

**НАСЛІДКИ СУМІСНОЇ ДІЇ СТРЕСУ ТА ФІТОЕСТРОГЕНІВ
У НЕОНАТАЛЬНИЙ ПЕРІОД ДЛЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ
ТА МЕТАБОЛІЧНОГО ПРОФІЛЮ САМОК ЩУРІВ**

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

(м. Харків)

Робота виконана згідно планової НДР «Віддалені наслідки впливу стресу та надлишку фітоестрогенів у період молочного вигодовування на репродуктивну функцію особин і корекція її порушень (експериментальне дослідження)», № держ. реєстрації 0109U000309.

Вступ. Значна частина порушень репродуктивного здоров'я формується під час вагітності та у ранньому дитячому віці. Серед причин певне місце посідає гормональний дисбаланс у стресованих вагітних та матерів, що годують [10]. Навіть слабкий стрес самки, що вигодовує дітей (експозиція до запаху «чужого» самця), не позначаючись на самому процесі лактації, викликає відповідну реакцію й у її щурят [20].

Останнім часом зростає кількість публікацій про негативну дію ФЕ (фітоестрогенів), надходження яких у найбільш чутливі до експозиції сполук з естрогеноподібною дією періоди онтогенезу може викликати транзиторні або стійкі зміни статевого розвитку та дозрівання особин [15, 17]. Щодо сумісної дії стресу та ФЕ, які можуть змінювати характер функціонування репродуктивної системи статевозрілих самок та впливати на позагонадні характеристики, даних ми не знайшли.

Саме тому **метою дослідження** було вивчення сумісного впливу емоційного стресу та ФЕ у неонатальний період на репродуктивну функцію та метаболічний профіль статевозрілих самок.

Об'єкт і методи дослідження. Робота виконана на самках щурів популяції Вістар 10-місячного віку, матерям яких (група Стрес+ФЕ) з 3 по 21 день лактації згодовували харчову домішку Genistein Soy Complex isoflavone-rich (Soylife, USA; відносний вміст ізофлавонів: дайдезін 60%, гліцитейн 22%, геністеїн 18%, [3]) у дозі 100 мг/кг м. т. за «геністеїновим еквівалентом», що вважається максимальною безпечною дозою за показниками ембріональної токсичності [21]. У групах Стрес та Стрес+ФЕ емоційний

стрес відтворювали висаджуючи самку-матір на 15 хв у клітку, де до цього знаходились «чужі» самці («maternal separation stress») з 3 по 15 добу лактації [16]. У цей же час самки-щурята по одинці виклалися на чисту підстилку («clean bedding»). Контролем були інтактні самки.

У дорослих самок під час проеструсу вивчали статеву поведінку за показниками процептивності (знайомство, залицання, реагування на самця) та рецептивності (відношення кількості лордозних поз самки до суми садок та інтромісії інтактного самця) [11]. Потім самок залишали з самцями, першою добою вагітності вважали день появи у вагінальних мазках сперміїв. На 20 добу самок знеживлювали декапітацією та визначали рівень внутрішньоутробних втрат [2].

У сироватці крові вимірювали вміст стабільних метаболітів циклу оксиду азоту реакції Грина з реактивом Грися при $\lambda = 546$ нм [9] та аргініна – за методом [1] при $\lambda = 500$ нм на спектрофотометрі СФ-46.

Отримані дані представлені як середнє арифметичне (\bar{x}) та його похибка (S_x). Статистичну значущість різниці між групами оцінювали за критеріями Q Дана й χ^2 та вважали значущими при $P \leq 0,05$ [6].

Результати досліджень та їх обговорення. Стресування самок в неонатальний період призвело у дорослому віці до зниження коефіцієнта лордозу на 14% ($P < 0,05$) відносно контролю (табл. 1). Відомо, що ця реакція, яка є сигналом готовності самки до парування, посилюється прогестероном, який сенсibiliзує нервову систему до дії естрогену [13].

Таблиця 1

Показники статевої поведінки та вмісту гормонів у крові

Показник	Контроль		Стрес		Стрес+ФЕ	
	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$
Коефіцієнт лордозу, %	7	100,0±0,0	7	85,7±4,3 ¹⁾	7	95,4±3,2
Процептивна поведінка, ум. од.	7	15,6±0,8	7	16,3±2,5	7	29,6±4,6 ¹⁾²⁾
Прогестерон, нмоль/л	7	93,5±8,2	7	65,4±6,7 ¹⁾	7	97,2±7,9
Естрадіол, пмоль/л	7	67,9±4,1	7	91,7±16,9	7	130,5±21,1 ¹⁾
Тестостерон, нмоль/л	7	1,63±0,17	7	2,52±0,33 ¹⁾	7	0,93±0,16 ¹⁾²⁾

Примітка: ¹⁾ – Статистично значущі розбіжності з даними групи Контроль.

²⁾ – Статистично значущі розбіжності з даними групи Стрес.

Андрогени у малих дозах посилюють привабливість самки, а у великих – пригнічують потяг. Крім того, недостатність прогестерону призводить до зниження чутливості гіпоталамусу до дії естрогенів і тим самим сприяє пригніченню рецептивної поведінки.

Наші попередні дослідження показали, що в крові самок групи Стрес в стадії покою реєстрували зменшення вмісту прогестерону на 30%, підвищення рівню тестостерону на 55% ($P < 0,05$) та незначне підвищення концентрації естрадіолу відносно даних інтактних тварин (**табл. 1**) [7].

Однак не дивлячись на деяке зниження статевої активності усі піддослідні тварини виявилися заплідненими, а у подальшому – вагітними. Водночас порушення гормонального тла негативно вплинуло на перебіг вагітності, що проявилось у зниженні кількості плодів на 22% ($P < 0,05$) за рахунок збільшення внутрішньоутробних втрат майже вчетверо ($P < 0,05$) порівняно з таким у самок групи Контроль (**табл. 2**). Отримані дані узгоджуються з відомим фактом, що нестача прогестерону на тлі гіперандрогенемії сприяє зростанню передімплантаційної гибелі ембріонів [12]. Такі гормональні зміни можуть бути наслідком порушення процесу формування пулу примордіальних фолікулів у яєчниках самок у перші дні після народження під впливом емоційного стресу. Можливо, з пулу «скомпроментованих» у ранньому постнатальному віці примордіальних фолікулів утворюються неповноцінні зрілі фолікули з порушеною функцією гормонпродукуючих компонентів.

Зважаючи на певні гормональні відмінності та змінену плідність, ми вважали за доцільне дослідити

у самок деякі метаболічні характеристики. Так, в крові самок групи Стрес був виявлений значно більший рівень нітритів та аргініну порівняно з таким у інтактних самок (**табл. 3**).

У фізіологічних концентраціях оксид азоту задіяний у процесах запліднення. Підвищення останнього може призводити до порушення мітохондріального окислення в яєчниках зі зниженням якісних характеристик яйцеклітини, які утворюють нежиттєздатні зародки [4]. Крім того, збільшення концентрації вільного аргініну в сироватці крові у цих самок може свідчити про пошкодження систем його реутилізації та зменшення його біодоступності як субстрату для NOS-синтаз [5].

Отже, стресування самок у неонатальний період призводить до гормонального та про/антиоксидантного дисбалансу, пригнічення статевої поведінки, порушення процесів виношування плодів.

Фітоестрогенізація щурят поряд з емоційним стресом змінювала наслідки останнього. Так, у дорослих самок концентрація прогестерону дорівнювала значенню групи Контроль, а вміст естрадіолу в крові перевищував контрольні дані майже в 2 рази на тлі зниження рівня тестостерону на 43% ($P < 0,05$, **табл. 1**). А як відомо [13], естрогени активізують центри жіночої статевої поведінки, отже і збільшення загального показника рецептивної поведінки було очікуваним (**табл. 1**).

На цьому гормональному тлі процеси імплантації та виношування проходили без порушень (**табл. 2**). Можливо, цьому сприяв достатній рівень прогестерону та менший вміст нітритів і більший – аргініну

Таблиця 2

Показники перебігу вагітності

Показник	Контроль		Стрес		Стрес+ФЕ	
	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$
Кількість (на самку):						
жовтих тіл	10	11,4±0,7	9	11,4±0,6	9	11,2±0,9
місць імплантацій	10	10,8±0,6	9	9,0±1,0	9	10,3±1,0
плодів	10	10,6±0,5	9	8,3±0,9 ¹⁾	9	10,2±1,0
Доімплантаційні втрати, %	10	5,0±1,4	9	21,5±7,3 ¹⁾	9	8,2±4,4
Постімплантаційні втрати, %	10	1,6±1,1	9	8,7±4,0 ¹⁾	9	0,9±0,9
Загальні втрати (%)	10	6,5±1,9	9	28,3±7,9 ¹⁾	9	9,1±4,3

Примітка: ¹⁾ – Статистично значущі розбіжності з даними групи Контроль.

в крові цих самок порівняно зі стресованими тваринами (**табл. 3**). Тобто, фітоестрогенізація нівелювала негативний вплив стресу і зберігала нормальний рівень плідності.

Відомо, що стрес різної сили має різні наслідки. Короткострокова стимуляція (handling) знижує чутливість гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи до стресу за рахунок зменшення викиду глюкокортикоїдів у відповідь на стрес. Останнє відбувається на тлі збільшення щільності рецепторів кортикостерону в гіпокампі, що, навіть, захищає у дорослому віці від нейрональних і когнітивних порушень у разі ішемії мозку [18]. І навпаки, сильний стрес (відділення від матері) порушує програму розвитку організму, підсилює тривожність, викликає порушення статевої поведінки тощо [14], що й спостерігалося у нашому дослідженні, коли

Таблиця 3

Вміст нітритів і аргініну у крові самок

Показник	Контроль		Стрес		Стрес+ФЕ	
	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$	n	$\bar{x} \pm S_x$
Нітрити, мкмоль/л	8	7,19±0,41	8	15,90±0,16 ¹⁾	8	12,01±0,64 ¹⁾²⁾
Аргінін, ммоль/л	8	92,49±4,76	8	346,03±38,82 ¹⁾	8	417,89±27,98 ¹⁾

Примітка: ¹⁾ – Статистично значущі розбіжності з даними групи Контроль.

²⁾ – Статистично значущі розбіжності з даними групи Стрес.

стрес матері був ще й посилений стресом «clean bedding» у щурят.

Естрогенам під час стресу відводиться важлива роль: вони діють як нейропротектори, що пов'язано, насамперед, з їх модулюючим впливом на гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову систему завдяки їх зв'язуванню з рецепторами естрогенів (РЕ) α і β [8]. При цьому 17 β -естрадіол має більшу спорідненість з РЕ- α , а ФЕ – до РЕ- β (до 87%) [22]. Відомо, що в мозку РЕ- α задіяні у регуляції репродуктивної нейроендокринної функції та поведінки. Агоністи РЕ- α діють як анксиогени і, відповідно, посилюють гормональну відповідь на стрес. Селективні агоністи РЕ- β , навпроти, виявляють сильну анксиолітичну дію в поведінкових тестах. Тобто вони пригнічують АКТГ- та кортикостерон-відповідь на стрес [19], що ми і спостерігали у нашому дослідженні. Можливо також, що

у випадку сумісної дії стресу та ФЕ сполуки з естрогеноподібною активністю запобігали порушенням процесу формування пулу примордіальних фолікулів у яєчниках самок у перші дні після народження.

Висновок. Неонатальна фітоестрогенізація самок щурів на тлі хронічного емоційного стресу пом'якшує негативні наслідки стресу. У дорослому віці у самок відмічається зростання відносної естрогенізації, посилення процептивної поведінки, нормалізація характеристик плідності, позитивні біохімічні зміни – зменшення вмісту оксиду азоту та зростання концентрації аргініну.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження зміни щільності РЕ- α та РЕ- β у окремих ядрах мозку за умов дії стресу та естрогенів у неонатальному періоді пояснить молекулярні механізми описаних змін.

Література

1. Алейникова Т. Л. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Т. Л. Алейникова, Г. В. Рубцова, Н. А. Павлова. – М. : Медицина, 2000. – 128 с.
2. Бишовець Т. Ф. Експериментальне вивчення ембріотоксичної дії лікарських засобів : методичні рекомендації / Т. Ф. Бишовець // Доклінічні дослідження лікарських засобів / за ред. О. В. Стефанова. – К., 2001. – С. 115-138.
3. Вивчення складу соєвого продукту Genistein Soy Complex хроматографічними методами / А. І. Гладкова, Ф. Г. Яременко, Л. Є. Нікішина, С. В. Кравченко // Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Десяті Данилівські читання) : матер. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків 3-4 бер. 2011 р. – Х., 2011. – С. 29-30.
4. Возрастные особенности влияния ишемического preconditionирования изолированного сердца крысы на метаболизм NO / Т. А. Бадова, В. В. Безруков, Ю. П. Коркач [та ін.] // Проблемы старения и долголетия – 2006. – Т. 15, №4. – С. 291-300.
5. Генетика окислительного стресса / Е. П. Гуськов, Т. П. Шкурят, Т. В. Вардуни [и др.] – Ростов-на-Дону : СКНЦ ВШ ЮФУ, 2009. – 156 с.
6. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика / С. А. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
7. Гормональні зміни у дорослих щурів, що зазнали дії стресу та/або фітоестрогенів під час молочного вигодовування / Н. О. Карпенко, О. В. Сомова, Є. М. Коренева, Е. Є. Чистякова [та ін.] // Ендокринологія. – 2011. – Т. 16, № 1. – С. 76-82.
8. Кузьмина В. Е. Функциональное состояние женских гонад и развитие стресс-реакции / В. Е. Кузьмина // Вестник СамГУ. Естественная серия. – 2008. – № 2 (61). – С. 295-302.
9. Пат. 31600 Україна, МПК А6G01 N33/52. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині / А. В. Коцюрба, Т. В. Семікопна, О. П. Вікторов [та ін.] (UA) ; Український НДІ кардіології ім. М. Д. Стражеска. №98095152 ; заяв. 30. 09. 1998 ; опубл. 15. 12. 2000, Бюл. № 7, 2000 р. – 2 с.
10. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология / А. Г. Резников, В. П. Пишак, Н. Д. Носенко [и др.]. – Черновцы : Медакадемия, 2004. – 318 с.
11. Резников О. Г. Доклінічне вивчення впливу лікарських засобів, що застосовуються під час вагітності, на нейроендокринні системи регуляції репродукції та адаптації у нащадків / О. Г. Резников, Н. Д. Носенко / За ред. О. В. Стефанова. – К., 2001. – С. 153-165.
12. Репродуктивная эндокринология: в 2-х т. / Под ред. С. К. Йена, Р. Б. Джаффе. – М. : Медицина, 1998.
13. Эндокринная регуляция. Биохимические и физиологические аспекты : учеб. пособие / А. Н. Смирнов / Под ред. В. А. Ткачука – 2009. – 368 с.
14. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress / M. J. Meaney, J. Diorio, D. Francis [et al.] // Dev. Neurosci. – 1996. – Vol. 18, № 1-2. – P. 49-72.
15. Effects of Genistein or Soy Milk During Late Gestation and Lactation on Adult Uterine Organization in the Rat / C. L. Hughes, G. Liu, S. Beall [et al.] // Experim. Biol. Med. – 2004. – № 229. – P. 108-117.
16. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function / R. W. Rhees, E. D. Lephart, D. Eliason [et al.] // Behav. Brain Res. – 2001. – № 1. – P. 1-10.
17. Jefferson W. N. Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: genistein as an example / W. N. Jefferson, E. Pedilla-Banks, R. R. Newbold // Molec. Nutr. Food Res. – 2007. – Vol. 51, № 7. – P. 832-844.
18. Maternal exposure to low levels of corticosterone during lactation protects the adult offspring against ischemic brain damage / P. Casolini, M. R. Domenici, C. Cinque [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – Vol. 27, № 26. – P. 7041-7046.
19. Mueller S. O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens // J. Chromatogr. – 2002. – Vol. 777, № 1-2. – P. 155-165.
20. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats / A. R. Zuena, J. Mairesse, P. Casolini [et al.] // PLoS One. – 2008. – Vol. 14, № 3(5). – P. e2170.
21. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dietary phytoestrogen analyses / W. Owens, J. Ashby, J. Odum [et al.] // Environm. Health. Perspect. – 2003. – Vol. 111, № 12. – P. 1559-1567.
22. Weiser, M. J. Estrogen receptor beta in the brain: from form to function / M. J. Weiser, C. D. Foradori, R. J. Handa // Brain Res Rev. – 2008. – Vol. 57, № 2. – P. 309-320.

УДК 612. 621. 38:612. 621. 31+612. 663

НАСЛІДКИ СУМІСНОЇ ДІЇ СТРЕСУ ТА ФІТОЕСТРОГЕНІВ У НЕОНАТАЛЬНИЙ ПЕРІОД ДЛЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ ТА МЕТАБОЛІЧНОГО ПРОФІЛЮ САМОК ЩУРІВ

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

Резюме. Досліджено дорослих самок – нащадків матерів, які були стресовані (з 3 по 15 добу після пологів, група Стрес) або на тлі стресу отримували з кормом фітоестрогени (100 мг/кг м. т. з 3 по 21 добу лактації, група Стрес+ФЕ). Виявлено, що у самок групи Стрес знижена рецептивність, погіршується процес імплантації та життєздатність ембріонів, зменшується кількість плодів. Неонатальна фітоестрогенізація самок щурів на тлі хронічного емоційного стресу пом'якшує наслідки стресу. У дорослих самок зростає відносна естрогенізація, посилюється процептивна поведінка, нормалізується плідність, відмічаються позитивні біохімічні зміни – зменшення вмісту оксиду азоту та зростання концентрації аргініну.

Ключові слова: молочне вигодовування, фітоестрогени, стрес, фертильність самок, оксид азоту, аргінін.

УДК 612. 621. 38:612. 621. 31+612. 663

ПОСЛЕДСТВИЯ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ СТРЕССА И ФИТОЭСТРОГЕНОВ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ДЛЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ САМОК КРЫС

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

Резюме. Исследованы взрослые самки – потомки матерей, подвергнутых эмоциональному стрессу (с 3 по 15 сутки после родов, группа Стресс) или дополнительно фитоэстрогенизированных избытком фитоэстрогенов в корме (100 мг/кг массы тела с 3 по 21 день лактации, группа Стресс+ФЭ). Обнаружено, что у самок группы Стресс снижена рецептивность, хуже процесс имплантации и жизнеспособность эмбрионов, меньше количество плодов. Неонатальная фитоэстрогенізація на фоне эмоционального стресса смягчает последствия стресса. У взрослых самок увеличивается относительная эстрогенізація, усиливается процептивное поведение, нормализуется плодовитость, отмечаются позитивные биохимические изменения – уменьшение концентрации оксид азота и увеличение содержания аргинина.

Ключевые слова: молочное вскармливание, фитоэстрогены, стресс, фертильность самок, оксид азота, аргинин.

UDC 612. 621. 38:612. 621. 31+612. 663

The Consequences of Neonatal Combined Stress and Phytoestrogens for Reproductive Function and Metabolic Profile of Adult Female Rats

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

Summary. The changes of hormonal profile of pregnant female can modify pubescence and reproductive function of their offspring. We determined sensitivity to stress and hyperestrogenisation of suckling period and long-term effects on reproductive function and metabolism of adult female descendants have been investigated. The combined emotional stress and excess phytoestrogens was modeled in adult females after delivery. The emotional stress (by maternal separation) was produced during 15 min from 3 to 15 days (group Stress) and excess phytoestrogens was effected by administration of the phytoestrogens mixture with food in doses of 100 mg/kg b. m. from 3 to 21 days of lactation (group Stress+PhE). Female pups were placed one at a time maternal separation on clean bedding.

The reproductive function and metabolic profile of adult female descendants have been studied. Sexual behavior, fertility and rate of fetal losses on 20th days of gestation were researched in 10 months age females. Concentrations of stable metabolites of nitric oxide cycle and arginine were measured in serum. Comparison of the results with the parameters of the sampling and the data of control group was made using the criteria Q Dunn and χ^2 . P values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Neonatal stressed adult females have reduced of lordosis coefficient (on 14%, $P < 0,05$) in comparison with control values. During the diestrus phase these females had several hormonal differences: 1) the level of progesterone has been decreased on 30% and concentration of testosterone – increased on 55% in comparison with control values. However, in spite of this slight decline of sexual activity sperms in vaginal smears were detected next day in females coupled with intact males. On day 20 after fertilization all females were pregnant. Stressed females have reduced number of embryo (by 22%, $P < 0,05$) due to 4-fold increase fetal loss ($P < 0,05$). Stressed females has significantly higher levels of nitrite and arginine in serum in comparison with intact females. So neonatal stressed females shown the inhibition of sexual behavior, hormonal and pro / antioxidant disbalance, and as a consequence, disturbances of the gestation processes.

Simultaneous phytoestrogenisation of stressed rats alleviate the consequences of emotional stress. Progesterone concentration is not differ from the control value, and the estradiol concentration exceeded the control data by almost 2 times due to lower levels of testosterone by 43% ($P < 0,05$). Against this background of hormonal processes of implantation and gestation were no pathological changes. This may occur due to a sufficient level of progesterone and due to the lower content of nitrite in the blood of females in comparison with Stress group even higher concentrations of arginine. So phytoestrogenisation mitigate the negative effects of stress, resulting in restored of female fertility.

Neonatal phytoestrogenisation together with stress has been alleviated unfavourable consequences of stress only. High relative estrogenisation, intensity of proceptivity, normalisation of fertility, positive changes of biochemical indices of adult female rats from Stress+PhE group has been shown.

Key words: milk feeding, phytoestrogens, stress, female fertility, nitric oxide, arginine.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 16. 09. 2013 р.