

Стрес і фітоестрогенізація у неонатальний період як чинники гіпофертильності самців щурів

Е.Є. Чистякова,
Н.Ф. Величко,
Н.П. Смоленко,
Н.О. Карпенко

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України»

Резюме. З метою визначення наслідків дії емоційного стресу або/та надмірного надходження фітоестрогенів під час молочного вигодовування для перебігу процесів програмування, дозрівання та функціонування репродуктивної функції у самців щурів досліджено здатність до відтворення. **Результати.** Виявлено, що дія емоційного стресу у цей критичний період призводить до зниження копуляторної активності та плідності (більше ніж на 40%) у дорослих самців. Вживання фітоестрогенів на тлі стресування у підсосний період посилює вираженість цих наслідків, результатом чого є збільшення відсотка самців, які не здатні спаровуватися та отримувати життєздатних нащадків. **Висновок.** Емоційний стрес і надмірне надходження фітоестрогенів під час молочного вигодовування можуть бути чинниками диспрограмної гіпофертильності дорослих самців. **Ключові слова:** стрес, фітоестрогени, період молочного вигодовування, статеве поведінка, спермограма, фертильність.

Пошук причин зниження репродуктивного потенціалу населення — актуальна задача сьогодення. В Україні майже в 40% неплідних шлюбів виявляється чоловічий чинник, а приблизно 30% серед усіх випадків чоловічої неплідності складає так звана ідіопатична форма, у зв'язку з чим виявлення причин останньої є актуальним і важливим завданням [1].

Відомо, що становлення програми розвитку репродуктивної системи — складний, дуже чутливий до несприятливих умов процес. Соціологічні дані останніх років свідчать, що

близько чверті дітей народжуються у неповних сім'ях [2, 3], що змінює традиційну роль жінки у сім'ї, підвищує її невротизацію [4], позначається на здоров'ї внаслідок постійного психоемоційного стресу [5]. Тривожність матерів є як причиною, так і наслідком так званої «епідемії» гіпогалакції, що підвищує роль штучного вигодовування, зокрема використання штучних молочних сумішей із додаванням соєвого молока, джерела фітоестрогенів (ФЕ), які є чинником розвитку репродуктивних порушень [6]. Кількість геністеїну та дайдзеїну, що надходять до організму дитини із соєвими молочними сумішами, у тисячу разів перевищує кількість ФЕ у грудному моло-

* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», вул. Артема, 10, м. Харків, 61002, Україна. E-mail: zdovado@ukr.net

© Е.Є. Чистякова, Н.Ф. Величко, Н.П. Смоленко, Н.О. Карпенко

Оригінальні дослідження

ці, навіть за умов вживання матір'ю багатого на сою раціону [7], що спричиняє 500-кратне збільшення їх вмісту у сечі дітей [8].

Отже, шалений ритм життя, нерегулярне та/або неякісне харчування, стреси призводять до порушення нормального функціонування організму матері, яка вигодовує дитину, що може бути причиною гіпофертильності нащадків у зрілому віці [6, 9].

У доступній літературі ми не знайшли жодних повідомлень про наслідки сумісної дії ФЕ та стресу. Тому **метою** даного дослідження було визначення імпринтингових наслідків стресування та фітоестрогенізації у неонатальний період для репродуктивної функції дорослих самців щурів.

Матеріали та методи

Дослідження проводилися на дорослих щурах-самцях лінії Вістар, частину яких піддавали дії емоційного стресу з 3-ї по 15-у добу після народження шляхом висаджування самиці-матері на 15 хв у клітку, де до цього знаходились «чужі» самці. У цей же час щурята викладалися поодиноці на чисту підстилку (група стрес) [10]. У другій частині самців було відтворено модель сумісної дії емоційного стресу та ФЕ (група стрес+ФЕ) шляхом згодовування матері суміші ФЕ у дозі 100 г/кг [10].

Показники репродуктивної функції самців вивчали у 10-місячному віці. Статеву поведінку досліджували 15 хв у парному тесті з оварієктомованою рецептивною самицею у присмерковий час. Оварієктомію самиць щурів проводили під ефірним наркозом [11], після якої впродовж 16 діб вивчали цитологію вагінальних мазків для верифікації стадії спокою. Рецептивність в оварієктомованих самиць викликали послідовним введенням олійних розчинів E_2 дипропіонату (10 мкг на щура, підшкірно) за 48 год і Δ_4P (500 мкг на щура, підшкірно) за 4-5 год перед початком тесту. У тесті з рецептивною самицею визначали кількість наближень самця до самиці, кількість садок, інтромісій та еякуляцій. Оцінювали часові показники: латентність садки, інтромісії, еякуляції, розраховували тривалість рефрактерного періоду.

Фертильність самців визначали за результатами парування з інтактними самицями

впродовж 8 діб. Розраховували індекси запліднення та вагітності; рівень загальних внутрішньоутробних втрат за даними розтину на 20-у добу вагітності [12]; показник середньої реалізованої плідності самців Φ_i (фертильність інтегральна) [13]. Стан сперматогенезу оцінювали за концентрацією епідидимальних спермій, їх рухливістю та відсотком патологічних форм на 200 досліджених клітин [12]. Інтактні самці аналогічного віку склали групу контролю. Тварин утримували в стандартних умовах віварію, на рекомендованому раціоні та вільному доступі до питної води. Всі експерименти проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей. Умертвіння тварин проводили під тіопенталовим наркозом.

З огляду на відповідність розподілу даних у вибірках закону нормального розподілу отримані дані наведено як середнє арифметичне (\bar{x}) та його похибка ($S_{\bar{x}}$). Розбіжності вважали статистично значущими за $p \leq 0,05$ за критеріями χ^2 для якісних і Q Данна для множинних порівнянь [14].

Результати та їх обговорення

Відомо, що механізми регулювання статевої поведінки самців щурів умовно діляться на центральний (статева мотивація), про який свідчать латентність садки та рефрактерний період після еякуляції, та периферичний (копуляція та еякуляція), що характеризується кількістю інтромісій, необхідних для настання еякуляції, та її латентним періодом [15].

У самців групи контролю під час парування зафіксовано по одній, а у 25% щурів — по дві еякуляції (**табл.**). У стресованих тварин порушується робота обох регуляторних механізмів: до 25% зменшувалася кількість самців з еякуляцією за час тесту ($p < 0,01$ за критерієм χ^2 проти контролю), та не завершувався рефрактерний період після еякуляції впродовж тесту.

Продовження тестування до 25 хв продемонструвало в усіх самців групи стресу еякуляцію, латентний період якої збільшився в 1,8 раза ($p < 0,05$), що свідчить про її ретардацію. Це супроводжувалося зменшенням кількості інтромісій (на 35%), потрібних для досягнення

Таблиця. Показники статевої поведінки самців із неонатальною патологією

Показник	Група	Група		
		контроль, (n=11)	стрес, (n=16)	стрес+ФЕ, (n=16)
		$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$	$\bar{x} \pm S_x$
Садки	кількість	1,4±0,5	1,6±0,4	2,9±0,9
	латентність, с	80,0±16,0	93,1±25,2	95,3±20,4
Інтромісії	кількість	23,9±0,6	15,5±0,7 ¹⁾	24,3±2,3 ²⁾
	латентність, с	84,1±14,8	80,0±21,1	75,3±13,2
Еякуляції	кількість	1,2±0,1	0,3±0,1 ¹⁾	0,6±0,1
	латентність, с	423,6±41,2	746,3±63,9 ¹⁾	586,7±79,8
Обнюхування самки		5,1±1,2	7,3±0,8	6,8±1,0
Рефрактерний період, с		395,0±82,1	–	247,0±43,3

Примітка: 1) — вірогідна різниця ($p < 0,05$) із показником контролю; 2) — вірогідна різниця ($p < 0,05$) із показником групи стресу.

еякуляції. Згідно з даними літератури, робота периферичного регуляторного механізму (еякуляції) вимагає наявності достатньої концентрації активного метаболіту тестостерону (Тс) — 5 α -дигідротестостерону [16]. Отже, затримка еякуляції може свідчити про недостатність останнього внаслідок зниження синтезу Тс або змін його метаболізму (ароматизації чи 5 α -відновлення) [17]. Відомо, що на ранніх етапах онтогенезу самців (у щурів між 19-ю добою ембріонального періоду та 3-7-ю добою життя) відбувається програмує статево диференціацію мозку зростання концентрації Тс у крові. Порушення цього процесу внаслідок стресу, як показують наші дані, може бути одним із механізмів змін метаболізму андрогенів у дорослому віці.

У групі стрес+ФЕ більша кількість самців виявилася здатною до еякуляції (56%), більше було й спроможних до початку другої серії парувань (див. табл.). На відміну від самців групи стресу, у щурів групи стрес+ФЕ кількість інтромісій не відрізнялася від контрольних значень. Це дозволяло вважати, що фітоестрогенізація нівелює негативну дію стресу на статево поведінку.

Після парування самців групи стрес+ФЕ з інтактними самицями було виявлено лише 67% запліднених самиць проти 92% у контролі ($p = 0,001$), і навіть менше, ніж у групі стресу (82%). Причому індекс вагітності в цій групі (92%) відповідав показникам груп контролю (93%) і стресу (86%). Натомість результати розтинів вагітних самиць показали статис-

тично значущий ріст внутрішньоутробних втрат (у 2-3 рази) в обох піддослідних групах (рис. 1).

Можливою причиною таких ускладнень перебігу вагітності могли бути порушення сперматогенезу. Так, концентрація сперматозоїдів та їх рухливість у самців групи стресу знижувалися на 44% і 26% відповідно, а кількість аномальних сперміїв зростала на 123% ($p < 0,05$) порівняно з показниками групи контролю (рис. 2). Такі показники спермограми у чоловіків кваліфікують як олігоастенозооспермію, що може бути причиною неплідності або спричинити зрив вагітності у запліднених ними жінок.

У самців групи стрес+ФЕ також зменшувалася відсоток рухливих сперміїв (на 12%, $p < 0,05$) і збільшувалася кількість їх патологічних форм (на 33%, $p < 0,05$) порівняно з групою контролю (див. рис. 2). Але ці зміни не були настільки вираженими, як у групі стресу. Навпаки, фітоестрогенізація на тлі стресування пом'яксувала наслідки останнього для сперматогенезу. Отже, причини гіпофертильності самців групи стрес+ФЕ слід шукати в іншому напрямку.

Після розрахунку інтегрального показника репродуктивного потенціалу самців Φ_i встановлено, що у самців груп стресу та стрес+ФЕ цей показник був нижчим на 40% від конт-

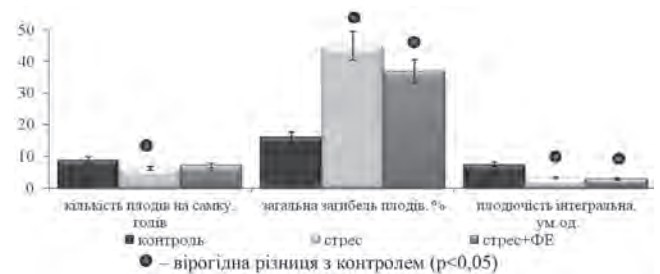


Рис. 1. Показники фертильності самців із неонатальною патологією.

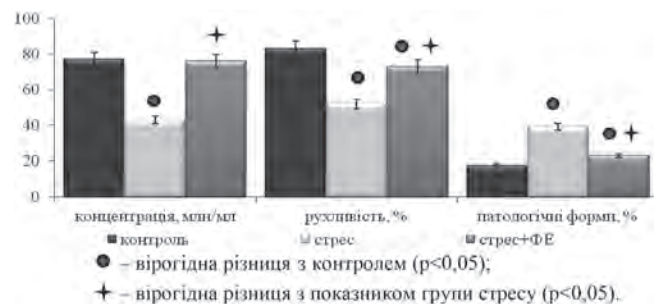


Рис. 2. Показники спермограми самців із неонатальною патологією.

Оригінальні дослідження

рольних даних ($p < 0,05$, див. рис. 1). Отже, зменшення плідності у самців піддослідних груп не можна пояснити грубими порушеннями сперматогенезу. Відомо, що навіть слабкий стрес самиці, яка годує, викликає відповідну стресорну реакцію й у її щурят [18, 19]. Стрес подібної сили у так званий «період відносної стрес-резистентності», що у щурів припадає на 2-6-у добу постнатального життя (період статевої диференціації мозку), викликає зниження в крові концентрації кортикостерону у нащадків і чутливості їх надниркових залоз до дії адренкортикотропного гормону, призводить до зростання тривожності дорослих тварин і появи деяких інших поведінкових розладів [20].

Рання естрогенізація змінює експресію мРНК α - та β -рецепторів естрогенів у сім'яниках, гіпоталамусі та гіпофізі самців щурів [21, 22]. Щодо ФЕ експериментально доведено, що у критичні періоди, такі як вагітність або лактація, коли плоди або новонароджені є найбільш чутливими до дії сполук з естрогеноподібною дією, надходження ФЕ може викликати транзиторні або стійкі зміни у процесах статевого розвитку та дозрівання особин [23], а також спричинити порушення статевої диференціації самців, призводячи до пригнічення їхньої статевої активності [24]. Можливо, емоційний стрес окремо та сумісно з ФЕ у підсосний період призводять у самців щурів до порушень програмування регуляції стероїдогенезу, виразність яких залежить від виду чинника. Адже відомо, що глюкокортикоїди можуть впливати на розвиток мозку, діючи на формування системи гіпоталамус — гіпофіз — надниркові залози. Механізми вказаних програмуючих ефектів глюкокортикоїдів пов'язують із впливом на гени, що регулюють синтез рецепторів до цих гормонів у нейронах у різних відділах мозку [25]. Тому стає зрозумілим, що наявність (надходження) чинників з естрогенною активністю, які можуть взаємодіяти з рецепторами естрогенів, становить загрозу нормальному перебігу статевої диференціації організму та його репродуктивній функції [9, 26].

Отже, в неонатальний період дія стресу окремо або сумісно з ФЕ справляє тривалий вплив на показники, що визначають міжнейрональні взаємини, змінює концентрацію ре-

човин, що беруть участь у регуляції репродуктивної функції.

Отримана модель чоловічої гіпофертильності може бути використаною для розробки нових лікарських засобів, підходів до її профілактики тощо та вивчення механізмів виникнення патології репродуктивної функції у чоловіків.

Висновки

1. Емоційний стрес самців у підсосний період призводить у дорослому віці до розладу статевої поведінки, порушення сперматогенезу та зниження плідності.
2. Вживання надлишку ФЕ на тлі емоційного стресу у той же період зменшує пошкоджуючу дію стресу на статеву поведінку, сперматогенез, але не поліпшує плідності.

Список використаної літератури

1. Яцків О., Тарновська А. Причини і форми чоловічого непліддя та методи діагностики еякуляту як основного показника чоловічого здоров'я // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. — 2012. — Вип. № 60. — С. 4-20. (Yatskiv O., Tarnovska A. Causes and forms of male infertility and methods of ejaculate diagnosis, as the main indicator of male health // Visnyk Lvivskyi Universitet. Series Biology. — Issue 60. — P. 4-20).
2. Ничипоренко С.В. Демографічний аспект сімейної політики в Україні // Демографія та соц. економіка. — 2005. — № 2. — С. 30-37. (Nychyporenko S.V. Demographic aspect of family policy in Ukraine // Demografia ta soc. ekonomika. — 2005. — № 2. — P. 30-37).
3. Лист № 28/17 від 23.01.2009 р. Головного управління статистики у Харківській області. (List № 28/1723.01.2009 Golovnoho upravlinnya statistiky v Kharkivska oblast).
4. Гайдаєв Ю.О. Дослідження демографічних процесів та проблем системи охорони здоров'я України // Укр. мед. часопис. — 2007. — Т. 61, № 5. — С. 3-8. (Haidaev Yu.O. Investigation of the demographic processes and problems of public health system in Ukraine // Ukr. Med. Chasopis. — 2007. — Vol. 61, № 5. — P. 3-8).
5. Татарчук Т.Ф. Стресс и репродуктивная функция женщины // Міжнар. ендокринолог. журн. — 2006. — № 3. — С. 66-74. (Tatarchuk T.F. Stress and reproductive function of woman // Mizhnar. Endokrinol. zhurn. — 2006. — № 3. — P. 66-74).
6. Никитин А.И. Фитоэстрогены и репродуктивная функция // Репрод. медицина. — 2011. — № 3-4 (08-09). — С. 12-17. (Nikitin A.I. Fitoestrogens and reproductive function // Reprod. Meditsina. — 2011. — № 3-4 (08-09). — P. 12-17).
7. Franke A.A., Custer L.J. Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption // Clin. Chem. — 1996. — № 42. — P. 955-964.
8. Cao Y.A., Calafat A.M., Doerge D.R. Isoflavones in urine, saliva, and blood of infants: data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula // J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol. — 2008. — Vol. 30. — P. 225-235.
9. Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С., Мислицкий В.Ф. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. — Чернівці: Медакадемія, 2004. — 320 с. (Reznikov O.G., Pishak V.P., Nosenko N.D., Tkachuk S.S., Mislitsky V.F. Prenatal stress and neuroendocrine pathology. — Chernivtsi: Medacademia, 2004. — 320 p.).
10. Пат. 95758 Україна. Спосіб моделювання неонатально індукованої гіпофертильності самців / Н.О. Карпенко, Е.Є. Чистякова, Є.М. Коренева, Н.Ф. Величко. Опубл. 12.01.2015, Бюл. № 1.

(Ukraine Pat. 95758. Method of modeling of male neonatal induced hypofertility / N.O. Karpenko, Ye.M. Chistyakova, Ye. Korenyeva, N. Velichko, Bjul. — 2015. — № 1).

11. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии // Из-во Московского ун-та, 1968. — 276 с. (Kabak Ya.M. Practicum on the Endocrinology. — M., 1968. — 276 p.)
12. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. — К.: Авіцена, 2001. — 528 с. (Preclinical studies of medical drugs: methodical recommendations / Ed. O.V. Stefanov. — K.: Avicena, 2001. — 528 p.)
13. Карпенко Н.О., Талько В.В., Омельчук С.Т., Лапта С.С. Інтегральна оцінка репродуктивної функції самців лабораторних тварин // Укр. біофармацевт. журн. — 2011. — № 2 (13). — С. 64-68. (Karpenko N.O., Talko V.V., Omelchuk S.T., Lapta S.S. Integral assessment of the reproductive function of male laboratory animals // Ukr. Biopharmaceut. zhurn. — 2011. — № 2 (13). — P. 64-68).
14. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: МОРИОН, 2001. — 408 с. (Lapach S.N., Gubenko A.V., Babich P.N. Statistic methods in medical and biologic researches using Excel. — K.: Morion, 2001. — 408 p.)
15. Lisk R., Greenwald D. Central plus peripheral stimulation by androgen is necessary for complete restoration of copulatory behavior in the male hamster // Neuroendocrinology. — 1983. — V. 36, № 3. — P. 211-217.
16. Пат. № 4258639/28-14. Способ моделирования эякуляции у животного / А.И. Гладкова, Н.А. Карпенко. Заяв. 9.06.87. Оpub. 30.08.89. Бюлл. № 32. (Pat. № 4258639/28-14. Method of ejaculation modeling in animal / A.I. Gladkova, N.A. Karpenko. — Bjull. № 32).
17. Величко Н.Ф., Карпенко Н.А., Чистякова Э.Е. Состояние гормонального профиля у взрослых самцов крыс в следствии импринтингового действия стресса и/или фитоэстрогенов в период молочного вскармливания // XII Междунар. заоч. науч. — практ. конф., Москва, 2013 г. — М., 2013. — С. 13-17. (Velichko N.F., Karpenko N.A., Chistyakova E.Ye. Condition of hormonal profile in adult male rats as a result of imprinting stress action and/or fitoestrogens in milk feeding period // XII Mezhdunar. Zaoch. Nauch.-prakt. konf., M., 2013 — M., 2013. — P. 13-17).
18. Gerardin D.C., Pereira O.C., Kempinas W.G. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress // Physiol. Behav. — 2005. — Vol. 84, № 1. — P. 97-104.
19. Rhee R.W., Lephart E.D., Eliason D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function // Behav. Brain Res. — 2001. — № 1. — P. 1-10.
20. Wisniewski A.B. Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behavior in male mice // Physiol. Behav. — 2005. — Vol. 15, № 2. — P. 327-334.
21. Schwarz J.M., Nugent B.M., McCarthy M.M. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span // Endocrinology. — 2010. — Vol. 151, № 10. — P. 4871-4881.
22. Tena-Sempere M., Navarro J., Pinilla L. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in rat testis during postnatal development // J. Endocrinol. — 2000. — Vol. 165, № 2. — P. 345-357.
23. Faqi A.S., Johnson W.D., Morrissey R.L., McCormick D.L. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats // Reprod. Toxicol. — 2004. — Vol. 18, № 4. — P. 605-611.
24. Wisniewski A.B. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinized the reproductive system in rats // J. Urol. — 2003. — Vol. 169, № 4. — P. 1582-1586.
25. Рыжавский Б.Я. Развитие головного мозга в ранние периоды онтогенеза: последствия некоторых воздействий // Соросов. образоват. журн. — 2000. — № 1. — С. 37-43. (Ryzhavskii B.Ya. Development of brain in early ontogenetic periods: the consequences of some influences // Sorosov. Obrazovat. Zhurn. — 2000. — № 1. — P. 37-43).
26. Cimafranca M.A., Davila J., Ekman G.C. Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice // Biol. Reprod. — 2010. — № 1. — P. 114-121.

(Надійшла до редакції 29.04.2016 р.)

Стресс и фитоэстрогенизация в неонатальном периоде как факторы гипофертильности самцов крыс

Э.Е. Чистякова, Н.Ф. Величко, Н.П. Смоленко, Н.А. Карпенко

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского НАМН Украины»

Резюме. С целью выявления последствий действия эмоционального стресса или/и избыточного поступления фитоэстрогенов во время молочного вскармливания для протекания процессов программирования, созревания и функционирования репродуктивной функции у самцов крыс исследована их способность к размножению. **Результаты.** Выявлено, что действие эмоционального стресса в этот критический период приводит к снижению копуляторной активности и плодовитости (более чем на 40%) у взрослых самцов. Употребление фитоэстрогенов на фоне стрессирования в подсосный период усиливает выраженность этих последствий, результатом чего стало увеличение части самцов, не способных к спариванию и получению жизнеспособных потомков. **Вывод.** Эмоциональный стресс и избыточное поступление фитоэстрогенов во время молочного вскармливания могут быть факторами диспрограммной гипофертильности взрослых самцов.

Ключевые слова: стресс, фитоэстрогены, период молочного вскармливания, половое поведение, спермограмма, фертильность.

Stress and fitoestrogenization in the neonatal period as factors of hypofertility in male rats

E.Ye. Chistyakova, N.F. Velichko, N.P. Smolenko, N.O. Karpenko

SI «V.Ya. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems, National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Summary. Aim. In order to identify the effects of emotional stress and/or phytoestrogen excess intake of during milk feeding for course of programming processes, maturation and functioning of reproductive function of adult males their ability to reproduction have been investigated. **Results.** It was revealed that the effect of emotional stress in this critical period leads to a decrease of copulatory activity and fertility (more than by 40%) in adult males. Consumption of phytoestrogens against the background of stress at between feeding period enhances these consequences, resulting in an increase of the part of males who were unable to mating and to be the fathers of viable offspring. **Conclusions.** Emotional stress and excess intake of phytoestrogens during milk feeding may be the factors for disprogramming hypofertility of adult males.

Keywords: emotional stress, phytoestrogens, milk feeding, sexual behavior, spermogram, fertility.