

Вплив стресу та фітоестрогенізації у неонатальний період на фертильність статевозрілих самців щурів

Н.Ф. Величко, Н.О. Карпенко, Є.М. Коренєва,
Е.Є. Чистякова, Н.П. Смоленко, В.О. Бондаренко

Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», Харків; e-mail: natavelihko@ukr.net

У роботі експериментально показана значимість періоду молочного вигодовування щодо становлення та формування чоловічого репродуктивного здоров'я. З'ясовано, що застосування емоційного стресу та надмірної фітоестрогенізації як окремо, так і сумісно у самців щурів у період молочного вигодовування призводить до певних розладів репродуктивної системи у дорослому віці. Змодельований емоційний стрес або фітоестрогенізація за принципом імпринтингу стали причиною гіперестрогенії, андрогенного дефіциту, зміни співвідношення показника андрогенізації/естрогенізації у дорослому віці. Застосовані чинники призвели до порушення сперматогенезу, пригнічення статевої активності, зниження репродуктивного потенціалу. У стресованих тварин вміст тестостерону знижувався до значень інтактних самиць. За умов сумісного застосування стресу та фітоестрогенів у самців щурів були відсутні клінічно значущі зміни показників спермограми. Концентрація статевих гормонів відповідала фізіологічній нормі, статева поведінка характеризувалася незначними різноспрямованими змінами. Однак зниження у 2,5 раза їхньої плодючості було критичним та найбільшим серед усіх досліджуваних груп. Останнє вказує на порушення сперматогенезу та утворення дефектних сперматозоїдів, тобто на проблему батьківського геному, можливо, епігенетичної природи.

Ключові слова: емоційний стрес; фітоестрогени; молочне вигодовування; фертильність самців; спермограма; статеві гормони.

ВСТУП

Нині в Україні є потреба у більш пильній увазі до факторів, що впливають на народжуваність. Серед численних причин виникнення демографічної кризи провідне місце посідає чоловіче безпліддя. Функціонування репродуктивної системи дорослого організму залежить від умов, в яких проходив його розвиток. Несприятлива екологічна ситуація, емоційний стрес та особливості способу харчування у критичні періоди онтогенезу (до яких належить фізіологічне молочне вигодовування) здатні впливати на формування репродуктивної системи. Особливістю дії таких чинників є перманентність виявлення їх наслідків упродовж усього життя особини.

Період фізіологічного молочного вигодовування контролюється значною кількістю гормональних факторів та є надзвичайно

чутливим до дії різноманітних видів стресу. Відомо, що внаслідок стресування у самиці відбуваються зміни на центральному та периферичному нейрогуморальних рівнях, які позначаються на складових материнського молока і призводять до стресорної гіпогалактії [1]. М'який неонатальний стресоподібний досвід у нащадків асоціюється з «позитивним» ефектом або підвищенням резистентності організму. Такий стрес, на відміну від інших, викликає зниження в крові концентрації кортикостерону [2] та чутливості надниркових залоз до дії адренокортикотропного гормону (АКТГ) [3]. Вважають, що наявність у материнському молоці таких адаптогенів, як гормони надниркових залоз, АКТГ, β -ендорфін та пролактин має пристосувальний характер і забезпечує виживання її нащадків [4]. Однак сильне хронічне стресу-

© Н.Ф. Величко, Н.О. Карпенко, Є.М. Коренєва, Е.Є. Чистякова, Н.П. Смоленко, В.О. Бондаренко

вання матері порушує статеву диференціацію мозку нащадків, уповільнює зростання та строк настання статевої зрілості, а згодом призводить до зниження фертильності [5]. Гормональні та поведінкові ознаки стресу у нащадків реєструються навіть за відсутності безпосередніх контактів із матір'ю під час процедури її стресування [6]. Наслідки дії стресу на формування чоловічого фенотипу у людей тератогенні. Проте не виключають, що їхньою біологічною основою є адаптивні механізми пристосування організму та популяції до життя в стресорному середовищі [7].

Актуальною проблемою сучасності є також вплив на організм сполук, що здатні порушувати роботу ендокринної системи, так звані ендокринні деструктори (дисраптори). Відмічені зміни репродуктивної функції у людей та тварин при надходженні як штучних речовин, що використовують для виробництва синтетичних полімерів, так і надмірної кількості природних сполук, зокрема фітоестрогенів (ФЕ), котрі здатні взаємодіяти з рецепторами гормонів. Нині точний механізм дії ФЕ невідомий. Однак встановлено, що їм притаманні естрогенні та антиестрогенні властивості. Припускають, що такий неоднозначний вплив пов'язаний з різним рівнем афінитету (спорідненості) до відповідних типів рецепторів [8]. Надходження ФЕ є небезпечним у критичні періоди онтогенезу такі, як вагітність або лактація. Оскільки вони саме у цей час спроможні викликати перехідні або стійкі зміни у процесах статевого розвитку та дозріванні особин, втручаючись у статеву диференціацію мозку [9]. ФЕ можуть потрапляти до організму дитини під час лактації з материнським молоком та утворювати активні форми. До того ж, у зв'язку із розповсюдженістю штучного вигодовування немовлят (майже 70% дітей, починаючи з чотиримісячного віку), використовуються молочні суміші, у 25% яких наявні ФЕ ізоляту соєвого білка [10]. Наразі надходження ФЕ у декілька разів перевищує таке при природному годуванні [11] і спричиняє

500-кратне збільшення вмісту ізофлавонів у сечі [12]. Соєві молочні суміші вживають уже понад 50 років, однак мало уваги приділяють тому, що в крові дітей концентрація циркулюючих ізофлавонів у 13000–22000 разів перевищує концентрацію естрадіолу в плазмі крові в ранньому житті [13]. Сао та співавт. [14] вважають, що це може суттєво впливати на зменшення кількості сперматозоїдів, зміну репродуктивної функції та зниження фертильності, появу аномалій розвитку репродуктивної системи, збільшення випадків раку молочних залоз, яєчників, шийки матки, простати та сім'яників, неврологічні та імунні розлади. Цілком можливо, що пандемія хвороб обміну речовин, зокрема, цукрового діабету та ожиріння, депресивні розлади теж можуть бути пов'язані з дією цих чинників у критичні періоди онтогенезу організму, хоча ці питання вивчені недостатньо. Практично зовсім не досліджено наслідки сумісної дії стресу та надмірної фітоестрогенізації на ранніх етапах онтогенезу. Відсутність клінічних спостережень про негативний вплив ФЕ на тлі стресу (або навпаки) на немовлят та вагітних, нестача вагомих доказів їхньої безпечності/небезпечності для особин у ранні періоди онтогенезу потребує належних експериментальних і клінічних досліджень.

Метою нашої роботи було визначення характеру змін статевої поведінки, фертильності, показників спермограми та вмісту статевих гормонів у сироватці крові дорослих самців щурів внаслідок дії емоційного стресу, надлишку ФЕ та сумісного застосування цих чинників у період молочного вигодовування.

МЕТОДИКА

Експеримент та утримання тварин проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005) і національних «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених V

національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Для одержання нащадків відбирали інтактних самиць з 4-5-добовим естральним циклом та спаровували їх з інтактними самцями. За 1-2 доби до пологів вагітних самиць розсаджували в окремі клітки. День пологів вважали першим днем життя щурят.

Моделювання емоційного стресу у матері та нащадків проводили з 3-ї по 15-ту добу життя щурят відокремленням кожного з них від виводка й матері та експозиції останньої до запаху «чужого» самця [6]. Тривалість таких маніпуляцій як для щурят, так і для матері становила 15 хв. Надлишкову фітоестрогенізацію створювали згодовуванням самицям-матерям з 3-ї по 21-шу добу лактації біологічно активної домішки у дозі 100 мг/кг. Використовували домішку Genistein Soy Complex isoflavone-rich «Soylife, США» із відносним вмістом ізофлавонів (у перерахунку на індивідуальні аглікони): дайзеїну – 60%, гліцитеїну – 22%, геністеїну – 18% [15]. Дозу розраховували за так званим «геністеїновим еквівалентом», який показує умовну естрогенну активність різних біофлавоноїдів відносно зазначеної активності геністеїну [16]. На 30-ту добу життя нащадків відсаджували від матері, розділяли за статтю. До 1-ї контрольної групи ввійшли інтактні самці, до 2-ї контрольної – інтактні самиці. Ці тварини були потрібні для визначення характеру відмінностей та з'ясування спрямованості змін показників у дослідних самців. До 3-ї групи ввійшли щури, що зазнали дії емоційного стресу, до 4-ї – тварини з надлишком ФЕ, до 5-ї – тварини, що зазнали одночасної дії стресу та ФЕ. В усіх групах кількість тварин була однаковою ($n = 12$). У віці 10 міс у дослідних самців оцінювали статеву поведінку. У тесті з рецептивною самицею визначали кількість наближень до неї самця, кількість садок, інтромісій та еякуляцій. Оцінювали часові показники: латентність садки, інтромісії, еякуляції, розраховували тривалість постеякуляторного інтервалу, коефіцієнт садки/інтромісії. Фертильність самців визначали

за результатами парування з інтактними здоровими самицями. Співвідношення числа самиць до самців становило 3:1. Першою добою вагітності вважали день знаходження сперматозоїдів у вагінальних мазках самиць. Розраховували у відсотках індекс запліднення та індекс вагітності. Самиць декапітували на 20-ту добу вагітності під тіопенталовим наркозом. Вилучали яєчники, в яких підраховували кількість жовтих тіл вагітності, а в матці – число місць імплантації та живих плодів. Визначали ступінь перед- та післяімплантаційних, а також загальних внутрішньоутробних втрат. За результатами парування з інтактними самицями розраховували інтегральний показник середньої реалізованої плідності (фертильності) самців (Φ_i) та його похибку ($\pm S_{\Phi_i}$) [17]. Із експерименту самців виводили швидкою декапітацією. Далі у суспензії епідидимальних сперматозоїдів оцінювали стан сперматогенезу [18]. У сироватці крові за допомогою тест-наборів для імуноферментного аналізу визначали вміст статевих гормонів: естрадіолу (E_2), загального тестостерону (Т).

Відповідність розподілу показників у вибірці визначали, використовуючи закон нормального розподілу та критерій Шапіро–Уїлка; результати представлено як середнє арифметичне (\bar{X}) та його похибка ($\pm S_{\bar{X}}$). Нульову гіпотезу про відсутність різниці між групами перевіряли із застосуванням параметричних та непараметричних методів U-критерій Манна–Уїтні та критерій Q Дана. Розходження вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні вмісту статевих гормонів було виявлено, що концентрація E_2 у крові стресованих самців майже в 1,5 раза вища, ніж у інтактних самців, але в 1,8 раза нижча, ніж у інтактних самиць (табл. 1; $P < 0,05$). Вміст Т у сироватці крові виявився майже втричі меншим відносно значень інтактних самців. Тобто стресовані тварини за вмістом андрогену не відрізнялися від інтактних самиць (див. табл. 1; $P < 0,05$).

Таблиця 1. Вміст статевих гормонів у дослідних тварин ($X \pm S_x$, $n = 6$)

Група тварин	Загальний тестостерон (Т), нмоль/л	Естрадіол (E_2), пмоль/л	$T/E_2 \times 10^{-3}$
Інтактні самці	18,90 \pm 1,2	24,20 \pm 0,6	0,79 \pm 0,1
Інтактні самиці	5,6 \pm 0,3 *	64,59 \pm 1,8 *	0,09 \pm 0,0 *
Стресовані самці	6,78 \pm 0,4*	35,72 \pm 1,9 **,*	0,19 \pm 0,0 **,*
Самці з надлишком фітоестрогенів	10,90 \pm 0,6 **,*	23,27 \pm 0,4 **	0,47 \pm 0,0 **,*
Стресовані самці з надлишком фітоестрогенів	23,59 \pm 1,0 **	22,28 \pm 0,2 **	1,06 \pm 0,1 **

Примітка: тут і в табл. 2 і 3. *P < 0,05 щодо інтактних самців; ** P < 0,05 щодо інтактних самиць.

Розрахунок співвідношення T/E_2 , який є показником андрогенізації/естрогенізації організму показав, що у 3-й групі він у 4 рази менший відносно значень інтактних самців, а щодо інтактних самиць – удвічі вищий. Водночас це співвідношення у інтактних самців у 8,7 рази більше порівняно зі значеннями у інтактних самиць. Тобто змодельований емоційний стрес став причиною андрогенного дефіциту та гіперестрогенізації самців у дорослому віці. Це призвело до зміни співвідношення T/E_2 , яке суттєво відрізняється від фізіологічної норми інтактних самців. Зниження вмісту Т у дослідних тварин набувало такого значення при якому його концентрація не відрізнялася від показників інтактних самиць, що є ознакою зменшення фізіологічних статевих відмінностей. Імовірно, гіпоандрогенія у стресованих самців є наслідком підвищення активності ароматази у тканинах-продуцентах естрогенів та може свідчити про порушення інкреторної

функції сім'яників або механізму зворотного зв'язку. При високій концентрації E_2 через гіпофіз надсилається сигнал до сім'яників, що призводить до зменшення або тимчасового припинення синтезу Т. Але при досить тривалому збереженні високої концентрації E_2 сім'яники отримують помилковий сигнал, що ще більше гальмує синтез Т [19].

Спермограма відображає стан репродуктивної системи самця. Аналіз показників спермограми суспензії епидидимальних спермій у стресованих самців виявив суттєві зміни: майже вдвічі була меншою загальна концентрація сперматозоїдів, у 2,4 рази концентрація морфологічно нормальних форм та на 30% частка рухливих гамет. Відсоток патологічних форм перевищував у 2 рази показники інтактних самців (табл. 2; P < 0,05).

Відомо, що відповідна статеві поведінка залежать від диференціації мозку та подальшого функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі [20]. Тому гормональні зміни,

Таблиця 2. Показники спермограми у дослідних самців ($X \pm S_x$, $n = 12$)

Група тварин	Концентрація сперматозоїдів, 10^6 /мл	Рухливі сперматозоїди, %	Патологічні форми, %	Морфологічно нормальні форми, 10^6 /мл
Інтактні самці	77,2 \pm 1,4	83,4 \pm 1,7	17,6 \pm 0,7	63,6 \pm 1,1
Стресовані самці	43,2 \pm 3,3*	61,5 \pm 4,4*	39,3 \pm 2,5*	26,6 \pm 2,6*
Самці з надлишком фітоестрогенів	73,27 \pm 1,8	65,36 \pm 1,8*	30,00 \pm 1,1*	51,23 \pm 1,3*
Стресовані самці з надлишком фітоестрогенів	76,33 \pm 1,5	73,17 \pm 2,1*	23,33 \pm 1,0*	58,40 \pm 0,7*

що виникли внаслідок дії стресу у період фізіологічного молочного вигодовування, могли вплинути на характер статевої поведінки, яку демонстрували дорослі тварини. Аналіз результатів цієї частини дослідження показав відсутність самців, які за час тесту встигали розпочати другу сесію паруваль (рисунок; $P < 0,05$), що, можливо, пов'язано з андрогенним дефіцитом та гіперестрогенією [21]. Імовірно, це свідчить про післястресові відхилення на усіх рівнях регуляції, які позначилися на статевій поведінці [22]. Також у дослідних самців відмічено сповільнення статевого акту та ослаблення копулятивної активності: зниження кількості еякуляцій на 67% і подовження її латентності на 76,2% (див. рисунок; $P < 0,05$).

Сповільнення статевого акту може бути наслідком зниження концентрації дигідротестостерону (ДГТ). Адже тривалість латентності еякуляції зворотно пропорційна вмісту 5α -відновленого метаболіту Т-ДГТ. Час рефрактерного періоду (постеякуляторний інтервал) віддзеркалює активність передньої частки гіпоталамуса, що контролюється Т, ароматизованим до E_2 . Це може вказувати на порушення метаболізму андрогена в центрах регуляції статевої поведінки.

Дослідження фертильності показало збереження у стресованих тварин здатності до запліднення інтактних самиць. Індеси запліднення (77,8%) та вагітності (85,7%) не відрізнялися від норми (86,7 та 84,7% відповідно). Але внаслідок збільшення внутрішнь-

оутробних втрат на передімплантаційному етапі у 8,8 раза та післяімплантаційному – на 43% загальна кількість приплоду зменшилася майже втричі (табл. 3).

Це означає, що у заплідненні брали участь дефектні сперматозоїди. Саме пошкодження батьківського геному у вигляді генних мутацій, мікрodelецій, анеуплоїдії, епігенетичних змін, пошкоджень ДНК і порушень компактизації хроматину в чоловічих статевих клітинах можуть призводити до переривання вагітності на різних строках [19]. У інтактних самиць, що були запліднені стресованими самцями, на 34% зменшилася частка плодів чоловічої статі. Маса та краніо-каудальний розмір шурят достовірної різниці не мали. Зафіксовано зниження на 57,4% показника інтегральної реалізованої плідності (фертильності).

Надходження сполук із естрогенною активністю так само мало імпринтинговий вплив на гормональні характеристики дорослих тварин. Виявлено майже дворазовий дефіцит загального Т у крові самців 4-ї групи (ФЕ) (див. табл. 1). Однак вміст E_2 у сироватці був на рівні фізіологічної норми. На 41% виявилось меншим співвідношення Т/ E_2 (див. табл. 1). Незважаючи на те, що ФЕ не депонуються в організмі, вони спроможні до спотворювання взаємодії з рецепторами естрогенів. Це надає їм потенційну здатність до модифікації механізмів регуляції програми становлення статевих особливостей метаболізму та рецепції гормонів в органах.

Таблиця 3. Внутрішньоутробні втрати та інтегральна плідність ($X \pm S_x$, $n = 12$)

Група тварин	Втрати			Загальна кількість плодів на самицю	Інтегральна плідність, од
	передімплантаційні, %	післяімплантаційні, %	Загальні, %		
Інтактні самці	4,5 ± 2,1	12,2 ± 2,0	16,3 ± 2,8	8,9 ± 0,6	7,5 ± 0,5
Стресовані самці	39,7 ± 8,5*	6,9 ± 0,9*	45,1 ± 7,4*	6,3 ± 0,8*	3,2 ± 0,6*
Самці з надлишком фітоестрогенів	16,0 ± 7,4*	7,7 ± 0,8	19,5 ± 8,2	9,7 ± 1,0	4,8 ± 0,5*
Стресовані самці з надлишком фітоестрогенів	18,2 ± 4,6*	24,4 ± 6,8*	36,9 ± 6,7*	7,23 ± 0,8*	3,0 ± 0,3*

Порушення репродуктивної функції у щурів із 4-ї групи були менш важкі, ніж у стресованих самців. Загальна кількість сперматозоїдів залишалася незмінною, хоча виявилось вдвічі більше патологічних та на 22% менше рухливих сперміїв (див. табл. 2). Це призвело до зменшення морфологічно нормальних гамет майже на 20%. Тобто спостерігалися лише порушення процесу сперміогенезу. Варто зазначити, що нормальна концентрація сперматозоїдів, наразі швидше за все, пов'язана із збереженням вмісту фолікулолестимулюючого гормону (ФСГ) на перших етапах розвитку сперматогенного епітелію у нащадків. Порушення процесів сперміогенезу (утворення значної кількості аномальних форм), на нашу думку, є наслідком відстроченої гіперестрогенізації.

Статева поведінка тварин 4-ї групи мала деякі особливості. Через значне зростання постекуляторного інтервалу жоден із самців не встигав розпочати другу сесію паруваль за час тесту (див. рисунок). Також підвищувалась активність залицяльної поведінки та ослаблювалась копулятивна. Про це свідчило зниження кількості копуляцій до $9,0 \pm 2,3$ від $12,6 \pm 0,7$ од. у контролі та подовження латентності всіх складових спарювальної поведінки: садок – на 38,4%, інтромісій – на 75,7% та еякуляцій – на 42,1%.

Однак зміни спермограми та статевої поведінки не завадили дослідним самцям запліднити інтактних самиць. Індеси запліднення та вагітності не виходили за межі норми. Порушення фертильності проявилось у зростанні доімплантаційної загибелі ембріонів у вагітних самиць у 3,3 раза ($P < 0,05$), хоча загальний ступінь внутрішньоутробних втрат статистичної значущості не мав (див. табл. 3). Також у виводках зменшилася на 22% кількість плодів чоловічої статі, а жіночих навпаки – збільшилася на 53%. Інтегральний показник реалізованої плідності у 4-й групі став на 36% меншим. Імовірно, це свідчить про утворення значної кількості неповноцінних сперматозоїдів із порушен-

нями на субклітинному або геномному рівні.

Імпринтинговий вплив одночасної дії обох досліджуваних чинників мав дещо парадоксальний ефект. Концентрація Т, Е₂ та їх співвідношення у сироватці крові знаходились у фізіологічних межах (див. табл. 1). Тобто при поєднанні двох пошкоджуючих чинників їхній вплив не потенціювався, а відбувалося пригнічення або нівелювання одного фактора іншим. У такому випадку стрес нівелює або пригнічує дію ФЕ. Це можна пояснити зміною концентрації глюкокортикоїдів (ГК). Так, у попередній роботі нами було встановлено, що застосовані умови експерименту позначаються на концентрації кортикостероїдів у щурів як на 22-гу добу життя, так і у дорослому віці [23]. У стресованих щурів цей показник не відрізнявся від контролю в цей термін ($259,0 \pm 7,3$) щодо ($246,0 \pm 7,9$) нмоль/л, а у 6 міс він був вищим у 1,6 раза (від $296 \pm 12,3$ до $321,8 \pm 5,2$ нмоль/л). У 5-й групі (стрес і ФЕ) вміст кортикостерону був більшим, ніж у контролі на ранньому етапі життя на 14% (від $259,0 \pm 7,3$ до $295,1 \pm 5,5$ нмоль/л; $P < 0,05$). Але у дорослому віці ця різниця зникла ($196 \pm 12,3$ щодо $206,5 \pm 18,4$ нмоль/л; $P < 0,05$). Механізм такої одночасної дії гормонів стресу (ГК) та естрогеноподібних сполук залишається невідомим. Але, можливо, це пов'язано з наявністю значної гомології в будові стероїдних рецепторів. Оскільки існує припущення, що еволюція цих рецепторів має спільні витоки утворення [24]. Фармакологічне застосування ГК підвищує експресію естрогенових рецепторів та гормональний ефект естрогенів [24]. Однак одночасно знижується експресія самих глюкокортикоїдних рецепторів та ефект ГК. Такі дані вказують на сильний інгібуючий вплив ГК на роботу естрогенів в органах. Тобто вплив ГК опосередкований регуляторним шляхом із залученням естрогенових рецепторів, а, значить, і взаємодією з однаковими регуляторними послідовностями молекули ДНК для естрогенових рецепторів. Співвідношення вмісту

глюкокортикоїдів/естрогенів може впливати на експресію рецепторів та на вираженість гормонального ефекту.

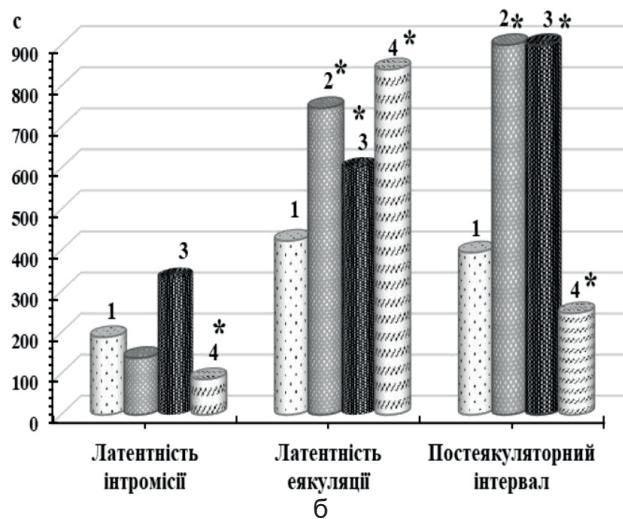
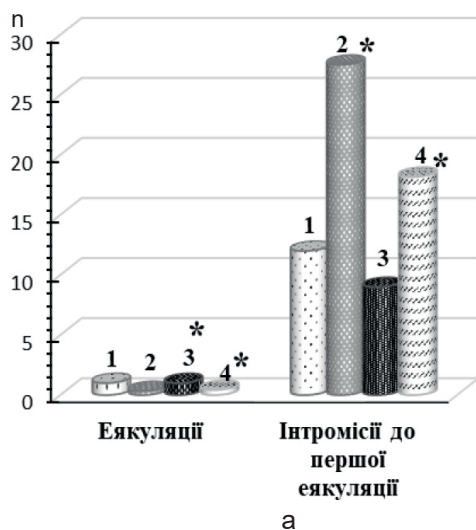
Одночасна дія досліджуваних чинників не мала значного імпринтингового ефекту. Концентрація сперматозоїдів відповідала нормі, хоча була вищою на 33% частка патологічно змінених гамет та меншим на 12% вміст рухливих сперматозоїдів відносно фізіологічної норми (див. табл. 2). Ці зміни зумовили невелике (на 8,1%), але статистично вагоме зменшення морфологічно нормальних гамет, що є ознакою неповноцінного перебігу сперміогенезу.

Щодо статевої поведінки у 5-й групі: було зареєстровано більше на 76% інтромісій (див. рис.), однак це не призвело до зростання кількості еякуляцій через збільшення удвічі їхньої латентності. Постеякуляторний рефрактерний інтервал скоротився на 37,5%, а кількість самців, що встигали розпочати другу серію паруваль, зменшилась у 2 рази. Враховуючи те, що статеві гормони (Т, Е₂ та ДГТ) діють на різних рівнях регуляції статевої поведінки, можна вважати, що майже двократне зростання латентності еякуляції та скорочення рефрактерного періоду між першою та другою сесією паруваль вказує на зменшення у периферичних тканинах вмісту

ДГТ, тобто порушується баланс Т/ДГТ.

Зміни спермограми та статевої поведінки не позначились суттєво на здатності самців 5-ї групи до запліднення інтактних самиць. Індекси запліднення та вагітності не відрізнялися від контрольних значень. Але у вагітних самиць були великі внутрішньоутробні втрати: у передімплантаційний період – у 4 рази та у післяімплантаційний – удвічі (див. табл. 3), що зумовило більш ніж дворазове зростання загальних внутрішньоутробних втрат відносно інтактних тварин. Плоди не відрізнялися від контрольних за краніо-каудальним розміром та масою, хоча ознаки статевої приналежності у нащадків-самців були більш вираженими: розмір ано-генітальної відстані був більшим на 7% ($P < 0,05$). Виявлено зменшення кількості плодів чоловічої статі – на 21% ($P < 0,05$). Середня реалізована плідність зменшилась у 2,5 рази ($P < 0,05$). Тобто розлади визначаються переважно дефектами статевих клітин та їхнього спадкового матеріалу, що виникають у процесі сперміогенезу. Це деякою мірою пояснює отримані результати щодо перебігу вагітності у самиць, запліднених самцями 5-ї групи.

Наукове вивчення як окремої, так і сумісної дії стресу та фітоестрогенізації на



Окремі елементи статевої поведінки самців шурів: а – кількісні показники; б – часові показники; 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – фітоестрогени, 4 – стрес і фітоестрогени; * $P \leq 0,05$ відносно контролю

репродуктивну функцію зумовлено практичною повсякденністю та надзвичайною розповсюдженістю цих явищ у суспільстві. Адже результати досліджень впливу цих чинників на матір та розвиток її нащадків досить суперечливі. Тому прогрес у розумінні механізмів їх впливу на гуморальну регуляцію та спрямованість метаболічних процесів в організмі, що розвивається, стане підґрунтям заходів профілактики, спрямованих на зменшення частоти чоловічої гіпофертильності.

Таким чином, період молочного вигодування є надзвичайно важливим етапом у становленні та формуванні чоловічого репродуктивного здоров'я. Отримання у цей період емоційного стресу та надмірної фітоестрогенізації має імпринтинговий відстрочений негативний характер, що призводить до розладів у функціонуванні репродуктивної системи статевозрілих самців. Змодельований емоційний стрес або надмірна фітоестрогенізація спричиняють порушення процесу статевого розвитку, що проявляється змінами сперматогенезу, пригніченням статевої активності, зниженням репродуктивного потенціалу та набутим андрогенодефіцитом. Стресовані тварини характеризувалися зменшенням фізіологічних статевих відмінностей гормональнозалежних процесів у дорослому віці. За умов сумісного застосування у пошкоджуючих чинників на тлі відсутності значущих змін показників спермограми, концентрації статевих гормонів та незначних різноспрямованих змін статевої поведінки спостерігається критичне зменшення репродуктивного потенціалу у 2,5 раза, що призводить до важких імпринтингових наслідків зниження плодючості дорослих самців.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Н.Ф. Величко, Н.А. Карпенко, Е.М. Коренева, Е.Е. Чистякова, Н.П. Смоленко, В.А. Бондаренко

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА И ФИТОЭСТРОГЕНИЗАЦИИ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ КРЫС

В работе экспериментально показана значимость периода молочного вскармливания для становления и формирования мужского репродуктивного здоровья. Установлено, что применение эмоционального стресса и избыточной фитоестрогенизации как отдельно, так и совместно у самцов крыс в период молочного вскармливания приводит к определенным расстройствам репродуктивной системы во взрослом возрасте. Смоделированный эмоциональный стресс или фитоестрогенизация по принципу импринтинга стали причиной гиперэстрогении, андрогенного дефицита, изменения соотношения показателя андрогенизации/эстрогенизации у взрослых особей. Примененные факторы привели к нарушению сперматогенеза, угнетению половой активности, снижению репродуктивного потенциала. У стрессированных животных концентрация андрогенов приобрела такие значения, что по содержанию тестостерона они не отличались от интактных самок. При совместном применении эмоционального стресса и избыточной фитоестрогенизации в подсосный период у взрослых самцов крыс отсутствовали клинически значимые изменения показателей спермограммы. Концентрация половых гормонов отвечала физиологической норме, половое поведение характеризовалось незначительными разнонаправленными изменениями. Однако снижение в 2,5 раза их плодовитости (или потенциального количества потомков) было критическим и самым большим среди всех исследуемых групп. Последнее указывает на нарушение сперматогенеза и образования дефектных сперматозоидов, то есть на проблему отцовского генома, возможно, эпигенетической природы.

Ключевые слова: эмоциональный стресс; фитоестрогены; молочное вскармливание; фертильность самцов; спермограмма; половые гормоны.

N.F. Velichko, N.O. Karpenko, E.M. Koreneva, E.E. Chistyakova, N.P. Smolenko, V.O. Bondarenko

THE EFFECT OF STRESS AND PHYTOESTROGENIZATION IN THE NEONATAL PERIOD ON THE FERTILITY OF ADULT MALE RATS

State Institution «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine»
e-mail: natavelihko@ukr.net

In the paper the significance of milk-feeding period for the formation of male reproductive health is experimentally shown. It has been found that the use of emotional stress and

excessive phytoestrogenization, both separately and together, in male rats during breastfeeding leads to certain disorders of the reproductive system in adulthood. Modeled emotional stress or phytoestrogenization on the principle of imprinting caused hyperostrogeny, androgen deficiency, changes in the ratio of androgenization/estrogenization in adulthood. The applied factors led to impaired spermatogenesis, inhibition of sexual activity, and decreased reproductive potential. In the stressed animals, the decrease in androgens was such that the testosterone levels did not differ from intact females. In the case of joint application of the factors in the suckling period, in adult male rats there were no clinically significant changes in the sperm count. The concentration of sex hormones corresponded to the physiological norm, sexual behavior was characterized by slightly differentiated changes. However, a 2.5-fold decrease in their fertility (or potential number of offspring) was critical and largest among all study groups. The latter indicates impaired spermatogenesis and the formation of defective sperm, that is, the problem of the parental genome, possibly epigenetic in nature.

Key words: emotional stress; phytoestrogens; breastfeeding; male fertility; spermogram; sex hormones.

REFERENCES

1. Neumann ID, Torner L, Wigger A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behavior in virgin, pregnant and lactating rats. *J Neurosci*. 2000;95:567-75.
2. Catalani A, Alemà GS, Cinque CC, et al. Maternal corticosterone effects on hypothalamus-pituitary-adrenal axis regulation and behavior of the offspring in rodents. *J Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(7):1502-17.
3. Levine S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox Res*. 2002;4(5-6):557-64.
4. Pawluski JL, Lambert KG, Kinsley CH. Neuroplasticity in the maternal hippocampus: Relation to cognition and effects of repeated stress. *Horm Behav*. 2016;77:86-97.
5. Reznikov AG. Functional teratology of the neuroendocrine system: etiology, pathogenesis, prevention. *Health Ukraine*. 2007;22(1):19-21. [Ukrainian].
6. Moles A, Rizzi R, D'Amato FR. Postnatal stress in mice: does "stressing" the pups? *J Dev Psychobiol*. 2004;44(4):230-7.
7. Walker CD, Deschamps S, Proulx K, et al. Mother to infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and implications for humans. *J Y Psychiat Neurosci*. 2004;29(5):382-91.
8. Litvitsky PF. *Clinical pathophysiology: a textbook*. M.: Practical medicine. 2015:776. [Russian].
9. Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, et al. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology*. 2011;32(2):261-7.
10. Ball ER, Caniglia MK, Wilcox JL, Burr J, et al. Effects of genistein in the maternal diet on reproductive development and spatial learning in male rats. *Horm Behav*. 2010;57(3):313-22.
11. Jochum F, Altheheld B, Meinardus P. Mothers' consumption of soy drink but not black tea increases the flavonoid content of term breast milk: a pilot randomized, controlled intervention study. *Ann Nutr Metab*. 2017;70(2):147-53.
12. Hoey L, Rowland IR, Lloyd AS, et al. Influence of soya-based infant formula consumption on isoflavone and gut microflora metabolite concentrations in urine and on faecal microflora composition and metabolic activity in infants and children. *Br J Nutr*. 2004;91(4):607-16.
13. Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr*. 1998;68 (6):1453-61.
14. Cao YA, Calafat AM, Doerge DR, et al. 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;30:225-35.
15. Gladkova AI, Yaremenko FG, Nikishina LYe, Kravchenko SV. The study of the composition of the soybean product genistein soy complex by chromatographic methods. *Advances and prospects of experimental and clinical endocrinology (Tenth Danile Readings): Mater. Research Practice Conf. from the international. participation, Kharkiv 3-4 March, 2011:29-30*. [Ukrainian].
16. Owens W, Ashby J, Odum J, et al. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dietary phytoestrogen analyses. *Environ Health Perspect*. 2003;111(12):1559-67.
17. Karpenko NO, Talko VV, Omelchuk ST, Lapta SS. Integral assessment of the reproductive function of male laboratory animals. *Ukr Biopharm Zh*. 2011;13(2):64-8. [Ukrainian].
18. Petrishchev VS, Schelochkov AM. Assessment of sperm morphology according to strict criteria (literature review). *Prob Reproduct*. 2002;(3):87-91. [Ukrainian].
19. Mohort TV, Zabarovskaya ZV, Shepelkevich AP. *Clinical endocrinology: textbook. allowance*. Minsk: Higher education School. 2013:415. [Belarus].
20. Handa RJ, Weiser M. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrin*. 2014;(16):67-72.
21. McHenry J, Carrier N, Hull E, et al. Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. *Front Neuroendocrin*. 2014; 35(1):42-57.
22. Keen-Rhinehart E, Michopoulos V, Toufexis DJ, et al. Continuous expression of corticotropin-releasing factor in the central nucleus of the amygdala emulates the dysregulation of the stress and reproductive axes. *J Mol Psychiat*. 2009;14(1):37-50.
23. Karpenko NO, Somova OV, Koreneva EM, et al. Hormonal changes in adult rats exposed to stress and/or phytoestrogens during breastfeeding. *Endocrinology*. 2011;16 (1):76-82. [Ukrainian].
24. Emelyanov VYu. Morphological changes of the uterus under the action of estrogens under conditions of prolonged increase of glucocorticoid hormone concentration: author. Dis. ... cand. med. sci: 03.00.25; CSU them. I.N. Ulyanov; Moscow. 2007:26. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 04.05.2020