

# ВЗАЄМОВПЛИВ ЕСТРОГЕНІЗАЦІЇ ТА СТРЕСУВАННЯ У ПЕРІОД МОЛОЧНОГО ВИГОДОВУВАННЯ: СТАТЕВА ПОВЕДІНКА ДОРΟΣЛИХ САМЦІВ ЩУРІВ

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

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків*

Причиною розладу всієї функції відтворення у чоловіків може бути значне послаблення сексуального потягу. Зниження лібідо посідає третє місце серед сексуальних розладів у чоловіків після еректильної дисфункції та прискореної еякуляції [1]. Відомо, що становлення програми розвитку репродуктивної функції, у тому числі й статевої поведінки, відбувається під контролем статевих гормонів вже на ранніх етапах розвитку особини. В критичні періоди онтогенезу серед чинників, здатних викликати гормональний дисбаланс та виказувати імпринтингову дію, певне місце належить стресу та гіперестрогенізації внаслідок надходження фітоестрогенів (ФЕ) з молоком матері [2–4].

У самців, що отримували ФЕ у ранньому онтогенезі, спостерігається пригнічення статевої активності [5], а у самок — порушення естрогензалежних форм поведінки [6]. У той же час імпринтингові наслідки сумісної дії стресу та ФЕ під час молочного вигодовування залишаються не вивченими, особливо з урахуванням того, що ФЕ можуть виказувати про- та антиестрогенну дію в залежності від їх дози.

Метою дослідження, що подається, було вивчення віддалених наслідків сумісної дії аліментарного надходження надлишку ФЕ у максимально безпечній дозі та емоційного стресу під час молочного вигодовування для статевої поведінки самців щурів.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Роботу виконано на щурах популяції Вістар відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001).

Інтактні вагітні самки, запліднені інтактними самцями, за 2–3 дні до пологів були рандомізовані на групи з умовними позначками Контроль (інтактні тварини), Стрес, ФЕ, E2, Стрес + ФЕ, Стрес + E2.

Після пологів у групі Стрес був відтворений емоційний стрес нащадків за моделлю

«clean bedding», для чого їх з третьої по 15 добу життя відокремлювали від виводку та матері на 15 хв. та переносили на чисту підстилку. На цей час самка поміщалась у пусту клітку, де до того знаходились самці (експозиція до запаху «чужого» самця) [7].

У групах Стрес + ФЕ та Стрес + E2 тварини зазнавали одночасного впливу такого ж стресу та отримували з молоком матері надлишок ФЕ або E2, а в групах ФЕ та E2

тільки отримували з молоком матері надлишок ФЕ або Е2. Для цього самкам груп ФЕ та Стрес + ФЕ з третього по 21 день лактації згодовували ФЕ у дозі 100 мг/кг м. т. матері, яка є максимально безпечною дозою (NOAEL) [8]. Для порівняння дії ФЕ з дією природного естрогену у той же період самки груп Е2 та Стрес + Е2 отримували з їжею  $17\beta$ -естрадіол (Е2) (Merck Group, Німеччина) у дозі 0,25 мг/кг м. т. [9].

Для моделювання аліментарного надходження надлишку ФЕ використовували біологічно активну харчову домішку Genistein Soy Complex isoflavone-rich (Soylife, США) з відносним вмістом дайдеїну — 60 %, гліцитейну — 22 % та геністеїну — 18 % [10]. Дозу ФЕ розраховували за так званим «геністеїновим еквівалентом». Дозу Е2 було обрано на підставі порівняння змін гормонального профілю при дії різних доз естрогену [11] та ФЕ [12].

По досягненні тваринами 120-денного віку формували у них статевий досвід, для чого тричі, з проміжком 4–6 днів, підсаджуючи на 15 хв. до самця оварієктомовану самку. Рецептивність у оварієктомованої самки гормонально індукували послідовним введенням масляного розчину естрадіолу дипропіонату (10 мкг на щура) за 48 год. та прогестерону (500 мкг на щура) за 4–5 год. до тестування.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що мотиваційний компонент статевої поведінки відіграє важливу роль у виборі адекватного статевого партнера, стимулює зростання концентрації тестостерону в крові у самців, значною мірою визначає повноцінність подальшого статевого акту. При дослідженні цього компонента у інтактних самців було знайдено, що вони у середньому проводили біля рецептивної самки в 5,4 рази більше часу, ніж біля оварієктомованої. Наслідком стресування тварин під час молочного вигодовування було те, що самці цієї групи перебували біля оварієктомованої самки довше, тому перевага рецептивної самки (відношення часу, що самець знаходиться поряд з рецептивною самкою, до часу перебування поряд з оварієкто-

Оцінку статевої мотивації самців щурів в тесті «Перевага партнера» проводили двічі впродовж 5 хв. у проміжку з 15 до 17 год., аналізуючи результати другого дня. Досліди проводили у спеціальній тест-камері у вигляді рукава з фарбованого дерева розмірами 180 см × 15 см і висотою бортиків 15 см, вкритою зверху металевою сіткою. У протилежних кінцях знаходилися відокремлені сіткою від середньої частини рукава відсіки довжиною по 30 см для рецептивної та оварієктомованої самок. Після розміщення самця в центр тест-камери реєстрували час його знаходження біля відсіків з рецептивною або оварієктомованою самкою.

Статеву поведінку самців досліджували у 15 хв. парному тесті з оварієктомованою рецептивною самкою у сутінковий час доби за часовими та кількісними показниками садок, інтромісій та еякуляцій. Реєстрували також кількість наближень самця до самки з обнюхуванням ано-генітальної області (залицяльна поведінка). Розраховували тривалість постеякуляторного інтервалу та коефіцієнт садки/інтромісії.

Зважаючи на характер розподілу даних у вибірках статистичний аналіз даних проводився із застосуванням непараметричних методів із використанням критеріїв U Вількоксона-Манна-Вітні [13] та  $\chi^2$ . Дані наведені як медіана (Me) та її похибка ( $S_{Me}$ ).

ваною самкою, ум. од.) дорівнювала лише 2,1 ум. од. (рис. 1).

При безпосередньому контакті з рецептивною самкою у самців групи Стрес спостерігалась більш активна залицяльна поведінка (зростання у 2 рази частоти наближень до самки,  $P < 0,01$ ) у порівнянні з результатами групи Контроль. На нашу думку, активація залицяльної поведінки відбувалась за рахунок пригнічення копулятивної і це відіграло роль «заміщення активності». Так, за час тесту у жодного самця не спостерігалась повноцінна статеві поведінка. Кінцевого ланцюжку спарювальної поведінки — еякуляції досягали лише 20 % тварин ( $P < 0,04$  за критерієм  $\chi^2$  відносно даних групи Контроль) (рис. 2) з частотою

$1,00 \pm 0,0$  за тест, що пов'язано зі зростанням латентного періоду еякуляції (у 1,8 рази). Загалом по групі частота еякуляції складала  $0,2 \pm 0,1$  за тест, що було статистично значуще нижче, ніж у інтактних тварин ( $1,3 \pm 0,2$ ,  $P < 0,05$ ). За час тесту у жодного щура не реєстрували початок другої серії парувань ( $P = 0,04$  за критерієм  $\chi^2$ ). На аналогічні імпринтингові наслідки в статевій поведінці дорослих нащадків після стресу відокремлення від матері вказують і поодинокі роботи [14], автори яких підкреслюють, що для таких тварин після досягнення статевої зрілості характерною є більша латентність садок та інтромісій, менша їх частка здатна до еякуляцій. Можливо, у нашому випадку зниження кількості еякуляцій за час тесту, тобто подовження часу статевого акту до здійснення еякуляції, може бути обумовленим підвищенням рівня серотоніну [15], а також дофаміну [16] у цих тварин. Подовжен-

ня тривалості латентності еякуляції вказує на недостатність утворення дигідротестостерону, за умов уведення якого у щурів спостерігається прискорена еякуляція [17].

Самці груп ФЕ та E2, як і інтактні тварини, при тестуванні статевої мотивації віддавали перевагу рецептивній самці, хоча для групи ФЕ це переважання дорівнювало 4,8 ум. од., а у групі E2—2,5 ум. од. (див. рис. 1). У щурів групи ФЕ залицяльна поведінка посилювалась. Її елементи спостерігалися у 1,5 рази частіше, ніж у самців групи Контроль, що співпадає з даними, отриманими при дослідженні наслідків згодовування самиці-матері такої ж суміші ФЕ, але у дозі 20 мг/кг м. т., за даними Гладкової А. І. та співавт., — зростання залицяльної активності у 2,4 рази [5]. Кінцевого ланцюжку спарювальної поведінки досягали всі тварини (див. рис. 2), хоча латентний період еякуляції подовжувався у 1,6 рази

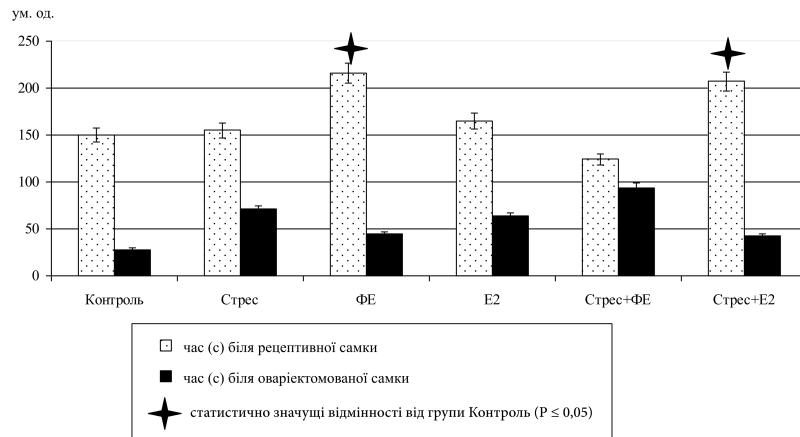


Рис. 1. Показники мотиваційної поведінки самців щурів у тесті «Перевага партнера».

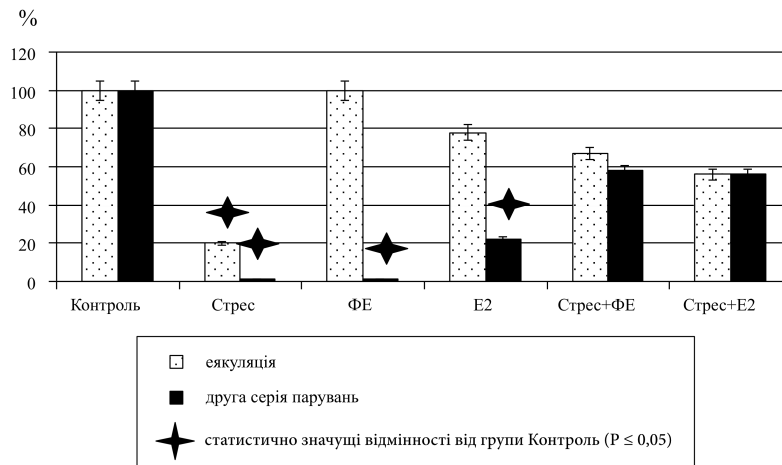


Рис. 2. Частка щурів, у яких за час тесту спостерігалися еякуляція та початок другої серії парувань.

(з  $380 \pm 55$  с у групі Контроль до  $520 \pm 6,3$  с,  $P < 0,01$ ). Тривалість постеякуляторного інтервалу зростала настільки, що за час тесту в жодного щура, на відміну від інтактних тварин, не реєстрували початок другої серії парувань ( $P < 0,01$  за критерієм  $\chi^2$ ). Щодо швидкості реагування на рецептивну самку (латентність садок та інтромісії), то у самців групи ФЕ вона не змінилася порівняно з інтактними щурами. Слід відзначити, що у разі згодовування самці-матері суміші ФЕ у меншій дозі (20 мг/кг) у дорослих нащадків спостерігалось уповільнення статевих реакцій на рецептивну самку [5], що може свідчити про нелінійність імпринтингових ефектів різних доз ФЕ.

Характер зміни статевої поведінки, коли відмічалась затримка еякуляції та відсутність другої серії копуляції, також відповідає картині недостатності продукування дигідротестостерону. Це припущення співпадає зі спостереженнями, що у молодих чоловіків за умов споживання соєвого білка спостерігається зниження рівня цього гормону та співвідношення між дигідротестостероном та тестостероном [18].

Статева поведінка самців групи E2 також характеризувалася збільшенням (у 1,7 рази) проявів елементів залицяльної поведінки при уповільненні реакцій на рецептивну самку, про що свідчило збільшення латентності інтромісії до  $135 \pm 13$  с порівняно з  $80 \pm 20$  с у групі Контроль ( $P < 0,05$ ). За час тесту еякуляції досягали 78 % тварин, але лише 22 % щурів змогли розпочати другу серію парувань ( $P < 0,01$  за критерієм  $\chi^2$  відносно даних групи Контроль).

У групі Стрес + ФЕ поведінка самців у тесті «Перевага партнера» статистично значуще не відрізнялася від такої у групі Стрес, перевага рецептивної самки дорівнювала лише 1,3 ум.од. (див. рис. 1), а залицяльна поведінка була значно слабкішою (у 1,8 рази). При цьому кількість інтромісій була майже вдвічі більшою. Еякуляції за час тесту досягали 67 % тварин, що більше, ніж у групі Стрес (20 %), але менше, ніж у групі ФЕ (100 %) (див. рис. 2). При цьому спостерігалась скорочена латентність еякуляції (у 1,5 рази). Початок другої серії парувань за 15 хв. тесту був зареєстрований у 56 % тварин.

Зважаючи на те, що в групах ФЕ або Стрес жодний самець не був спроможний розпочати другий тур парувань, можна стверджувати, що за умов сумісного застосування обох чинників відбувалося нівелювання негативної імпринтингової дії емоційного стресу та гіперестрогенізації під час формування функціональних зв'язків у ЦНС.

У самців групи Стрес + E2 у 1,4 рази зростав час перебування біля рецептивної самки (порівняно з даними груп Контроль та Стрес), переважання такої самки дорівнювало 4,8 ум.од. При контакті з самкою у самців цієї групи залицяльна поведінка була у межах нормальних величин, що відрізняло цю групу від групи Стрес. Половина тварин досягала еякуляції, кількісні та часові характеристики наближувались до контрольних показників. Тобто, у цих тварин рання естрогенізація також запобігала негативній імпринтинговій дії стресу.

## ВИСНОВКИ

1. Емоційний стрес або аліментарне надходження надлишку сполук з естрогеновою активністю під час фізіологічного молочного вигодовування змінює рівень статевої мотивації та статево поведінку дорослих самців щурів. Це проявляється посиленням залицяльної поведінки при послабленні копулятивної, яка характеризується уповільненням статевих реакцій на самку, готову до парування, та подовжен-

ням рефрактерного періоду після еякуляції.

2. За умов надходження з материнським молоком  $17\beta$ -естрадіолу або фітоестрогенів на тлі слабого хронічного емоційного стресу у дорослих самців спостерігається нівелювання негативних імпринтингових наслідків дії чинників щодо статевої мотивації або статевої поведінки.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Кон, И. С. Вкус запретного плода: Сексология для всех / И. С. Кон // Электронный ресурс — <http://sexology.narod.ru/chapt402.html>.
2. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология [Текст] / А. Г. Резников, В. П. Пишак, Н. Д. Носенко [и др.]. — Черновцы: Медакадемия, 2004. — 318 с.
3. Резников, А. Г. Эндокринологические аспекты стресса [Текст] / А. Г. Резников // Міжнар. ендокринолог. журн. — 2007. — Т. 10, № 4. — С. 103–111.
4. Interaction with stressed mothers affects corticosterone levels in pups after reunion and impairs the response to dexamethasone in adult mice [Text] / A. Moles [et al.] // Psychoneuroendocrinology. — 2008. — Vol. 33, № 4. — P. 462–470.
5. Половое поведение крыс после назначения фитоэстрогенов в разные периоды онтогенеза [Текст] / А. И. Гладкова, Н. П. Смоленко, Е. В. Сомова, Н. Ю. Селокова // Пробл. эндокрин. патол. — 2009. — № 4. — С. 85–93.
6. Exposure to Genistein during Gestation and lactation demasculinized the reproductive system in rats [Text] / A. B. Wisniewski [et al.] // J. Urol. — 2003. — Vol. 169, № 4. — P. 1582–1586.
7. Moles, A. Postnatal stress in mice: does «stressing» the mother have the same effect as «stressing» the pups? [Text] / A. Moles, R. Rizzi, F. R. D'Amato // Dev. Psychobiol. — 2004. — Vol. 44, № 4. — P. 230–237.
8. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Genistein (CAS No. 446–72–0) in Sprague-Dawley Rats (Feed Study) [Text] // Nat. Toxicol. Program. — 2008. — Vol. 545. — P. 1–240.
9. 90-Day Feeding and One-Generation Reproductive Study in Crl:CD BR Rats with 17beta-Estradiol [Text] / L. B. Biegel, A. N. Hirshfield, J. C. O'Connor [et al.] // Toxicol. Sciences. — 1998. — Vol. 44. — P. 116–142.
10. Вивчення складу соєвого продукту Genistein Soy Complex хроматографічними методами [Текст] / А. І. Гладкова, Ф. Г. Яременко, Л. Є. Нікішина, С. В. Кравченко // «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології»: Матер. наук.-практ. конф. Харків, 3–4 бер. 2011 р. Харків. — 2011. — С. 29–30.
11. Effects of Dietary 17beta-Estradiol Exposure on Serum Hormone Concentrations and Testicular Parameters in Male Crl: CD BR Rats [Text] / J. C. Cook, L. Johnson, J. C. O'Connor [et al.] // Toxicol. Sciences. — 1998. — Vol. 44. — P. 155–168.
12. Влияние фитоэстрогенов на уровень половых гормонов и фертильность крыс [Текст] / Е. В. Сомова, А. И. Гладкова, Н. А. Карпенко [и др.] // Пробл. эндокрин. патол. — 2010. — № 1 — С. 82–89.
13. Лакин, Г. Ф. Биометрия [Текст]: учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
14. Rhees, R. W. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function [Text] / R. W. Rhee, E. D. Lephart, D. Eliason // Behav. Brain Res. — 2001. — № 1. — P. 1–10.
15. Гомула, А. Влияние половых гормонов и нейротрансмиттеров на сексуальную функцию и поведение человека [Текст] / А. Гомула // Андрология и сексуальная медицина. — 2006. — № 1. — С. 36–46.
16. Hull, E. M. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior [Text] / E. M. Hull, J. W. Muschamp, S. Sato // Physiol. Behav. — 2004. — Vol. 83. — P. 291–307.
17. Гладкова, А. И. Функциональное взаимодействие андрогенов и тиреоидных гормонов в регуляции мужского полового поведения [Текст] / А. И. Гладкова, Н. А. Карпенко // Успехи физиол. наук. — 1992. — Т. 23, № 1. — С. 103–120.
18. Soy protein isolates of varying isoflavone content exert minor effect on serum reproductive hormones in healthy young men [Text] / B. L. Dillingham, B. L. McVeigh, J. W. Lampe [et al.] // J. Nutriol. — 2005. — № 135. — P. 584–591.

## ВЗАЄМОВПЛИВ ЕСТРОГЕНІЗАЦІЇ ТА СТРЕСУВАННЯ У ПЕРІОД МОЛОЧНОГО ВИГОДОВУВАННЯ: СТАТЕВА ПОВЕДІНКА ДОРОСЛИХ САМЦІВ ЩУРІВ

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

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

Вивчено особливості мотиваційної та спарювальної поведінки у статевозрілих щурів-самців, які в період молочного вигодовування були піддані дії стресу («clean bedding» з 3 по 15 добу життя) та/або одержували з молоком матері комплекс фитоестрогенів (100 мг/кг м. т. матері з 3 по 22 добу життя). Виявлено, що сполучення емоційного стресу та наявності у молоці матері фитоестрогенів нівелює негативні імпринтингові наслідки дії цих чинників окремо на статево мотивацію або статево поведінку дорослих самців. Аналогічний ефект виявлено у щурів, що отримували 17 $\beta$ -естрадіол у дозі 25 мг/кг м. т. матері.

Ключові слова: щури-самці, період молочного вигодовування, емоційний стрес, фитоестрогени, статева поведінка.

## ВЗАИМОВЛИЯНИЕ ЭСТРОГЕНИЗАЦИИ И СТРЕССА В ПЕРИОД МОЛОЧНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ: ПОЛОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ КРЫС

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

*ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков*

Изучены особенности мотивационного и спаривательного поведения у половозрелых крыс-самцов, которые в период молочного вскармливания были подвергнуты действию стресса («clean bedding» с 3 по 15 день жизни) и/или получали с молоком матери комплекс фитоэстрогенов (100 мг/кг м. т. матери с 3 по 22 день жизни). Обнаружено, что сочетание эмоционального стресса и наличия в материнском молоке фитоэстрогенов нивелирует негативные импринтинговые последствия действия этих факторов по отдельности в отношении половой мотивации и полового поведения взрослых самцов. Аналогичный эффект показан у крыс, получавших  $17\beta$ -эстрадиол в дозе 25 м/кг м. т. матери.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** крысы-самцы, молочное вскармливание, эмоциональный стресс, фитоэстрогены, половое поведение.

## THE RECIPROCAL ACTION BETWEEN ESTROGENIZATION AND STRESSING AT SUCKLING: THE SEXUAL BEHAVIOR OF THE ADULT MALE RATS

N. P. Smolenko, N. A. Karpenko, N. F. Velichko, E. E. Chistyakova

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

The peculiarity of the sexual motivation and behavior of the adult male rats under condition of stress («clean bedding» stress from 3<sup>rd</sup> till 15<sup>th</sup> days of life) and/or hyperphytoestrogenization (the phytoestrogen complex with the milk of the suckling mother in dose of 100 mg/kg of mother's b.w. from 3<sup>rd</sup> till 22<sup>th</sup> days of life) has been investigated. It has been found that combination of emotional stress and phytoestrogen in milk of the suckling mother to prevent of negative imprinting consequences of these factors for the sexual motivation and behavior of adult male rats. The same effect has been shown after combination of the emotional stress and  $17\beta$ -estradiol (25 mg/kg of mother's b.w.).

**К e y w o r d s:** male rats, suckling, emotional stress, sexual behavior, phytoestrogens.