

اثرات استرس مزمن چندگانه بر ساختار بافتی بیضه موش صحرایی

فرزاد رجایی^{1*}، مریم فرد²، محمد رضا ساروخانی¹

(1) مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

(2) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

تاریخ پذیرش: 92/2/3

تاریخ دریافت: 91/6/7

چکیده

مقدمه: افزایش استرس به دنبال پیشرفت تکنولوژی به نظر می رسد که عامل بسیار مهمی در ایجاد اختلالات ارگان های بدن نظیر دستگاه تولید مثل باشد. لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی آثار استرس بر روی بیضه موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش ها: 18 سر موش صحرایی نژاد ویستار به صورت تصادفی به 2 گروه مساوی تقسیم شدند. حیوانات در گروه تحت استرس به مدت 10 روز در معرض استرس های مختلف به صورت محرومیت غذایی، محرومیت آب، بی حرکتی در دمای 4 درجه، شنای اجباری و ایزوله شدن قرار گرفتند در حالی که حیوانات گروه کنترل بدون هیچ اختلالی در قفس های خود نگهداری شدند. پس از مدت مورد نظر، حیوانات بی هوش و بیضه آن ها جدا و وزن شدند. پس از آماده کردن اسلاید های میکروسکوپی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ، ضخامت مجرای سمینفروس با برنامه نرم افزاری Image Tool در گروه های مورد مطالعه، تعیین و داده ها از نظر آماری مورد مقایسه گردید.

یافته های پژوهش: مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ در گروه تحت استرس تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل دارد. ($P < 0.001$) میانگین ضخامت مجرای سمینفروس نیز در گروه تحت استرس در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد. ($P < 0.001$)

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که استرس مزمن چندگانه می تواند با کاهش در قطر مجرای سمینفروس، تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ بر سیستم تولید مثلی موش صحرایی اثر منفی داشته باشد ولی برای تایید مطالب فوق به مطالعات بیشتری نیاز است.

واژه های کلیدی: استرس چندگانه، بیضه، موش صحرایی

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

Email: farzadraj@yahoo.co.uk

مقدمه

نشان می دهند که استرس های روحی ملایم تا شدید می توانند با کاهش میزان ترشح تستوسترون باعث اختلال در اسپرماتوژنز در افراد مذکر شوند، (24). هم چنین شواهدی وجود دارد که نشان می دهد استرس در حیوانات می تواند وزن بدن، میزان تستوسترون، رفتارهای جنسی و ویژگی های مورفولوژیک بیضه را تحت تاثیر قرار دهد. چیگوروپاتیک و همکاران نشان دادند که تمرین های بدنی منظم، باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سن در بیضه به صورت کاهش آسیب در سلول های دودمان اسپرماتوزوآ و هم چنین کاهش آسیب در سلول های لایدیگ موش می شود، (25). مطالعه فیشر و همکاران نشان داد که استرس اجتماعی می تواند باعث آسیب دستگاه تولید مثل موش صحرایی نر به صورت کاهش وزن بیضه و پروستات، کاهش قطر لوله های سمینیفروس و ارتفاع اپیتلیوم اپیدیدیم شود، (26). شرایط استرس زا با تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد باعث ایجاد عدم تعادل در سیستم اکسیدان و آنتی اکسیدان سلول ها و بافت ها می شود، (27، 28). با توجه به افزایش استرس در زندگی روزمره انسان ها و این که مطالعات کمی وجود دارد که اثرات انواع متفاوت عوامل استرس زا را بر تغییرات بافت شناختی مجاری تناسلی در حیوانات و حتی انسان نشان دهند و با توجه به نقش این مجاری در باروری، در تحقیق حاضر تاثیر انواع متفاوت عوامل استرس زا بر روی ساختار میکروسکوپی بیضه موش صحرایی نر بررسی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد 18 سر موش صحرایی نژاد ویستار با وزن تقریبی 300-200 گرم به صورت تصادفی به 2 گروه مساوی استرس و بدون استرس تقسیم شدند. گروه بدون استرس بدون هیچ اختلالی در قفس های خود در طول 10 روز درمان قرار گرفتند در حالی که در گروه تحت استرس، حیوانات به مدت 10 روز در معرض انواع مختلف استرس قرار گرفتند. عوامل استرس زا جداگانه و مدت زمان اعمال هر روز در جدول شماره 1 ذکر شده است، (12). استفاده از استرس در زمان های مختلفی از روز، به منظور به حداقل

استرس به عنوان آشفتگی روحی یا عاطفی و یا دگرگونی تعریف می شود که در پاسخ به اثرات عوامل زیان آور خارجی و هم چنین محرک یا موقعیت ایجادکننده آن رخ می دهد، (1). ناباروری یکی از مهم ترین مشکلات نسل جوان است که به طور متوسط در 10-15 درصد زوجین وجود دارد، (2) و استرس یکی از عوامل تعیین کننده در ناباروری می باشد، (3، 4، 5)، که می تواند به دلیل اختلال در اسپرماتوژنیزس تحت تاثیر عوامل استرس زا ایجاد شود، (6). افزایش استرس به دنبال پیشرفت تکنولوژی به نظر می رسد که عامل بسیار مهمی در ایجاد اختلالات ارگان های بدن نظیر دستگاه تولید مثل باشد که می تواند اثرات سویی بر روی سیستم تناسلی بگذارد، (8). برای مثال آلمیدا و همکاران کاهش میزان لقاح به دلیل استرس در موش های تحت آزمایش را گزارش کردند، (9). استرس موجب کاهش اسپرماتوژنیزس و به دنبال آن کاهش در تعداد لایه های زایای بالغ در بیضه و کاهش اسپرماتوزوآ، (10)، و عدم لقاح می شود، (11). استرس های متنوع مزمن به صورت محرومیت غذایی، محرومیت آب، بی حرکتی، شنای اجباری و ایزولیشن تعریف می شود، (12). میزان تغییرات فیزیولوژیک به دنبال تاثیر عوامل استرس زا به میزان، تناوب و طول مدت قرارگیری حیوان در آن موقعیت وابسته است، (13). عوامل استرس زا بر حسب مرحله بلوغ، می توانند باعث تقویت یا تضعیف روند تولید مثل شوند، (14). کاهش در تعداد اسپرماتوزوآ به دنبال استرس ناشی از عدم تحرک، (11)، کاهش در تعداد، تحرک و میزان لقاح اسپرماتوزوآ بعد از شنای اجباری در موش های صحرایی، (15)، و افزایش در میزان آپوپتوز در لایه های زایا و کاهش تعداد اسپرماتوزوآ در موش ها، (16)، و اسپرم زایی ناقص در موش ها و موش های صحرایی، (17، 18، 19، 20، 21، 22)، به دنبال تاثیر عوامل استرس زا مشاهده شده است. به دنبال تاثیر انواع متفاوتی از استرس های فیزیولوژیک و روان شناختی بر محور عصبی، تغییراتی در تعدادی از اعضا و بافت های بدن ایجاد می شود، (23). مطالعات

اسپرمتوگونی، اسپرمتوسیت، اسپرم و لایدیگ و ضخامت مجرای سمینفروس با برنامه نرم افزاری Image Tool در گروه های مورد مطالعه، تعیین و داده ها از نظر آماری مورد مقایسه قرار گرفتند. روش بررسی آماری: آنالیز آماری داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید. برای آنالیز داده ها از نرم افزار آماری SPSS vol.16 و آزمون t استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

همان گونه که در جدول شماره 1 دیده می شود، میانگین قطر لوله های سمینفروس بر حسب میکرون (فاصله یک نقطه در قاعده یک سلول پوششی تا نقطه متناظر بر روی قاعده سلول روبروی آن در مقطع عرضی) در بین گروه های تحت استرس در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.001$). هم چنین مقایسه داده ها تفاوت معنی داری را در میانگین تعداد سلول های اسپرمتوگونی ($P < 0.001$)، اسپرمتوسیت ($P < 0.001$) و اسپرم ($P < 0.001$) در گروه های تحت استرس و کنترل نشان می دهد. هم چنین جدول شماره 2 نشان می دهد که تفاوت معنی داری در میانگین تعداد سلول های لایدیگ در گروه تحت استرس نسبت به گروه کنترل وجود دارد. ($P < 0.001$) با این وجود هیچ گونه تغییر معنی داری در وزن بیضه ها در گروه استرس نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

رساندن قابلیت پیش بینی شدن آن شروع می شد. بی حرکتی با قرار گیری در محفظه پلاستیکی لوله ای شکلی به ابعاد 21 سانتی متر در 6 سانتی متر به انجام می رسید، به صورتی که حیوانات قادر به حرکت نبودند. شنای اجباری با قرار دادن حیوان در مخزن شیشه ای با اندازه های $44 \times 33 \times 30$ سانتی متر و با عمق 22 سانتی متر آب در دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد صورت گرفت. هم چنین غذای مناسب و آب کافی در اختیار حیوانات در هر دو گروه قرار گرفت. پس از پایان 10 روز موش های هر دو گروه با تزریق کتامین (60 mg/kg) و زایلازین (6 mg/kg) بی هوش شدند و پس از باز کردن شکم، بیضه حیوانات سریعاً جدا و وزن شدند و سپس به قطعات کوچک تقسیم و در پارافرمالدئید 10 درصد ($\text{PH} = 7.2$) به مدت 72 ساعت جهت فیکساسیون قرار داده شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی شامل فیکساسیون، آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی توسط دستگاه پردازش بافتی انجام شد. برش های نازک به ضخامت 5 میکرون توسط دستگاه میکروتوم دوار تهیه شد، و در نهایت از هر نمونه 5 برش (برش های شماره 5، 8، 11، 14 و 17)، به منظور پرهیز از شمارش مجدد یک سلول، انتخاب شد. پس از رنگ آمیزی برش ها با هماتوکسیلین و اتوزین، لام های میکروسکوپی تهیه شدند و سپس با دوربین نیکون از میدان های میکروسکوپی لام ها عکسبرداری شد و عکس ها به کامپیوتر منتقل و با برنامه نرم افزاری کامپیوتری Image Tool، تعداد سلول های

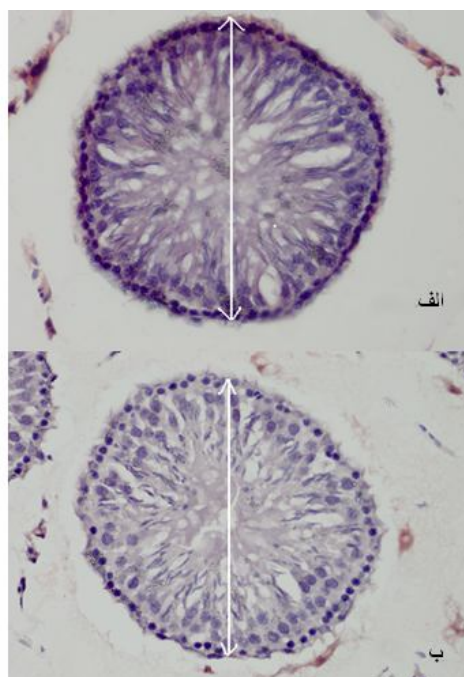
جدول شماره 1. عوامل استرس زای چندگانه ترتیبی به کار رفته در مطالعه

روزها	موارد استفاده شده	دوره
1	شنای اجباری	10 دقیقه
2	محدودیت	3 ساعت
3	محرومیت آب در دمای 3 درجه	24 ساعت
4	محدودیت در دمای 4 درجه	1/5 ساعت
5	ایزولیشن	24 ساعت
6	محرومیت غذا	24 ساعت
7	محرومیت آب	24 ساعت
8	محدودیت در دمای 4 درجه	2 ساعت
9	محدودیت غذا	24 ساعت
10	شنای اجباری	10 دقیقه

جدول شماره 2. مقایسه متغیرهای مورد مطالعه در گروه‌ها بر حسب میکرون

P	استرس	کنترل	متغیر
P<0.001	48/32±14/66	81/54±16/5	تعداد اسپرماتوگونی
P<0.001	50/75±17/33	83/72±94/2	تعداد اسپرماتوسیت
P<0.001	156/41±48/35	199/36±61/4	تعداد اسپرم
P<0.001	5/46±1/88	8/67±2/43	تعداد سلول لایدیگ
P<0.001	1033/9±95/5	1132/3±109/6	قطر لوله‌های سمینفروس

میانگین به صورت Mean±SD ارائه گردیده است



شکل شماره 1. لوله‌های سمینفروس در گروه کنترل (الف) و استرس (ب): همان گونه که مشاهده می‌شود کاهش در قطر لوله سمینفروس و همین‌طور کاهش در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرم گروه تحت استرس نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. بزرگ‌نمایی 60×

بحث و نتیجه‌گیری

این موضوع خود جای مطالعه و اندازه‌گیری دارد زیرا که مطالعات گذشته نشان دهنده این می‌باشند که وزن حیوانات به دنبال قرار گرفتن در معرض استرس کاهش می‌یابد، (37). مطالعات مشابهی که تغییرات مورفومتریک بیضه به دنبال قرارگیری در معرض استرس‌های متنوع و مزمن را نشان دهند، بسیار محدود است و بیشتر مطالعات قبلی در مورد تاثیر استرس‌های گرمایی، اکسیداتیو و اجتماعی بر روی سیستم تولید مثلی می‌باشد. فیشر و همکاران اثر استرس روانی ناشی از استرس اجتماعی را بر روی دستگاه تولید مثل 46 موش سوری نر بررسی کردند،

یافته‌های حاضر در موش‌هایی که به مدت 10 روز تحت استرس متنوع و مزمن بودند اختلاف معنی‌داری در قطر لوله‌های سمینفروس بین گروه تحت استرس و کنترل نشان داد. هم‌چنین یافته‌ها در موش‌هایی که در همین مدت تحت همان گونه استرس قرار داشتند اختلاف معنی‌داری را در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ بین گروه‌های تحت استرس و کنترل نشان داد. اما هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری بر روی وزن را نشان نداد. هم‌چنین در این مطالعه میانگین وزن بدن موش‌ها به دنبال استرس اندازه‌گیری نشده است که

موش هایی که دوره شنای اجباری را گذرانده اند، می گردد،(33). مطالعات قبلی تغییرات دژنراتیو در بیضه و کاهش اسپرما توژنیزس و به دنبال آن تغییرات آتروفیک در بافت بیضه موش های تحت استرس را نشان دادند،(34،35)، که با مطالعه حاضر همسو می باشد. بعضی از مطالعات قبلی نیز نشان می دهند که استرس های مزمن القا شده با تولید استرس اکسیداتیو سبب افزایش اسپرم های غیرطبیعی می شوند. استرس اکسیداتیو با تخریب DNA اسپرم،(36)، می تواند سبب افزایش مقدار آنتی اکسیدانت ها و افزایش پروکسیداسیون لیپیدها شود که این امر سبب تغییر شکل غیرطبیعی اسپرم ها می شود،(37). شواهد نشان می دهند که استرس باعث تولید اکسیدانت ها شده و هم چنین تعادل بین سوپراکسید دیسموتاز و فعالیت کاتالازهای دخیل در بیماری های وابسته به استرس نظیر افسردگی را به هم می زند،(38).

مطالعات قبلی نشان می دهند که استرس های مختلف می توانند به تغییرات آپوپتوتیک در سلول ها منجر شوند،(39)، ولی در مطالعه حاضر میزان آپوپتوز در لایه های زیای لوله های سمینیفروس به دنبال استرس مطالعه نشده است که پیشنهاد می شود در مطالعات آینده مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

نتایج نشان داد که استرس چندگانه ترتیبی می تواند با کاهش در قطر مجرای سمینیفروس، تعداد سلول های اسپرما توگونی، اسپرما توسیت، اسپرم و لایه های بر سیستم تولید مثل موش صحرایی اثر منفی داشته باشد ولی برای تایید مطالب فوق به مطالعات بیشتری نیاز است.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین برای تامین هزینه انجام این مطالعه تقدیر و تشکر می شود.

آن ها موش ها را به سه گروه موش های نری که از موش های ماده جدا بودند، موش های نری که قبل از جداسازی، به مدت 7 تا 50 روز با موش های ماده همزیستی داشتند و موش های نری که بعد از 50 روز همزیستی با موش های ماده فضای قفس شان برای 5 روز به نصف تقلیل یافت، تقسیم کردند. نتایج حاکی از تغییرات ضعیفی در گروه اول بود اما در دو گروه دیگر در موش های غالب (پیروز در جنگ) هیچ نشانه ای از تغییر مشاهده نشد. در موش های مغلوب (شکست خورده در جنگ) نیز کاهش قطر لوله های سمینیفروس گزارش گردید که حاکی از تاثیر استرس روانی ناشی از استرس اجتماعی بر دستگاه تولید مثل است،(30). در بررسی کیفی مطالعه حاضر، تغییرات ساختاری بر روی لوله های سمینیفروس مشاهده نشد که این می تواند به دلیل نوع متفاوت استرس و شدت آن و هم چنین متفاوت بودن نوع حیوان مورد آزمایش باشد. مطالعات بر روی سایر انواع استرس حاکی از این است که در بعضی از گروه ها کاهش اندازه قطر لوله ها می تواند به دلیل رادیکال های آزاد تولید شده به دنبال قرارگیری حیوانات در معرض استرس باشد، به طوری که میاستنیا و همکاران پیشنهاد کردند که استرس اجتماعی باعث تولید گونه های اکسیژن واکنشی می شود. گونه های اکسیژن واکنشی نیز با واکنش با بیلی روبین، سبب افزایش بیوپیرین می شود. وجود بیوپیرین نیز می تواند از نشانه های استرس اجتماعی باشد،(31). شواهدی وجود دارد که بیان می کند گلوکوکورتیکوئیدها می توانند هم بر تولید گونه های اکسیژن واکنشی و هم بر سیستم محافظ آنتی اکسیدانی اثر گذار باشند و این نشان دهنده دخالت میانجی های اکسیداتیو و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در سیستم عصبی مرکزی در پاسخ به استرس اجتماعی می باشد،(32). این مکانیسم همان گونه که بحث شد سبب آزاد شدن رادیکال های آزاد گشته و باعث کاهش تولید کاتالاز در بیضه، سمینال وزیکل و پروستات به خصوص در

References

- 1-Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 1976;115:53-6.
- 2-Shukla KK, Mahdi AA, Shankwar SN, Ahmad MK. *Mucuna pruriens* Reduces Stress and Improves the Quality of Semen in Infertile Men. *Evid Based Complement Alternat Med* 2010;7:137-44.
- 3-Kumar S, Kumari A, Murarka S, Kumar M. Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian J Exp Biol* 2009;47:615-24.
- 4-Sharpe RM Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br Med Bull* 2000;56:630-42.
- 5-Negro-Vilar A. Stress and other environmental factors affecting fertility in men and women; overview. *Environ Health Perspect* 1993;101:59-64.
- 6-Cordelli E, Freseghna AM, Leter G, Eleuteri P, Spano M. Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation. *Radiat Res* 2003;160:443-51.
- 7-Woolverton WL, Ator NA, Beardsley PM, Carroll ME. Effects of environmental conditions on the psychological wellbeing of primates. *Life Sci* 1989;44:901-17.
- 8-Ishida H, Mitsui K, Nukaya H. Study of active substances involved in skin dysfunction induced by crowding stress. Effect of crowding and isolation on some physiological variables, skin function and skin blood perfusion in hairless mice. *Biol Pharm Bull* 2003;26:170-81.
- 9-Mingoti GZ, Pereira RN, Monteiro CMR. Fertility of male adult rats submitted to forced swimming stress. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:677-81.
- 10-Rai J, Pandey SN, Srivastava RK. Effect of immobilization stress on spermatogenesis of Albino rats. *J Anat Soc India* 2003;52:55-7.
- 11-Potemina TE. Impairment of spermatogenesis in male rats during stress. *Bull Exp Biol* 2008;145:700-3.
- 12-Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 2001;197:13-24.
- 13-Fortes ZB, Garcia Leme J, Scivoletto R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: possible role of insulin on the endothelial cell. *Br J Pharmacol* 1984;83:635-43.
- 14-Bickley LK, Brown AR, Hosken DJ, Hamilton PB, Le Page G, Paull GC, et al. Interactive effects of inbreeding and endocrine disruption on reproduction in a model laboratory fish. *Evol Appl* 2013;6:279-89.
- 15-Saki G, Rahim F, Alizadeh K. Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. *J Hum Reprod Sci* 2009;2:72-5.
- 16-Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997;18:159-65.
- 17-Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Paul IM. Single exposure to heat induces stage specific germ cell apoptosis in rats: role of intra testicular testosterone on stage specificity. *Endocrinol* 1999;140:1709-17.
- 18-Paul C, Murray AA, Spears N. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reprod* 2008;136:73-84.
- 19-Setchell BP. The effect of heat on the testes of mammals. *Anim Reprod* 2006;3:81-91.
- 20-Setchell BP, Ekpe G, Zupp JL, Surani MA. Transient retardation in embryo growth in normal female mice made pregnant by males whose testes had been heated. *Hum Reprod* 1998;13:342-7.
- 21-Somwaru L, Li S, Doglio L, Goldberg E, Zirkin BR. Heat-induced apoptosis of mouse meiotic cells is Chronic stress and spermatogenesis in rat suppressed by ectopic expression of testis specific calpastatin. *J Androl* 2004;25:506-13.
- 22-Vera Y, Rodriguez S, Castanares M, Lue Y, Atienza V. Functional role of caspase in heat induced testicular germ cell apoptosis. *Biol Reprod* 2005;72:516-22.
- 23-McDonald DM, Bowden JJ, Baluk P, Bunnnett NW. Neurogenic inflammation. A model for studying efferent actions of sensory nerves. *Adv Exp Med Biol* 1996;410:453-62.
- 24-Mc Grady AV. Effects of psychological stress on male reproduction: a review. *Arch Androl* 1984;13:1-7.
- 25-Chigurupati S, Son T, Hyun DH, Lathia J, Mughal M, Savell J, et al. Lifelong run-

- ing reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. *J Endocrinol* 2008;199:333-41.
- 26-Fischer HD, Heinzeller T, Raab A. Gonadal response to psychosocial stress in male tree shrews (*Tupaia belangeri*) morphometry of testis, epididymis and prostate. *Andrologia* 1985;17:262-75.
- 27-Bano F, Singh RK, Singh R, Siddiqui MS, Mahdi AA. Seminal plasma lipid peroxide levels in infertile men. *J Endocrinol Reprod* 1999;3:20-8.
- 28-Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8:851-62.
- 29-Grissom N, Kerr W, Bhatnagar S. Struggling behavior during restraint is regulated by stress experience. *Behav Brain Res* 2008;191:219-26.
- 30-Wischmann T, Thorn P. (Male) infertility: what does it mean to men? New evidence from quantitative and qualitative studies. *Reprod Biomed* 2013;4:41-8.
- 31-Miyashita T, Yamaguchi T, Motoyama K, Unno K. Social stress increases biopyrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349:775-80.
- 32-Gonçalves L, Dafre AL, Carobrez SG, Gasparotto OC. A temporal analysis of the relationships between social stress, humoral immune response and glutathione-related antioxidant defenses. *Behav Brain Res* 2008;192:226-31.
- 33-Mishra DS, Maiti R, Bera S, Das K, Ghosh D. Protective effect of composite extract of *Withania somnifera*, *Ocimum sanctum* and *Zingiber officinale* on swimming induced reproductive endocrine dysfunction in male rat. *IJPT* 2005;4:110-7.
- 34-La Rosa-Rodriguez E, Le Clesiau H, Dubois G, Izard JL, Bonin M, Bordron J, et al. [Assessment of job stress after implementation of prevention measures in a pension fund]. *Sante Publique* 2013;25:59-67.
- 35-Mirilas P, Panayiotides I, Mentessidou A, Mavrogenis G, Kontis E, Lainas P, et al. Effect of testis nondescent or orchidopexy on antisperm antibodies and testis histology in rats. *Fertil Steril* 2010;94:1504-9.
- 36-Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23:737-52.
- 37-Aydin Y, Ozatik O, Hassa H, Ulusoy D, Ogut S, Sahin F. Relationship between oxidative stress and clinical pregnancy in assisted reproductive technology treatment cycles. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:765-72.
- 38-Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 2009;54:358-62.
- 39-Wan H, Mruk DD, Wong CK, Cheng CY. Targeting testis-specific proteins to inhibit spermatogenesis: lesson from endocrine disrupting chemicals. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:839-55.



The Effects of Chronic Multiple Stress on Histologic Structure of Rat Testis

Rajaei F^{1*}, Fard M², Sarokhani M.R¹

(Received: 28 Aug. 2012

Accepted: 23 Apr. 2013)

Abstract

Introduction: The increase of stress following the technological improvements appears to be an important factor that causes organs disorders. The present study was conducted to investigate the effects of chronic stress on the testes of Wistar rats.

Materials & Methods: 18 Wistar rats were divided randomly into two equal groups. The animals under stress were exposed to different multiple stress such as forced swimming, restraint, water deprivation, isolation and food deprivation for 10 days while the animals in control group were kept in their cages without any stress. After the stress time, all animals were anesthetized and their testes were removed and weighed. After preparing microscopic slides and staining with Hematoxiline and Eosin, the number of spermatogonia, spermatocytes, sperm/leydig cells, and thickness of the seminiferous tubule were determined using Image Tool software in the studied

groups. Finally the data were compared statistically.

Finding: The present study showed that the mean number of spermatogonia, spermatocytes, sperm and leydig cells in the stress group were significantly decreased compared to the control group ($P < 0.001$). Moreover, the mean thickness of seminiferous tubule in the stress group was significantly decreased compared to the control group. ($P < 0.001$)

Discussion & Conclusion: Our study showed that chronic multiple stress could have negative effects on rat testis by reducing the number of spermatogonia, spermatocytes, sperm, leydig cells and thickness of seminiferous tubule but more studies are needed to confirm these results.

Keywords: chronic multiple sequential stress, testis, rat

1. Cellular & Molecular Research Centre, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

2. Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

* (corresponding author)