

УДК 612.616;591.463:615.256.51

*Н. Ю. Селюкова,**Л. Ю. Сергієнко,**Н. О. Карпенко,**Є. М. Коренева,**Н. М. Бречка*

ДУ "Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України", м. Харків

ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ-НАЩАДКІВ ФІТОЕСТРОГЕНІЗОВАНИХ БАТЬКІВ

Ключові слова: фітоестрогени, нащадки, гістоструктура сім'яників.

Резюме. У статті наведено дані щодо особливостей морфологічних змін сім'яників статевозрілих нащадків, народжених від самців, які отримували в своєму раціоні перед спаровуванням надлишок суміші фітоестрогенів впродовж 30 днів в дозі 20 мг/кг маси тіла. Встановлено, що надмірне вживання фітоестрогенів батьком у преко́нсумаційному періоді призводить до патологічних змін в структурі сім'яників нащадків.

Вступ

На сьогодні порушення репродуктивної функції чоловіків як причина бездітності у шлюбі, за даними різних авторів, складають 25-50% [2]. При цьому близько у 30% неплідних чоловіків визначають так звані ідіопатичні патоспермії, коли відсутні очевидні причини безпліддя, такі як гіпогонадізм, варикоцеле, запальні стани статевих органів, тощо. Ймовірно, що пригнічення сперматогенезу в даного контингенту неплідних чоловіків може бути наслідком несприятливої екологічної ситуації та особливостями способу харчування, в тому числі тривалого вживання їжі, до складу якої входять естрогеноподібні речовини [1]. Останнє може змінювати андроген-естрогеновий баланс в організмі чоловіка, не призводячи до появи явних клінічних ознак гіпогонадізму. Тому дослідження наслідків впливу фітоестрогенів (ФЕ) на репродуктивну систему експериментальних тварин чоловічої статі на сьогодні є актуальним, оскільки може стати підґрунтям для розширення та поглиблення знань відносно причин та механізмів формування ідіопатичної неплідності в чоловіків у сучасному світі.

Як відомо, багатим джерелом ФЕ є боби сої (до 300 мг ФЕ у 100 г сої), споживання якої населенням значно зросло в останні роки внаслідок включення сої та її похідних до складу широкого спектра продуктів харчування (м'ясні, рибні, макаронні, кондитерські вироби та ін.) з метою зниження їх собівартості та покращення смакових якостей [4].

Незважаючи на численність робіт, прис-

вячених дослідженню впливу ФЕ на репродуктивну систему самців, лише поодинокі дослідження торкаються можливого впливу ФЕ через організм батька на його нащадків, зокрема, на їх репродуктивну функцію. Крім того, практично відсутні дані про реактивність нащадків батька, які отримували ФЕ, до дії несприятливих чинників середовища в дорослому віці. Подібний аспект досліджень має велике практичне значення оскільки дозволяє прогнозувати характер змін чутливості репродуктивної системи нащадків фітоестрогенованих батьків до надходження ФЕ в їх організм в післянатальному житті. А тому ми вважали за необхідне провести відповідні дослідження.

Мета дослідження

Встановити наявність впливу фітоестрогенізації батька на репродуктивну функцію їх статевозрілих нащадків чоловічої статі, а також оцінити морфофункціональний стан сім'яників за умов додаткового надходження надлишку до організму таких нащадків фітоестрогенів в період молочного вигодовування.

Матеріал і методи

Роботу виконано на 80 дорослих самцях та самицях щурів популяції Вістар масою 220-320 г та їх нащадках чоловічої статі. Дослідження проводилися відповідно до національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2011), які узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експеримен-

тальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985). Експериментальні тварини утримувалися у стандартних умовах віварію ДУ "Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України" при природному освітленні та раціоні, рекомендованому для даного виду тварин, і питному режимі *ad libitum*.

Для моделювання аліментарного надходження надлишку ФЕ використовували препарат Genistein Soy Complex isoflavone-rich (Soylife, USA), відносний вміст ізофлавонів у якому (у перерахунку на індивідуальні аглікони) був: дайдзеїну 60 %, гліцитеїну 22 %, геністеїну 18 % [3]. Виходячи з маси тіла кожного щура на початку експерименту розраховували величину необхідної наважки препарату для кожної тварини та змінювали її щонеділі відповідно від зростання маси тварини. В експерименті біологічну дію ФЕ вивчали при застосуванні дози 20 мг/кг маси тіла протягом 30 діб батьку в прекокусумційному періоді та/або матерям, що годують, теж протягом 30 діб.

Народжені нащадки були розділені на наступні групи: Po(-)/F1(-) - інтактні нащадки, отримані від інтактного батька; Po(ФЕ)/F1(-) - інтактні нащадки отримані від фітоестрогенізованого батька. Po(-)/F1(ФЕ) - нащадки інтактних батьків, що одержували ФЕ з молоком матері та групу з "подвійною" фітоестрогенізацією - Po(ФЕ)/F1(ФЕ) - нащадки фітоестрогенізованих батьків, матері яких теж отримували ФЕ під час молочного вигодовування.

Щурят усіх груп відлучали від матерів у 30-денному віці. По досягненню шестимісячного віку тварин знеживлювали шляхом швидкої декапітації без використання наркозу для запобігання впливу на рівень статевих гормонів. У нащадків чоловічої статі усіх досліджуваних груп вивчали стан сперматогенезу. Розраховували концентрацію морфологічно нормальних клітин CN [5].

Для проведення морфологічних досліджень сім'яники вилучали та фіксували у 10% формаліні, зневоджували за допомогою проведення органів через батарею спиртів зростаючої концентрації, заливали у парафін. Фарбування зрізів проводили гематоксиліном та еозином. Оцінювали діаметр сім'яних каналців, кількість клітин початкового етапу сперматогенезу (сперматогоніїв) в сім'яниках та підраховували індекс сперматогенезу. Оцінку гістоструктури проводили на мікроскопі "Primo Star" (Zeiss, Німеччина). Мікрофото зйомку виконано за допомогою фотокамери Canon G 10. Для мікрометричних досліджень застосовували мікромір MOB-1-16x.

Статистичний аналіз отриманих даних про-

дили за допомогою пакету програм Excel 2003 та Statistica 6.0. Нормальність розподілу змінних визначали за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. При порівнянні змінних із розподілом, відмінним від нормального, застосовували критерій Крускала-Уолліса. Отримані результати представлено в таблицях як \bar{X} - середнє арифметичне, s - стандартне відхилення. Перевірку статистичної гіпотези проводили на рівні значущості $p < 0,05$.

Обговорення результатів дослідження

Гістоструктура сім'яників нащадків-щурів інтактної групи має типову мікроструктуру, притаманну статевозрілим тваринам даного виду та віку: площа паренхіми органу, представлена сім'яними каналцями, абсолютно переважає площу стромы. Поперечні зрізи сім'яних каналців овально-округлої або дещо неправильної форми (рис. 1).

Стінку каналців формує базальна мембрана, до якої з зовнішнього боку прилягає шар фібробластів та проходять кровоносні капіляри. У середині каналців у складі сперматогенного епітелію знаходяться клітини, що належать до різних стадій сперматогенезу - від першої до четвертої. Тобто в каналцях можна спостерігати сперматогонії, сперматоцити першого та другого порядків, сперматиди, сперматозоїди різного ступеня сформованості. Шари клітин, що відповідають окремим стадіям сперматогенезу, розташовані правильно. Наповненість каналців клітинними формами свідчить про активний перебіг сперматогенезу.

У самців-нащадків групи Po(ФЕ)/F1(-) відмічається виразне зменшення діаметру ($p < 0,05$) та форми сім'яних каналців за рахунок розростання сполучної тканини, що формує строму органу. Клітинний склад гермінативного епітелію характеризується активним розмноженням сперматогоніїв, але друга, третя і особливо четверта стадія сперматогенезу пригнічені, за рахунок чого індекс сперматогенезу знижений порівняно з інтактними тваринами ($p < 0,05$) (див.табл., рис. 2).

Суспензії епідидимальних сперматозоїдів самців-нащадків фітоестрогенізованого батьків (Po(ФЕ)/F1(-)) не відрізняються від спермограм інтактних тварин за такими параметрами, як концентрація, рухливість та частка патологічних форм клітин (див. табл.).

Таким чином, морфометричні показники гістологічної картини сім'яників у нащадків фітоестрогенізованих батьків вказують на зменшення діаметру сім'яних каналців, яке корелює зі збільшеною кількістю сперматогоніїв. Таке

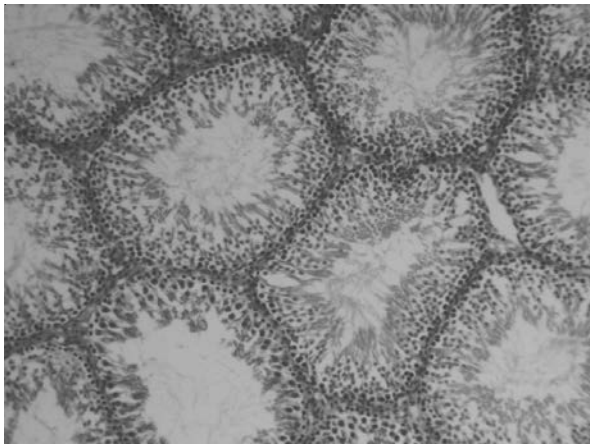


Рис. 1 Фото мікропрепарату фрагмента зрізу сім'яника інтактного щура-батька. Гематоксилін-еозин, x125

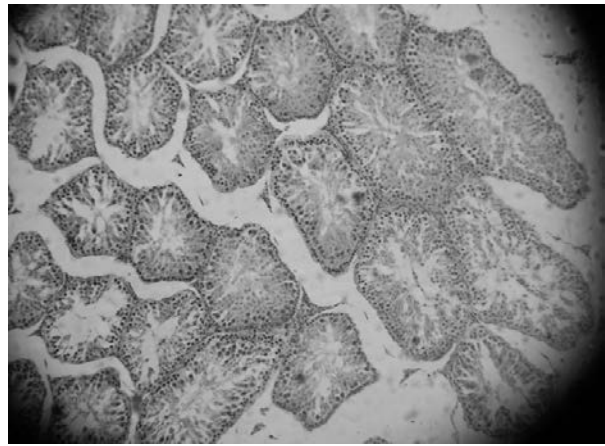


Рис. 2 Фото мікропрепарату фрагмента зрізу сім'яника нащадка фітоестрогенізованого батька. Гематоксилін-еозин, x125

Таблиця

Структурно-функціональні характеристики сім'яних канальців та показники функціонального стану епідидимальних спермій

Показник	Група							
	Інтактні		Po(ФЕ)/F ₁ (-)		Po(-)/F ₁ (ФЕ)		Po(ФЕ)/F ₁ (ФЕ)	
	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$
Діаметр канальців, ум.од.	60	66,4±1,5	60	58,9±1,3 ¹⁾	60	57,0±1,0 ¹⁾	60	60,4±1,2 ¹⁾²⁾
Кількість сперматогоніїв, штук в канальці	30	80,6±2,7	30	95,9±2,6 ¹⁾	30	73,1±3,1	30	95,4±2,0 ¹⁾²⁾
Індекс сперматогенезу, бали	100	3,5±0,1	100	3,0±0,1 ¹⁾	100	3,2±0,1 ¹⁾	100	3,1±0,1 ¹⁾
Рухливість, %	11	56,5±6,1	15	44,2±5,7	15	53,7±6,4	14	32,2±4,0 ¹⁾
Концентрація, млн/мл	11	29,8±5,1	15	21,7±2,7	15	25,4±3,8	14	22,8±2,4
Патологічні форми, %	11	17,6±2,6	15	18,0±2,2	15	30,6±4,5 ¹⁾	14	14,6±1,3 ²⁾
Концентрація морфологічно нормальних сперматозоїдів, млн/мл	11	25,2±4,8	15	18,1±2,6	15	15,9±2,2	14	19,5±2,1

Примітки: ¹⁾ відмінності від інтактної групи ($p < 0,05$); ²⁾ відмінності від групи Po(-)/F₁(ФЕ) ($p < 0,05$).

поєднання дає змогу відтворювати нормальну кількість сперматозоїдів, хоча індекс сперматогенезу, який свідчить про інтенсивність процесу, дещо знижений. Тобто, можна припустити, що у цих тварин відбувається компенсація запліднюючої функції за рахунок збільшення середньої кількості сперматогоніїв у канальцях.

Дослідження гістологічних зрізів сім'яників із розрахунком індексу сперматогенезу показало, що у статевозрілих нащадків інтактного батька (група Po(-)/F₁(ФЕ)) за умов застосування ФЕ у їх матері в підсосному періоді спостерігається зменшений діаметр сім'яних канальців (на 10 %, $p < 0,05$) та знижений індекс сперматогенезу (на 9%, $p < 0,05$). Стромальні елементи сильно розвинуті, займають до третини площі зрізу. Сперматогенез порушено на всіх стадіях. У багатьох місцях відмічається утворення так званих "вікон" деструкції за рахунок загибелі проміжних форм та навіть "оголення" базальної мембрани (рис. 3).

У суспензії епідидимальних сперматозоїдів у цієї групи щурів відмічається вдвічі більше патологічних форм спермій (див. табл.).

Цілком можливо, що виявлені відмінності є наслідком слабого естрогенного впливу ФЕ на початку розгортання програми реалізації статевого розвитку.

У разі контакту батька з ФЕ перед спаруванням та призначення ФЕ його нащадкам під час молочного вигодовування (група Po(ФЕ)/F₁(ФЕ)) у статевозрілих нащадків були наявні ознаки незавершеного сперматогенезу, про що свідчить статистично достовірно більша середня кількість сперматогоніїв у канальці (на 18 %) та низький індекс сперматогенезу (зменшення на 11%, $p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами. Відповідно кількість канальців, що оцінювались у 4 бали, дорівнювала 39 %, а 23 % канальців оцінювались у 2 бали. У інтактних тварин ці показники склали 61 та 10 % відповідно. Крім цього,

спостерігалось продукування сперматозоїдів з незадовільною рухливістю (див. табл.).

Діаметр сім'яних каналців самців Ро(ФЕ)/F1(ФЕ) менший ніж у інтактних щурів, але дещо більший за тварин із групи Ро(-)/F1(ФЕ). Клітинний склад та правильність пошарового розташування проміжних форм сперматогенезу порушені. В багатьох місцях спостерігається відокремлення зменшеної кількості сперматогонії від ба-

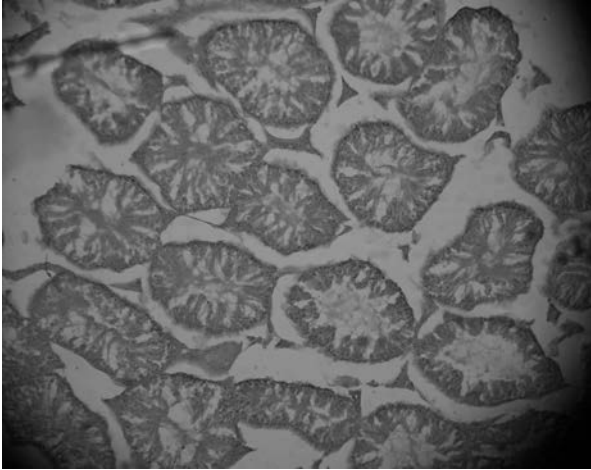


Рис. 3 Фото мікропрепарату фрагмента зрізу сім'яника щура-нащадка інтактного батька, але отримував надлишок фітоестрогенів в підсосному періоді. Гематоксилін-еозин, x125

збільшення патологічних форм сперматозоїдів (в два рази) ($p < 0,05$) у тварин групи Ро(-)/F1(ФЕ) по відношенню до інтактних та тварин з подвійною фітоестрогенізацією (див. табл.). Додаткова фітоестрогенізація, як було вже відмічено, призводила до помірного збільшення діаметру сім'яних каналців та кількості сперматогоніїв у нащадків порівнянні з групою Ро(-)/F1(ФЕ).

Висновки

1. Надлишок фітоестрогенів в харчових продуктах, що споживає самець у прекоконсумсаційному періоді справляє певний негативний вплив на гістоструктуру сім'яників його статевозрілих нащадків.

2. Додаткове навантаження фітоестрогенами нащадків інтактних батьків в підсосному періоді індукують виразні негативні зміни в структурно-функціональних показниках сім'яників нащадків.

3. Зрушення у гермінативній функції сім'яників притаманні статевозрілим нащадкам фітоестрогенізованих батьків, котрі дещо нормалізуються за умов отримання нащадками фітоестрогенів у підсосному періоді, хоча такий показник як відсоток рухливих форм сперматозоїдів у цих тварин найменший.

Перспективи подальших досліджень

Потребує свого подальшого вивчення вплив

зальної мембрани, утворення "вікон" деструкції. Всі стадії сперматогенезу загальмовані. Індекс сперматогенезу знижений (рис. 4).

Концентрація морфологічно нормальних сперматозоїдів залишається практично незмінною у всіх досліджених групах нащадків, хоча дещо зниженою по відношенню до інтактних тварин.

При порівнянні самців Ро(-)/F1(ФЕ) та Ро(ФЕ)/F1(ФЕ) груп було знайдено статистичне вірогідне



Рис. 4 Фото мікропрепарату фрагмента зрізу сім'яника щура-нащадка фітоестрогенізованого батька після навантаження фітоестрогенами в підсосному періоді. Гематоксилін-еозин, x125

зниження відсотку рухливих форм сперматозоїдів у нащадків фітоестрогенізованих батьків, котрі отримували фітоестрогени з молоком матері на фертильність цих нащадків та визначення - чому на решту показників спермограми подвійна фітоестрогенізація мала позитивний вплив.

Література. 1. Wendy, N. J. Reproductive Consequences of Developmental Phytoestrogen Exposure [Text] // N. J. Wendy, B. P. Heather, J. W. Carmen / Reproduction. -2012. - Vol. 143, №3 - P. 247-260. 2. Білецька, Е. М. Вплив факторів навколишнього середовища на чоловічу статеву систему [Текст] / Е. М. Білецька, Н. М. Онул // Довкілля та здоров'я. - 2011. - № 4. - С. 15-20. 3. Гладкова, А. І. Вивчення складу соєвого продукту Genistein Soy Complex хроматографічними методами / А. І. Гладкова, Ф. Г. Яременко, Л. С. Нікішина, С. В. Кравченко // Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Десяті Данилевські читання) : матер. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків 3-4 бер. 2011 р. - Х., 2011. - С. 29-30. 4. Захарченко, Н. Боб в помощь. Изделия из сои, настоящее и будущее [Текст] / Н. Захарченко // Мясной бизнес. -2005. - №11 (40). - С. 24-25. 5. Карпенко, Н. О. Интегральная оцінка репродуктивної функції самців лабораторних тварин [Текст] / В. В. Талько, С. Т. Омельчук, С. С. Лапта // Укр. біофармацевтич. журн. - 2011. - Т. 13, № 2. - С. 64-68.

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА СЕМЕННИКОВ КРЫС-ПОТОМКОВ ФИТОЭСТРОГЕНИЗИРОВАННЫХ ОТЦОВ

Н.Ю. Селюкова, Л.Ю. Сергиенко, Е.М. Коренева, Н.А. Карпенко, Н.М. Бречка

Резюме. В статье приведены данные относительно особенностей морфологических изменений семенников половозрелых потомков, рожденных от отцов получавших избыток фитоэстрогенов перед спариванием в течение 30

дней в дозе 20 мг/кг массы тела. Установлено, что чрезмерное употребление фитоэстрогенов отцом перед спариванием приводит к патологическим изменениям в структуре семенников потомков.

Ключевые слова: фитоэстрогены, потомки, гистоструктура семенников.

**HISTOLOGICAL STRUCTURE OF TESTES RATS
OFFSPRING FATHER'S WHO RECEIVED AN EXCESS
CONSUMPTION OF PHYTOESTROGENS**

*N.Yu. Seluykova, L.Yu. Sergiyenko, E.M. Koreneva, N.A.
Karpenko, N.M. Brechka*

Abstract. The article presents data on the characteristics of morphological changes the testes in adult male offspring who

were born after father's excessive consumption of phytoestrogens before pairing during 30 days at a dose of 20 mg/kg body weight. It is established that the excessive use of phytoestrogens father before pairing causes in pathological changes in the structure of the testes offspring.

Key words: phytoestrogens, offspring, histostructure testes.

**SI "V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology
Problems of the NAMS of Ukraine", Kharkiv**

Clin. and experim. pathol.- 2015.- Vol.14, №3 (53).-P.117-121.

Надійшла до редакції 28.08.2015

Рецензент – проф. С.С. Ткачук

*© Н. Ю. Селюкова, Л. Ю. Сергієнко, Н. О. Карпенко,
С. М. Коренева, Н. М. Бречка, 2015*