ, Ronnekleiv OK, Ibrahim N, Lagrange AH, Wagner EJ. Estrogen modulation of K^+channel activity in hypothalamic neurons involved in the control of reproductive axis. Steroids 2002; 67: 447-56.

32. Kelly MJ, Qiu J, Wagner EJ, Ronnekleiv OK. Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS). J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 83: 187-93.

33. Malyala A, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Esterogen modulation of hypothalamic neurons: Activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. Steroids 2005; 70: 397-406.

34. Mogil JS, Wilson SG, Cheler EJ, Rankin AL, Nemmani KVS, Lariviere WR, et al. The melonocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanism of analgesia in mice and humans. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 4867-72.

35. Terner JM, Lomas LM, Smith ES, Barrett AC, Picker MJ. Pharmacogenetic analysis of sex differences in opioid antinociception in rats. Pain 2003; 106: 381-91.