

장기간의 고정화 스트레스가 정자형성과 테스토스테론 합성에 미치는 영향

The Effect of Long-term Immobilization Stress on Spermatogenesis and Testosterone Production

Jae Sang Joo, Kwangsung Park, Kyu Youn Ahn¹, Yang Il Park

From the Departments of Urology and ¹Anatomy, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Purpose: The aim of this study was to investigate the effects of long-term immobilization stress on spermatogenesis and testosterone production in a rat model.

Materials and Methods: Thirty randomly selected adult male rats were divided into 6 groups: immobilization stress groups (I, III, V) and control groups (II, IV, VI). In the immobilization stress groups, 15 rats were immobilized in a steel cage for 6 hours per day for 14 days. Groups I and II were sacrificed just after finishing the immobilization session. Groups III and IV were sacrificed after a 1 week resting period. Groups V and VI were sacrificed after a 2 week resting period. The serum concentrations of corticosterone, luteinising hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and testosterone were measured. Specimens of the testis were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome.

Results: Following 2 weeks of immobilization, the serum concentration of corticosterone was significantly increased; whereas, the serum concentrations of LH and testosterone were decreased. However, the serum FSH concentration remained unchanged. After the 1 week resting period, there were significant recoveries in the serum concentrations of corticosterone, LH and testosterone. From the histology of the immobilization group, the mean testicular biopsy score (Johnsen score) was significantly decreased, but the mean value of the seminiferous tubule luminal diameter was significantly increased; whereas, that of the seminiferous tubule diameter remained unchanged. These changes slowly recovered after the resting period.

Conclusions: These results suggest that the exposure to long-term immobilization impairs spermatogenesis and androgenic testicular functions in rats. (Korean J Urol 2006;47:1197-1203)

Key Words: Immobilization, Testosterone, Spermatogenesis

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 11 호 2006

전남대학교 의과대학 비뇨기과학교실,
¹해부학교실

주제상 · 박광성 · 안규윤¹ · 박양일

접수일자 : 2006년 6월 5일
채택일자 : 2006년 7월 26일

교신저자: 박광성
전남대학교병원 비뇨기과
광주광역시 동구 학동 8번지
☎ 501-757
TEL: 062-220-6703, 6700
FAX: 062-227-1643
E-mail: kpark@chonnam.ac.kr

서 론

남성불임의 원인에는 특발성인 경우를 제외하고 정계정맥류, 정로 폐색, 염색체이상, 감염성 질환, 외상, 정류고환, 고프로락틴혈증, 역행성 사정 등이 있다.¹ 그 외에도 남성생식능력에 영향을 줄 수 있는 요인으로는 생활습관, 환경오염물질, 비만, 음낭고온노출, 스트레스 등이 언급되고 있

다.²⁻⁸ 이중 스트레스는 레닌안지오텐신시스템과 시상하부-뇌하수체부신축을 활성화하여 교감신경계와 부신수질에서 에피네프린과 노르에피네프린 분비를 증가시키고, 시상하부에서 부신피질자극호르몬분비호르몬과 바소프레신의 분비를 촉진시키며, 뇌하수체의 부신피질자극호르몬과 부신의 글루코코티코이드 분비를 증가시킨다고 알려져 있다.⁹ 스트레스가 남성생식능력에 영향을 미친 결과로 테스토스테론의 감소를 보고하고 있으나, 그 기전은 연구자마다 다

양한 실정이다.¹⁰⁻¹⁴ Suter 등¹⁰은 증가된 부신피질자극호르몬 분비호르몬이 글루코코티코이드 분비를 증가시키고 성선 자극호르몬분비호르몬을 억제시켜 황체형성호르몬이 억제되어 테스토스테론이 감소한다고 하였으며, 반면에 황체형성호르몬 감소 없이 테스토스테론이 감소하는 기전으로 Charpenet 등¹¹은 라이디히세포의 성선자극호르몬에 대한 저감수성 때문이라고 하였고, Orr 등¹²은 증가된 글루코코티코이드가 테스토스테론 생합성효소의 작용을 억제하여 라이디히세포의 테스토스테론 합성능력이 감소한다고 하였다. 그리고 Gao 등¹³은 라이디히세포가 고농도의 코티코스테론에 노출되면 고사되어 수가 감소한다고 하였으며, Cicero 등¹⁴은 스트레스로 체내에 분비된 오피오이드 물질에 의해서 뇌하수체에서 황체형성호르몬의 테스토스테론에 대한 음성되먹이기 기전으로 설명하기도 하였다. 지금까지는 스트레스와 남성생식능력에 관한 동물실험에서 기전에만 치중하여 회복에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

스트레스를 가하는 방법에 따라, Anderson 등¹⁵은 쥐에 수면박탈, 강급, 전기자극, 추위, 강제침수 등을 가하였을 때 스트레스의 종류에 따라 다양한 스테로이드 호르몬 반응을 보고하였고, Kawazu 등¹⁶은 햄스터에 광노출 시간을 제한함으로써 생식능력의 감소를 보고하였다.

이에 저자들은 성숙 수컷 흰쥐 모델에서 2주의 장기간 고정화 스트레스가 정자형성과 테스토스테론 합성에 미치는 영향을 알아보고, 휴식기간을 주었을 때 회복 여부를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 대상

성숙 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley, 550-580g, 생후 28주) 30마리를 (주)샘타코 바이오 코리아 (오산, 한국)에서 구입하여 본원 동물사에서 12개 우리 (40x27x18cm)에 2-3마리씩 분배하여 물과 고형압착사료를 자유롭게 섭취하게 하고 dark-light cycle (12시간:12시간) 조건하에 사육하였다.

2. 실험 방법

성숙 수컷 흰쥐 30마리를 6군 (실험군; I, III, V, 대조군; II, IV, VI)으로 나누어 실험하였다. 실험군 15마리는 매일 오전 8:00부터 6시간 동안 움직이지 못하게 고안된 철제 상자 (7x7x17cm)에 가두었고, 14일간 계속 반복하였다. 마지막 고정 후 다음 날인 15일째에 실험군 I군은 대조군 II군과 함께, 1주간 휴식 후 22일째에 실험군 III군은 대조군 IV군과 함께, 2주간 휴식 후 29일째 실험군 V군은 대조군 VI군과 함께 각각 오전에 pentothal sodium (50mg/kg)을 복강 내

에 주사하여 마취하였다. 각각의 체중을 측정하고 양측 고환을 적출한 후 개흉술로 5cc의 혈액을 추출하였고 4°C에서 2,500rpm으로 원심분리 후 혈청을 분리하여 -70°C 질소탱크 냉동고에 보관하였다. 적출된 양측 고환은 무게를 측정한 후 병리조직학적 관찰을 위해 Bouin 고정액에 4시간 동안 4°C에서 냉고정하였다.

3. 혈청 호르몬 검사

코티코스테론과 난포자극호르몬, 그리고 황체형성호르몬은 각각 Corticosterone-[¹²⁵I], follicle stimulating hormone-[¹²⁵I], luteinising hormone-[¹²⁵I]를 이용한 Biotrak Rat Hormone assays (RIA, using AmerlexTM-M magnetic separation, Amersham Biosciences, United Kingdom)로 측정하였고, 테스토스테론은 Testosterone-3-(O-carboxymethyl) oximino-(2-[¹²⁵I]iodohistamine)을 이용하여 gamma counter (Cobra 5005, Packard Instruments, Meriden, USA)로 방사선활성을 정량화한 후 Riasmart program (Packard)을 이용하여 산출하였다.

4. 병리조직학적 관찰

고환조직은 파라핀 포매 후 40μm 간격으로 두께 4μm의 연속 절편을 3개 만든 후 2개의 절편은 hematoxylin & eosin 염색을 시행하여 한 슬라이드당 30개의 정세관을 관찰하여 Johnsen score¹⁷ 평가 및, 정세관 직경, 정세관 내강 직경 등을 측정하고 각각의 평균값을 산출하였으며, 세 번째 절편은 Masson's trichrome 염색을 하여 정세관 주위 섬유화 등을 관찰하였다. 조직 촬영은 Nikon digital camera (DXM 1200F)가 부착된 Olympus VANOX-S 현미경을 이용하였고, 정세관 직경과 내강 직경의 측정은 Image-Pro Plus 4.0 (media cybermetrics, USA) 프로그램을 활용하였다.

5. 통계처리

결과치들은 평균±표준편차로 표시하였다. 실험군과 대조군의 통계 검정은 비모수검정법인 Mann Whitney U-test (SPSS 12.0)를 시행하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적 유의성을 가진 것으로 판정하였다.

결 과

1. 체중 및 고환 무게 변화

체중 변화는 실험군과 대조군 모두에서 증가하였으나, 실험군 I군에서 26.2±0.8g으로, 대조군 II군 37.4±6.1g과 비교하여 체중 증가량이 적었고 (p=0.008), 이후 휴식기간을 주더라도 실험군 III, V군은 대조군 IV, VI군과 비교하여 체중 증가량이 유의하게 적었다 (III vs IV; p=0.032, V vs VI;

Table 1. Effects of long-term immobilization on the body and testis weights in rats

Group	Body weight (g)		Body weight change (g)	Testis weight (g)	Testis weight/body weight (%)
	Before treatment	After treatment			
I	557.8±7.9	584.0±8.0	26.2±0.8*	3.91±0.08	0.670±0.010
II	560.4±5.9	597.8±8.51	37.4±6.1*	4.03±0.10	0.674±0.008
III	562.8±11.6	610.0±13.6	47.4±6.1*	4.08±0.13	0.670±0.007
IV	560.0±7.0	617.8±9.8	57.8±5.2*	4.19±0.10	0.680±0.006
V	559.4±7.4	628.2±11.3	68.8±7.7*	4.23±0.08	0.670±0.005
VI	561.0±9.8	640.8±12.2	79.8±4.0*	4.32±0.12	0.670±0.006

Immobilization stress group: I, III, V, control group: II, IV, VI. I: long-term immobilization for 2 weeks, II: control, III: long-term immobilization for 2 weeks+resting period for 1 week, IV: control, V: long-term immobilization for 2 weeks+resting period for 2 week, VI: control. *: $p < 0.05$

$p=0.032$) (Table 1). 양측 고환 무게는 고정화 I군에서 $3.91 \pm 0.08\text{g}$ 으로 대조군 II군 $4.03 \pm 0.10\text{g}$ 에 비해 적었으나 유의하지는 않았다 ($p=0.095$) (Table 1). 또한 휴식기간을 주었던 실험군 III, V군과 대조군 IV, VI군의 비교에서도 유의한 차이는 없었다. 체중당 고환무게비 (%)도 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

2. 혈청 호르몬 변화

코티코스테론은 실험군 I군에서 $108.6 \pm 5.8\text{ng/ml}$ 로 대조군 II군 $78.2 \pm 9.9\text{ng/ml}$ 보다 39% 증가하였고 ($p=0.008$), 황체형성호르몬은 I군에서 $1.28 \pm 0.12\text{ng/ml}$ 로 II군 $1.71 \pm 0.12\text{ng/ml}$ 보다 25% 감소하였으며 ($p=0.008$), 테스토스테론은 I군에서 $21.39 \pm 4.71\text{ng/ml}$ 로 II군 $40.39 \pm 4.35\text{ng/ml}$ 보다 47% 감소하였다 ($p=0.008$). 그러나 난포자극호르몬에는 유의한 차이가 없었다 ($p=0.421$). 코티코스테론, 황체형성호르몬, 테스토스테론의 변화는 고정화 스트레스 후 1주간 휴식한 군에서 의의 있게 회복되었다. 고정화 스트레스 후 2주간 휴식한 군도 대조군과 비교하여 차이를 보이지 않았다 (Table 2).

3. 병리조직학적 변화

1) Hematoxylin & eosin 염색: 대조군 정세관에서는 전과정의 생식세포가 정상적으로 관찰되었으나 실험군 일부 정세관에서는 정조세포, 정자세포 및 정자수 감소를 관찰할 수 있었으며 일부 정세관에서는 정자가 관찰되지 않았다. Johnsen score 평균값에서도 실험군 I, III, V군은 각각 대조군 II, IV, VI군보다 유의하게 감소하였다 (I vs II; $p=0.008$, III vs IV; $p=0.008$, V vs VI; $p=0.008$). 또한 실험군 I, III, V군의 Johnsen score 평균값은 8.7 ± 0.4 , 9.1 ± 0.2 , 9.4 ± 0.2 로 휴식 후에 서서히 호전되는 경향을 보였다. 정세관 직경은 각 군에서 유의한 차이는 보이지 않았으나 정세관 내

Table 2. Effects of long-term immobilization on the serum concentrations of corticosterone, LH, FSH and testosterone

Group	Corticosterone (ng/ml)	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	Testosterone (ng/ml)
I	108.6±5.8*	1.28±0.12*	115.6±19.3	21.4±4.7*
II	78.2±9.9*	1.71±0.12*	131.1±11.7	40.4±4.4*
III	81.5±12.8	1.67±0.11	139.8±20.2	39.8±4.8
IV	84.1±10.1	1.79±0.08	120.8±17.9	41.3±3.8
V	79.8±7.3	1.65±0.07	119.7±18.5	40.1±4.6
VI	85.4±9.8	1.73±0.05	140.8±19.6	40.7±4.6

Immobilization stress group: I, III, V, Control group: II, IV, VI. I: long-term immobilization for 2 weeks, II: control, III: long-term immobilization for 2 weeks+resting period for 1 week, IV: control, V: long-term immobilization for 2 weeks+resting period for 2 week, VI: control. LH: luteinising hormone, FSH: follicle stimulating hormone. *: $p < 0.05$

강 직경은 2주간 고정화한 실험군 I군에서 $51.4 \pm 2.4\mu\text{m}$ 로 대조군 II군 $39.4 \pm 2.4\mu\text{m}$ 에 비해 30% 증가하였고 ($p=0.008$), 실험군 I군에서 정세관 직경과 내강 직경의 차는 대조군 II군과 비교하여 15% 감소하였다 ($p=0.008$). 1주의 휴식 후에도 실험군 III군에서 정세관 내강 직경은 대조군 IV군에 비해 16% 증가하였고 ($p=0.008$), 정세관 직경과 내강 직경의 차는 대조군 IV군과 비교하여 9% 감소하였다 ($p=0.008$). 1주의 휴식 후에도 정세관 내강 직경의 증가와 정세관 직경과 내강 직경의 차 감소는 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보였으나, 2주간 휴식한 V군은 대조군 VI군과 비교하여 Johnsen score를 제외하고 모든 값에서 유의하지 않았다 (Table 3, Fig. 1, 2).

2) Masson's trichrome 염색: 고환 조직 절편을 Masson's trichrome 염색하에 광학 현미경으로 200배 시야에서 관찰

Table 3. Effects of long-term immobilization on the seminiferous tubule diameter, lumen diameter and the mean Johnsen score

Group	Tubule diameter (μm)	Lumen diameter (μm)	Tubule diameter-lumen diameter (μm)	Johnsen score
I	111.2±2.9	51.4±2.4*	59.8±0.8*	8.7±0.4*
II	109.8±2.2	39.4±2.4*	70.4±1.3*	9.8±0.1*
III	111.0±3.9	46.4±2.1*	64.6±1.9*	9.1±0.2*
IV	110.8±2.6	39.8±1.9*	71.0±1.4*	9.8±0.1*
V	110.2±3.0	42.0±2.5	68.2±3.1	9.4±0.2*
VI	110.0±2.2	40.8±1.3	69.2±1.1	9.8±0.1*

Immobilization stress group: I, III, V, control group: II, IV, VI. Tubule diameter: seminiferous tubule diameter, Lumen diameter: seminiferous tubule lumen diameter. *: $p < 0.05$

하였다. 고정화한 실험군 I군에서 정세관 주변 미세혈관의 섬유화와 정세관 주변 간질의 비후가 일부 관찰되었으나, 정세관 주변의 저명한 섬유화나 정세관 구조의 파괴는 관찰되지 않았다.

고 찰

고정화 스트레스로 인한 체중의 변화는 모든 군에서 증가하였으나 고정화군에서의 증가량이 대조군에 비해 적었다. 이는 고정화 스트레스에 의해 체중증가가 억제되었다고 생각해 볼 수 있겠다. 고환무게나 체중당 고환무게비(%)는 고정화군에서 상대적으로 감소를 보였으나 통계적 유의성을 보이지 않았다. 고정화 방식과 기간의 차이는 있으나, Suarez 등¹⁸은 32일간 계속 고정하였을 때 체중과 고환

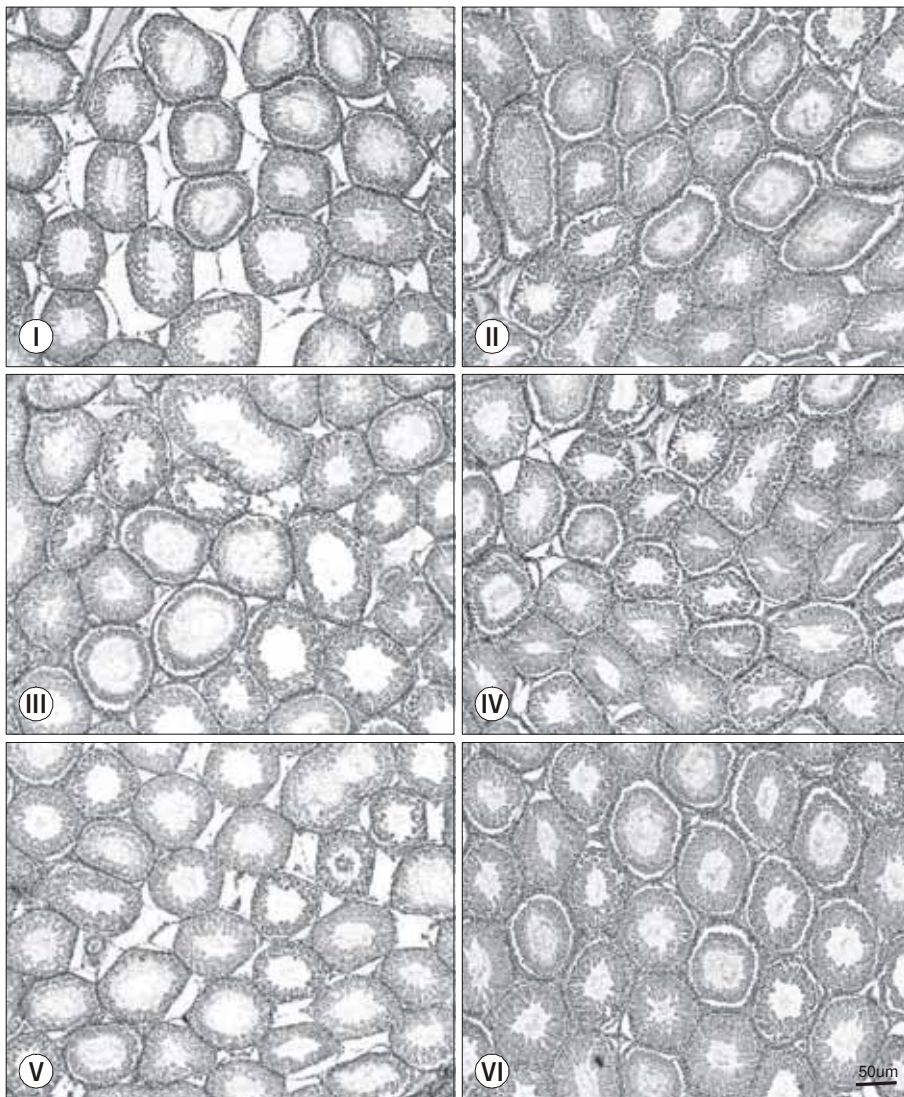


Fig. 1. Cross-section of the testis in the immobilization stress groups (I, III, V) and the control groups (II, IV, VI). The microscopic findings show widening of the seminiferous tubule lumen in groups I and III. In the immobilization stress groups; more deterioration in spermatogenesis is observed (group I > III > V). In the control groups; normal spermatogenesis in all types of cell (H&E stain, scale bar is 50μm).

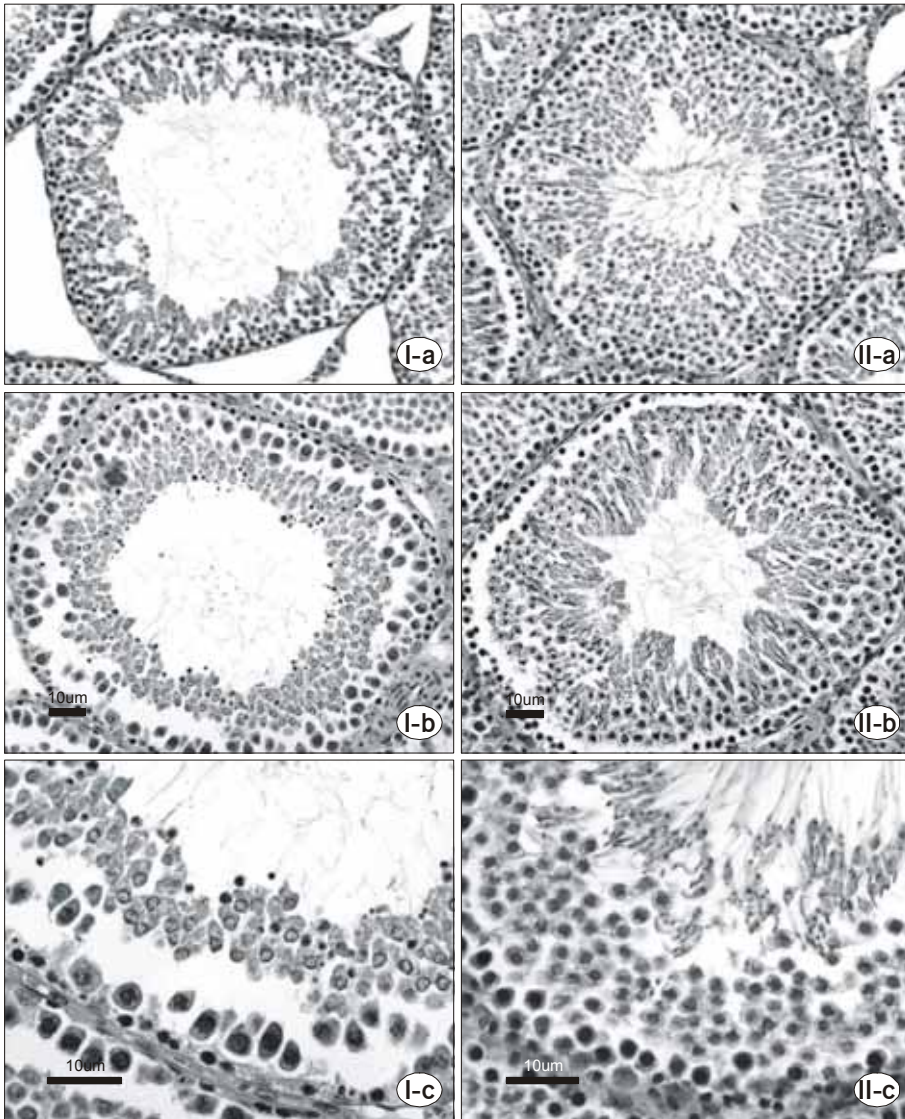


Fig. 2. Effects of long-term immobilization on the seminiferous tubule. Group I: markedly reduces germinal epithelium, with a few mature spermatid at luminal edge. Group II shows normal spermatogenesis in all types of cell. Immobilization stress group (Group I) vs control group (Group II) (H&E stain, scale bar is 10µm).

무게가 유의하게 감소했다고 했고, Tash 등¹⁹은 6주간 계속 뒷다리를 고정하는 스트레스를 가한 경우 체중 변화는 10% 이내로 감소하였으나 유의하지 않았으며 고환무게는 유의하게 감소했다고 하였다.

고정화 스트레스로 인한 혈청 호르몬의 변화는 코티코스테론은 증가하였으며 황체형성호르몬과 테스토스테론은 감소하였고 난포자극호르몬은 유의한 변화를 보이지 않았다. 이는 고정화로 인한 스트레스 반응으로 시상하부-뇌하수체부신축의 활성 증가와 시상하부-뇌하수체고환축의 활성 억제 기전이 작용한다고 생각해 볼 수 있다. 또한 변화된 호르몬들은 2주간 고정화 스트레스를 가한 후 1주간 휴식한 군에서 정상화되었다. 고정화 스트레스에 따른 호르몬 변화 기전을 보다 명확하게 하기 위해서는 부신의 무게 측정이나 조직학적 검사 등을 추가해 볼 수 있겠고, 라이디히

세포와 관련된 다른 기전이 동시에 작용할 수 있어 라이디히세포에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 본다.

Tsuchiya와 Horii²⁰는 시리아햄스터에 고정화 스트레스를 가하여 10분과 30분간 고정화한 경우는 테스토스테론에 변화가 없었고 2시간과 6시간 고정화한 경우는 테스토스테론이 감소되었다고 하였으며, Yazawa 등²¹은 흰쥐를 하루 2시간씩 7일간 고정화 스트레스를 가했을 때 코티코스테론과 테스토스테론의 변화가 없었다고 하였다. 저자들은 타 연구에 비해 하루 6시간의 충분한 시간과 2주의 장기간 동안 고정화 스트레스를 가했고, 결과가 상이한 것은 고정화 스트레스를 가한 시간과 총 기간이 스트레스에 의한 호르몬 변화에 영향을 준다고 할 수 있다. Almeida 등²²은 쥐를 사춘기 이전부터 초기사춘기까지 15일 동안 매일 6시간씩 고정화한 경우에 코티코스테론은 증가하고 황체형성호르몬

은 감소하였으나 테스토스테론은 증가하였다고 하였다. 성숙기가 지난 쥐를 대상으로 한 본 연구와 테스토스테론의 결과가 다른 것은 고정화 스트레스가 성 발달 단계에 따라 성선축에 각기 다른 방식으로 작용하여 호르몬 변화가 상이하게 나온 것으로 생각할 수 있고 이를 보다 분명히 하기 위해서는 같은 조건에서 성 발달 단계가 다른 대상에 대한 연구가 필요하다고 본다.

정세관 변화를 일으켜 정자형성에 악영향을 주는 원인은 다양하다. 노화과정으로 인해 Fukuda 등²³은 늙은 말에서 정세관 위축과 정세관 고유층과 간질의 섬유화를 보고하였고, Montella와 Prino²⁴는 잠복고환에서 정세관 크기 감소 및 변형과 정세관 고유층의 두께 증가 및 정세관 주변 섬유화를 보고하였으며, Tapanainen 등²⁵은 뇌하수체절제술 혹은 항황체형성호르몬항체나 성선자극호르몬분비호르몬길항제의 주입 등이 정세관 내 정세포 고사를 촉진시킨다고 하였고, Tash 등¹⁹은 흰쥐의 뒷다리를 6주간 매달아 정세관 직경이 감소하고 정세관 내강 직경은 증가하였다고 하였으며, Park 등²⁶은 음낭 고온화가 정세관 내 정자형성 장애를 일으킨다고 하였다. 그리고 Sasagawa 등²⁷은 스트레스의 종류에 따라 고사되는 생식세포 단계가 다르고 연령에 따라 주로 고사되는 세포가 다를 수 있다고 하였다.

고정화군의 정세관에서 정조세포, 정자세포와 정자의 수 감소가 관찰되었다. 또한 정세관 변화를 보다 정확하게 알 수 있는 Johnsen score 평균값은 고정화군들에서 대조군들에 비해 유의하게 감소하였으며 휴식기간을 주면 서서히 호전됨을 보였으나 2주 휴식 후에도 완전히 정상화되지는 않았다. 실험군 정세관의 회복은 더 많은 휴식기간이 필요할 것으로 생각된다. 타 연구에서 주로 보였던 정세관 직경의 감소는 보이지 않았고 정세관 내강 직경만 증가하였다. 이로 인한 정세관 직경과 정세관 내강 직경의 차 감소는 정세관 상피층의 두께 감소와 정세관의 기능저하를 생각해 볼 수 있다. 또한 Masson's trichrome 염색하에서 고정화한 실험군 I군은 대조군 II군에 비해 정세관 주변 미세혈관의 섬유화와 정세관 주변 간질의 비후가 관찰되었으나 정세관 주변의 저명한 섬유화나 정세관 구조의 파괴는 관찰되지 않았다.

본 연구를 통해 고정화 스트레스에 의한 테스토스테론의 변화기전을 보다 명확히 알 수 있었다. 그리고 고환 조직 소견에서 정세관의 Johnsen's score 감소와 정세관 직경의 증가 없이 정세관 내강 직경만 증가를 보여 고정화 스트레스에 의한 정자형성장애가 발생함을 알 수 있었다. 호르몬의 변화는 휴식기간을 주었을 때 비교적 빨리 회복되었지만 정세관의 미세 변화는 2주 후에도 완전히 회복되지 않아 보다 많은 시간이 필요할 것으로 생각해 볼 수 있겠다.

결 론

성숙 수컷 흰쥐 모델에서 장기간 고정화 스트레스는 시상하부뇌하수체부신축의 활성을 증가시키고 시상하부뇌하수체고환축을 억제하여 정자형성과 테스토스테론 합성을 억제하였다. 그리고 휴식기간을 주었을 때 호르몬의 변화는 빨리 회복되었으나, 정세관의 변화는 비교적 서서히 회복되었다. 고정화방식에 따른 스트레스의 강도, 가하는 시간과 기간의 차이가 혈중 호르몬 변화와 정자형성에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요하리라고 생각한다.

REFERENCES

1. Park NC, Park YS, Hwang KH, Chung MK, Yoon JB. Male infertility: the clinicostatistical analysis of recent 10 years cumulative data. *Korean J Urol* 1996;37:939-46
2. Hassan MA, Killick SR. Negative life style is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril* 2004;81:384-92
3. Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 2005;20:208-15
4. Thonneau P, Ducot B, Bujan L, Mieusset R, Spira A. Effect of male occupational heat exposure on time to pregnancy. *Int J Androl* 1997;20:274-8
5. Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* 2005;20:452-5
6. Hafez B, Hafez ES. Stress/aging: endocrine profiles/reproductive dysfunction in men. *Arch Androl* 2004;50:207-38
7. Orr TE, Mann DR. Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm Behav* 1992;26:350-63
8. Fenske M. Role of cortisol in the ACTH-induced suppression of testicular steroidogenesis in guinea pigs. *J Endocrinol* 1997;154:407-14
9. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003;463:235-72
10. Suter DE, Schwartz NB, Ringstrom SJ. Dual role of glucocorticoids in regulation of pituitary content and secretion of gonadotropin. *Am J Physiol* 1998;254:595-600
11. Charpenet G, Tache Y, Bernier M, Ducharme JR, Collu R. Stress-induced testicular hyposensitivity to gonadotropin in rats. Role of the pituitary gland. *Biol Reprod* 1982;27:616-23
12. Orr TE, Taylor MF, Bhattacharyya AK, Collins DC, Mann DR. Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of

- LH/hCG receptors. *J Androl* 1994;15:302-8
13. Gao HB, Tong MH, Hu YQ, Guo QS, Ge R, Hardy MP. Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. *Endocrinology* 2002;143:130-8
14. Cicero TJ, Schainker BA, Meyer ER. Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology* 1979;104:1286-91
15. Anderson ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:791-7
16. Kawazu S, Kishi H, Saita E, Jin W, Suzuki AK, Watanabe G, et al. Inhibin secretion in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) testis during active and inactive states of spermatogenesis induced by the restriction of photoperiod. *J Reprod Dev* 2003;49:87-97
17. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results of 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1:2-25
18. Suarez M, Fiol de Cuneo M, Vincenti L, Ruiz RD. Changes in corticosterone levels and sperm functional activity by chronic stress in rats. *Arch Physiol Biochem* 1996;104:351-6
19. Tash JS, Johnson DC, Enders GC. Long-term (6-wk) hindlimb suspension inhibits spermatogenesis in adult male rats. *J Appl Physiol* 2002;92:1191-8
20. Tsuchiya T, Horii I. Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male Syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20:95-102
21. Yazawa H, Sasagawa I, Ishigooka M, Nakada T. Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Hum Reprod* 1999;14:1806-10
22. Almeida SA, Petenusci SO, Franci JA, Rosa-e-Silva AA, Carvalho TL. Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in pubertal rats. *Andrologia* 2000;32:7-11
23. Fukuda T, Kikuchi M, Kurotaki T, Oyamada T, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Age-related changes in the testes of horses. *Equine Vet J* 2001;33:20-5
24. Montella A, Prino A. Morphological findings in cryptorchidism in the adult male. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990;66:215-22
25. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993;7:643-50
26. Park SH, Park KS, Park YI. Effects of temperature change on heat shock protein 70 expression in rat testes. *Korean J Urol* 2003;44:186-91
27. Sasagawa I, Yazawa H, Suzuki Y, Nakada T. Stress and testicular germ cell apoptosis. *Arch Androl* 2001;47:211-6