

Н.Ю. Селюкова, Н.О. Карпенко, Є.М. Коренева, О.В. Сомова, Н.П. Смоленко,
С.С. Почерняєва, Н.М. Бречка

Фітоестрогенізація самців-щурів для соматостатевого розвитку та фертильності їхніх нащадків

Досліджено наслідки вживання самцями-батьками впродовж 30 діб з їжею суміші рослинних фітоестрогенів у дозі 20 мг / кг щодо репродуктивної функції їх нащадків чоловічої статі, а також характер змін у останніх за умов додаткової фітоестрогенізації під час молочного вигодовування. Вживання батьком фітоестрогенів перед спаровуванням викликає фемінізацію нащадків, а саме аногенітальна відстань у самців при народженні була менша, ніж у інтактних тварин: $2,7 \pm 0,1$ щодо $3,1 \pm 0,0$ мм ($P < 0,05$). Це, а також додаткова фітоестрогенізація народжених щурят, гальмують їх соматичний і статевий розвиток, призводять до послаблення статевої активності у дорослих і зменшення фертильності внаслідок погіршення запліднювальної здатності сперматозоїдів. Можливим механізмом цього може бути зменшення відносної андрогенізації за рахунок 3–4-кратного зростання вмісту естрадіолу. Виявлено більш значні наслідки для репродуктивної функції за умов додаткової фітоестрогенізації нащадків фітоестрогенізованого батька.

Ключові слова: фітоестрогени, нащадки, статеве поведінка, сперматогенез.

ВСТУП

Нині багатьма експериментальними та клінічними дослідженнями, результати яких узагальнені у змістовних оглядах, доведено негативні наслідки для статевої функції людини та тварин дії ксенобіотиків [1, 2]. Серед них важливе місце займають рослинні фітоестрогени (ФЕ) – ізофлавоноїди з естрогеноподібною активністю – за умов надходження їх надлишку з продуктами харчування. Вживання значної кількості ФЕ матір'ю під час вагітності призводить до порушень соматостатевого розвитку [3] та репродуктивної функції у нащадків чоловічої статі [4]. Водночас питання відносно значення надлишку ФЕ у раціоні батька для стану його нащадків не досліджено. Відомо, що функціональна активність системи відтворення нащадків змінюється внаслідок дії на батька у преко́нсумаційний період різних факторів: гіперандрогенізації [5], стресу [6], іонізуюче випромінювання [7], важких металів [8]. Ціл-

© Н.Ю. Селюкова, Н.О. Карпенко, Є.М. Коренева, О.В. Сомова, Н.П. Смоленко, С.С. Почерняєва, Н.М. Бречка

ком можливо, що й надлишок ФЕ у раціоні самця може відігравати роль негативного фактора щодо соматостатевого розвитку та репродуктивної функції його нащадків.

Невисвітленим також є питання про вплив фітоестрогенізації батька у преко́нсумаційний період на чутливість його нащадків до дії такого ж чинника. Тим більше, що показано негативні наслідки експозиції до ФЕ у критичні періоди онтогенезу для статевої диференціації мозку самців з індукцією поведінкових розладів у дорослому віці [4]. Можливо, це може вплинути на реакцію нащадків на надлишок ФЕ у материнському молоці, змінюючи становлення та функціонування їх репродуктивної системи. Це питання є актуальним через поширення епідемії гіпогалакції та штучного вигодовування немовлят молочними сумішами, переважна більшість яких містить похідні сої.

Метою нашої роботи було визначення наслідків вживання ФЕ самцями-плідниками перед паруванням з самицею (у преко́нсума-

ційний період) для репродуктивної функції їх нащадків чоловічої статі, а також встановлення значення попередньої фітоестрогенізації батька для чутливості їх нащадків до дії сполук з естрогеновою активністю у критичний період онтогенезу (період молочного вигодовування).

МЕТОДИКА

Робота виконана на дорослих щурах лінії Вістар та їх нащадках чоловічої статі з датованим народженням (день народження вважали за першу добу життя). Тварин утримували у стандартних умовах віварію при природному освітленні, рекомендованому раціоні та питному режимі *ad libitum*. Дослідження проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001) [9].

Самців батьківського покоління (Р₀) впродовж 30 днів згодовували надлишком суміші ФЕ у дозі 20 мг / кг, після чого їх спарувували з інтактними самицями для одержання нащадків, які утворили групу Р₀(ФЕ). Приблизно половина нащадків з 1-ї по 30-ту добу життя також отримувала надлишок ФЕ з молоком матері, якій у корм додавали таку ж суміш ФЕ і у такій самій дозі. Ці тварини увійшли у групу Р₀(ФЕ)+ФЕ. За щурятами спостерігали до статевої зрілості, досліджували характер соматостатевого розвитку. У віці 6–7 міс у них вивчали статеву поведінку, стан сперматогенезу, плідність, вміст тестостерону та естрадіолу у сироватці крові, масу деяких внутрішніх органів.

Для моделювання аліментарного надходження надлишку ФЕ використовували харчову домішку Genistein Soy Complex isoflavone-rich («Soylife», США), відносний вміст ізофлавононів у якій (у перерахунку на індивідуальні аглікони) був: дайдзеїну 60 %, гліцитеїну 22 %, геністеїну 18 %. Дозу розраховували за так званим «геністеїновим еквівалентом» [10].

Соматостатевий розвиток тварин оцінювали за часом відлипання вушок, появи гене-

ралізованого волосяного покриву, відкриття очей, прорізування зубів і опущення яєчок у мошонку, життєздатність – за часткою тварин, що залишилися живими на 30-ту добу життя. Контролювали також динаміку маси тіла.

Статеву поведінку самців досліджували у 15-хвилинному парному тесті з рецептивною самицею після оварієктомії у присмерковий час. Визначали кількісні та часові показники статевої поведінки. Для формування в самців стереотипних реакцій та отримання ними сексуального досвіду було проведено три поведінкових тести з самицями. Вихідний рівень статевої активності досліджуваних самців оцінювали за результатами четвертого тесту.

Фертильність самців-нащадків визначали за результатами парування з інтактними самицями. Самиць швидко декапітували на 20-ту добу вагітності, підраховували кількість жовтих тіл вагітності, місць імплантації та плодів. Визначали рівень пре-, постімплантаційних і сумарних внутрішньоутробних втрат у вагітних самиць, розраховували індекс запліднення та індекс вагітності.

Після виведення щурів з експерименту за допомогою декапітації визначали масу сім'яників, сім'яних пухирців, епідидимісів, вентральної частини передміхурової залози. Стан сперматогенезу оцінювали за концентрацією епідидимальних сперматозоїдів, їх рухливістю та відсотком патологічних форм [11].

Вміст гормонів у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом за допомогою тест-наборів Estradiol ELISA EIA-2693 («DRG», США) та Стероид ИФА-тестостерон-01 («АлкорБио», Росія) на аналізаторі Stat FAX-3100.

Отримані результати наведені як середнє арифметичне (\bar{x}), його похибка ($\pm S_{\bar{x}}$) і їх порівнювали зі значеннями, отримані у інтактних тварин, народжених від інтактних батьків (контрольна група). Статистичну вірогідність відмінностей між групами розраховували використовуючи критерій t Стьюдента або χ^2 (у разі якісних порівнянь), які вважали значущими при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фітоестрогенізація самця-плідника позначилася на кількості нащадків у виводку. У гніздах не тільки кількість щурят була більшою порівняно з виводками контрольної групи: $9,3 \pm 0,7$ щодо $6,5 \pm 0,7$ плодів ($P < 0,01$), але й новонароджених самиць серед них було більше на 60 %: $5,3 \pm 0,5$ щодо $3,3 \pm 0,5$ плодів ($P < 0,01$). Таке явище може бути пояснене більшою життєздатністю плодів жіночої статі або заплідненням овоцитів переважно сперматозоїдами з хромосомою X [12].

Ознакою внутрішньоутробного статевого розвитку є аногенітальна відстань (АГВ). Так, у самців-нащадків групи $P_0(\Phi E)$ вона при народженні була менша, ніж у інтактних тварин: $2,7 \pm 0,1$ щодо $3,1 \pm 0,0$ мм ($P < 0,05$), що може свідчити про фемінізуючу дію преко-сумаційного введення ФЕ.

Надалі нащадки цієї групи були розподілені порівну і половина їх додатково отримувала ФЕ з молоком матері (група $P_0(\Phi E) + \Phi E$). За перший місяць спостереження життєздатність щурят дослідних груп (відсоток загиблих у гнізді) не відрізнялася від контролю. У щурят групи $P_0(\Phi E)$ перебіг соматичного розвитку не порушувався, але додаткова фітоестрогенізація у групі $P_0(\Phi E) + \Phi E$ прискорила появу вторинного волосяного покриву та затримала відкриття очей.

Аналіз динаміки маси тіла нащадків, яка вважається інтегральним показником фізичного стану, показав, що у самців груп $P_0(\Phi E)$ та $P_0(\Phi E) + \Phi E$ маса тіла була меншою, ніж у

самців контрольної групи, починаючи з 60-ї доби життя ($P < 0,01$; рис. 1). Це відставання (на 14–15 %) спостерігалось й у 6-місячних щурів. Така затримка соматичного розвитку, можливо, викликана здатністю ФЕ гальмувати синтез білка [13], змінювати експресію генів білків у печінці, які регулюють метаболізм жирних кислот і тиреоїдних гормонів [14]. Крім того, у тварин обох груп статеве дозрівання за часом опущення яєчок запізнювалося порівняно зі щурами контрольної групи: $24,0 \pm 0,3$ щодо $22,6 \pm 0,4$ доби ($P < 0,01$).

У самців-щурів груп $P_0(\Phi E)$ та $P_0(\Phi E) + \Phi E$ (рис. 2) виявлені зміни у статевій поведінці, які полягали, по-перше, у зменшенні частки самців, які демонстрували повноцінний статевий акт. Так, у самців групи $P_0(\Phi E)$ еякуляція спостерігалася у однієї тварини з десяти (у контролі – 100 %; $P < 0,001$), жодна тварина не розпочинала другу серію парувань (у контролі – 22 %). За умов додаткової фітоестрогенізації (група $P_0(\Phi E) + \Phi E$) еякуляції спостерігалися у 9 самців з 10, хоча деякі теж не встигали за час тесту розпочати другу серію копуляцій. По-друге, варто відмітити гальмування статевих реакцій у дослідних самців, що проявлялося зростанням майже втричі латентності перших садок та інтромісій ($P < 0,05$) при статистично значущому зменшенні їх кількості. Ці результати узгоджуються з даними наших попередніх досліджень про вплив екзогенної фітоестрогенізації тварин різного віку на їх статеву поведінку [15].

При дослідженні плідності самців дослідних груп індекс запліднення становив 90,9 та

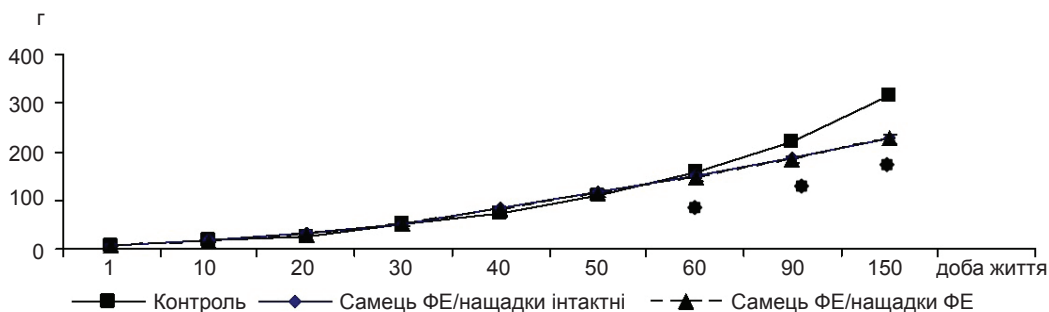


Рис. 1. Динаміка маси тіла самців-нащадків фітоестрогенізованого батька.

* статистично вірогідні відмінності від контролю ($P < 0,05$)

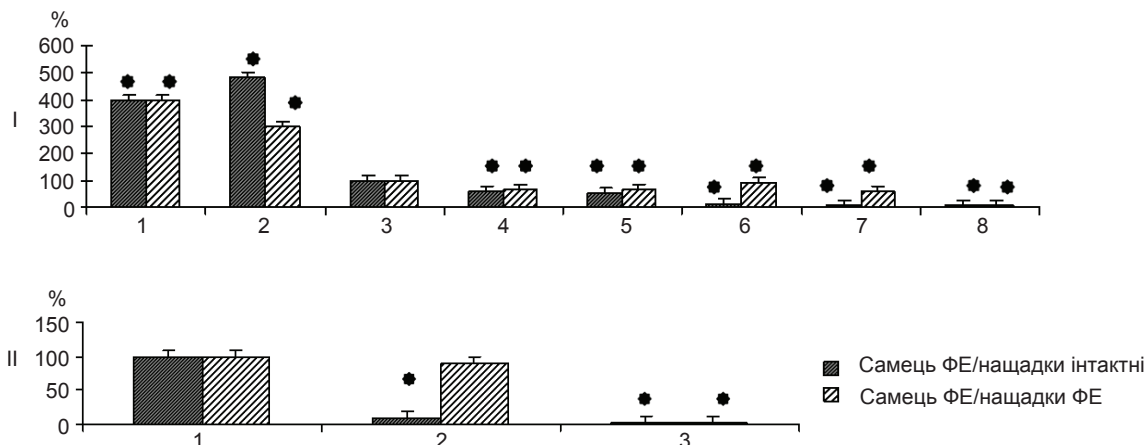


Рис. 2. Статева поведінка самців-нащадків отриманих від фітоестрогенізованого батька. За 100 % прийняті дані контрольної групи; I – показники статевої поведінки за 15-хвилинний тест, 1 – латентність садки (с), 2 – латентність інтромісії (с), 3 – латентність еякуляції (с), 4 – кількість садок, 5 – кількість інтромісій, 6 – кількість еякуляцій, 7 – кількість інтромісій до першої еякуляції, 8 – тривалість постеякуляторного інтервалу (с); II – кількість тварин з наявністю окремих елементів статевої поведінки: 1 – садки та інтромісії; 2 – еякуляції, 3 – друга серія копуляцій. * статистично вірогідні відмінності від контролю (P < 0,05)

100 %, що не відрізнялося від контрольних значень, але індекс вагітності знижувався і дорівнював 60 (група Ро(ФЕ)) та 75 % (група Ро(ФЕ)+ФЕ) відповідно порівняно зі 100,0 % у контрольній групі (P < 0,05). Перебіг вагітності у самиць (за внутрішньоутробними втратами) в обох групах не порушувався.

Аналіз спермограм показав, що фітоестрогенізація батька не вплинула на сперматогенез у нащадків групи Ро(ФЕ). Водночас у нащадків групи Ро(ФЕ)+ФЕ виявлено зниження рухливості сперматозоїдів (на третину) порівняно зі значеннями контрольної групи та збільшена частка патологічних форм

клітин порівняно з самцями групи Ро(ФЕ) (P < 0,01).

Наслідки зміни темпів і характеру соматостатевого розвитку проявилися у динаміці масових коефіцієнтів внутрішніх органів. Так, у нащадків групи Ро(ФЕ), абсолютна маса передміхурової залози була вірогідно нижчою на 27 % (табл. 1). У нащадків групи Ро(ФЕ)+ФЕ зменшилась абсолютна маса сім'яних пухирців (на 29 %), придатків сім'яників (на 14 %) та передміхурової залози (на 37 %) порівняно з інтактними щурами (P < 0,05). При порівнянні самців груп Ро(-ФЕ) та Ро(ФЕ)+ФЕ було знайдено вірогідне

Таблиця 1. Маса тіла та абсолютна маса органів самців-нащадків фітоестрогенізованого батька ($\bar{x} \pm S_x$)

Маса	Контроль (n=11)	Батько ФЕ / нащадки інтактні (n=14)	Батько ФЕ / нащадки ФЕ (n=15)
Тіло, г	322,3±8,8	277,9±6,2*	275,3±11,3*
Сім'яники, мг	3495,4±128,1	3459,3±143,5	3374,7±191,6
Придатки сім'яників, мг	1260,5±64,3	1190,7±58,6	1084,3±54,6*
Сім'яні пухирці, мг	663,5±75,5	556,9±47,3	471,5±50,1*
Вентральна частина передміхурової залози, мг	620,9±59,6	452,3±46,5*	393,5±48,9*

Примітка. Тут і в табл. 2: * статистично значущі відмінності від контрольної групи (P < 0,05).

Таблиця 2. Вміст гормонів у сироватці крові самців-нащадків фітоестрогенізованого батька ($\bar{x} \pm S_x$)

Маса	Контроль (n=9)	Батько ФЕ / нащадки інтактні (n=13)	Батько ФЕ / нащадки ФЕ (n=8)
Естрадіол, пмоль/л	30,1±6,0	129,8±23,6*	106,2±7,9*
Тестостерон, нмоль/л	22,2±4,6	26,8±4,5	15,7±3,9
Тестостерон / естрадіол, ум. од.	806,2±147,1	341,9±103,3*	168,0±52,7*

підвищення маси гіпофіза на 15 %: $3,0 \pm 0,1$ щодо $3,5 \pm 0,1$ мг/100 г ($P < 0,05$).

Спрямованість гормональних змін була однаковою в обох дослідних групах. Хоча вміст тестостерону у них не відрізнявся від контролю, але концентрація естрадіолу зростала у 3–4 рази порівняно з інтактними щурами, що може вказувати на посилення ароматазної активності або зменшення активності 5α -редуктази внаслідок дії ФЕ (табл. 2). Більше того, співвідношення вмісту цих гормонів було нижчим в обох групах, що вказує на відносну гіперестрогенію.

Таким чином, вплив естрогеноподібних речовин проявляється не тільки за умов надходження у критичні періоди ембріонального та постнатального періодів, а й, навіть, при дії на статеві клітини батьків. Швидше за все, спостерігається вплив ФЕ на ДНК сперматозоїдів батька на епігенетичному рівні, що можливо пов'язано зі зміною процесів метилювання нуклеїнових кислот. Адже мутагенна дія чинника проявилася б зростанням внутрішньоутробних втрат у вагітних самиць. Тим більше, що для геністеїну максимально безпечна доза для них становила 100 мг/кг [16], що в 5 разів більше, ніж у нашому досліді.

ВИСНОВКИ

1. Надлишок ФЕ у раціоні батька в преко-сумаційний період викликає народження більшої частки нащадків жіночої статі у запліднених ними інтактних самиць. Потомки чоловічої статі фітоестрогенізованого батька фемінізовані та відрізняються затримкою статевого дозрівання.

2. Порушення репродуктивної функції нащадків фітоестрогенізованого батька полягають у послабленні статевої поведінки, зменшенні індексу вагітності у запліднених ними самиць, які супроводжуються змінами гормонального фону, що полягають у відносній гіперестрогенії.

3. Преко-сумаційне вживання ФЕ не тільки змінює соматичний і статевий стан особини, але й відображається на наступній реактивності до цього чинника у нащадків у період молочного вигодовування, викликаючи більш виражене зниження репродуктивного потенціалу останніх.

Н.Ю. Селюкова, Н.А. Карпенко, Е.М. Коренева, Е.В. Сомова, Н.П. Смоленко, С.С. Почерняева, Н.М. Бречка

ФИТОЕСТРОГЕНИЗАЦИЯ САМЦОВ-КРЫС ДЛЯ СОМАТОПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ И ФЕРТИЛЬНОСТИ ИХ ПОТОМКОВ

Исследованы последствия употребления самцами крыс в течение 30 сут с кормом смеси растительных фитоэстрогенов в дозе 20 мг/кг для репродуктивной функции их потомков мужского пола, а также характер изменений у последних при условии дополнительной фитоэстрогенизации при молочном вскармливании. Найдено, что фитоэстрогенизация отца вызывает феминизацию его потомков, а именно аногенитальное расстояние у самцов при рождении было меньше, чем у интактных животных $2,7 \pm 0,1$ против $3,1 \pm 0,0$ мм ($P < 0,05$). Это, а также дополнительная фитоэстрогенизация родившихся крысят тормозит их соматическое и половое развитие, приводит к ослаблению половой активности у взрослых, уменьшению плодовитости из-за ухудшения оплодотворяющей способности сперматозоидов. Возможным механизмом этого может быть уменьшение относительной андрогенизации за счет 3–4-кратного роста содержания эстрадиола. Выявлено более значительные последствия для репродуктивной функции в условиях дополнительной фитоэстрогенизации потомков фитоэстрогенизованого отца.

Ключевые слова: фитоэстрогены, потомки, половое поведение, сперматогенез.

N.Yu. Selyukova, N.O. Karpenko, E.M. Koreneva, O.V. Somova, N.P. Smolyenko, S.S. Pocherneyeva, N.M. Brechka

THE IMPACT OF MALE PHYTOESTROGENIZATION ON THE SOMATO-SEXUAL DEVELOPMENT AND FERTILITY OF THE OFFSPRINGS IN RATS

The effect of phytoestrogen-rich diet administered to male rats in a dose 20 mg / kg of body weight for 30 days with the mixture of phytoestrogens on reproductive function of male offspring and the effect of additional phytoestrogenization during milk feeding have been investigated. It was shown that male phytoestrogenization leads to feminization of the offsprings. Specifically, at birth, the ano-genital distance in males was less than that measured in control rats: (2,7 ± 0,1) vs (3,1 ± 0,0) mm (P <0,05). This and additional phytoestrogenization of newborn rats during milk feeding inhibit their somatic and sexual development, weakening sexual activity in adults and reducing fertility at the expense of decreased fertilizing capacity of sperm. A possible mechanism for the observed effects may be a reduction of relative androgenization due to increased of estradiol concentration by 3-4 times. Analysis of the data revealed a significant impact of phytoestrogens in father's diet on reproductive function of their offsprings under conditions of additional phytoestrogenization after birth. Key words: phytoestrogens, descendants, sexual behavior, spermatogenesis.

SI « V Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv

REFERENCES

1. Koreneva EM, Karpenko NA. Phytoestrogens. Influence on the reproductive system. *Problems Endocrine Pathology* 2007; **3**:87-95.
2. Wigle D, Arbuckle T, Tuner M. Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev* 2008; **11**(5-6):373-517.
3. Shepelskaya NR, Prodanchuk MG. Soy phytoestrogens and their anti-androgenic action. *Problems harch* 2010; 3-4:26-31.
4. Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP. Expisure to Genistein during Gestation and lactation demasculinized the reproductive system in rats. *J Urol* 2003; **169**(4):1582-6.
5. Gladkova A, Zolotukhina V, Klimova A. Features consequences of hyperandrogenism of a parent for a offspring. *Endocrinology* 2001; 6:6.
6. Chistyakova EE. Features of reproductive disorders of male offspring received from male rats that have had stress. Thesis fundamental and Clinical endocrinology: problems, achievements and perspectives (7th Danilevsky reading), Kharkov, 21-22 February. p. 144-5.
7. Karpenko NA, Chub N, Bryzgalova G. Effect of long-term low-dosage of irradiation of germ cells in male gametogenesis postmeyotychniy phase of spermatogenesis in their offspring. *UJ of Radiology* 2000; 8:73-76.
8. Hu WY, Wu SH, Wang LL. A toxicological and epidemiological study of reproductive functions of male workers exposed to lead. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol* 1992; **36**(1):25-30.
9. General ethical principles of animal experimentation. *Endocrinology* 2003; **8**(1):142-5.
10. Gladkova AI Yaremenko FG, Nikishina LE, Kravchenko SV. Study of the composition of soy product Genistein Soy Complex using chromatographic methods. Thesis conference Kharkiv, 3-4 March. 2011 p. 29-30.
11. Byshovets TF. Experimental study embryotoxic action of medicines: methodological recommendations. *Preclinical studies of medicines*; 2001.
12. Vorobyova OA, Leontyeva OA, Korsak VS. Effect sperm morphology on of fertilization frequency and early embryonic development disorders. *Cytology* 1996; **38**(2):1248-54.
13. Rehfeldt C, Kalbe C, Nürnberg G, Mau M. Dose-dependent effects of genistein and daidzein on protein metabolism in porcine myotube cultures. *J Agric Food Chem* 2009; **57**(3):852-7.
14. Simmen FA, Mercado CP, Zavacki AM, Huang SA, Greenway AD, Kang P, Bowman MT, Prior RL. Soy protein diet alters expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat. *J Nutr Biochem* 2010; **21**(11):1106-13.
15. Smolyenko NP, Gladkova AI Karpenko N. Deleted consequences of phytoestrogens in different age periods for a sexual behavior of male rats. Thesis scientific and practical Conference «Achievements and Prospects of Experimental and Clinical Endocrinology» (9th Danilevsky reading), Kharkiv, 2-3 March. 2010 p.122-3.
16. McClellan RM, Wolz E, Davidovich A. Reproductive safety studies with genistein in rats. *Food. Chem. Toxicol* 2007; **45**(8):1319-32.

*ДУ «Ін-т проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України», Харків
E-mail: selyk3@ukr.net*

Матеріал надійшов до редакції 09.08.2013