مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۰/هفته چهارم آذرماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۳۰

بررسی اثر تستوسترون بر مقدار نیتریک اکسید و فاکتور مشتق از سلول استرومایی در گردش خون محیطی رت‌های ویستار ماده

مریم مؤتمر[۱]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۲]، فرید نصر اصفهانی[۱]، زهرا سادات مرتضوی[۱]، سعیده بحرانی[۱]

چکیده

مقدمه: پیشرفت‌های اخیر در درمان بیماری‌های قلبی مدیون کشف سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی می‌باشد. نیتریک اکسید (NO یا Nitric oxide) و فاکتور مشتق از سلول‌های استرومایی (SDF-1α یا Stromal cell derived factor) در مهاجرت، جانشینی و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های اندوتلیال بالغ نقش دارند. ابتلای بیشتر مردان به بیماری‌های قلبی، نشان‌دهنده‌ی نقش هورمون‌های جنسی در این زمینه می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۲۴ رت ماده‌ی نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۱۸۰-۱۶۰ گرم در ۴ گروه شم با تزریق روغن کنجد، اواریکتومی با تزریق روغن کنجد، اواریکتومی با تزریق روزانه ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون و اواریکتومی با تزریق روزانه ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون، به طور تصادفی تقسیم شدند. پس از ۲۱ روز تزریق، NO و SDF-1α در خون رت‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت NO در گروه‌های شم، روغن کنجد، تستوسترون روزانه ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم و تستوسترون روزانه ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم به ترتیب ۱/۴ ± ۳۰/۷، ۰/۳ ± ۲۲/۴، ۱/۷ ± ۱۸/۳ (P < ۰/۰۵) و ۰/۴ ± ۱۹/۲ میکرومول در لیتر و SDF-1α در ۴ گروه گفته شده به ترتیب ۴۲/۴ ± ۱۲۵، ۱۰/۳ ± ۷۰/۶، ۱۵/۲ ± ۶۹/۴ و ۶۲ ± ۱۶۶ پیکوگرم در میلی‌لیتر خون بود (P = ۰/۶).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که افزایش تستوسترون می‌تواند با کاهش فاکتورهای محرک ترمیم عروق مانند NO در بیماری‌های قلبی مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: تستوسترون، نیتریک اکسید، فاکتور مشتق از سلول استرومایی

مقدمه

در دهه‌های اخیر دانش ما در مورد هموستاز سیستم قلب و عروق دچار تحول بنیادین شده است. این تحول، مدیون کشف سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی (EPC یا Endothelial progenitor cell) می‌باشد EPCها سلول‌هایی مشتق از مغز استخوان هستند که با القای رگ‌زایی در ارگان‌های دچار هیپوکسی و با تحریک ترمیم سلول‌های اندوتلیال در عروق آسیب‌دیده، عملکرد ارگان‌های ایسکمیک را بهبود می‌بخشند (۲-۱). بیماران با سطح پایین‌تر EPC موجود در گردش خون، خطر بیشتری برای ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی دارند (۳).

از جمله عواملی که در مهاجرت و جایگزینی EPCها نقش دارند، فاکتور مشتق از سلول استرومایی (SDF-1α یا Stromal cell derived factor) می‌باشد. SDF-1α یک کموکاین است که به وسیله‌ی سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌های اپیتلیال و میوفیبروبلاست تولید می‌شود (۴). غلظت خونی SDF-1α در مهاجرت سلول‌های هماتوپویتیک مغز استخوان به درون خون محیطی و جایگزینی آن‌ها در

[۱] دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد
Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

عروق آسیب دیده نقش دارد. این فاکتور باعث افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) و آنژیوژنز می‌شود. همچنین نئوواسکولوژنز را در اندام‌های دچار ایسکمی ارتقا می‌دهد (۶-۵). بلوک کردن SDF-1α درون‌زاد تعداد EPC را کاهش می‌دهد، تکثیر و مهاجرت EPC را مهار می‌کند و حتی باعث آپوپتوز آن‌ها می‌گردد (۷). فاکتور دیگر نیتریک اکسید (NO یا Nitric Oxide) با طیف عملکرد فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک گسترده می‌باشد. این فاکتور باعث تنظیم تون عروق و آنژیوژنز در بیماری‌های ایسکمیک و بهبود زخم و التهاب می‌شود. نقش این فاکتور در جداسازی EPCها و مهاجرت و تمایز آن‌ها به سلول‌های اندوتلیال در بافت‌های دچار ایسکمی، ثابت شده است (۸). مطالعات زیادی حاکی از آن است که هورمون‌های جنسی از طریق تغییر در سنتز و زیست دستیابی NO مشتق از اندوتلیوم، اثر خود را اعمال می‌کنند (۱۰-۹).

خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی در دو جنس متفاوت است و زنان در سنین باروری نسبت به مردان هم‌سن خود با بروز کمتری از این بیماری‌ها مواجه هستند (۱۲-۱۱). این موضوع بیانگر نقش محافظتی هورمون استروژن و تأثیر مثبت آن در تنظیم پروفایل لیپیدی می‌باشد (۳). هورمون E2 (بتا ۱۷ استرادیول) باعث مهاجرت EPCها از مغز استخوان و ارتقای عملکرد آن‌ها می‌شود (۱۴-۱۳).

سلول‌های اندوتلیال و عضله‌ی صاف عروق برای استرادیول و تستوسترون گیرنده‌های خاصی را بیان می‌کنند (۱۷-۱۵). استروژن با انتقال پیام به گیرنده‌ی آلفا و بتای استروژن (Estrogen receptor alpha and beta یا ERα و ERβ) عمل می‌کند. این گیرنده‌ها توسط سلول‌های اندوتلیال، EPCها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cell یا MSC) و عضلات صاف عروق بیان می‌شوند (۱۸). استروژن با دو مکانیسم ژنومی و غیر ژنومی بر روی سلول‌ها اثر می‌گذارد. در مکانیسم غیر ژنومی، این هورمون به واسطه‌ی فعال‌سازی سریع آنزیم eNOs اثر مستقیمی بر روی رگ‌زایی دارد. این هورمون با اتصال به گیرنده‌ی ERα موجب تکثیر سلول‌های اندوتلیال می‌شود (۲۱-۱۹). همچنین استروژن با اتصال به گیرنده‌ی ERβ موجب حفاظت از عروق ایسکمیک و کاهش آپوپتوز می‌شود (۲۲).

تعداد EPC در حال گردش با سطح E2 پلاسما در طول سیکل قاعدگی مرتبط است. این تعداد، در زنان بارور از مردان جوان و همچنین زنان پس از یائسگی بیشتر است. در عین حال هیچ تفاوتی بین تعداد EPC در زنان پس از یائسگی و مردان، با همان سن وجود ندارد (۲۳). این مشاهده که بیماری‌های قلبی- عروقی در مردان نسبت به زنان هم‌سن خود بیشتر است، احتمال این فرضیه را بالا می‌برد که تستوسترون اثر منفی بر روی سیستم قلبی و عروق دارد. این سیستم یکی از اهداف اثر آندروژن‌ها می‌باشد. معلوم نیست که کمتر بودن بیماری‌های قلبی- عروقی در زنان قبل از سن یائسگی ناشی از وجود استروژن بیشتر است یا تستوسترون کمتر. اگر چه اثر استروژن بر روی آنژیوژنز به شکل گسترده‌ای مطالعه شده است، ولی نقش آندروژن‌ها در این فرایند هنوز شکافته نشده است. تعدادی مطالعه بیانگر اثرات ارتقا دهنده و مؤثر آندروژن‌ها بر روی تعداد EPCها می‌باشد، ولی مطالعاتی که در شرایط بالینی و In vivo انجام گرفت

به طور کامل از این رابطه پشتیبانی نمی‌کند (۲۴). درمان با تستوسترون باعث افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال و تشکیل شبکه‌ی عروقی می‌شود که این اثرات در حضور آنتاگونیست گیرنده‌های آندروژن (AR یا Androgen receptor) کاهش می‌یابد. تستوسترون برون‌زاد در خرگوش‌های نر عقیم، آترواسکلروز شرایین را مهار می‌کند. همچنین کاهش تستوسترون پلاسما با افزایش سختی عروق در مردان همراه است (۱۸). در گزارش‌های قبلی، به دنبال درمان ترکیبی از آگونیست‌های آندروژنی، افزایش به نسبت کم ولی پر اهمیت در تکثیر و مهاجرت EPCها رخ داد (۲۵). در یک مطالعه، مردان هیپوگناد با کاهش تعداد EPC در گردش خون روبرو بودند که این سطح کاهش‌یافته با درمان دارویی با تستوسترون به حالت اولیه بازگشت (۲۶)، ولی در این مشاهده نمی‌توان برای این هورمون اثر مستقیمی بر روی EPCها در نظر گرفت (۳). به هر حال این یافته‌ها به شدت به روش‌های انجام‌شده بستگی دارد و اثر آندروژن‌ها بر روی حرکت EPCها هنوز نامشخص و مورد بحث است (۲۷، ۳).

با توجه به محدودیت اطلاعات در زمینه‌ی تأثیر آندروژن‌ها بر روی EPCها و مکانیسم اثر آن‌ها، ما در این مطالعه، نقش آندروژن‌ها را با اندازه‌گیری غلظت NO و SDF-1α (فاکتورهای مرتبط با مهاجرت و جانشینی EPCها) در گردش خون محیطی رت‌های ماده‌ی گنادکتومی شده، بررسی کردیم.

روش‌ها

در مطالعه‌ی تجربی حاضر، تعداد ۲۴ رت ماده‌ی نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۱۸۰-۱۶۰ گرم از انستیتو پاستورخریداری شد. کلیه‌ی مواد مورد استفاده در این طرح از شرکت سیگمای کشور آلمان تهیه گردید و در غیر این صورت به کمپانی و کشور تولید کننده اشاره شده است. رت‌های ماده پس از توزین به صورت تصادفی در ۴ گروه ۶تایی تقسیم شدند. همه‌ی حیوانات در شرایط یکسان، در قفس‌های پلاستیکی با درهای فلزی (۳ رت در هر قفس) در لانه‌ی حیوانات گروه فیزیولوژی نگه‌داری شدند. شرایط لانه از نظر دما، روشنایی (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) و دسترسی کافی به آب و غذا تحت کنترل بود. به منظور سازگاری رت‌ها، تمام آزمایش‌ها بعد از ۱ هفته استقرار کامل رت‌ها در لانه شروع شد.

گروه‌های مورد آزمون بدین ترتیب بودند: گروه ۱، رت‌هایی که در محل تخمدان آن‌ها برش جراحی ایجاد شد و بدون دستکاری تخمدان‌ها، شکاف بسته شد (Sham) و با ۰/۱ میلی‌لیتر روغن کنجد تیمار شدند؛ گروه ۲، تحت جراحی اواریکتومی دو طرفه قرار گرفتند و با ۰/۱ میلی‌لیتر روغن کنجد تیمار شدند؛ گروه ۳، تحت جراحی اواریکتومی دو طرفه قرار گرفتند و روزانه با ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون به صورت محلول در روغن کنجد تیمار شدند و گروه ۴، تحت جراحی اواریکتومی دو طرفه قرار گرفتند و روزانه با ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون محلول در روغن کنجد تیمار شدند.

گنادکتومی در سن ۴ هفتگی رت‌ها انجام شد. رت‌ها پس از توزین، با کتامین ۱۰ درصد (۷۰-۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلوزین ۲ درصد (۱۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (Alfasan، هلند) به صورت داخل صفاقی (Intraperitoneal یا IP) بیهوش شدند (۲۸). گنادکتومی بر اساس روش WaynForth

www.mui.ac.ir

انجام شد (۲۹). به طور خلاصه، به منظور جراحی اواریکتومی، رت‌ها به شکم خوابانیده شدند و در هر یک از پهلوها یک شکاف به طول ۱ سانتی‌متر ایجاد شد. بعد از کنار زدن توده‌ی چربی اطراف، لوله‌ی فالوپ و عروق همراه آن با نخ بخیه بسته و قطع گردیدند. سپس تخمدان‌ها خارج شدند و شکاف‌ها با نخ بخیه ۶/۰ دوخته شد. به منظور جلوگیری از عفونت ۰/۲ میلی‌لیتر پنی‌سیلین ۸۰۰۰۰۰ u/ml به صورت IP به رت‌ها تزریق شد. حیوانات پس از جراحی به قفس‌های خود بازگردانده شدند تا به حالت عادی بازگردند. ۲ هفته پس از عمل جراحی و حذف منبع درونی تستوسترون (حاصل از اثر آروماتاز بر استروژن)، تیمار رت‌ها آغاز شد. تمامی تزریقات روزانه به صورت زیر جلدی (Subcutaneous یا SC) و در ناحیه‌ی پشت رت‌ها صورت گرفت.

پس از ۲۱ روز (۳ هفته) تزریق (۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق) رت‌ها به روش استاندارد کشته شدند و مقدار ۵ میلی‌لیتر خون از قلب آن‌ها گرفته شد. پس از انجام هر بار خون‌گیری، نمونه‌های خون به مدت ۴۰ دقیقه در لوله‌های حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر EDTA ۱ میلی‌مولار در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند و سوپرناتانت آن‌ها استخراج شد (۳۰). نمونه‌های سرمی در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، سطح NO و SDF-1α سرم آن‌ها به ترتیب با استفاده از آزمایش ELISA و روش Griess reaction اندازه گیری شد. سنجش غلظت NO با استفاده از Promega griess reagent kit انجام شد (۳۱). همچنین برای سنجش غلظت SDF-1α، از کیت ELISA (R & D system, USA) استفاده گردید.

اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون ANOVA و پس‌آزمون LSD آنالیز شد. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین ارائه گردید. به علاوه، سطح معنی‌داری برای تمام آنالیزها $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

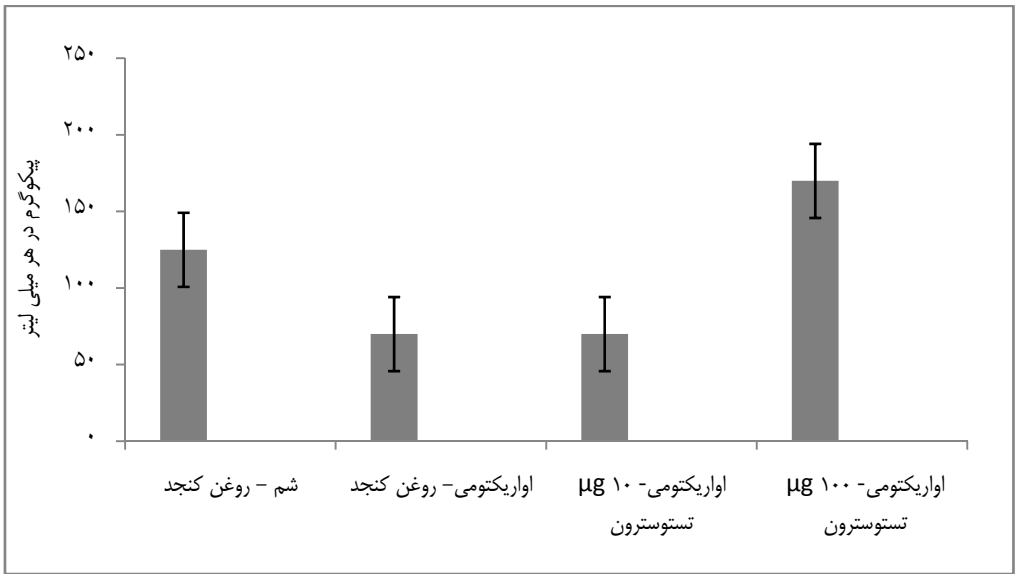
موارد اخلاقی و پروتکل اجرای این پژوهش توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بررسی و تأیید گردید.

یافته‌ها

همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری در مورد تأثیر تستوسترون در رت‌های گروه‌های آزمون نسبت به گروه شاهد نشان داد که تزریق تستوسترون در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی تستوسترون در پایان روز بیست و یکم باعث کاهش معنی‌داری در غلظت NO در گروه‌های تیمار شده با تستوسترون نسبت به گروه‌های شاهد شد.

میانگین غلظت NO در گروه Sham، اواریکتومی با تزریق روغن کنجد، اواریکتومی با تزریق روزانه ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون، اواریکتومی با تزریق روزانه ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون، به ترتیب ۱/۴ ± ۳۰/۷، ۰/۳ ± ۲۲/۴، ۱/۷ ± ۱۸/۳، ۰/۴ ± ۱۹/۲ میکرومول در لیتر بود. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با تستوسترون و سایر گروه‌ها دیده شد ($P < ۰/۰۵$).

شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین غلظت NO (Nitric oxide) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین غلظت SDF-1α (Stromal cell derived factor) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

همچنین همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، میانگین غلظت SDF-1α در گروه Sham، اواریکتومی با تزریق روغن کنجد، اواریکتومی با تزریق روزانه ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون، اواریکتومی با تزریق روزانه ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم تستوسترون، به ترتیب عبارت از ۴۲/۴ ± ۱۲۵، ۱۰/۳ ± ۷۰/۶، ۱۵/۲ ± ۶۹/۴، ۶۲ ± ۱۶۶ پیکوگرم در میلی‌لیتر خون بود. تفاوت معنی‌داری بین میانگین غلظت SDF-1α در گروه‌های مختلف تحت آزمون دیده نشد (P = ۰/۶).

بحث

NO و SDF-1α از مهم‌ترین عوامل مؤثر در آنژیوژنز و نئوواسکولوژنز می‌باشند. این عوامل موجب تحریک

مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی از مغز استخوان به درون خون محیطی و جانشینی آن‌ها در بافت‌های ایسکمیک می‌شوند. برخی مطالعات بیانگر آن هستند که تعداد EPC توسط آندروژن‌ها تنظیم می‌شود (۲۶-۲۴). با وجود این که این سلول‌ها گیرنده‌ی آندروژن را در سطح خود بیان می‌کنند ولی اطلاعات کمی در مورد اثر آندروژن‌ها بر روی EPCها وجود دارد. در مطالعه‌ی حاضر، اواریکتومی باعث کاهش معنی‌دار غلظت NO در سرم خون رت‌های ماده شد. تعدادی از مطالعات حاکی از آن است که هورمون‌های جنسی از طریق تغییر در سنتز و زیست دستیابی NO مشتق شده از اندوتلیوم اثر خود را اعمال می‌کنند (۱۰-۹). استروژن به واسطه‌ی فعال‌سازی سریع آنزیم eNOs و افزایش همانندسازی در سلول‌های اندوتلیال، اثر مستقیمی بر روی رگ‌زایی دارد (۲۰-۱۹).

در مطالعات منتشر شده‌ی محدودی که بر روی مدل‌های حیوانی انجام گرفته است، نتایج متفاوتی از تأثیر تستوسترون بر تعداد EPC و غلظت NO به دست آمده است. در یک مطالعه بیان شد که تستوسترون ممکن است اثر تحریک کننده روی تولید NO داشته باشد (۲۰). اما در مطالعه‌ی حاضر، غلظت NO سرم خون رت‌های ماده، در گروه‌های تیمار شده با تستوسترون از سایر گروه‌ها کمتر بود. نقش NO در بیماری‌های قلبی- عروقی بسیار چشمگیر و قابل توجه است (۳۲). در یک مطالعه، مردان هیپوگناد با کاهش تعداد EPC در خون محیطی روبرو بودند. این سطح کاهش‌یافته با درمان دارویی با تستوسترون به حالت اولیه بازگشت (۲۶). البته در این نتایج نمی‌توان اثر مستقیم این هورمون بر روی EPCها را در نظر گرفت. در هر حال، مکانیسم اثر آندروژن‌ها بر روی حرکت EPCها هنوز نامشخص و مورد بحث است (۳). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تستوسترون موجب کاهش غلظت NO در خون محیطی می‌شود که در حد دانش کنونی ما این اولین بار است که چنین یافته‌ای به دست آمد. مطالعات اخیر بیانگر این موضوع هستند که NO در مهاجرت و جایگزینی EPCها و رگ‌زایی مشارکت دارد (۳۲). NO همچنین می‌تواند در مسیر فسفریلاسیون، با فعال کردن فسفاتیدیل اینوزیتول و ۳- کیناز مستقل از Akt باعث تحریک و شروع مهاجرت EPCها از مغز استخوان گردد (۳۳).

فاکتور مشتق از سلول استرومایی، آنژیوژنز را القا و نئوواسکولوژنز را در اندام‌های دچار ایسکمی ارتقا می‌دهد (۵). علاوه بر این، SDF-1α باعث افزایش مهاجرت EPCها و جانشینی آن‌ها در عروق آسیب دیده می‌شود (۵). با این وجود، نتایج مطالعه‌ی حاضر بیان کننده‌ی عدم ارتباط سطح تستوسترون خون با غلظت سرمی این فاکتور بود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که تزریق تستوسترون به عنوان یکی از فاکتورهای محرک مهاجرت و جایگزینی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی و ترمیم عروق، باعث کاهش غلظت سرمی NO در رت‌های ویستار ماده‌ی اواریکتومی شده می‌شود؛ این در حالی است که غلظت این فاکتور در رت‌های سالم بیشتر است. بنابراین به نظر می‌آید که این هورمون بر بیماری‌های قلبی- عروقی اثر منفی دارد. همچنین مطابق با یافته‌های این تحقیق ارتباط مستقیمی بین هورمون تستوسترون و غلظت SDF-1α دیده نشد، هر چند برای تعمیم این نتایج در انسان و شناخت مکانیسم اثر

تستوسترون بر روی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی نیاز به مطالعات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر از مسؤولین و کارشناسان مرکز تحقیقات فیزیولوژی، بدین وسیله از کمک‌های بی‌دریغ آقایان فریدون حق‌دوست و علیرضا زندی‌فر که ما را در کلیه‌ی مراحل این پژوهش یاری کردند، صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نماییم.

References

1. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(7): 1185-9.
2. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. Circ Res 2003; 93(2): e17-e24.
3. Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, Bolego C, Pinna C, Boscaro E, et al. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. Clin Sci (Lond) 2009; 117(10): 355-64.
4. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. J Clin Invest 2007; 117(5): 1219-22.
5. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. Circulation 2004; 109(20): 2454-61.
6. Chen Y, Fu L, Han Y, Teng Y, Sun J, Xie R, et al. Testosterone replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by enhancing expression of cytokines HIF-1a, SDF-1a and VEGF. Eur J Pharmacol 2012; 684(1-3): 116-24.
7. Yin Y, Huang L, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J, et al. AMD3100 mobilizes endothelial progenitor cells in mice, but inhibits its biological functions by blocking an autocrine/paracrine regulatory loop of stromal cell derived factor-1 in vitro. J Cardiovasc Pharmacol 2007; 50(1): 61-7.
8. Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. FASEB J 2001; 15(13): 2530-2.
9. Collins P, Shay J, Jiang C, Moss J. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. Circulation 1994; 90(4): 1964-8.
10. Thompson LP, Weiner CP. Long-term estradiol replacement decreases contractility of guinea pig coronary arteries to the thromboxane mimetic U46619. Circulation 1997; 95(3): 709-14.
11. Wenger NK. Coronary heart disease: an older woman's major health risk. BMJ 1997; 315(7115): 1085-90.
12. Soybir OC, Gurdal SO, Oran ES, Tulubas F, Yuksel M, Akyildiz AI, et al. Delayed cutaneous wound healing in aged rats compared to younger ones. Int Wound J 2012; 9(5): 478-87.
13. Bulut D, Albrecht N, Imohl M, Gunesdogan B, Bulut-Streich N, Borgel J, et al. Hormonal status modulates circulating endothelial progenitor cells. Clin Res Cardiol 2007; 96(5): 258-63.
14. Foresta C, Zuccarello D, Biagioli A, de Toni L, Prana E, Nicoletti V, et al. Oestrogen stimulates endothelial progenitor cells via oestrogen receptor-alpha. Clin Endocrinol (Oxf) 2007; 67(4): 520-5.
15. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. Steroids 2004; 69(8-9): 537-42.
16. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S, et al. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. Endocrinology 2004; 145(12): 5745-56.
17. Struthers AD, MacDonald TM. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. Cardiovasc Res 2004; 61(4): 663-70.
18. Herrmann JL, Abarbanell AM, Weil BR, Manukyan MC, Poynter JA, Wang Y, et al. Gender dimorphisms in progenitor and stem cell function in cardiovascular disease. J Cardiovasc Transl Res 2010; 3(2): 103-13.
19. Leung SW, Teoh H, Keung W, Man RY. Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways. Clin Exp Pharmacol Physiol

2007; 34(8): 822-6.
20. Hillebrand U, Hausberg M, Lang D, Stock C, Riethmuller C, Callies C, et al. How steroid hormones act on the endothelium--insights by atomic force microscopy. Pflugers Arch 2008; 456(1): 51-60.
21. Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. Circ Res 2002; 90(4): 413-9.
22. Wang M, Wang Y, Weil B, Abarbanell A, Herrmann J, Tan J, et al. Estrogen receptor beta mediates increased activation of PI3K/Akt signaling and improved myocardial function in female hearts following acute ischemia. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2009; 296(4): R972-R978.
23. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection? Int J Cardiol 2009; 136(2): 200-10.
24. Sieveking DP, Lim P, Chow RW, Dunn LL, Bao S, McGrath KC, et al. A sex-specific role for androgens in angiogenesis. J Exp Med 2010; 207(2): 345-52.
25. Foresta C, Zuccarello D, de Toni L, Garolla A, Caretta N, Ferlin A. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway. Clin Endocrinol (Oxf) 2008; 68(2): 284-9.
26. Foresta C, Caretta N, Lana A, de Toni L, Biagioli A, Ferlin A, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(11): 4599-602.
27. Rubinow KB, Amory JK, Page ST. Androgens exert sexually dimorphic effects on angiogenesis: novel insight into the relationship between androgens and cardiovascular disease. Asian J Androl 2011; 13(4): 626-7.
28. Udayakumar TS, Tyagi A, Rajalakshmi M, Das SN, Hashim S, Bajaj JS. Changes in structure and functions of prostate by long-term administration of an androgen, testosterone enanthate, in rhesus monkey (Macaca mulatta). Anat Rec 1998; 252(4): 637-45.
29. Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat. Philadelphia, PA: Academic Press; 1980.
30. Quanhong L, Caili F, Yukui R, Guanghui H, Tongyi C. Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. Plant Foods Hum Nutr 2005; 60(1): 13-6.
31. Zandifar E, Sohrabi BS, Zandifar A, Haghjooy JS. The effect of captopril on impaired wound healing in experimental diabetes. Int J Endocrinol 2012; 2012: 785247.
32. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Mol Aspects Med 2005; 26(1-2): 33-65.
33. de Resende MM, Huw LY, Qian HS, Kauser K. Role of endothelial nitric oxide in bone marrow-derived progenitor cell mobilization. Handb Exp Pharmacol 2007; (180): 37-44.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 210, 4th week, December 2012 Received: 25.8.2012 Accepted: 20.11.2012

The Effect of Testosterone on the Amount of Nitric Oxide and Stromal Cell-derived Factor-1α in Peripheral Circulation of Female Wistar Rats

Maryam Motamer[1], Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD[2], Farid Nasr Esfahani[1], Zahra Sadat Mortazavi[1], Saeideh Bahrani[1]

Abstract

Background: Recent therapeutic advances in cardiovascular diseases are indebted to the discovery of endothelial progenitor cells (EPC). Nitric oxide (NO) and stromal cell derived factor-1α (SDF-1α) play roles in migration, homing, and differentiation of EPCs in mature endothelial cells. The incidence of cardiovascular diseases is higher in men than women. This fact suggests the influence of sex hormones on the pathophysiology of cardiovascular diseases.

Methods: 24 adult female Wistar rats weighing 160–180 grams were randomly divided into four groups (n = 6): 1) sham-treated by sesame oil, 2) ovariectomized (OVX)-treated by sesame oil, 3) OVX-treated by 10 µg/kg/day testosterone, 4) OVX-treated by 100 µg/kg/day testosterone. After 21 days from injection, the animals were euthanized and blood samples were stored for the determination of serum levels of NO and SDF-1α.

Findings: The serum levels of NO in sham, OVX, OVX-10 µg/kg/day testosterone, and OVX-100 µg/kg/day testosterone groups were 30.7 ± 1.4, 22.4 ± 0.3, 18.3 ± 1.7, and 19.2 ± 0.4 µmol/L, respectively. Moreover, the corresponding values for the serum level of SDF-1α were 125 ± 42.4, 70.6 ± 10.3, 69.4 ± 15.2, and 166 ± 62 pg/ml. The serum concentration of NO in testosterone treated groups was significantly lower than the other groups ($P < 0.05$). Nonetheless, there was no significant differences in SDF-1α levels between the study groups ($P = 0.6$).

Conclusion: Totally, this study suggests that testosterone might influence cardiovascular diseases by reducing vascular healing factors such as nitric oxide.

Keywords: Testosterone, Nitric oxide, Chemokine CXCL12

[1] Student of Medicine, Physiology Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Associate Professor, Physiology Research Center AND Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD, Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir