بررسی تأثیر فرومون‌های جنسی فرار رات ماده بر روی سطح پلاسمائی هورمون تستوسترون در دوران کودکی، بلوغ و پیری رات نر نژاد ویستار

حیدر آقابابا [۱*]، اعظم لطافت [۲]

چکیده

فرومون ها مواد شیمیایی ترشح شده از جانوران می باشند که برای منظم ساختن جمعیت های حیوانی و تعامل های اجتماعی آنان در بین حیوانات هم نوع عمل می کند. فرمون های جنسی در پستانداران رفتارهای متنوعی از جمله رفتارهای تهاجمی در جنس نر، تسریع بلوغ، رفتارهای معاشقه‌ای، جفت یابی و والدینی در هر دوجنس و اختتام دوره بارداری در جنس ماده را باعث می‌گردد. در این تحقیق برای بررسی تأثیر فرومون‌های رات ماده بر روی میزان هورمون تستوسترون رات نر در سنین کودکی، بلوغ و پیری، به کمک قفس مخصوصی که برای در اختیار گذاشتن فرومون های جنسی رات ماده بر روی جنس نر طراحی شده بود، استفاده گردید. سپس از رات های نر خونگیری به عمل آمده میزان پلاسمائی هورمون تستوسترون به روش تست هورمونی ELIZA اندازه گیری گردید. در رات نر ۵۰ روزه کودک که در کنار ماده قرار نگرفته بود (گروه کنترل)، میانگین سطح پلاسمایی هورمون تستوسترون *ng/ml* ۲/۸۳بود که این میزان در گروه تجربی ۵۵ روزه به *ng/ml* ۲/۹۵رسید و در گروه تجربی ۶۰ روزه به *ng/ml* ۳/۰۳ و در گروه ۶۵ روزه به *ng/ml* ۳/۵۸ افزایش یافت. در رات بالغ نر ۸۵ روزه که در کنار ماده قرار نگرفته بود (گروه کنترل) میزان سطح پلاسمایی تستوسترون *ng/ml* ۷/۶۷ تخمین زده شد، در حالی که در گروه های تجربی ۹۰ روزه این میزان به *ng/ml* ۸/۲۳ و در رات ۹۵ روزه به *ng/ml* ۹/۱۸ و در رات ۱۰۰ روزه به *ng/ml* ۱۰/۴۹ رسید. اختلاف سطح هورمونی نسبت به گروه کنترل در $p<0.05$ معنی دار به دست آمد. در دوره پیری میزان سطح پلاسمایی هورمون تستوسترون کاهش پیدا کرد ولی باز در مقایسه رات نر ۱۵۰ روزه(*ng/ml*۷/۷۷) که در کنار رات ماده بالغ قرار نداشت (گروه کنترل) با گروههای تجربی ۱۵۰ روزه (*ng/ml* ۸/۸۳) و ۱۶۰ روزه (*ng/ml* ۹/۱۶) افزایش معنی داری را نشان داد. این یافته ها نشان می دهد که فرومون های جنسی رات ماده بر روی سطح پلاسمایی فرومون تستوسترون در سنین کودکی، بلوغ و پیری تأثیر فزاینده دارد.

کلید واژگان: فرومون‌های جنسی، تستوسترون، موش رات، کودکی، بلوغ، پیری

مقدمه

واژه فرومون از دو کلمه لاتین Pher به معنای حامل بودن و Hormone به معنای تحریک کننده گرفته شده است در حقیقت نقش فرومون مشابه نقش هورمون ها است با این

۱*-گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران heydar2001@yahoo.com

۲- گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

تفاوت که هورمون از غدد مترشحه داخلی حاصل می شود در حالی که فرومون ها نتیجه فعالیت غدد خارجی است.

ترکیب شیمیایی فرومون ها و هورمون های جانوری مشابه هم است و اغلب آنها از مشتقات استروئیدها هستند. فرمون ها قادرند بر روی یکسری رفتارهای تولید مثلی تأثیر بگذارند (بخصوص در زمان جفت گیری). فرومون هایی که بطور آهسته بر روی رفتارهای بعدی تأثیر می گذارند را آغازگر (Primer Effect) می گویند و از طریق سیستم غدد درون ریز عمل می کنند؛اکثر فرومون های جنسی جزو فرومون های آغازگر قرار می گیرند.(۱) هورمون ها باعث هماهنگی و نظم در نحوه بیان پاسخ های مقتضی به پیام های فرومونی می گردند.(۲) فرومون های آغازگر(Primer Pheromone)، از طریق GnRH بر روی نسبت LH/FSH و تولید تستوسترون و استرادیول تأثیر می گذارند؛ و به عبارت بهتر فرومون های آغازگر، تمام محور (HPGA) hypothalamic-pituitary-gonadal axis) را دچار نوسان می کنند؛ و در نتیجه رفتارهای متعاقب این تغییرات را نیز تحت تأثیر قرار می دهند(۹). فرومون ها قادرند بر روی مراحل تولید مثلی در پستانداران اثر بگذارند. آنها به جذابیت جنسی ورفتارهای مقاربتی کمک کرده وقادرند فیزیولوژی تولید مثل را تعدیل کنند. ترکیبات مترشحه توسط ماده ها،پاسخ های اندوکرینی در نرها از قبیل آزاد سازی هورمون LH و یا تستوسترون را باعث می شود. پیام های شیمیایی نر،دوره قاعدگی بسیاری از گونه ها را تنظیم می کند. بعنوان مثال در موش،پیام ادراری نرها باعث سه پاسخ فیزیولوژیک می شود: تسریع بلوغ ماده های جوان، تسهیل آبستنی و همزمان کردن دوره قاعدگی ما ده ها . هرسه مسیر، از طریق مسیرهای نورواندوکرینولوژیکی صورت می گیرد ونهایتا باعث تغییر سریع در ترشح LH و یا پرولاکتین می شود (۳). دسته‌ای از فرومون ها بنام فرومون های پراکنشی (Dispersive Pheromone) که موجب پراکنش افراد یک گونه و در نتیجه افزایش فضا برای زیست و در نتیجه کاهش رقابت بین افراد یک جمعیت می گردد تأثیر قابل توجهی بر روی رفتارهای اجتماعی رات های کودک و نابالغ دارد . همچنین فرومون های تجمعی (Associative Pheromone) که موجب تجمع افراد یک گونه د ر محل منبع فرومون می گردند قادرند رات های نابالغ را تحت تأثیر قرار دهند(۵). فرومون های جنسی بعد از بلوغ در فرایند فیزیولوژیکی مداخله می کنند. مثلا ملخ ها پس از آخرین پوست اندازی ازنظر جنسی نابالغ باقی می مانند. در صورتی که ملخهای بالغ بر روی آنها فرومون ترشح کنند ، موجب بلوغ جنسی ملخ های جوانتر می گردد (۶). نوع پاسخی که یک جانور به فرومون ها می دهد بسیار وابسته به سن، سطوح هورمونی جانور و تسلط جنسی وی دارد. در رات نر پیر سطح هورمون تستوسترون کاهش می یابد و پاسخ های رات نر پیر به فرومون های ماده نیز کاهش می یابد ولی بطور کلی فرومون های جنسی ماده باعث ایجاد نوسان در میزان تستو سترون در رات نر پیر می شوند (۸). رفتارهای وابسته به هورمون ها تحت تأثیر سایر ورودی های حسی نیز می توانند قرار بگیرند. بعنوان مثال، بوهایی که تحت شرایط اجتماعی و محیطی خاص در اختیار پستانداران قرا می گیرند؛ به کمک حس بینایی، به رات نر کمک می کنند تا وضعیت هورمون LH را تغییر دهند(۴). براساس مدل های ارائه شده برای جزئیات سیستم نورواندوکرینولوژی پستانداران توسط Kohl، بیان شده است که LH یک پارامتر قابل اطمینان برای اند ازه گیری و مقایسه رفتارهای جنسی با حس بویایی در انسان می باشد(۱۰).

مواد و روش کار

خریداری ونگهداری حیوانات : در این تحقیق از ۸ رات ماده و ۲۴ رات نر استفاده شد که همگی از انستیتو سرم سازی رازی شیراز خریداری شدند ودر شرایط استاندارد (دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) در اتاق حیوانات دانشگاه از آنها نگهداری شد. وزن رات های نر کودک ۱۶۰ گرم، رات های نر بالغ حدود ۲۱۰ گرم و رات های نر پیر در حدود ۳۶۰ گرم در نظر گرفته شد. برای اینکه بتوانیم اثر فرومون رات ماده به تنهایی را بر روی میزان تستو سترون نر بررسی کنیم ۸ قفس ساختیم که جنس آن از پلاستیک و دارای درپوش بود این قفس ها با یک ورقه فلزی که یک دستگاه تهویه در وسط آن تعبیه شده بود به دو قسمت مساوی تقسیم شد که باعث می شد بوی رات ماده به رات نر برسد (تصویر ۱).

تصویر ۱- یک نمای کلی از قفس مخصوص. همانطور که مشاهده می شود هواکشی که در وسط قفس بر روی دیواره فلزی تعبیه شده باعث می شود بوی ادرار و عرق ماده که در سمت راست قرار گرفته، به رات نر که در سمت چپ قرار گرفته منتقل شود.

خونگیری: با توجه به اینکه باید چندین بار از رات خونگیری می شد، خونگیری از انتهای دم صورت می گرفت. از موش های نری که در معرض موش ماده قرار نداشتند در روزهای ۵۰ (دوره کودکی)، ۸۵(دوره بلوغ) و ۱۵۰ (دوره پیری) خونگیری کرده و سپس آنها را در قفس مخصوص گذاشته، بعد از گذشت ۵ روزه قرار گرفتن در کنار رات ماده دوباره خونگیری شد و این کار در فاصله ۱۵ روزسه بار تکرار گردید. البته برای موش نر پیر این کار در مدت ۱۰ روز و ۲ بار خونگیری صورت می گرفت. بلافاصله بعد از خونگیری نمونه های خونی در سانتریفوژ قرار می گرفتند و سرم آنها جداسازی می گردید و در فریزر قرار داده می شدند و تا زمان تست هورمونی در دمای زیر صفردرجه قرار می گرفت پس از اتمام خونگیری ها از آنها تست هورمونی به عمل آمد. برای خونگیری از دم رات ها ابتدا توسط اتر رقیق شده برای چند دقیقه رات را کم هوش می کردیم تا رات احساس درد نکند .تمامی نمونه های هورمونی توسط کیت های Free Testosterone و به روش ELIZA تست هورمونی شدند و نتایج به دست آمده مستقیما مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

گروه بندی: برای این تحقیق رات ها به ۱۱ گروه تقسیم شدند که چهار گروه اول نابالغ، چهار گروه دوم بالغ و سه گروه آخر پیر بودند. در هر گروه، یک گروه کنترل وجود داشت که در معرض فرومون قرار نمی گرفت. از گروه نابالغ در روز های ۵۰، ۵۵ و ۶۰ ؛ از گروه بالغ در روزهای ۸۵، ۹۰ و ۹۵ ؛ و از گروه پیر در روز های ۱۵۰ و ۱۶۰ خونگیری به عمل آمد.

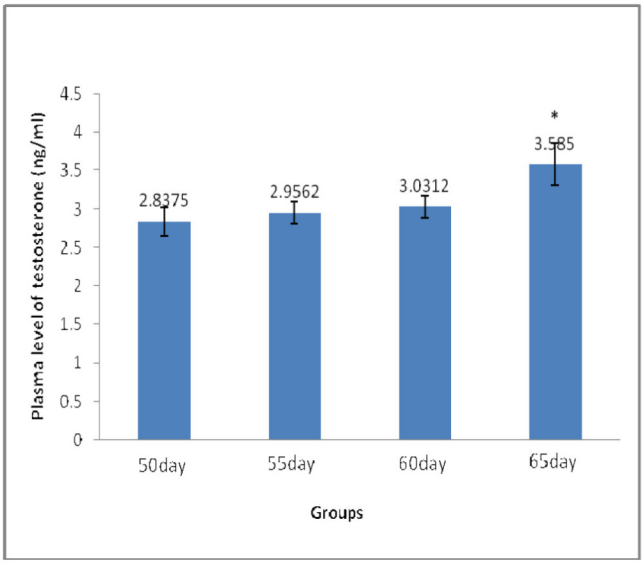
روش های آماری: نظر به این که تمام این خونگیری ها از ۸ رات نر صورت گرفته است, به لحاظ آماری این ۱۱ گروه به هم وابسته می باشند و لذا از روش های آماری مربوط به گروه های وابسته استفاده شده است. در این تحقیق برای مقایسه دو یا چند گروه با یک گروه از روش های آماری parametric paired T-test استفاده گردید. ضمناً برای مقایسه دو یا چند

گروه با دو یا چند گروه دیگر از روش آماری Repeated measure test استفاده گردید. از آنجائی که خونگیری ها کلاً از ۸ موش نر صورت گرفته بود، بکارگیری روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) صحیح نبود. به همین علت از یک روش آماری مشابه با ANOVA استفاده شد که که در آن داده ها بر اساس تناوب زمانی با هم مقایسه شدند.

نتایج

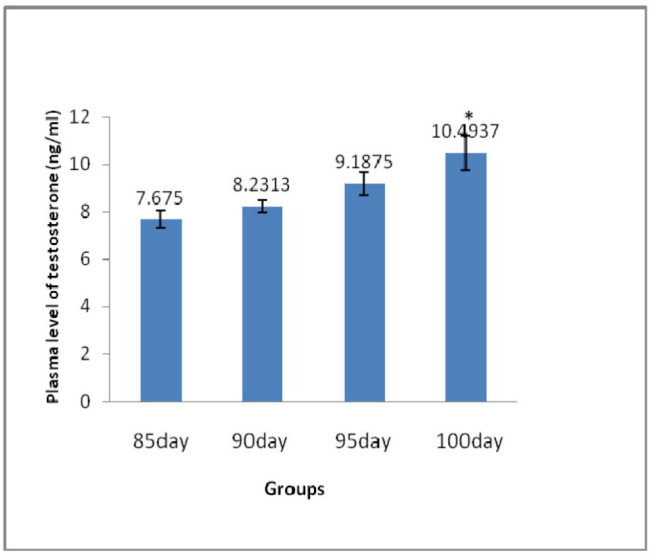
نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از این تحقیق را می توان بصورت خلاصه در نمودارهای زیر مشاهده کرد:

الف) مقایسه سطح پلاسمائی هورمون تستوسترون بین گروه کنترل و گروه های تجربی دریافت کننده فرومون ماده در دوران کودکی: در رات های نر ۵۰ روزه کودک که در کنار ماده قرار نگرفته بودند (گروه کنترل)، میانگین سطح پلاسمایی هورمون تستوسترون *ng/ml* ۲/۸۳بود که این میزان در گروه تجربی ۵۵ روزه به *ng/ml* ۲/۹۵رسید و در گروه تجربی ۶۰ روزه به *ng/ml* ۳/۰۳ و در گروه ۶۵ روزه به *ng/ml* ۳/۵۸ افزایش یافت. تنها گروه ۶۵ روزه تفاوت معنی داری در $P<0.05$ را با گروه کنترل دوران کودکی نشان داد (نمودار ۱).



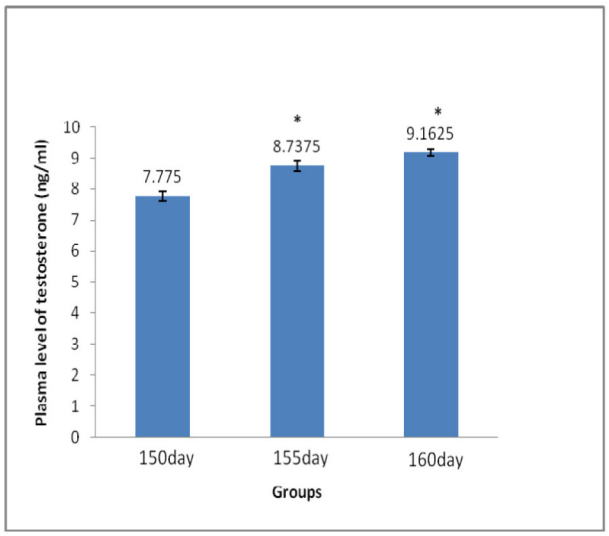
نمودار۱ – مقایسه سطح پلاسمایی هورمون تستو سترون در گروه کنترل ۵۰ روزه با گروه های تجربی۵۵ ، ۶۰ و ۶۵ روزه در رات نابالغ که در این نمودار هر ستون نمایانگر میانگین ± انحراف معیار یک گروه می باشد. تفاوت سطح هورمونی در گروه رات های ۶۵ روزه ، نسبت به گروه کنترل در $P<0.05$ معنی دار می باشد.

ب) مقایسه سطح پلاسمائی هورمون تستوسترون بین گروه کنترل و گروه های تجربی دریافت کننده فرومون ماده در دوران بلوغ: در رات های بالغ نر ۸۵ روزه که در کنار ماده قرار نگرفته بود (گروه کنترل) میزان سطح پلاسمایی تستوسترون *ng/ml* ۷/۶۷ تخمین زده شد، در حالی که در گروه های تجربی ۹۰ روزه این میزان به *ng/ml* ۸/۲۳ و در رات ۹۵ روزه به *ng/ml* ۹/۱۸ و در رات ۱۰۰ روزه به *ng/ml* ۱۰/۴۹ رسید. اختلاف سطح هورمونی نسبت به گروه کنترل در $p<0.05$ معنی دار به دست آمد (نمودار۲).



نمودار۲ – مقایسه سطح پلاسمایی هورمون تستو سترون در گروه کنترل ۸۵ روزه با گروه های تجربی۹۰ ، ۹۵ و ۱۰۰ روزه در رات بالغ که در این نمودار هر ستون نمایانگر میانگین ± انحراف معیار یک گروه می باشد. تفاوت سطح هورمونی در گروه رات های ۱۰۰ روزه، نسبت به گروه کنترل در $P<0.05$ معنی دار می باشد.

ج) مقایسه سطح پلاسمائی هورمون تستوسترون بین گروه کنترل و گروه های تجربی دریافت کننده فرومون ماده در دوران پیری: در رات بالغ نر ۸۵ روزه که در کنار ماده قرار نگرفته بود (گروه کنترل) میزان سطح پلاسمایی تستوسترون ۷/۶۷ *ng/ml* تخمین زده شد، در حالی که در گروه های تجربی ۹۰ روزه این میزان به ۸/۲۳ *ng/ml* و در رات ۹۵ روزه به ۹/۱۸ *ng/ml* و در رات ۱۰۰ روزه به ۱۰/۴۹ *ng/ml* رسید. اختلاف سطح هورمونی نسبت به گروه کنترل در هر دو گروهی که فرومون را دریافت کرده اند در $p<0.05$ معنی دار به دست آمد (نمودار۳).



نمودار۳ – مقایسه سطح پلاسمایی هورمون تستو سترون در گروه کنترل ۱۵۰ روزه با گروه تجربی ۱۵۵ روزه و ۱۶۰ روزه در رات پیر که در این نمودار هر ستون نمایانگر میانگین ± انحراف معیار یک گروه می باشد. تفاوت سطح هورمونی در هز دو گروه ، نسبت به گروه کنترل در $P<0.05$ معنی دار می باشد.

بحث

طبق نظریه Hideaki و همکارانش در سال ۲۰۰۹ فرومون های جنسی مترشحه ار رات ماده بالغ بر روی رات نر کودک تأثیر کمی دارد زیرا حس بویایی نسبت به دریافت این فرومون ها در دوران کودکی عکس العمل کمتری نشان می دهند بیشترین تأثیرات را بروی رات نر کودک فرومون های تجمع دارند(۸). نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان دهنده همین مطلب است که فرومون های جنسی ماده زمانی که در کنار رات نر قرار می گیرند بروی سطح پلاسمایی هورمون تست و سترون رات نر کودک تأثیر کمتری دارد یعنی سطح هورمون تست و سترون در رات نر کودک گروه های تجربی نسبت به گروه های کنترل افزایش کمی دیده می شود. بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیقات Grammer و همکارانش در سال ۲۰۰۵ ، تولید هورمون تستوسترون که مهمترین هورمون جنسی بیضه ها به حساب می آید از هفته

هفتم آغاز دوره جنینی در انسان آغاز می شود و بعد از تولد به کمترین میزان خود می رسد و در اواخر کودکی فرومون های بلوغ و جنسی می توانند تأثیرات فزاینده بروی میزان سطح پلاسمایی هورمون تستو سترون داشته باشند . در تحقیق حاضر نشان داده شده است سطح پلاسمایی این هورمون در رات نر کودک افزایش داشت که احتمالا این افزایش طبق یافته های Grammer و همکارانش بدلیل دریافت فرومون های رات های ماده موجود در قفس مخصوص بوده است(۷). بنابر این می توان حدس زد که فرومون ها می توانند بر روی تکوین سیستم عصبی مرکزی رات ها و اعمال یک سری تغییرات نوروواندوکرینولوژیکی نقش داشته باشد. طبق نظریه Wood در سال ۱۹۹۹ ، نرهای بالغ برای یک جفت گیری موفق هم نیاز به تستوسترون و هم به ورودی های حسی – شیمیایی بویایی نیاز دارند. رفتارهای جفت گیری را می توان با تزریق تستوسترون به نر اخته شده بازگرداند و ترشحات فرومونی رات ماده تأثیرات متنوعی بر روی رفتار نر ها دارد از جمله باعث نزدیکی و تماس ،بوییدن رفتار جفت گیری و پاسخ های هورمونی می گردد (۱۳). در این تحقیق دریافت فرومون های رات ماده توسط سیستم بویایی نر باعث افزایش سطح پلاسمایی هورمون تست و سترون در رات نر بالغ شد که نتیجه به دست آمده مؤید نظریه Wood است. Monti-Bloch و همکارانش پیشنهاد کردند که فرومون های جنسی، نوسانات LH در مردان را تحت تأثیر قرار می دهد. Jutte نیز نشان داد که یک ترکیب آبکی متشکل از ۵ اسید چرب مربوط به تخمدان ها قادر است سطح تستو سترون را در مردان افزایش دهد.(۱۱) آزمایشاتی که در تحقیق حاضر در مورد موش ها صورت گرفت نشان داد که سطح هورمون تستو سترون در رات های نر که در کنار رات ماده در قفس های مخصوص قرار گرفتند و این فرومون ها را دریافت کردند افزایش پیدا کرد. Hideaki در ادامه تحقیقاتی که بر روی تأثیر فرومون های جنسی انجام داد متوجه شد که جانوران مختلف به تحریکات مشابه، پاسخ های متنوعی میدهند که نوع پاسخی که جانور می دهد بسیار وابسته به سن و سطوح هورمونی اش می باشد. وی با قرار دادن رات های پیر در معرض فرومون های جنسی رات ماده مشاهده کرد وضعیت و شرایط محیطی برای رات نر پیر تغییر پیدا کرد و میزان تستوسترون آن نسبت به رات نرپیری که در معرض فرومون قرار نمی گرفت افزایش پیدا کرد(۸). یافته های Hideaki با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر در مورد رات های پیر مطابقت داشت. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان می دهند که فرومون های جنسی رات ماده بر روی سطح پلاسمایی فرومون تستوسترون در سنین کودکی، بلوغ و پیری تأثیر فزاینده دارند؛ به نحوی که بیشترین تأثیر را در دوران بلوغ مشاهده می کنیم و به تدریج تأثیر آن کمتر می گردد.

منابع

۱- برومنو فر سامد، فرومون ها و ارتباط شیمیایی در پستانداران، پایان نامه دکتری، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۷۰، صفحه ۳۲.

2- Cardwell JR, Stacey NE. Androgen increases olfactory receptor response to a vertebrate sex pheromone. Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and behavioral Physiology, 176(1995), 55-61.

3- Cohen-Tannoudji J, lavenet C, Locatelli A, Tillet Y. Non-involvement of accessory olfactory system in the LH response of anoestrous ewes to male odors. J.Reprod. Fert. (1989);86:135-144.

4- Cooper HM, Parvopassu F, Herbin M, Magnin M. Neuroanatomical pathways linking vision and olfaction in mammals. Psychoneuroendocrinology (1994); 19:623-39.

5- Dulac, C. Molecular Architecture Of Pheromone Sensing in Mammals. Molecular Mechanisms Influencing Aggressive Behaviours, Novartis Foundation Symposium; (2005); 268: 100-110.

6- Gillett SG. Changes in the social behaviour of the desert locust, Schistocerca gregaria, in response to the gregarizing pheromone. Animal Behaviour, Volume 23, Part 3, August 1975, Pages 494-503

7- Grammer K, Fink B,Neave N. Human pheromones and sexual attraction; European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology; (2005)
, 118(2): 135-142

8- Hideaki I, Kayo N, Yasushi K. The volatility of an alarm pheromone in male rats. Physiology & Behavior; 96 (2009) 749–752

9- Hoffman GE, Lee WS, Attardi B, Yann V, Fitzsimmons M. Luteinizing hormone releasing hormone neurons express cfos antigen after steroid activation. Endocrinology; 126(1990), 1736-41.

10- Kohl J, Atzmueller M, Fink B, Grammer K. Human Pheromones: Integrating Neuroendocrinology and Ethology; Neuroendocrinology Letters (2001); 22:309–321

11- Monti-Bloch L, Diaz-Sanchez V, Jennings-White C, Berliner D. Modulation of serum testosterone and autonomic function through stimulation of the male human vomeronasal organ (VNO) with pregna-4, 20 – diene-3,6-dione. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.; (1998) 65,237-242.

12- Sæther T, Christophersen B, Haugen T. Expression and Regulation of Δ^5-Desaturase, Δ^6-Desaturase, Stearoyl-Coenzyme A (CoA) Desaturase 1, and Stearoyl-CoA Desaturase 2 in Rat Testis; Biology of Reproduction; (2003); 69(1):117-124.