Original Article

بررسی اثر استرس بی‌حرکتی بر هورمون‌های محور HPG (هیپوتالاموس – هیپوفیز – گنادی) و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی

احمد مظفر[۱*]،مجتبی کشاورز [۱و۴]، پروین زارعیان[۲]، حبیب اله جوهری[۳]، حسین کارگر جهرمی[۵]، شیرزاد حسینی[۶]

۱-گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران.
۲-گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران.
۳-گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاداسلامی، واحدداراب، داراب، فارس، ایران.
۴- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی شیراز ، فارس ،ایران.
۵- مرکز تحقیقات زئونوز، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.
۶- دانشگاه پرستاری و مامایی حضرت فاطمه (س)، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ، شیراز ، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۵/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: استرس تاثیرات مختلفی بر فرآیندهای زیستی موجودات زنده می‌گذارد در این مطالعه اثر استرس بی‌حرکتی بر میزان ترشح هورمون‌های محور HPG و همچنین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در موش‌های صحرایی نر بالغ را مورد بررسی قرار داده ایم.

مواد و روش‌ها: ۳۰ سر موش صحرایی نر در ۳ گروه قرار داده شدند. گروه کنترل: بدون استرس و گروه های بی‌حرکتی ۷ روزه و ۱۴ روزه: که به ترتیب ۷ و ۱۴ روز و روزانه به مدت ۲ ساعت تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند. در پایان دوره مستقیما از قلب حیوان خون‌گیری انجام شد. غلظت هورمون‌های LH، GnRH و تستوسترون در سرم با روش الیزا اندازه‌گیری شد. همچنین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه موش‌های صحرایی نر بالغ مورد بررسی قرار گرفت نتایج توسط تست آماری واریانس یک طرفه و دانکن در سطح $P\leq0.05$ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که استرس بی‌حرکتی باعث کاهش معنی‌دار غلظت هورمون‌های GnRH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل گردید، همچنین استرس بی‌حرکتی ۱۴ روزه باعث کاهش معنی‌دار سلول‌های اسپرماتوگونی گردید.

نتیجه‌گیری: نتیجه این مطالعه نشان داد که استرس بی‌حرکتی باعث تاثیر مهاری بر محور HPG و همین‌طور باعث اثر منفی بر فرایند اسپرماتوژنز می‌گردد.

کلمات کلیدی: استرس بی‌حرکتی، محور HPG، موش صحرایی نر بالغ، اسپرماتوگونی

مقدمه

بررسی علل و عوامل ایجاد کننده ناباروری در مردان و چگونگی جلوگیری از ایجاد ناباروری در یک جامعه کمک ارزنده‌ایی به بیمارانی است که از ناباروری رنج می‌برند. استرس از جمله مواردی است که هر موجود زنده‌ای در طول حیات خود با آن روبرو می‌شود هر چند که استرس به نوعی برای ادامه‌ی حیات ما ضروری است اما این پدیده خود موجب عوارض ناخواسته و منفی بسیاری بر روی بدن ما می‌گردد. مشاهده می‌کنیم که همه ساله تعداد بسیار زیادی از افراد مجبور به تحمل بی‌حرکتی می‌گردند که این بی‌حرکتی می‌تواند به دلیل شکستگی قسمتی از بدن یا جراحی یا آسیب به اندام حرکتی و یا علل دیگر باشد. صرف نظر از دلیل بیماران برای بی‌حرکتی این نوع استرس می‌تواند عوارض نا خواسته‌ای برای فرد داشته باشد در تحقیقات بسیاری که در مورد استرس انجام گرفته است شواهدی بر تاثیر استرس‌های گوناگون مانند استرس صوتی بر روی ترشح هورمون‌های جنسی وجود دارد به عنوان مثال در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ در کشور ژاپن انجام گرفت مشخص گردید که استرس صوتی باعث کاهش سطح تستوسترون خون در مردان می‌گردد (۸). در موردی دیگر موش‌های صحرایی که تحت استرس آب سرد قرار گرفته بودند کاهش سطح تستوسترون خون آن‌ها گزارش شد (۳). در مواردی که حیوانات تحت استرس روانی قرار گرفته بودند نیز تغییراتی در سطح بعضی از هورمون‌های از جمله هورمون‌های جنسی گزارش شد مانند تحقیقی که توسط شان تاک در سال ۲۰۱۰ در رابطه با اثر استرس حاد قرار گرفتن در معرض گاو نر بر گاو ماده انجام شد و نشان داد که این نوع استرس باعث بالا رفتن میزان هورمون کورتیزول و همچنین باعث پایین آمدن میزان هورمون LH می‌گردد (۱۲). از سوی دیگر می‌دانیم که عملکرد دستگاه تناسلی بشدت تحت

* نویسنده مسئول: احمد مظفر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم،ایران.
تلفن: ۰۹۱۷۴۳۲۷۶۵۷ Email: ahmadmozafar77@yahoo.com

تاثیر هورمون‌های مترشحه از محور HPG می‌باشد به عنوان نمونه تستوسترون که توسط سلول‌های لایدیگ ترشح می‌شود برای رشد و تقسیم سلول‌های ژرمینال که اولین مرحله در تشکیل اسپرماتوزوئید می‌باشد ضروری است (۹). با توجه به اهمیت تاثیر استرس در زندگی انسان امروز و با توجه به این واقعیت که بعضی از انواع استرس می‌توانند بر میزان ترشح تعدادی از هورمون‌های جنسی و متعاقبا بر عملکرد دستگاه تولید مثلی تاثیر گذار باشند هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر استرس بی‌حرکتی بر غلظت هورمون‌های GnRH LH، و تستوسترون و همین طور تعداد سلول‌هـای اسپرماتوگونی در موش‌های صحرایی آزمایشگاهی می باشد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه‌ی تجربی حاضر، از ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات در خانه‌ی حیوانات واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور – ۱۲ ساعت تاریکی و دمای۲±۲۲ درجه سانتی گراد) نگه داری شدند. این حیوانات به طور تصادفی در ۳گروه به شرح زیر قرار داده شدند.

۱) گروه کنترل
۲) گروه تجربی ۱
۳) گروه تجربی ۲

در گروه کنترل هیچ گونه استرسی بر موش‌های صحرایی (Rat) اعمال نگردید. در گروه تجربی ۱ موش‌های صحرایی به مدت ۷ روز تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند و در گروه تجربی ۲ موش‌های صحرایی به مدت ۱۴ روز تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند.

طریقه‌ی القای استرس بی‌حرکتی: برای القای استرس بی‌حرکتی از مهار کننده‌های مخصوص از جنس ماکرولون شفاف که متناسب با اندازه‌ی موش‌های صحرایی انتخاب گردیده بود به نحوی که موش‌های صحرایی درون آن قابلیت حرکت را تا حد ممکن از دست دهند. موش‌های صحرایی را در ساعت مشخصی از روز به مدت ۲ ساعت در درون این مهار کننده‌ها قرار داده و تا حد امکان از تاثیر عوامل استرس‌زای دیگر مانند سر و صدا و تغییرات نوری و یا تغییرات دمایی بر آن‌ها جلوگیری به عمل می‌آمد. پس از پایان القای استرس موش‌های صحرایی به قفس‌های خود که بصورت گروه‌های ۵ تایی در آن‌ها قرار داشتند برگردانده می‌شدند. به ترتیب پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز از گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نمونه‌گیری انجام گردید.

خون‌گیری به روش خون‌گیری مستقیم از قلب انجام گردید و پس از جداسازی سرم به وسیله ی سانتریفیوژ تست غلظت هورمون‌های GnRH و LH به وسیله کیت‌های مخصوص موش صحرایی و تستوسترون به روش الایزا بر روی سرم‌ها انجام گرفت.

روش جدا کردن نمونه‌ی بافتی: پس از برش دادن قسمت پایین بدن موش‌های صحرایی و خارج کردن بیضه‌ی چپ و جدا کردن اپیدیدیم از آن بدون آسیب زدن به بافت بیضه نمونه در محلول تثبیت کننده‌ی تثبیت کننده بوئن قرار داده شد.

بررسی‌های بافتی بیضه: بیضه چپ قرارداده شده در فیکساتیو بوئن را از محلول خارج کرده سپس بافت باپارافین قالب‌گیری و با استفاده از میکروتوم مقاطع باضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ آمیزی گردید. لام‌های رنگ‌آمیزی شده بامیکروسکوپ نوری و از لحاظ مشخصه زیر توسط فردی که از گروه بندی اطلاع ندارد مورد شمارش قرار گرفت: در هر نمونه تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در ۱۲ لوله اسپرم ساز با بزرگنمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری بررسی گردید. اعداد به دست آمده به صورت میانگین تعداد سلول‌ها درهرلوله بیان گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تحلیل داده‌ها از برنامه نرم افزاری SPSS نسخه ۱۶ و برای مقایسه گروه‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن استفاده شد. بر اساس تست دانکن اگر در هر گروه حداقل یک حرف مشترک وجود داشته باشد در این حالت اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. مقدار $P \leq 0.5$ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد. میانگین و انحراف معیار داده‌ها محاسبه شدند.

نتایج

سطح غلظت سرمی هورمون GnRH: یافته‌های مربوط به غلظت هورمون GnRH نشان داده که هر دو گروه تجربی کاهش معنی‌دار سطح هورمون نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. این کاهش در گروه تجربی ۲ (استرس بی‌حرکتی ۱۴ روزه) نسبت به گروه تجربی ۱ (استرس بی‌حرکتی ۷ روزه) بیشتر بوده است و این نوع استرس با افزایش مدت استرس باعث کاهش هورمون GnRH گردید (جدول ۱).

جدول ۱ ـ مقایسه‌ی میانگین غلظت سرمی هورمون‌های GnRH ،LH و تستوسترون و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد مطالعه

پارامتر	گروه ها		
	کنترل	تجربی ۱	تجربی ۲
هورمون GnRH pg/ml	۸۶/۶۰±۶/۳۶	۲۸/۲۰±۶/۷۱*	۶/۱۴±۱/۱۳*
هورمون LH Iu/ml	۰/۱۱±۰/۰۰۸	۰/۰۹۰±۰/۱۱۷	۰/۰۹۴±۰/۱۱۳
هورمون تستوسترون pg/ml	۴/۹۰±۰/۲۳	۲/۸۱±۰/۳۸*	۰/۹۱±۰/۱۲*
تعداد سلول اسپرماتوگونی	۶۷/۴۷±۰/۳۷	۶۹/۸۶±۲/۶۵	۵۹/۱۱±۱/۶۷*

داده‌های جدول بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین ۱۰ موش صحرایی در هر گروه آورده شده است سطح اختلاف معنی‌دار $P \leq 0.5$ است. علامت ستاره بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

سطح غلظت سرمی هورمون LH: علی رغم کاهش سطح هورمون LH این کاهش در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبوده است (جدول ۱).

سطح غلظت هورمون سرمی تستوسترون: کاهش معنی‌دار در هر دو گروه تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. همچنین استرس بی‌حرکتی به مدت ۱۴ روز نسبت به استرس بی‌حرکتی به مدت ۷ روز تاثیر شدیدتری بر روی روند کاهش سطح هورمون تستوسترون نشان داد (جدول ۱).

تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی: استرس بی‌حرکتی ۱۴ روزه باعث کاهش معنی‌دار در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نسبت به گروه کنترل شد (جدول ۱).

بحث و نتیجه گیری

بر اساس مطالعات انجام شده مشخص گردید که در پاسخ به ۳ ساعت استرس بی‌حرکتی میزان بیان ژن (RFRP (RF-amide related peptides و RFRP mRNA در هیپوتالاموس بالا می‌رود و RFRP نیز نقش موثری در مهار ترشح GnRH دارد (۶)، در مطالعات اخیر مشخص گردیده که استرس بستن پا (foot shock) به مدت ۵ ساعت در چهار روز متوالی می‌تواند میزان GnRH-mRNA را به میزان معنی‌داری در حیوانات پایین بیاورد (۳) در مطالعات فرین در سال ۱۹۹۹ بر روی اثر استرس‌های روانی بر روی انسان مشخص گردید که این نوع استرس‌ها باعث بروز مکانیسم‌های مهاری در هیپوتالاموس می‌گردند و میزان GnRH را کاهش می‌دهد (۷).

هورمون LH توسط یک دسته سلول به نام گنادوتروپ ها در هیپوفیز قدامی ترشح می‌گردد در فقدان کامل ترشح GnRH گنادوتروپ ها تقریبا هیچ گونه LH ترشح نمی‌کنند (۹) جانسون و همکاران در سال ۱۹۸۸ در تحقیقات خود بر روی دانش آموزان قبل و بعد از استرس ناشی از امتحان متوجه شدند که استرس باعث پایین آمدن سطح LH در پلاسمای خون افراد مورد آزمایش می‌گردد (۱۰). تحقیقات تیلبروک و همکاران ایشان در سال ۱۹۹۹ در دانشگاه موناش بر روی گوسفند مشخص نمود در گوسفندهای نر در اثر استرس بی‌حرکتی به مدت ۴ ساعت میزان LH کاهش می‌یابد (۱۳). کیربی در سال ۲۰۰۹ در استرالیا تحقیقی در ارتباط با اثر استرس بی‌حرکتی بر روی گوسفند ماده انجام داد که نتیجه‌ی آن کاهش سطح LH بود. ایشان در این تحقیق بیان نموده‌اند که این کاهش به دلیل تاثیر گذاری استرس از راه ترشح کورتیزول و اثر آن به وسیله گیرنده‌ی نوع دو گلوکوکورتیکوئید بر روی عملکرد GnRH است که با این عمل باعث کاهش میزان LH می‌گردد (۶). استاکپول در سال ۲۰۰۳ در تحقیقی که بر روی گوسفندان انجام داد به این نتیجه رسید که استرس محدود کننده باعث کاهش میزان سطح LH در نمونه‌های تحت استرس می‌گردد (۱۱).

تستوسترون توسط سلول‌های میان بافتی لیدیگ در بیضه ترشح می‌گردد اما ترشح آن فقط در هنگامی انجام می‌شود که این سلول‌ها توسط هورمون لوتئینی از غده‌ی هیپوفیز قدامی تحریک شوند. تستوسترون با تاثیر بر روی هیپوتالاموس و تنظیم ترشح GnRH می‌تواند اثر مهاری روی LH داشته باشد (۹). تحقیقات آلمیدیا و همکاران در سال ۱۹۸۸ بر روی استرس بی‌حرکتی به مدت ۶ ساعت در روز برای یک دوره ۶۰ روزه در موش‌های نژاد ویستار نشان داد که استرس باعث کاهش میزان LH به میزان ۲۹٪ و تستوسترون به میزان ۳۷٪ در خون موش‌های صحرائی می‌گردد (۲). در مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۳ مشخص گردید استرس آب سرد باعث کاهش میزان تستوسترون پلاسمای خون در موش‌های صحرایی نر می‌شود (۳) در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت مشخص گردید که استرس صوتی باعث کاهش تستوسترون در مردان می‌گردد (۸) تستوسترون که توسط سلول‌های لایدیگ ترشح می‌شود برای رشد و تقسیم سلول‌های ژرمینال که اولین مرحله در تشکیل اسپرماتوزوئید می‌باشد ضروری است (۹). روشن است که در این تحقیق به دنبال استرس به دلیل کاهش سطح تستوسترون تغییرات در فرایند اسپرماتوژنز آغاز گردیده است.

جان ایتکن در سال ۲۰۰۸ بیان می‌دارد که اسپرماتوژنزیس یک فرایند بسیار پویا هست و به همین نسبت در مقابل عوامل کنش‌زا حساس است به عنوان مثال استرس اکسیداتیو باعث تاثیر منفی روی اسپرماتوگونی و لایدیگ می‌گردد (۱). بنابراین این احتمال وجود دارد که استرس بی‌حرکتی می‌تواند باعث تاثیر منفی بر ترشح هورمون‌های محور HPG و فرایند اسپرماتوژنز گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از پرسنل محترم بخش تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم اعلام می‌دارند.

References

1. Aitkencheng J, Shaun D. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes [internet][place unknown].2008.Available from:.http://www.landesbioscience.com/pdf/09.2008
2. Almeida S, Petenusci JA, Anselmo-Franci AAM, Rosa-e-Silva. Decreased spermatogenic and androgenic testicular functionsin adult rats submitted to immobilization-induced stressfromprepuberty. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.1988; 31(3): 1443-1448.
3. Bozena B, Felice P, Stefano A, Alessandro D, Mario C, Guido F, et al. Effect of Different Chronic Intermittent Stressors and Acetyl-Carnitine on Hypothalamic β-Endorphin and GnRH and on Plasma Testosterone Levels in Male Rats. Neuroendocrinology. 1993;57(6):985-90.
4. Brzozowskia T, Konturekb PC , Konturek SJ, Kwiecieńa S, Drozdowicza D, Bielanskia , et al. Exogenous and endogenousghrelin in gastroprotection against stress-induced gastricdamage.http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011504000503:2004
5. Ciechanowska M, Lapot M, Malewski T, Misztal T, Mateusiak K, Przekop F. Effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the preoptic area-hypothalamus and GnRH-R gene in the stalk/median

eminence and anterior pituitary gland in ewes during follicular phase of the estrous cycle. Acta Neuro biol Exp (Wars). 2007;67(1):1-12.
6. Elizabeth D,K, Graghty A, Ubuka T, Bentley G, Kaufer D. Stress increases putative gonadtropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. PNAS. 2009:106(27): 11324-11329.
7. Ferin M . Stress and the Reproductive Cycle. JCEM. 1999;84(6):1768-74.
8. Fuki H, Masako Y. The effect of music and visual stress on testosterone and cortisol in men and women. Neuroendocrinology. Neuro Endocrinol Lett. 2003; 24(3-4):173-80.
9. Guyton A C, Hall J E. Textbook of medical physiology.11th ed. philadelphia: Elsiversaunders; 2006.P.996-1006.
10. Johansson G, Laakso M, Peder M, Karonen L. Examination Stress Decreases Plasma Level of Luteinizing Hormone in Male Students. Psychosomatic Medicine. 1988;50(3):286-294.
11. Stackpole C A,Turner I, Clarke I, Lambert, Tilbrook AJ. Seasonal Differences in the Effect of Isolation and Restraint Stress on the Luteinizing Hormone Response to Gonadotropin-Releasing HormoneinHypothalamopituitary Disconnected, Gonadectomized Rams and Ewes. Biology of Reproduction. 2003; 69(4):1158-1164.
12. Tauck S, Olsen J, Wilkinson J, Wedlake R, Davis K, Berardinel J. Characteristics of temporal patterns of cortisoland luteinizing hormone in primiparous, postpartum, anovular, suckled, beef cows exposed acutely to bulls. available from: http://www.rbej.com/content/8/1/89.2010
13. Tilbrook, Canny B J, Serapiglia M D, Ambrose T J, Clarke I J. Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/re straint stress in gonadectomised rams and ewes is influenced by sex steroids. J Endocrinol. 1999;160(3):469-81.

Original Article

The Effect of Immobilization Stress on the HPG Axis (Hypothalamic - Pituitary - Gonad) Hormones and the Number of Spermatogonia

Mozafar A[1*], Keshavarz k[1, 4], Zareian P[2], Johary H[3],Kargarjahromi H[5], Hoseini S[6]

1- Department of biology, Islamic Azad University, Jahrom, Fars, Iran.
2- Physiology Department, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Biology Department, Darab Azad University, Darab, Iran.
4- Young Researcher club Elite, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
5- Zoonoses Research Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran.
6- Intensive Care Nurse, fatemeh (P.B.U.H) School of Nursing and Midwifery Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 03 Jun 2013 Accepted: 15 Aug 2013

Abstract

Background & Objective: Stress has different effects on the living organisms. In this study the effect of immobilization stress the HPG (hypothalamic - pituitary - gonad axis) hormones secretion and the number of spermatogonia was studied in adult male rats.

Materials & Methods: 30 male rats were divided into 3 groups. The Control group: who were not exposed to any kind of stress, and two experimental 7 and 14 day groups which respectively received 2 hours of immobilized stress over 7 and 14 day stress periods, blood samples were collected directly from the heart of the animals, Hormones GnRH, LH and testosterone levels were measured by ELISA. The number of spermatogonia in the testes of adult male rats were counted. We used ANOVA and Duncan's test results in $p \leq 0.05$ for statistic analyze test.

Results: The results showed that immobilization stress significantly decreased concentrations of GnRH and testosterone hormones compared with the control group. Also the 14-day immobilization stress caused a significant reduction in spermatogonia cells.

Conclusion: The results of this study indicate that the inhibitory effect of immobilization stress on the HPG axis may also cause negative effects on the spermatogenesis process.

Keywords: **Immobilization Stress, HPG Axis, Adult Male Rat, Spermatogonia**

*** Corresponding author: Mozafar Ahmad,** Department of biology, Islamic Azad University, Jahrom, Fars, Iran.
Tel:+98 917 4327657
Email: ahmadmozafar77@yahoo.com