

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ім. В. Я. ДАНИЛЕВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

ВЕЛИЧКО НАТАЛІЯ ФЕДОРІВНА

УДК: 612.6; 502:616; 57.017.55+64+645;577

**ВІДДАЛЕНІ НАСЛІДКИ НЕОНАТАЛЬНОГО ВПЛИВУ
ФІТОЕСТРОГЕНІВ І СТРЕСУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ТА
ГОРМОНАЛЬНО-МЕТАБОЛІЧНІ ПОКАЗНИКИ У ДОРΟΣЛИХ САМЦІВ
ЩУРІВ
(експериментальне дослідження)**

14.01.14 – ендокринологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державній установі «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України».

Науковий керівник кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник **Карпенко Ніна Олексіївна**, Державна Установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», завідувач лабораторії репродуктивної ендокринології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор **Ковзун Олена Ігорівна**, Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», заступник директора з наукової роботи, головний науковий співробітник відділу фундаментальних та прикладних проблем ендокринології.

доктор біологічних наук, професор **Божков Анатолій Іванович**, Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, завідувач кафедри молекулярної біології і біотехнології, директор НДІ біології Харківського національного університету.

Захист відбудеться «_____» _____ 2019 р. о ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.564.01 при Державній установі «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» (61002, м. Харків, вул. Алчевських, 10).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» (61002, м. Харків, вул. Алчевських, 10).

Автореферат розісланий «_____» _____ 2019 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Ж. А. Лещенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Кожне п'яте-шосте подружжя в світі не має дітей. За результатами широкомасштабних досліджень спермограм здорового населення різних країн світу констатується факт зниження фертильності чоловіків. І за даними ВООЗ це призвело до зростання частоти чоловічого безпліддя, яка дорівнює частоті жіночого (Шафранський В. В., 2016). Приблизно в 39 % випадків чоловічого безпліддя констатується його ідіопатична форма, коли погіршення фертильності відбувається, зокрема, внаслідок порушення програмування розвитку особини у критичні періоди онтогенезу (період гестації та ранній неонатальний період) (Hochberget Z. et al., 2011). Тому актуальним та важливим медико-соціальним завданням є пошук чинників зниження плідності чоловіків, дослідження етіології та патогенезу чоловічого безпліддя, що дозволить проводити більш обґрунтовану та ефективну діагностику й терапію розладів функції відтворення.

Загально визнано, що стрес у перинатальний період порушує статеву диференціацію мозку, позначаючись на стані репродуктивної функції дорослих нащадків (Dörner G., 1981-1995; Резников А. Г., 2008; McEwen B. S., 2010). Зміни статевої поведінки у дорослому віці спостерігали й у стресованих під час вигодовування нащадків-самців (Lupien S. J. et al., 2009). Тому, беручи до уваги поширеність стану психоемоційного стресу у матерів під час лактації (Гайдаєв Ю. О., 2007; Kitsiou-Tzeli S. et al., 2017;), зростає важливість дослідження його віддалених наслідків у нащадків.

Процес статевої диференціації мозку також порушується при наявності в амніотичній рідині або материнському молоці сполук, які здатні імітувати дію ендогенних естрогенів та зв'язуватись з рецепторами естрогенів (ER) (Tena-Sempere M. et al. 2000). Зокрема, описано зміни сомато-статевого розвитку нащадків (North K. et al., 2000; Miodovnik A. et al. 2011), а у дорослих – порушення статевої поведінки, зниження плідності за умов надлишку фітоестрогенів (ФЕ) у кормі самки під час вагітності або лактації (Whitten P. L. et al., 1995; Ball E. R., 2010). Тобто, ФЕ здатні змінювати стан репродуктивної функції при надмірному надходженні не тільки у батька і дорослих тварин (Гладкова А. І., та співавт. 2001), але й на етапах раннього розвитку.

З огляду на таке дуже поширене сполучення у сучасних соціальних умовах, як психоемоційний стрес матері та надмірне надходження з її раціоном ФЕ, багатим джерелом яких є соя, це з великою імовірністю може бути причиною гіпофертильності більш чутливих нащадків чоловічої статі.

Враховуючи значущість гепатобіліарного метаболізму статевих гормонів, стан печінки надзвичайно важливий для репродуктивної функції (Дедов І. І. та співавт., 2000). Тому хронічні розлади гепатобіліарної системи з залученням ліпідного, білкового обмінів та оксиду азоту (NO), супроводжуються зниженням концентрації та якості сперматозоїдів (Foresta C. et al., 2008; Бондаренко В. О. та співавт., 2010;). Адже такі сполуки як білок, сечовина, аргінін, продукти ліпідного обміну (тригліцериди (ТГ), холестерин (ХС)) та NO мають важливе фізіологічне значення для повноцінного функціонування сперматозоїдів.

Натепер доведено, що характер метаболічних процесів у печінці програмується на ранніх етапах онтогенезу під контролем статевих гормонів (Smirnov A. N., 2009). Вважають, що і стрес, і надлишок ФЕ здатні змінити програму функціонування печінки, що вплине й на стан репродуктивної функції (Bozhkov A. I. et al., 2009). Однак віддалені наслідки дії стресу, надходження надлишку ФЕ та їх сумісної дії в період молочного вигодовування для здатності печінки впливати на співвідношення основних статевих гормонів натепер невідомі. Це визначає необхідність поглибленого дослідження за вищенаведених умов гормонопродукуючої (за показниками вмісту тестостерону (Тс) та естрадіолу (Е₂)) і гермінативної функції сім'яників та метаболічних процесів, що впливають на стан статевих залоз та, взагалі, на репродуктивну функцію.

Також потребують визначення особливості обміну ліпідів у печінці з огляду на її центральне місце у синтезі ХС – субстрату для утворення статевих гормонів (Дєдов І. І. та співавт., 2000). Оскільки метаболізм ХС та жирних кислот регулюється й статевими гормонами, баланс між цими системами може позначатися на стані репродуктивної функції (Кравчун Н. А. и соавт., 2008; Sparks L. M. et al., 2009;).

Важливим вважається вивчення особливостей обміну амінокислоти аргініну, наявність якої корелює зі станом репродуктивної функції (Дмитриєнко Н. П. та співавт., 2008) завдяки утворенню з аргініну NO – сигнальної молекули для репродуктивної системи.

Такі дослідження у дорослих тварин, що у ранньому віці зазнали дії емоційного стресу або/та надходження надлишку ФЕ, дозволять виявити особливості функціонування сім'яників та зв'язок з метаболічними процесами у різних тканинах (гонади, кров та печінка) та висвітлити можливі патогенетичні механізми розвитку неонатально індукованої чоловічої гіпофертильності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано відповідно плану науково-дослідних робіт ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» і вона є фрагментом НДР «Віддалені наслідки впливу стресу та надлишку фітоестрогенів у період молочного вигодовування на репродуктивну функцію особин і корекція її порушень (експериментальне дослідження) (№ державної реєстрації 0109U000309, 2009-2011 рр.) та НДР «Визначити особливості репродуктивних розладів, індукованих неонатально або локальною гіпертермією, та можливість фармакологічної корекції за допомогою тiazолініламіду камфорної кислоти» (№ державної реєстрації 0111U010494, 2012-2014 рр.). Автор роботи був співвиконавцем вказаних НДР.

Мета і завдання дослідження. Мета – встановити особливості функціонування репродуктивної системи та гормонально-метаболічного стану дорослих самців щурів, які у неонатальний період зазнали дії емоційного стресу, надходження надлишку суміші фітоестрогенів або сумісної дії цих чинників.

Для реалізації поставленої мети вирішувалися наступні завдання:

1. Оцінити стан репродуктивної функції (за показниками сперматогенезу, статевої поведінки та фертильності) піддослідних самців, які під час молочного вигодовування зазнавали дії емоційного стресу.

2. Визначити гормонально-метаболичні особливості дорослих неонатально стресованих самців щурів щодо інтактних тварин різної статі (за показниками вмісту Тс, Е₂, обміну ліпідів (вміст ТГ, загального ХС, холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ХС ЛПВЩ)), білків (за вмістом загального білка, сечовини, аргініну, активності трансаміназ), суми стабільних метаболітів циклу оксиду азоту (NOx) у сироватці крові, тканинах гонад та печінки.

3. Охарактеризувати стан репродуктивної функції дорослих самців щурів, які під час молочного вигодовування отримували надмірну кількість суміші фітоестрогенів.

4. Встановити особливості гормонально-метаболичних характеристик дорослих самців щурів, які під час молочного вигодовування отримували надмірну кількість суміші фітоестрогенів та проаналізувати результати у порівнянні з показниками інтактних тварин.

5. Оцінити характер змін репродуктивної функції дорослих самців, яких піддавали сумісній дії надлишку фітоестрогенів та емоційного стресу.

6. Визначити гормонально-метаболичні особливості дорослих тварин, яких піддавали сумісній дії надлишку фітоестрогенів та емоційного стресу у порівнянні з показниками інтактних тварин обох статей.

Об'єкт дослідження – порушення функціональної активності чоловічих статевих залоз, гормонально-метаболичних процесів та репродуктивної функції внаслідок неонатальних втручань (емоційний стрес, надходження надмірної кількості фітоестрогенів, поєднаний вплив чинників).

Предмет дослідження – функціональна активність статевих залоз, статева поведінка, сперматогенез, фертильність, гормональні та метаболичні показники тканин печінки, сім'яників, сироватки крові самців щурів.

Методи дослідження: фізіологічні – для дослідження статевої поведінки та фертильності піддослідних самців; цитологічні – для оцінки стану сперматогенезу у суспензії епидидимальних сперматозоїдів визначали їхню кількість, рухливість та відсоток патологічних форм гамет; гітологічні – для визначення кількісних характеристик сперматогенезу за допомогою морфометричної оцінки стану сім'яродного епітелію та подальшим світлооптичним дослідженням зразків сім'яників за стандартними методами; біохімічні – для оцінки метаболичного стану у піддослідних тварин за визначенням показників білкового (загальний білок, сечовина, аргінін, активність ферментів аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамін-трансферази (АСТ)), ліпідного обміну (загальний ХС, ТГ, ХС ЛПВЩ), NOx; імуноферментні – для дослідження гормонального стану у піддослідних тварин за визначенням рівня статевих гормонів Тс та Е₂ у сироватці крові, гомогенатах органів печінки та сім'яників; статистичні – для визначення оцінки нормальності, розрахунку основних статистичних параметрів (середнє значення і його похибка) використовувався пакет аналізу програм Excel 2003 та Statistika 6.0, нормальність розподілу у вибірках перевіряли з використанням критерію W Шапіро-Вілка, перевірку нульової гіпотези про відсутність різниці між групами проводилась із застосуванням параметричних та непараметричних методів, а саме: при порівнянні двох груп використовували U-критерій Манна-Вітні, а кількох груп – критерій Q

Дана, значущість розбіжностей відносних показників між групами оцінювали за критерієм χ^2 . Кількість спостережень або зразків представлено як (n).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше доведено, що емоційний стрес, надмірна фітоестрогенізація та комплексна дія цих чинників у період фізіологічного молочного вигодовування мають стійкі віддалені наслідки у дорослих нащадків-самців щодо репродуктивної функції (зміни сперматогенезу, ослаблення статевої активності, зниження репродуктивного потенціалу) та гормонально-метаболічних характеристик.

Вперше показано відстрочене зменшення фізіологічних статевих відмінностей вмісту статевих гормонів (абсолютна чи відносна гіперестрогенія та андрогенний дефіцит), характеру ліпідного та білкового обміну (дисліпідемія, білковий дефіцит, ознаки оксидативного стресу).

У неонатально обтяжених самців вперше виявлено органі особливості біохімічних процесів у сім'яниках і печінці та їхній взаємозв'язок з функцією відтворення. Доповнено наукові дані щодо ймовірних патогенетичних причин розвитку чоловічої гіпофертильності невизначеного генезу.

Показано, що при комплексній дії у підсосний період чинників, що досліджувались, у дорослих самців щурів за відсутності значних змін гормонального балансу, статевої поведінки та порушень сперматогенезу більш ніж удвічі зменшується потенційна кількість нащадків внаслідок зростання внутрішньоутробних втрат у вагітних інтактних самок, запліднених цими самцями.

Показано, що у тварин спостерігаються такі гормонально-метаболічних розлади з ознаками зменшення фізіологічних статевих відмінностей, які можуть бути виявлені лише при дослідженні тканин печінки та сім'яника. У клінічній практиці ці випадки можуть бути визначені як гіпофертильність невизначеного генезу з метаболічними розладами.

Конкретизовано та осучаснено наукові знання щодо статевих відмінностей деяких метаболічних показників крові та печінки інтактних 10-місячних щурів різної статі.

Практичне значення одержаних результатів. Визначено можливі чинники, дія яких у ранні періоди онтогенезу призводить до розвитку чоловічої гіпофертильності, та теоретично обґрунтовано профілактичні заходи щодо мінімізації негативних наслідків втручання під час фізіологічного молочного вигодовування для збереження репродуктивної функції в дорослому віці.

Розроблено та впроваджено в практику спосіб моделювання неонатально індукованої гіпофертильності самців щурів з метаболічними розладами шляхом дії емоційного стресу на новонароджених щурят та їх матер з одночасним додаванням до раціону самки-матері суміші ФЕ (Патент України на корисну модель № 95758), що розширило арсенал експериментальних моделей чоловічої гіпофертильності.

Результати дисертаційної роботи впроваджено у лабораторії патогістології ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», у відділі ендокринології репродукції та адаптації ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», включено у лекційні курси Київського національного медичного університету імені О. Богомольця.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені в рукописі, отримано автором самостійно або за його безпосередньої участі. Автором самостійно проведено аналіз наукової літератури за даною проблемою. Спільно з науковим керівником проведено визначення теми дисертаційної роботи, мети та завдань, вибір об'єкту, методів дослідження, аналіз та інтерпретація отриманих даних. Весь фактичний матеріал отриманий дисертантом самостійно на базі лабораторії репродуктивної ендокринології ДУ ІПЕП. Аналіз та систематизацію результатів, статистичну обробку даних, обґрунтування наукових положень, а також написання дисертаційної роботи автор виконав самостійно. Дослідження статевої поведінки самців щурів та визначення фертильності самців виконувались спільно зі співробітниками лабораторії репродуктивної ендокринології ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», морфологічний аналіз сім'яників проводився за участі к. б. н. Ю. Б. Лар'яновської, які є співавторами наукових публікацій.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації доповідалися та обговорювалися на науково-практичних конференціях з міжнародною участю: Ендокринна патологія у віковому аспекті (Харків, 2009; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015); Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології (Данилевські читання) (Харків, 2009; 2010; 2011; 2012; 2013; 2015; 2016); Довкілля і здоров'я (Тернопіль, 2010; 2012); XIV Конгрес СФУЛТ (Донецьк-Київ-Чикаго, 2012).

Публікації за матеріалами дисертаційної роботи. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 24 наукових праці, у тому числі 7 статей (1 – самостійна та 6 у співавторстві) у фахових наукових виданнях України (рекомендованих ДАК МОН України) та включених до міжнародних наукометричних баз. Матеріали дисертації відображено також в 1 патенті України на корисну модель та 17 тезах.

Структура та обсяг дисертації. Роботу викладено на 216 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація складається із анотації, списку публікацій здобувача, основної частини (вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків), списку використаних джерел, що містить 319 посилань та складає 35 сторінок, 3 додатки. Дисертацію проілюстровано 22 таблицями та 43 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Усі дослідження проводилися відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001) (Резников О.Г., 2003), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Лабораторні тварини. У роботі використано 212 статевозрілих щурів різної статі популяції Вістар віком десять місяців – нащадків інтактних самок та самців із віварію ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України». Тварини утримувалися у стандартних умовах віварію при природному

освітленні. Експерименти проводили переважно у зимово-літній період (лютий – червень) (рис. 1).

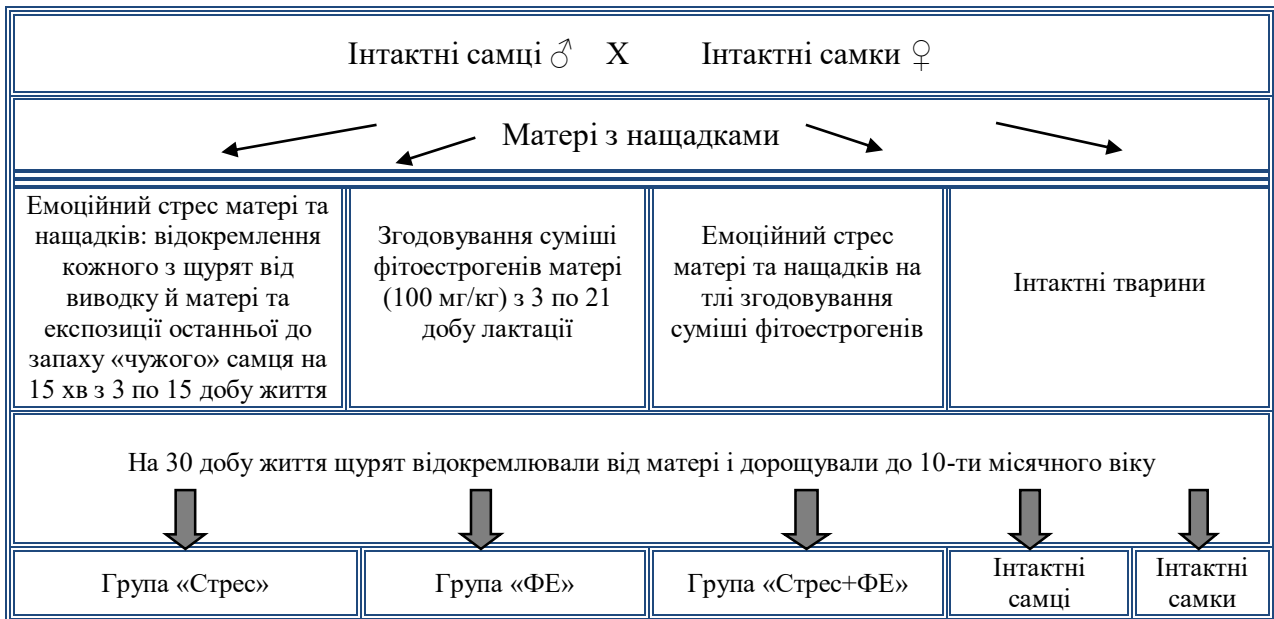


Рис. 1 Схема експерименту

Постановка експерименту. За одну – дві доби до пологів самок, запліднених інтактними самцями, розсаджували в окремі клітки та рандомізували на групи: «Інтактні», «ФЕ», «Стрес», «Стрес+ФЕ». Інтактні самки та самці щурів, які утримувались у звичайних умовах віварію до 10 місячного віку, склали групу «Інтактний контроль».

У групі «Стрес» з третьої по 21 добу лактації був відтворений емоційний стрес у матері та нащадків через відокремлення кожного з щурят від виводку й матері на 15 хв та одночасної експозиції самки-матері до запаху "чужого" самця (Moles A. et al., 2004).

Самкам групи «ФЕ» з третьої по 21 добу лактації згодовували багату на ФЕ біологічно активну домішку у дозі 100 мг/кг маси тіла матері (Гладкова А. І. та співавт., 2011). Доза 100 мг/кг маси тіла за так званим «геністеїновим еквівалентом» дорівнювала максимально безпечній (NOAEL) (Owens W. et al., 2003) за показниками токсичності для матерів та розвитку ембріонів (McClain R. M. et al., 2007).

У групі «Стрес+ФЕ» тварини зазнавали одночасного впливу стресу та ФЕ, як у групах «Стрес» та «ФЕ».

Відбір зразків тканин. Тварин знеживлювали шляхом швидкої декапітації. На автопсії збирали зразки сироватки крові, тканини печінки та сім'яників для біохімічних досліджень. Сім'яники для гістологічних досліджень фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну.

Методи досліджень та розрахунку. Статеву поведінку у самців досліджували у присмерковий час в четвертому парному 15 хв тесті з оварієктомованою самкою, у якій викликали стан рецептивності введенням гормонів.

Оварієктомію самок щурів проводили під тіопенатовим наркозом. Визначали кількість наближень самця до самки, кількість садок, інтромісій та еякуляцій.

Оцінювали величину латентності садки, інтромісії, еякуляції, розраховували тривалість постеякуляторного інтервалу. Дослідження статевої поведінки щурів виконувались спільно з к. б. н. Н. П. Смоленко.

Фертильність самців визначали за результатами парування з інтактними здоровими самками з регулярним естральним циклом. Самок знеживлювали на 20 добу вагітності під тіопенатовим наркозом, вилучали яєчники, в яких підраховували кількість жовтих тіл вагітності, а в матці – кількість місць імплантації та живих плодів. Визначали рівень перед- та післяімплантаційних внутрішньоутробних втрат (McClain R. M. et al., 2007).

Розраховували індекс запліднення та індекс вагітності (у відсотках), інтегральний показник середньої реалізованої плідності самців щурів (Фі) (Карпенко Н. О. та співавт., 2011). Дослідження фертильності самців виконувались спільно з к. б. н. Е. Є. Чистяковою.

Стан сперматогенезу досліджували за показниками суспензії епідидимальних сперматозоїдів. Рухливість гамет виражали як відсоток рухливих клітин (на 200 сперматозоїдів), відсоток аномальних форм визначали (на 200 клітин), беручи до уваги морфологію зрілого сперматозоїда. Розраховували концентрацію морфологічно нормальних клітин (C_N).

Кількісні характеристики сперматогенезу визначали при морфометричній оцінці стану сім'яродного епітелію (Стефанов О.В., 2001). Зразки сім'яників підготовлювали до подальшого світлооптичного дослідження за стандартними, прийнятими у морфології, методами (Меркулов Г. А., 1969). Мікроскопію (об'єктив 20, окуляр 10,0x200) і фотографування препаратів здійснено на мікроскопі Micros 400 (Austria), доукомплектованого цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотографування проведено в системі Aver Media, фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4 GHz за допомогою програми Nikon Viw 5.

Біохімічні дослідження. Для біохімічних досліджень тканин сім'яників та печінки готувався 10 % гомогенат у 0,9 % розчині NaCl. Розрахунки концентрацій для органів проводили на грам сирової тканини, сироватки – на 1 мл.

Концентрацію ТГ та ЗХС визначали колориметричним методом наборами фірми СпайнЛаб (Україна).

Концентрацію сечовини та активність ферментів АЛТ та АСТ визначали за допомогою стандартних наборів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностик» (Україна). Вміст ХС ЛПВЩ визначали за допомогою набору реактивів фірми «Диакон-ДС» (Росія).

Загальний вміст стабільних метаболітів циклу оксиду азоту (нітрит- та нітрат-аніонів, NOx) визначали за допомогою реакції Грина (Коцюрuba А.В. та співавт., 1998).

Концентрацію вільного аргініну виміряли методом, заснованим на реакції взаємодії аргініну гідрохлориду зі спиртовим розчином α -нафтолу та гіпобромного реактиву з утворенням кольорового розчину (Алейнікова Т. Л. та співавт., 2000). Концентрацію загального білка визначали методом Лоурі у модифікації Міллера (Miller G. L., 1959).

Рівень стероїдних гормонів (E_2 та T_c) визначали за допомогою тест-наборів для імуноферментного аналізу фірми «ХЕМА» (Росія). Для визначення концентрації E_2

та Тс із тканин печінки та сім'яника готували 10 % гомогенат та проводили подвійну екстракцію спирт-ефірною сумішшю. Сухий осад розчиняли у фосфатно-сольовому буфері рН-7,4 та зберігали до аналізу при мінус 18 °С не більше семи діб.

Статистична обробка отриманих результатів. Відповідність розподілу даних у вибірці закону нормального розподілу перевіряли з використанням критерію W Шапіро-Вілка, результати представлено як середнє арифметичне (\bar{x}) та його похибка ($\pm S_{\bar{x}}$). Одиницею розрахунку при обчисленні даних про перебіг вагітності самки або про розвиток нащадків була вагітна самка або один приплід. Ці дані представлено як середнє арифметичне зважене (W) та його похибка (кількість самок або приплодів у групі).

При проведенні кількох серій експерименту (дослідження спермограм у неонатально обтяжених самців) дані представлено аналогічно (кількість повторів експерименту). Кількість спостережень або зразків представлено як (n).

Результати груп «Стрес», «ФЕ», «Стрес+ФЕ» порівнювали з даними тварин двох референтних груп того ж віку – інтактні самці та інтактні самки за допомогою пакету аналізу програм Excel 2003 та Statistika 6.0.

Перевірку нульової гіпотези про відсутність різниці між групами проводилась із застосуванням параметричних та непараметричних методів, а саме: при порівнянні двох груп використовували U-критерій Манна-Вітні, а кількох груп – критерій Q Дана (Гланц С.А., 1998).

Значущість розбіжностей відносних показників (%) між групами оцінювали за критерієм χ^2 . Різницю між групами вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. *Статеві відмінності гормонально-метаболічного обміну інтактних 10 місячних самців та самок щурів, що розглядаються як референтні групи.* Здорові самці та самки лабораторних тварин достатньо значуще відрізняються один від одного за деякими гормональними та біохімічними показниками (Малинин М. Л., 2008).

З огляду на відсутність сучасних референтних значень фізіологічної норми біохімічних параметрів та з метою осучаснення наукових знань і конкретизації статевих відмінностей метаболічних показників у статевозрілих самців та самок лабораторних щурів, у сироватці крові, тканинах печінки було визначено концентрацію статевих гормонів, показники білкового та ліпідного обміну, вміст NOx як маркера нітрозивного стресу.

Встановлено, що у інтактних самців вміст Тс більше, ніж у самок: у сироватці крові – майже у 3,4 рази, а в печінці – майже у два рази. Концентрація E₂ у самців, навпаки, була меншою: у крові – втричі, а в печінці – майже у два рази.

При розрахунку співвідношення Тс/E₂, як показника абсолютної або відносної андрогенізації (естрогенізації) організму, виявлено, що у самців він вище, ніж у самок: у сироватці крові – майже в дев'ять разів, а в печінці – майже у чотири рази (табл. 1) ($p < 0,05$).

Дослідження показало, що вміст ТГ, ЗХС та ХС ЛПВЩ у сироватці крові та печінці інтактних самців у два рази менший, ніж у інтактних самок (табл. 2) ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Гормональні показники у самців та самок щурів, n=6, ($\bar{X} \pm S_x$)

Показник	Група				
	інтактні		«Стрес»	«ФЕ»	«Стрес+ФЕ»
	самці	самки			
сироватка крові					
Тестостерон, нмоль/л	18,90±1,16	5,60±0,3 ^{а)}	6,78±0,44 ^{а)}	10,90±0,60 ^{а),б)}	23,59±1,03 ^{б)}
Естрадіол, пмоль/л	24,20±0,58	64,59±1,76 ^{а)}	35,72±1,90 ^{а),б)}	23,27±0,42 ^{б)}	22,28±0,25 ^{б)}
Тс/Е ₂ , x10 ⁻³	0,79±0,06	0,09±0,01 ^{а)}	0,19±0,01 ^{а),б)}	0,47±0,03 ^{а),б)}	1,06±0,06 ^{б)}
гомогенат печінки					
Тестостерон, нмоль/г	2,22±0,21	1,06±0,01 ^{а)}	1,09±0,05 ^{а)}	2,52±0,06 ^{б)}	1,56±0,03 ^{а),б)}
Естрадіол, пмоль/г	0,20±0,00	0,36±0,01 ^{а)}	0,13±0,01 ^{а),б)}	0,31±0,02 ^{а)}	0,32±0,02 ^{а)}
Тс/Е ₂ , x10 ⁻³	11,21±1,08	2,94±0,08 ^{а)}	8,42±0,78 ^{а),б)}	8,24±0,62 ^{а),б)}	5,02±0,31 ^{а),б)}
гомогенат сім'яників					
Тестостерон, нмоль/г	9,71±0,20		6,76±0,38 ^{а)}	2,56±0,12 ^{а)}	9,52±0,27
Естрадіол, пмоль/г	0,17±0,01		0,26±0,01 ^{а)}	0,26±0,01 ^{а)}	0,45±0,03 ^{а)}
Тс/Е ₂ , x10 ⁻³	56,28±1,67		25,57±1,35 ^{а)}	9,91±0,55 ^{а)}	21,70±1,19 ^{а)}

Примітки:

а) – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самців (p < 0,05);

б) – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самок (p < 0,05).

Таблиця 2

Показники метаболізму ліпідів щурів, n=12, ($\bar{X} \pm S_x$)

Показник	Група				
	інтактні		«Стрес»	«ФЕ»	«Стрес+ФЕ»
	самці	самки			
сироватка крові					
Тригліцериди, ммоль/л	1,04±0,02	2,10±0,08 ^{а)}	1,93±0,04 ^{а)}	2,20±0,07 ^{а)}	3,12±0,13 ^{а),б)}
Загальний холестерин, ммоль/л	2,28±0,05	4,11±0,08 ^{а)}	1,73±0,04 ^{а),б)}	4,12±0,10 ^{а)}	8,24±0,30 ^{а),б)}
Холестерин ліпопротеїдів високої щільності, ммоль/л	0,55±0,01	1,33±0,02 ^{а)}	0,21±0,01 ^{а),б)}	0,33±0,01 ^{а),б)}	0,32±0,01 ^{а),б)}
гомогенат печінки					
Тригліцериди, ммоль/г	2,19±0,13	4,40±0,10 ^{а)}	3,26±0,11 ^{а),б)}	3,14±0,17 ^{а),б)}	3,16±0,27 ^{а),б)}
Загальний холестерин, ммоль/г	4,21±0,05	8,49±0,05 ^{а)}	4,50±0,04 ^{б)}	4,31±0,03 ^{б)}	4,32±0,06 ^{б)}
Холестерин ліпопротеїдів високої щільності, ммоль/г	1,80±0,08	3,68±0,14 ^{а)}	1,14±0,05 ^{б)}	0,74±0,01 ^{а),б)}	0,62±0,01 ^{а),б)}
гомогенат сім'яників					
Тригліцериди, ммоль/г	1,65±0,04		0,97±0,02 ^{а)}	2,01±0,03 ^{а)}	1,88±0,02
Загальний холестерин, ммоль/г	3,35±0,19		1,93±0,01 ^{а)}	4,03±0,18	3,85±0,03
Холестерин ліпопротеїдів високої щільності, ммоль/г	0,27±0,01		0,11±0,00 ^{а)}	0,18±0,00 ^{а)}	0,15±0,00 ^{а)}

Примітки:

а) – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самців (p < 0,05);

б) – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самок (p < 0,05).

Вміст загального білка у крові самців виявився меншим відносно самок в 1,5 рази (табл. 3) ($p < 0,05$).

Таблиця 3

Показники метаболізму білків у самців та самок щурів, $n=12$, ($\bar{X} \pm S_x$)

Показник	Група				
	інтакті		«Стрес»	«ФЕ»	«Стрес+ФЕ»
	самці	самки			
сироватка крові					
Загальний білок, мг/мл	129,90±1,81	160,91±5,09 ^{a)}	148,28±3,83 ^{a)}	153,47±7,87 ^{a)}	119,11±2,96 ^{б)}
Сечовина, ммоль/л	4,10±0,11	2,63±0,18 ^{a)}	4,42±0,19 ^{б)}	5,21±0,23 ^{a), б)}	4,04±0,16 ^{б)}
АЛТ, мккат/л	0,21±0,01	0,14±0,01 ^{a)}	0,13±0,01 ^{a)}	0,15±0,01 ^{a)}	0,14±0,01 ^{a)}
АСТ, мккат/л	0,22±0,01	0,33±0,01 ^{a)}	0,18±0,01 ^{a), б)}	0,21±0,02 ^{б)}	0,31±0,01 ^{a)}
Вільний аргінін, ммоль/л	370,96±12,41	319,76±4,89 ^{a)}	146,69±2,83 ^{a), б)}	375,62±7,51 ^{б)}	230,84±4,06 ^{б)}
Сумарний вміст (NOx), мкмоль/л	0,14±0,01	2,19±0,04 ^{a)}	0,61±0,01 ^{a), б)}	0,13±0,01 ^{б)}	0,77±0,02 ^{a), б)}
гомогенат печінки					
Загальний білок, мг/г	388,47±3,14	253,73±5,15 ^{a)}	261,30±6,33 ^{a)}	243,40±10,27 ^{a)}	254,31±10,90 ^{a)}
Сечовина, ммоль/г	21,93±0,55	29,57±0,30 ^{a)}	20,19±0,43 ^{б)}	20,00±0,30 ^{б)}	30,63±0,75 ^{б)}
АЛТ, мккат/г	2,66±0,13	1,50±0,03 ^{a)}	1,08±0,05 ^{a), б)}	2,71±0,07 ^{б)}	2,26±0,07 ^{б)}
АСТ, мккат/г	3,13±0,12	0,97±0,02 ^{a)}	0,61±0,02 ^{a), б)}	0,48±0,04 ^{a), б)}	1,16±0,07 ^{a), б)}
Вільний аргінін, ммоль/г	2,69±0,10	4,80±0,08 ^{a)}	1,51±0,08 ^{a), б)}	4,02±0,20 ^{a)}	2,63±0,17 ^{б)}
Сумарний вміст (NOx), мкмоль/г	5,68±0,10	3,73±0,15 ^{a)}	8,50±0,07 ^{a), б)}	9,08±0,11 ^{a), б)}	10,19±0,07 ^{a), б)}
гомогенат сім'яників					
Загальний білок, мг/г	262,38±5,42		226,28±3,93 ^{a)}	148,69±3,79 ^{a)}	377,04±18,36 ^{a)}
Сечовина, ммоль/г	11,81±0,32		14,99±0,34 ^{a)}	14,85±0,30 ^{a)}	14,36±0,42 ^{a)}
АЛТ, мккат/г	0,44±0,02		1,03±0,07 ^{a)}	0,13±0,00 ^{a)}	0,30±0,01 ^{a)}
АСТ, мккат/г	1,57±0,10		1,30±0,03	1,60±0,06	1,68±0,04
Вільний аргінін, ммоль/г	4,59±0,13		2,78±0,04 ^{a)}	4,58±0,13	3,19±0,12 ^{a)}
Сумарний вміст (NOx), мкмоль/г	2,53±0,02		1,38±0,11 ^{a)}	2,32±0,06	2,24±0,03

Примітки:

а) – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самців ($p < 0,05$);

б) – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самок ($p < 0,05$).

В доступній літературі даних стосовно концентрації загального білка у тварин потрібної вікової групи не знайдено. Однак відомо, що у чоловіків у віці від 35 до 59 років вміст загального білка у крові нижче, ніж у жінок. Дана вікова група людей відповідає віковій групі наших тварин. У печінці концентрація загального білка у самців була в 1,5 рази вище, ніж у самок. Активність трансферази АЛТ у самців була вищою: в крові – на 35 %, а в гомогенаті печінки – на 44 %. Активність АСТ у крові самців виявилась нижчою на 49 %, а в гомогенаті печінки – вищою на 70 %, ніж у

самок (див. табл. 3) ($p < 0,05$). Визначення концентрації сечовини показало, що у самців цей показник у крові вище на 35 %, а в гомогенаті печінки – нижче на 34 %, ніж у інтактних самок. Концентрація аргініну у крові самців вище на 14 %, а в печінці нижче на 44 %, ніж у самок. Рівень NOx у крові самців у 16 разів менший, ніж у самок. Однак, у печінці концентрація NOx виявилась на 35 % вищою, ніж у самок (див. табл. 3) ($p < 0,05$). Таким чином, характер білкового та ліпідного обміну, а також інтенсивність утворення стабільних метаболітів циклу оксиду азоту у інтактних самців та самок щурів віком 10 місяців має статеві відмінності.

Стан репродуктивної системи дорослих самців щурів, що зазнали довготривалої дії емоційного стресу в період молочного вигодовування. У дорослих самців, що були піддані емоційному стресу у підсосний період, виявлено суттєві зміни гормонально-метаболічних показників. Вміст E_2 в крові та сім'яниках майже в 1,5 раза перевищував такі в інтактних самців. У печінці концентрація E_2 в групі «Стрес» виявилась меншою як у порівнянні з інтактними самками (майже в три рази), так й відносно інтактних самців (в 1,5 раза). Тобто, змодельований емоційний стрес став причиною гіперестрогенізації самців у дорослому віці (за показниками концентрації E_2 у крові, сім'яниках) та гіпоестрогенії в основному метаболізуючому органі – печінці. Концентрація Тс в крові та печінці тварин цієї групи свідчила про гіпоандрогенію: майже втричі та вдвічі менше, ніж у інтактних самців, що не відрізнялося від показників інтактних самок ($p < 0,05$) (див. табл. 1). Розрахунок співвідношення Тс/ E_2 , показав його зменшення відносно інтактних: у крові – у чотири рази, в печінці – у 2,2 раза, в сім'яниках – майже на чверть. У крові та сім'яниках зниження відбувається внаслідок підвищеного вмісту E_2 та меншої концентрації Тс, що свідчить про абсолютну естрогенізацію організму. У печінці зниження Тс/ E_2 відбувається на тлі як меншої концентрації Тс, так і E_2 . Однак, у даному випадку це свідчить про відносну естрогенізацію, адже зменшення вмісту Тс суттєвіше (менше у два рази), ніж зменшення E_2 (на третину). Можливо, гіперестрогенія та дефіцит андрогенів у самців пов'язані зі зміною кількості та активності відповідних рецепторів у печінці внаслідок імпринтингової дії стресу (Ahyi A. N. et al., 2013), оскільки підвищений рівень глюкокортикоїдів здатен посилювати дію естрогенів, активуючи ER через окремі ділянки, гомологічні за своєю будовою рецепторам кортикостероїдів. Гіпоандрогенія у самців ймовірніше, є наслідком підвищення активності ароматази у тканинах-продуцентах естрогенів (Schakman O. et al., 2012) і свідчить про порушення секреторної функції сім'яників та регуляції за механізмом зворотного зв'язку.

У групі «Стрес» спостерігалися ознаки дисліпідемії та оксидативного стресу. Вміст ТГ в крові був майже у два рази більший та досягав рівня інтактних самок (див. табл. 2). У сім'яниках вміст ТГ був майже у два рази меншим, ніж в інтактних самців. Аналогічні зміни вмісту ТГ відмічались й у печінці, але на відміну від інтактних тварин обох статей, в яких спостерігається чітка пряма залежність між концентрацією E_2 та ТГ у сироватці та печінці, для печінки самців групи «Стрес» ця залежність порушується, оскільки більший вміст ТГ спостерігається на тлі низького рівня E_2 . Знайдено зменшення вмісту ЗХС: в крові на 24 %, в сім'яниках – у два рази, хоча у печінці він відповідав нормі (див. табл. 2). Рівень ХС ЛПВЩ у піддослідних тварин був меншим: у сироватці – на 62 %, печінці – на 37 %, в сім'яниках – у 2,5 раза (див.

табл. 2). Через щільний зв'язок між синтезом стероїдів та обміном ХС порушення обміну ХС на будь-якому етапі може призводити до андрогенної недостатності, статевої дисфункції та безпліддя (Агаджанян В. А., 2009). Вміст загального протеїну у піддослідних тварин у крові та печінці виявився подібним показникам самок, але у порівнянні з інтактними самцями був меншим, як і у сім'яниках (див. табл. 3). Було виявлено зменшення активності АЛТ у сироватці та печінці (майже на 40 та 60 %, відповідно), що подібно показникам інтактних самок. Встановлено зменшення активності АСТ у сироватці та печінці щурів цієї групи відносно інтактних самців (майже на 24 та 80 %, відповідно), а проти інтактних самок – менше на 46 та 38 %, відповідно. У сім'яниках відрізнялася від норми лише активність АЛТ (перевищувала у два рази фізіологічну норму, (див. табл. 3)). Реакції трансамінування в усіх клітинах організму відіграють значну роль в метаболізмі білків забезпечуючи біосинтез 11 амінокислот, деяких специфічних сполук, об'єднують шляхи вуглеводного та амінокислотного обміну, тому зменшення концентрації білка та зміна активності трансфераз АЛТ та АСТ можуть відображати стан протеїнового обміну. Клітини Сертолі продукують сечовину, необхідну для нормального розвитку сім'яників, яка у кров із органу виводиться за допомогою транспортера сечовини (UT-V-транспортера) (Guo L. et al., 2007). Локальне зростання вмісту сечовини у сім'яниках на 27 %, (див. табл. 3), яке спостерігається й при старінні (Закуцкий А. Н., 2008), може свідчити про дефіцит UT-V-транспортера. У своїй основі сперматозоїди складаються з білків, серед амінокислот яких переважає аргінін. З нього утворюються поліаміни, які входять до складу ядерного хроматину, є важливими прекурсорами молекул росту, репарації та поділу клітин. Метаболізм аргініну з залученням НАДФН-залежних NO-синтаз призводить до утворення NO, радикалу, що бере участь у заплідненні на різних етапах. Рівень аргініну був меншим: у крові – на 60 %, в печінці - майже на 44 % відносно інтактних самців. Це поєднується із виявленим зростанням концентрації NOx – у крові в 4,4 рази, в печінці – в 1,5 рази. В сім'яниках вміст аргініну та NOx був меншим майже у два рази. Спермограма піддослідних самців суттєво відрізнялася від норми: майже вдвічі була меншою загальна концентрація сперматозоїдів, у 2,4 рази – показника C_N та на 30 % – частка рухливих гамет при вищій (у два рази) долі патологічних форм ($p < 0,05$), (табл. 4).

Таблиця 4

Показники спермограми у щурів, n=12 ($\bar{X} \pm S_x$)

Показник	Група			
	інтактні самці	«Стрес»	«ФЕ»	«Стрес+ФЕ»
Концентрація, млн/мл	77,2±1,4	43,2±3,3 ^{a)}	73,27±1,75	76,33±1,50
Рухливі сперматозоїди, %	83,4±1,7	61,5±4,4 ^{a)}	65,36±1,75 ^{a)}	73,17±2,06 ^{a)}
Патологічні форми, %	17,6±0,7	39,3±2,5 ^{a)}	30,00±1,14 ^{a)}	23,33±1,01 ^{a)}
Морфологічно нормальні форми, млн/мл	63,6±1,1	26,6±2,6 ^{a)}	51,23±1,26 ^{a)}	58,40±0,76 ^{a)}

Примітка. а) – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самців ($p < 0,05$).

Наслідками дії стресу в підсосний період ми вважаємо й зміни статевої поведінки дорослих самців. Відмічено сповільнення статевого акту та ослаблення

копулятивної активності: зниження кількості еякуляцій за тест на 67 % та подовження її латентності на 76,2 % (рис. 2).

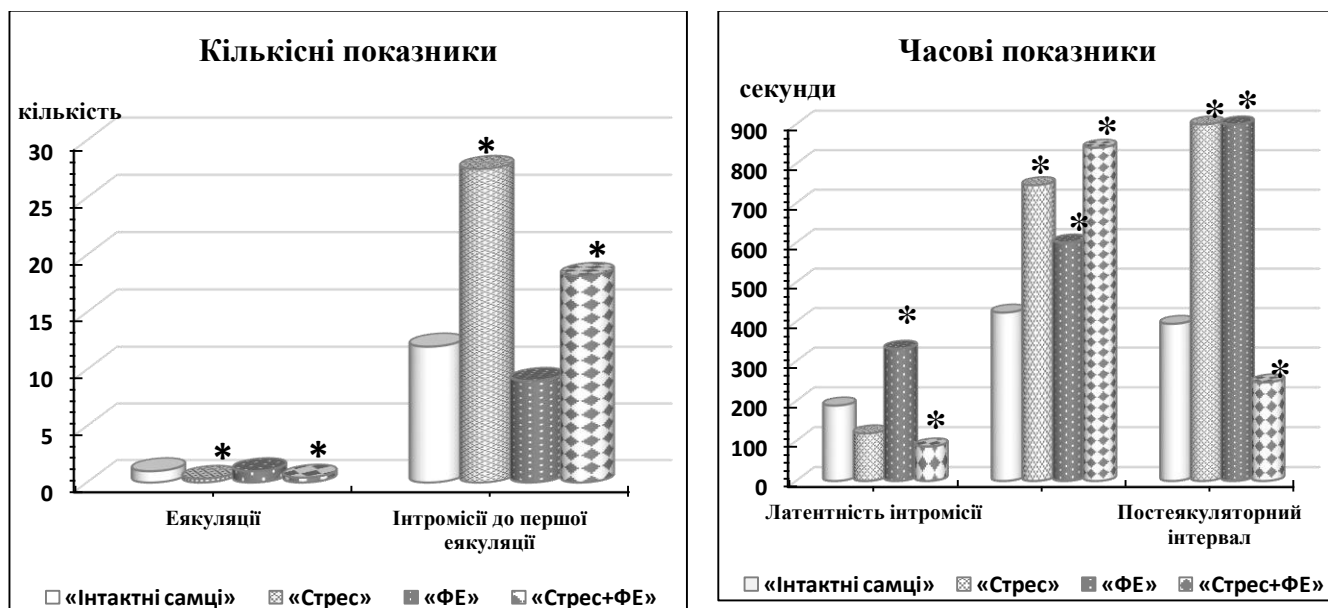


Рис. 2. Окремі елементами статевої поведінки підослідних самців:

* – відхилення достовірно щодо показників групи інтактних самців ($p < 0,05$).

Сповільнення статевого акту може бути наслідком зниження концентрації дигідротестостерон (ДГТ). Адже відомо, що тривалість латентності еякуляції зворотно пропорційна рівню 5α -відновленого метаболіту Тс ДГТ (Гладкова А.І., Карпенко Н.А., 1987). За час тесту жоден самець не встигав розпочати другу сесію парувань (див. рис. 2). Тривалість рефрактерного періоду віддзеркалює активність передньої долі гіпоталамусу, що контролюється Тс, ароматизованого до E_2 . Це може вказувати на порушення метаболізму андрогену в центрах регуляції статевої поведінки. Самці цієї групи зберігали здатність до запліднення інтактних самиць. Індекси запліднення (77,8 %) та вагітності (85,7 %) не відрізнялися від норми (86,7 та 84,7 %, відповідно). Але внаслідок збільшення внутрішньоутробних втрат у 8,8 раза, на передімплантаційному етапі у них була меншою кількістю тварин у приплоді (табл. 5).

Таблиця 5

Внутрішньоутробні втрати та репродуктивний потенціал у підослідних тварин, $n=6$, ($\bar{X} \pm S_x$)

Показник	Група			
	інтактні самці	«Стрес»	«ФЕ»	«Стрес+ФЕ»
Передімплантаційні, %	4,5±2,1	39,7±8,5 ^{a)}	16,0±7,4 ^{a)}	18,2±4,6 ^{a)}
Післяімплантаційні, %	12,2±3,0	6,9±2,4	7,7±4,9	24,4±6,8 ^{a)}
Загальні, %	16,3±2,8	45,1±7,4 ^{a)}	19,5±8,2	36,9±6,7 ^{a)}
Плодів на самку, од.	8,9±0,6	6,3±0,75 ^{a)}	9,7±1,0	7,23±0,8 ^{a)}
Фі, плодів на самку	7,5±0,5	3,2±0,6 ^{a)}	4,8±0,5 ^{a)}	3,0±0,3 ^{a)}
Відносна величина, %	100,0	41,9 ^{a)}	64,2 ^{a)}	41,9 ^{a)}

Примітка. а) – відхилення достовірно щодо інтактних самців ($p < 0,05$).

Це означає, що у заплідненні приймали 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.

У запліднених інтактних самок відмічене зменшення частки плодів-самців на 34 %. За іншими показниками: маса та краніо-каудальний розмір щурят достовірної різниці не мали. Такі зміни призвели до зменшення потенційної плідності Φ і самців групи «Стрес» на 58,1 %. Факт дефектності сперматозоїдів підтверджується розрахунком відносної ваги внеску порушень статевої поведінки або зміни якості статевих клітин у зменшення показника Φ і в цій групі. У піддослідних самців переважає відносна вага внеску порушень якості статевих клітин: майже 60 % проти 40,1 % для відносної ваги внеску порушень поведінки.

Вплив надмірного надходження фітоестрогенів у період молочного вигодовування на стан репродуктивної системи дорослих самців щурів. Надходження сполук з естрогенною активністю також мало імпринтинговий вплив на гормонально-метаболічні характеристики дорослих самців. Вміст загального Тс в крові та сім'яниках був меншим, ніж в інтактних самців (майже у два та чотири рази, відповідно) (див. табл. 1). Рівень E_2 у сироватці не змінювався, однак, у сім'яниках та печінці, де відбувається значна частина метаболізму стероїдних гормонів, був на 53 та 55 % вищим, ніж у контролі (див. табл. 1), що наближало ці показники до рівня інтактних самок. Це призвело до зменшення співвідношення Tc/E_2 : у крові – на 41 %, у печінці – майже на 30 %, у сім'яниках – майже у 6 разів у порівнянні з контролем (див. табл. 1). Зниження Tc/E_2 у сироватці та печінці вказує на відносну естрогенізацію, оскільки відбувається за рахунок зниження Тс (сироватка – майже в два рази) або його нормального рівня (печінка) при збереженні фізіологічного рівню E_2 (кров) або його підвищення (печінка). У сім'яниках вміст Тс був значно меншим (майже у чотири рази), а E_2 – більшим (у 1,5 раза), що вказує на класичну абсолютну естрогенізацію даного органу. ФЕ не депонуються в організмі, але спроможність до спотворювання імпринтингу взаємодії з рецепторами естрогенів надає їм потенційну здатність модифікувати механізми регуляції програми становлення статевих особливостей метаболізму та рецепції гормонів в органах.

У групі «ФЕ» зміна співвідношення Tc/E_2 супроводжується суттєвою зміною вмісту проатерогенних ліпідів: ТГ та ЗХС. У крові, печінці та сім'яниках виявлений більший вміст ТГ у порівнянні з інтактними самцями (див. табл. 2). У крові та печінці цей показник майже наближався до показників інтактних самок. Концентрація ЗХС у крові у два рази була більшою, ніж в інтактних самців, що є подібним до показників інтактних самок, хоча у печінці та сім'яниках концентрація ЗХС змін не зазнала. В усіх органах вміст ХС ЛПВЩ був суттєво меншим у порівнянні з нормою: у крові – на 40 %, у печінці – майже на 60 %, у сім'яниках – на 33 % (див. табл. 2). Дані літератури стосовно метаболізму ліпідів та їхнього впливу на чоловічу фертильність досить не однорідні, що вказує на недостатність досліджень у цьому напрямку. Так, у роботі J. C. Lu та співавторів (2016) показано, що на відміну від рівню ліпідів крові ці показники для сім'яної плазми корелюють з параметрами сперми. Концентрація

ТГ, ХС, ХС ЛПВЩ, та холестерину-ліпопротеїдів низької щільності в сім'яній плазмі у пацієнтів з оліго-, астено- та тератоспермією вище, ніж у чоловіків з нормальними параметрами спермограми. Також існують суперечливі результати щодо зв'язку між ожирінням та чоловічою плодючістю. Було показано, що індекс маси тіла зворотно пропорційний об'єму сперми, загальній концентрації, рухливості та відсотку морфологічно нормальних гамет (Shayeb A. G. et al., 2011). У роботі F. Erdemir та співавторів (2012) на тваринах було виявлено, що раціон з високим вмістом жиру збільшує рівень ТГ у крові та знижує вміст Тс, що призводить до безпліддя.

У самців відмічені ознаки порушення білкового обміну: збільшена концентрація загального білка у сироватці на 20 %, що наближає його до показників самок, та зменшена – у печінці та сім'яниках майже на 40 і 43 %, відповідно) (див. табл. 3). Концентрація сечовини була вища, ніж в інтактних тварин щурів: у крові – майже на 30 %, у сім'яниках – на 26 %, хоча без змін у печінці (див. табл. 3). Активність АЛТ зменшена у крові та сім'яниках на 30 та 70 %, відповідно. У печінці відмінності були протилежними – зменшувалась активність АСТ на 85 % (див. табл. 3), що також наближало цей показник до такого в інтактних самок.

Ранній контакт з ФЕ не позначився на концентрації вільного аргініну та NOx у крові та сім'яниках, хоча у печінці ці показники виявилися вищими, ніж в інтактних самців: на 50 і 60 %, відповідно. До того ж вміст аргініну в печінці був подібним до результатів інтактних самок (див. табл. 3). Визначення та розкриття важливості білкового обміну для процесу сперматогенезу може бути корисним як одна з причин гіпофертильності, особливо в умовах зміненого гормонального фону. Розбалансованість реакцій трансамінування може створювати дефіцит субстрату для гліколізу та призводити до зниження активності та рухливості сперміїв. Також, утворення сечовини напряму пов'язано з відповідною активністю трансаміназ та фіксацією аміаку в циклі сечовини. Адже прискорене сечовиноутворення у щурів відбувається на тлі дещо зниженої активності трансфераз. Це також вказує на підвищений протеоліз, що відбувається в умовах нітрозивного стресу та створює сприятливі для цього умови.

У групі «ФЕ» спостерігалися менш важкі порушення репродуктивної функції, ніж у стресованих самців. Була незмінена загальна кількість сперматозоїдів, хоча було вдвічі більше патологічних форм та на 22 % менше рухливих (див. табл. 4). Це призвело до зменшення показника C_N майже на 20 %. Тобто, спостерігалися лише порушення процесу сперміогенезу, тому що мікроскопічне дослідження помітних змін у структурній організації сім'яників не виявило. На відсутність прямої кореляції між концентрацією Тс та кількістю сперматозоїдів в 1 мл сперми як у здорових, так і гіпофертильних чоловіків, вже звертали увагу (Бондаренко В. О. та співавт., 2012; Савікіна К. Г. та співавт., 2015). Тому збереження нормальної концентрації сперматозоїдів, скоріше за все, пов'язано зі збереженням нормального рівня фолікулоstimулюючого гормону (ФСГ) на перших етапах розвитку сперматогенного епітелію у нащадків. Також, достатня кількість аргініну можливо, змогла забезпечити утворення потрібної кількості поліамінів, що й зберегло сперматогенну функцію сім'яників. Порушення процесів сперміогенезу (утворення значної кількості

аномальних форм), на нашу думку є наслідком відстроченої абсолютної естрогенізації сім'яників.

Фітоестрогенізація вплинула і на характер статевої поведінки самців. По-перше, жоден з них не встигав розпочати другу сесію парувань за час тесту через значне зростання постеякуляторного інтервалу (див. рис. 2). По-друге, підвищувалась активність залицяльної поведінки та ослаблювалась – копулятивної. Про це свідчило зниження кількості копуляцій до $(9,0 \pm 2,3)$ одиниць від $(12,6 \pm 0,7)$ одиниць у контролі та подовження латентності усіх складових спарювальної поведінки: садок – на 38,4 %, інтромісій – на 75,7 % та еякуляцій – на 42,1 %.

Зміни спермограми та статевої поведінки не завадили піддослідним самцям запліднити інтактних самиць при більш тривалому контакті. Індекси запліднення (78,9 %) та вагітності (80,0 %) не виходили за межі норми. Порушення фертильності самців проявилися зростанням доімплантаційної загибелі ембріонів у вагітних самок у 3,3 рази ($p < 0,05$), хоча загальний рівень внутрішньоутробних втрат статистично значуще з контролем не різнився (див. табл. 5). У виводках основної групи зменшилась кількість плодів чоловічої статі на 22 % та збільшилась кількість жіночих – на 53 %. Інтегральний показник потенційної плідності Фі самців був на 35,8 % менше, ніж у групі інтактних самців. У цьому випадку переважала відносна вага внеску порушень якості статевих клітин: 64,2 % проти 36 % відносно ваги внеску змін поведінки. Це свідчить про утворення значної кількості неповноцінних сперматозоїдів з порушеннями на субклітинному та, можливо, на геномному рівні.

Наслідки сумісного впливу емоційного стресу та надходження надлишку фітоестрогенів у період молочного вигодовування на стан репродуктивної системи дорослих самців щурів. Імпринтинговий вплив одночасної дії досліджуваних чинників мав дещо парадоксальний ефект. У крові концентрація Тс, Е₂ та співвідношення Тс/Е₂ знаходились у фізіологічних межах (див. табл. 1). У печінці концентрація Тс була меншою на 30 %, Е₂ – більшою на 60 %, а коефіцієнт Тс/Е₂ – менше у 2,2 рази, що наближало ці показники до таких у самок. У сім'яниках концентрація Тс дорівнювала контрольним показникам, а вміст Е₂ був майже у три рази більшим, що призвело до зменшення коефіцієнту Тс/Е₂ у 2,6 рази (див. табл. 1). Це свідчить про порушення обміну андрогенів та домінування Е₂, а з урахуванням показника Тс/Е₂ – про абсолютну естрогенізацію як печінки, так і сім'яників. Тобто, є прихований гормональний дисбаланс (ознаки зменшення фізіологічних статевих відмінностей), який не можна визначити лише за вмістом гормонів сироватки крові. Привертає увагу той факт, що сумісне застосування двох чинників по-різному проявилось у досліджуваних тканинах. Так, у печінці мала місце сумація негативних ефектів дії емоційного стресу та надмірної фітоестрогенізації, що проявлялося більш значним зменшенням показника Тс/Е₂ у порівнянні з дією чинників окремо. Для сім'яників такої сумації не відбулося і ступінь зменшення показника Тс/Е₂ відповідав такій у групі «Стрес». Слід відмітити, що за умов надходження ФЕ у підсосний період показник андрогенізації сім'яників був у 2,5 рази меншим. Тобто, при поєднанні двох пошкоджуючих чинників їхній вплив не потенціюється, а відбувається пригнічення або нівелювання одного фактору іншим. У даному випадку стрес нівелює або пригнічує дію ФЕ. У попередній роботі нами було встановлено, що застосовані умови

експерименту позначаються на концентрації кортикостероїдів у щурів як на 22 добу життя, так і у дорослому віці (Карпенко Н. О. та співавт., 2011). У щурів групи «Стрес» цей показник не відрізнявся від контролю на 22 добу життя ((259,0±7,3) нмоль/л щодо (246,0±7,9) нмоль/л), а у шести місячних щурів він статистично достовірно був вищим у 1,6 рази (від (196±12,3) до (321,8±5,2) нмоль/л). Навпаки, у щурів групи «Стрес+ФЕ» рівень кортикостерону був більшим, ніж у контролі на ранньому етапі життя на 14 % (від (259,0±7,3) до (295,1±5,5) нмоль/л), ($p < 0,05$). У дорослому віці ця різниця зникала ((196±12,3) нмоль/л щодо (206,5±18,4) нмоль/л), ($p < 0,05$). Механізм такої одночасної дії гормонів стресу (глюкокортикоїдів) 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 витoki утворення. У роботі В. Ю. Ємельянова (2007) було показано, що фармакологічне застосування глюкокортикоїдів здатне підвищувати експресію естрогенових рецепторів та гормональний ефект естрогенів. Однак, одночасно відбувається зниження експресії самих глюкокортикоїдних рецепторів та впливу глюкокортикоїдів. Біологічне значення цього явища також залишається невідомим. Але, на думку автора, такі дані вказують на сильний інгібуючий вплив глюкокортикоїдів на роботу естрогенів в органах. А при дії глюкокортикоїдів за відсутності естрогенів зміни рівня експресії рецепторів не відбувалося. Це вказує на те, що вплив глюкокортикоїдів опосередкований регуляторним шляхом із залученням естрогенових рецепторів, а, значить, і взаємодією з однаковими регуляторними послідовностями молекули ДНК для естрогенових рецепторів. Проте інтенсивність такого впливу буде різною. Також у роботі В. Ю. Ємельянова було показано, що при тривалому одночасному введенні E_2 та дексаметазону концентрації естрогенів у крові у контрольних та дослідних мишей залишаються однаковими. Однак рівень експресії естрогенових рецепторів у матці цих тварин суттєво різнився. Таке застосування гормонів призводило до зниження експресії глюкокортикоїдних рецепторів та підвищення рецепції α -естрогенових рецепторів в усіх структурах матки мишей. Таким чином, співвідношення глюкокортикоїди/естрогени може впливати на експресію рецепторів та на вираженість гормонального ефекту.

Ще одним поясненням може бути той факт, що ФЕ здатні пригнічувати дію цитохрому P-450, який приймає участь у синтезі стероїдів, а глюкокортикоїди навпаки, посилювати його індукцію (Stejskalova L. et al., 2013). І це могло мати вирішальний вплив під час статевої диференціації.

Також у піддослідних тварин виявлено проатерогенний характер змін показників обміну ліпідів. Вміст ТГ був вищим у крові у три рази та печінці на 44 % відносно інтактних самців, що наближало (і перевищувало) ці показники інтактних самок (див. табл. 2) ($p < 0,05$). У сім'яниках вміст ТГ був в межах фізіологічної норми. Вміст ЗХС був більшим лише у крові: відносно інтактних самців майже в чотири рази, а відносно інтактних самок – у два рази при незмінності його у печінці та сім'яниках. Концентрація ХС ЛПВЩ була нижчою відносно інтактних самців: у сироватці крові – на 42 %, в печінці – на 66 %, в сім'яниках – на 44 % (див. табл. 2). Надфізіологічний вміст ТГ у зразках може вказувати на надмірну концентрацію жирних кислот у

навколуклітинному просторі, що сприяє розвитку ліпотоксичності та окислювального стресу і є ознакою передчасного старіння організму. Підвищення вмісту сироваткових ХС та ТГ та зменшення ХС ЛПВЩ у сукупності зі станом хронічного окислювального стресу свідчить про наявність ушкоджень ендотелію судин, що є патологічною основою для ініціації розвитку чоловічої гіпофертильності.

Показники білкового обміну у піддослідних самців мали різноспрямовані зміни. У крові концентрація загального протеїну та сечовини відповідала фізіологічній нормі, хоча відмічалось зниження активності АЛТ на 33 % та зростання АСТ на 41 %, що наближено до показників інтактних самок. Знайдено дефіцит аргініну майже на 38 % відносно інтактних самців, та на 28 % – відносно самок (див. табл. 3). Це узгоджується зі зростанням вмісту NOx майже у шість разів у порівнянні з контролем, хоча ця величина становила лише третину від показника інтактних самок. У печінці вміст загального білка був меншим на 35 %, що наближалось до показників інтактних самок, а у сім'яниках – більшим на 44 %. У цих органах була більшою концентрація сечовини: у печінці – на 40 %, що було близько до такої інтактних самок, в сім'яниках – майже на 22 %. Активність АЛТ у печінці не відрізнялась від норми, але була знижена в сім'яниках на 32 % ($p < 0,05$). Активність АСТ у сім'яниках залишалась на фізіологічному рівні, у печінці – у 2,7 раза меншою, ніж в інтактних самців й більш подібною до показників інтактних самок. У печінці вміст аргініну не змінювався, однак концентрація NOx була вище у два рази (див. табл.3). У сім'яниках вміст аргініну менше на 30,5 %, але концентрація NOx відповідала фізіологічній нормі. Отже, деякий зсув статевих відмінностей у метаболізмі протеїнів та різноспрямовані зміни концентрації білку, сечовини, аргініну, NOx, активності трансфераз АЛТ та АСТ створюють передумови білкового дефіциту в організмі з ознаками нїтрозивного стресу.

Одночасний вплив досліджуваних чинників не мав значної імпринтингової дії на показники спермограми: 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. 4). Ці зміни обумовили невелике (на 8,1 %), але статистично значуще зменшення показника C_N , що було ознакою неповноцінного перебігу сперміогенезу. Утворення сперматозоїдів – гормонально залежний процес, де головну роль відіграє Тс. Однак, надфізіологічний вміст E_2 в сім'яниках у піддослідних тварин міг позначитись на розвитку спермальних клітин не зменшуючи їх кількість (Амстиславская Т. Г., 2009). Щодо статевої поведінки самців «Стрес+ФЕ» було відмічене те, що за час тесту у них реєструвалося більше на 76 % інтромісій (див. рис. 2), однак, це не привело до зростання кількості еякуляцій через збільшення її латентності у два рази. Постеякуляторний рефрактерний інтервал скоротився на 37,5 %, а кількість самців, що встигали розпочати другу серію паруваль, зменшилась вдвічі. Враховуючи те, що статеві гормони (Тс, E_2 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, порушення балансу Тс/ДГТ. З цим

узгоджується підвищений вміст E_2 у гомогенатах сім'яників та печінки, адже зниження вмісту ДГТ створює умови для підвищеного утворення E_2 .

Зміни спермограми та статевої поведінки не позначились суттєво на здатності самців «Стрес+ФЕ» до запліднення інтактних самиць. Індекси запліднення (66,7 %) та вагітності (92,9 %) при цьому не відрізнялися від контрольних показників. У вагітних самок були більшими внутрішньоутробні втрати: у передімплантаційний період – у чотири рази та у післяімплантаційний – у два рази (див. табл. 5), що обумовило зростання у 2,2 рази рівня загальних внутрішньоутробних втрат відносно інтактних. Плоди не відрізнялись від контрольних за краніо-каудальним розміром та масою, хоча ознаки статевої приналежності у нащадків-самців були більш виразними: розмір ано-генітальної відстані був більшим на 7 % ($p < 0,05$). Виявлено зменшення кількості плодів чоловічої статі – на 21% ($p < 0,05$). Обчислення інтегрального показника середньої реалізованої плідності самців показав зменшення Φ_i у 2,4 рази ($p < 0,05$). Розрахунок відносної ваги внеску у зниження плідності змін статевої поведінки або якості статевих клітин виявив, що у самців переважає відносна вага порушень якості статевих клітин: 53,0 % проти 47,0 %. Тобто, виявлені розлади визначаються переважно дефектами статевих клітин та їхнього спадкового матеріалу, що виникають у процесі сперміогенезу. На сьогодні проблема якості батьківського геному є актуальною проблемою. Адже під час запліднення сперматозоїд передає в ооцит не лише ядерну ДНК, але й фактори активації, центросоми, мРНК, мікро РНК та деякі елементи хроматину, що містять необхідні сигнали епігенетичної природи, важливі для подальшого розвитку зиготи. Оскільки епігенетичні модифікації можуть передаватися нащадкам, вочевидь, вони здатні впливати на гаметогенез, розвиток ембріонів та слугувати потенційною причиною безпліддя. Це деякою мірою пояснює отримані дані що до перебігу вагітності у самок, запліднених самцями групи «Стрес+ФЕ».

Результати досліджень впливу емоційного стресу та фітоестрогенізації матері на розвиток її нащадків суперечливі. Дослідження як окремої, так і сумісної дії на репродуктивну функцію обумовлено практичною повсякденністю та надзвичайною розповсюдженістю цих явищ у суспільстві. Прогрес у розумінні механізмів впливу даних чинників на гуморальну регуляцію та спрямованість метаболічних процесів в організмі, що розвивається, стане підґрунтям заходів профілактики, спрямованих на зменшення частоти чоловічої гіпофертильності.

Порівняння віддалених наслідків досліджених чинників показує, що найбільші зміни в гормонально-метаболічному аспекті у межах досліджуваних показників відбулися у тварин групи «Стрес»: лише три з 33 аналізів (11 досліджуваних сполук у трьох тканинах) відповідали фізіологічній нормі. В інших групах такими виявились: у групі «ФЕ» – 13, а у групі «Стрес+ФЕ» – 12 показників. При оцінці віддалених наслідків неонатальних впливів для репродуктивної функції за інтегральним показником Φ_i , найменш важкими вони були у групі «ФЕ». У групі «Стрес» та «Стрес+ФЕ» Φ_i зменшувався більш, ніж вдвічі внаслідок високого рівня ембріональних втрат у запліднених ними самок. Це вказує на порушення сперматогенезу та утворення дефектних сперматозоїдів, тобто, на проблему батьківського геному, можливо, епігенетичної природи.

Отримані дані щодо метаболічних особливостей продукції NOx і його попередника аргініну свідчать про розвиток стану оксидативного стресу та його патогенетичної ролі в порушенні репродуктивної функції. Аналіз результатів обстеження пацієнтів клініки «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», що зверталися з приводу ідіопатичної гіпофертильності, показав зв'язок підвищення вмісту NOx, зниження концентрації вільного аргініну в сім'яній плазмі, нормального рівня загального Тс у крові чоловіків з астенозооспермією. Аналогічний патерн змін виявлений для самців групи «Стрес+ФЕ»: відповідна нормі концентрація сироваткового Тс та Е₂, більший вміст NOx та менший – аргініну, відсутність клінічно значущих змін показників спермограми (астенозооспермія), незначні різноспрямовані зміни статевої поведінки. Водночас, має місце стан «прихованих» гормонально-метаболічних розладів, який може бути виявлений лише при дослідженні тканин печінки та сім'яника. За сукупністю ознак стан стресованих та фітоестрогенозорованих у ранній період онтогенезу самців щурів можна вважати патогенетичною моделлю неонатально індукованої чоловічої гіпофертильності з метаболічними розладами, яка розширює арсенал експериментальних моделей чоловічої гіпофертильності.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на підставі проведеного комплексного дослідження поглиблено уявлення щодо актуальної проблеми сучасної ендокринології – встановлення чинників, які здатні впливати на розвиток чоловічого безпліддя та доказ імпринтингового характеру їхньої дії. Визначено відстрочені негативні ефекти емоційного стресу, надмірної фітоестрогенозації та сумісної дії цих чинників під час молочного вигодовування щодо репродуктивної функції дорослих самців. Показано зменшення фізіологічних статевих відмінностей гормонально-метаболічних процесів, що сприяє зниженню репродуктивного потенціалу щурів у дорослому віці.

1. У дорослих самців щурів емоційний стрес відокремлення від матері під час молочного вигодовування зменшує величину репродуктивного потенціалу на 58,1 % проти контролю внаслідок змін статевої поведінки (сповільнення статевого акту та зменшення частоти еякуляцій), порушення сперматогенної функції сім'яників (погіршення спермограми за усіма досліджуваними показниками) при відсутності змін їхньої структурної організації та збільшення більш ніж у два рази внутрішньоутробних втрат у запліднених інтактних самок.

2. У неонатально стресованих дорослих самців щурів зменшується вміст тестостерону, зростає концентрація естрадіолу у сироватці та сім'яниках, наявний дефіцит обох гормонів у печінці, що є проявом зменшення абсолютної та відносної андрогенозації. Показники концентрації тестостерону, тригліцеридів, загального протеїну, активність ензимів АЛТ та АСТ в сироватці крові та печінці наближені до показників інтактних самок. Тварини мають ознаки дисліпідемії та хронічного нитрозивного стресу (зростання концентрації оксиду азоту та менший вміст вільного аргініну).

3. У дорослих самців надмірна фітоестрогенозація у неонатальний період призводить до менш важких порушень репродуктивної функції (зменшення репродуктивного потенціалу самців на 35,8 %). Відмічено деякі зміни статевої

поведінки, порушення сперміогенезу та дозрівання сперматозоїдів при збереженні їхньої нормальної концентрації.

4. Неонатально фітоестрогенізовані самці щурів відрізняються відносною (сироватка крові, печінка) та абсолютною (сім'яники) естрогенізацією організму (зменшення вмісту тестостерону та збільшення естрадіолу), проатерогенними змінами показників ліпідного обміну (збільшення вмісту тригліцеридів та зменшення холестерину ліпопротеїдів високої щільності), зменшенням фізіологічних статевих відмінностей деяких показників білкового обміну (більший вміст аргініну у печінці).

5. За умов сумісного впливу стресу та надмірної фітоестрогенізації в період молочного вигодовування у дорослих самців відмінності показників репродуктивної функції від фізіологічної норми були незначними (затримка та зменшення частоти еякуляцій, зменшення рухливості та погіршення морфологічної будови гамет). При цьому на 60,4 % зменшується потенціальна кількість нащадків при паруванні з інтактними самками (репродуктивний потенціал) внаслідок значного збільшення внутрішньоутробних втрат у самок (у 2,2 раза) через дефекти сперматозоїдів.

6. Для самців, що неонатально зазнали одночасної дії стресу та надмірної фітоестрогенізації, є характерним зменшення фізіологічних статевих відмінностей гормонально-метаболических показників і прихований гормональний дисбаланс. Хоча вміст тестостерону та естрадіолу у сироватці крові відповідає контрольним значенням, зміна співвідношення андрогени/естрогени у тканинах (абсолютна естрогенізація печінки та відносна – сім'яників) супроводжується дисліпідемією та розвитком хронічного нітрозивного стресу.

7. За сукупністю ознак гормонально-метаболических показників, характеристик спермограм та репродуктивного потенціалу стан щурів, підданих дії стресу та фітоестрогенізації у ранній період онтогенезу, можна вважати моделлю неонатально індукованої чоловічої гіпофертильності з метаболическими розладами.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гормональні зміни у дорослих щурів, що зазнали дії стресу та/або фітоестрогенів під час молочного вигодовування / Н. О. Карпенко О. В. Сомова., Є. М. Коренєва, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, Н. Ф. Величко, С. С. Ричкова. *Ендокринологія*. 2011. Т. 16, № 1. С. 76-82. (Дисертанту належить проведення досліджень, статистичний аналіз та часткова інтерпретація результатів).

2. Розвиток оксидативного стресу та порушення сперматогенезу в дорослих самців щурів, що зазнали дії м'якого емоційного стресу в період молочного вигодовування / Н. Ф. Величко, Н. О. Карпенко. Н. П. Смоленко., Е. Є. Чистякова, Є. М. Коренєва. *Проблеми ендокринної патології*. 2012. № 4. С. 91-95. (Дисертанту належить проведення досліджень, збір матеріалів, статистичний аналіз та інтерпретація результатів, оформлення статті).

3. Взаємовплив естрогенізації та стресування у період молочного вигодовування: статеві поведінка дорослих самців щурів / Н. П. Смоленко, Н. О. Карпенко, Н. Ф. Величко, Е. Є. Чистякова. *Проблеми ендокринної патології*. 2012. № 3. С. 74-79. (Дисертанту належить проведення досліджень, статистичний аналіз та часткова інтерпретація результатів).

4. Вікова динаміка статевої активності самців щурів після дії стресу або фітоестрогенізації у ранньому постнатальному періоді / Н. П. Смоленко, Н. О. Карпенко, Н. Ф. Величко, Е. Є. Чистякова, С. С. Ричкова. *Вісник проблем біології і медицини*. 2012. Т. 2, Вип. 3, (95). С. 106-108. (Дисертанту належить проведення досліджень, статистичний аналіз та часткова інтерпретація результатів).

5. Величко Н. Ф. Особливості гормонально-метаболических змін у дорослих самців щурів за умови емоційного стресу під час молочного вигодовування / *Фізіологічний журнал*. 2014. Т. 60, № 5. С. 105-114. (Дисертанту належить проведення досліджень, збір матеріалів, статистичний аналіз та інтерпретація результатів, оформлення статті).

6. Наслідки сумісної дії стресу та фітоестрогенів у неонатальний період для репродуктивної функції та метаболічного профілю самок щурів / Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, Н. Ф. Величко, Н. О. Карпенко. *Вісник проблем біології і медицини*. 2013. Т. 2 (103), Вип. 3. С. 244-247. (Дисертанту належить проведення досліджень, статистичний аналіз та часткова інтерпретація результатів)

7. Стрес і фітоестрогенізація у неонатальний період як чинники гіпофертильності самців щурів / Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, Н. Ф. Величко, Н. О. Карпенко. *Ендокринологія*. 2016. Т. 21, № 2. С. 161-165. (Дисертанту належить проведення досліджень, статистичний аналіз та часткова інтерпретація результатів).

8. Карпенко Н. О., Чистякова Е. Є., Коренева Є. М., Величко Н. Ф. Спосіб моделювання неонатально індукованої гіпофертильності самців: пат. 95758 Україна. № u2014 06302 ; заявл. 06.06.2014 ; опубл. 12.01.2015, Бюл. № 1. 4 с. (Дисертанту належить проведення досліджень, статистичний аналіз та часткова інтерпретація результатів).

За матеріалами дисертації опубліковано також 17 тез доповідей у збірниках і матеріалах вітчизняних та міжнародних конференцій.

АНОТАЦІЯ

Величко Н. Ф. Віддалені наслідки неонатального впливу фітоестрогенів та стресу на репродуктивну функцію та гормонально-метаболическі показники у дорослих самців щурів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.01.14 «Ендокринологія». – Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», Харків, 2019.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню відстрочених наслідків впливу емоційного стресу та надлишкової фітоестрогенізації в період молочного вигодовування на репродуктивну функцію щурів чоловічої статі в дорослому віці, стан сім'яників, вміст статевих гормонів, деякі метаболічні аспекти білкового, ліпідного обміну та оксидативного стану. Експериментально доведено, що дія застосованих чинників має імпринтингові наслідки, що змінює перебіг біохімічних процесів та негативно позначається на стані репродуктивної системи у тварин досліджуваних груп. Це проявляється у порушенні сперматогенезу, зниженні статевої активності, репродуктивного потенціалу та супроводжується дисбалансом статевих гормонів, зменшенням фізіологічних статевих відмінностей деяких метаболічних

аспектів білкового, ліпідного обміну з розвитком хронічного оксидативного (нітрозивного) стресу, дисліпідемії, білкового дефіциту.

За умов сумісного впливу стресу та надмірної фітоестрогенізації у період молочного вигодовування у дорослих самців розвивається стан прихованого гормонального дисбалансу, який не можна визначити при дослідженні гормонів лише у сироватці крові. На тлі незначних різноспрямованих змін статевої поведінки та показників спермограми більш, ніж вдвічі зменшується репродуктивний потенціал, тобто, потенційна кількість нащадків у цих тварин. Такий стан можна вважати патогенетичною моделлю неонатально індукованої чоловічої гіпофертильності невизначеної генези з метаболічними розладами.

Ключові слова: фітоестрогени, стрес, репродуктивна система, статеві гомони, метаболізм, фертильність.

АННОТАЦІЯ

Величко Н. Ф. Отдаленные последствия неонатального влияния фитоэстрогенов и стресса на репродуктивную функцию и гормонально-метаболические показатели у взрослых самцов крыс.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 14.01.14 «Эндокринология». – Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», Харьков, 2019.

Диссертационная работа посвящена исследованию отсроченных последствий влияния эмоционального стресса и избыточной фитоэстрогенизации в период молочного вскармливания на репродуктивную функцию самцов крыс во взрослом возрасте, состоянии семенников, содержание половых гормонов, некоторые метаболические аспекты белкового, липидного обмена и оксидативного состояния. Экспериментально доказано, что действие примененных факторов имеет импринтинговое влияние, изменяет течение биохимических процессов и отрицательно сказывается на состоянии репродуктивной системы у животных исследуемых групп. Это проявляется в нарушении сперматогенеза, снижении половой активности, репродуктивного потенциала и сопровождается дисбалансом половых гормонов, уменьшением физиологических половых различий некоторых метаболических аспектов белкового, липидного обмена с развитием хронического оксидативного (нітрозивного) стресса, дислипидемии, белкового дефіцита.

В условиях совместного влияния стресса и чрезмерной фитоэстрогенизации в период молочного вскармливания у взрослых самцов развивается состояние скрытого гормонального дисбаланса, который нельзя определить при исследовании гормонов только в сыворотке крови. На фоне незначительных разнонаправленных изменений полового поведения и показателей спермограммы более чем вдвое уменьшается репродуктивный потенциал, то есть потенциальное количество потомков у этих животных. Такое состояние можно считать патогенетической моделью неонатально индуцированной мужской гипофертильности неопределенного генеза с метаболическими расстройствами.

Ключевые слова: фитоэстрогены, стресс, репродуктивная система, половые гормоны, метаболізм, фертильність.

ANNOTATION

Velichko N. F. Long-term effects of neonatal influence of phytoestrogens and stress on the reproductive function and hormonal-metabolic parameters in adult males of rats. – Manuscript.

Thesis for the PhD degree by speciality 14.01.14 «Endocrinology». – State Institution «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems NAMS of Ukraine», Kharkiv, 2019.

The dissertation is devoted to the investigation of deferred effects of emotional stress and excess phytoestrogens in the period of breast feeding on the reproductive function of male rats in adulthood, the condition of the testicles, the content of sex hormones, some metabolic aspects of the protein, lipid metabolism and oxidative state. It is experimentally proved that the effect of applied factors has imprinting consequences, which changes the course of biochemical processes and adversely affects the state of the reproductive system in animals of the studied groups. It manifests itself in violation of spermatogenesis, decreased sexual activity, reproductive potential and is accompanied by an imbalance of sex hormones, feminization of some metabolic aspects of the protein, lipid metabolism with the development of chronic oxidative (nitrosis) stress, dyslipidemia, protein deficiency, which is a sign of premature aging of the body.

Stress during the period of breastfeeding in adult males has led to the development of hyperostrogeny and hypoandrogenia and a shift in the index of androgenization / estrogenization (testosterone (Tc)/estradiol (E₂)) toward females. Changes in hormonal balance affected the indicators of lipid and protein metabolism, the development of nitrosive stress. It is revealed: decrease in the total concentration of sperm, the share of motile gametes, the concentration of morphologically normal cells, the increase in the proportion of pathological forms. Sexual behavior was characterized by slowing of sexual intercourse, weakening of copulatory activity. Intact females fertilized by these males showed an 8,8-fold increase in pre-implantation fetal death, an increase of nearly three times the total prenatal loss, and a decrease in litter size. It has been established that the emotional stress of separation from mother during breast feeding in adult males in rats reduces their reproductive potential by 58,1 % and leads to an increase of more than 2 times fetal loss in fertilized intact females.

The features of protein metabolism were a decrease in tissue transferase activity, an increase in protein and urea content in the serum with multiple changes in these parameters in the testes, no change in the concentration of arginine and stable metabolites of the nitric oxide cycle (NO_x), with the exception of the increase in these parameters in the liver. Impaired reproductive function in adult males of the phytoestrogenized males was less severe. The total number of sperm in the semen was maintained while reducing the percentage of motile sperm and the concentration of morphologically normal cells due to the almost double increase in the proportion of abnormal forms. Changes in sexual behavior were also manifested in the slowing of the response to the receptive female, increased latency of intromission and ejaculation, and the postacculatory period continued so that no male had time to start the second pairing session during the test. At the same time, a decrease in the frequency of copulatory reactions was observed, which was offset by activation of the reflexive behavior. During prolonged contact, the males fertilized the females, which

increased the rate of pre-implantation fetal death 3,5 times, with no statistically significant differences in the overall loss rate. A survey of the fruits showed a reduction in the number of male fetuses to 78 % of control and an increase of 53 % in the number of female fetuses. Excessive fitoestrohenizatsiya in the neonatal period causes less severe reproductive disorders adult males, some changes in sexual behavior, violations spermiohenezu and maturation of sperm while maintaining their normal concentration, which is summarized in reducing the reproductive capacity of males at 35,8 % versus control animals. In phytoestrogenized male rats the direction of hormonal and metabolic processes with signs of their feminization is changing.

The combined effect of stress and phytoestrogens had a somewhat paradoxical effect in adult animals. If the blood Tc, E₂ and Tc/E₂ concentrations were within physiological limits, there was a hidden hormonal imbalance in the tissues: hyperestrogenization of the testes three times and the liver more than 60 %, in which it was combined with a decrease in the Tc concentration by 30 %. As in the previous groups, changes in the proatherogenic nature were detected. Differences in protein metabolism appeared to be multidirectional changes in blood transfer activity, arginine deficiency, and higher NO_x content nearly sixfold. Total liver deficiency, less Asp activity, increased urea content and NO_x doubled in liver. In the testes, increased total protein content was associated with higher urea content and arginine deficiency. Transaminase activity in the blood and total protein content in the liver were similar to the physiological norm of intact females, and changes in urea content in the liver brought it closer to females. With the combined use of stress and phytoestrogens, sperm counts in adult males were not too severe. Only functional characteristics changed: motility and morphological structure of sperm. The differences in sexual behavior were that although males recorded more intromission by 76 % during the test, this did not increase the number of ejaculations due to a twofold increase in latency. However, due to the reduction in the duration of the post-ejaculatory interval, some males still managed to initiate a second series of mating events, although the proportion of such rats was halved. During the longer contact period, the males fertilized the receptive intact females, although the course of pregnancy was characterized by a 4-fold increase before and 2-fold post-implantation fetal death. This doubled the total intrauterine loss mainly due to the death of male fetuses by 21 %. Under conditions of combined influence of stress and excessive phytoestrogenization during the period of breastfeeding in males, a condition of latent hormonal imbalance develops, which cannot be determined in the study of hormones only in blood serum. Against the backdrop of minor, multidirectional changes in sexual behavior and sperm counts, the reproductive potential is more than halved, that is, the potential number of offspring in these animals. Such a condition can be considered a pathogenetic model of neonatal-induced male hypo-fertility of indeterminate genesis with metabolic disorders.

Key words: phytoestrogens, stress, reproductive system, sex hormones, metabolism, fertility.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АЛТ	– аланінамінотрансфераза;
АСТ	– аспартатамінотрансфераза;
ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я;

ДГТ	– дигідротестостерон;
E ₂	– естрадіол;
ЗХС	– загальний холестерин;
ХС	– холестерин;
НАДФН	– нікотинаденін-дінуклеотид відновлений;
ОС	– оксидативний стрес;
ТГ	– тригліцериди;
Тс	– тестостерон;
ФЕ	– фітоестрогени;
Фі	– середня реалізована плідність самців лабораторних гризунів;
ФСГ	– фолікулостимулюючий гормон;
ХС ЛПВЩ	– холестерин ліпопротеїдів високої щільності;
C _N	– концентрація морфологічно нормальних клітин;
ER	– рецептори естрогенів;
NO	– оксид азоту;
NO _x	– сумарний вміст нітрит- та нітрат-аніонів;
UT-B	– транспортер сечовини В.