

РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ТА ПОРУШЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ В ДОРОСЛИХ САМЦІВ ЩУРІВ, ЩО ЗАЗНАЛИ ДІЇ М'ЯКОГО ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ В ПЕРІОД МОЛОЧНОГО ВИГОДОВУВАННЯ

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

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

За останнє десятиріччя у різних країнах світу констатується погіршення показників сперматогенної функції [1]. Чоловічий фактор безпліддя, за різними даними, коливається від 30 до 50 %, з яких приблизно у 32 % випадків констатується ідіопатична форма [2], чинники якої можуть закладатися ще на ранніх етапах розвитку особини [3].

Формування повноцінних гонад та становлення репродуктивної функції в ранньому онтогенезі залежить не тільки від послідовності експресії різноманітних генів на статевих хромосомах, але й визначається численними факторами довкілля, спроможними впливати на розвиток організму в пре- та постнатальному періоді життя [4].

На сьогодні велика кількість спеціалізованої літератури з репродуктивної медицини присвячена впливу емоційного стресу та вільнорадикального окислення на чоловічу статеву функцію у дорослому віці, зокрема на сперматогенез [5, 6]. Відомо, що стрес є патогенетичним чинником, якому притаманні властивості активації стресреалізуючих (прооксидантних) та стреслімітуючих (антиоксидантних) систем організму [7]. Порухення балансу між цими системами призводить до підвищення кількості вільних радикалів та розвитку оксидативного стресу. До вільних радикалів належить оксид азоту (NO), який продукується НАДФН-залежними NO-синтазами (NOS)

окисненням L-аргініну в L-цитрулін. У фізіологічних концентраціях NO задіяний у процесах запліднення, тоді як підвищений вміст оксиду азоту та продукти його перетворення (нітросполуки, нітроти, нітрати, перокси-нітроти) є цитотоксичними. Вони спроможні в сперматозоїдах ініціювати оксидативні пошкодження клітинних ліпідів, протеїнів, ДНК та призводити, таким чином, до чоловічого безпліддя [8, 9].

Різноманітні види стресу, їх потужність та тривалість у критичні періоди онтогенезу можуть по-різному вплинути на розвиток особини та подальше функціонування систем її організму. Доведено, що емоційний стрес вагітної самки у першому триместрі вагітності призводить до виражених ушкоджень репродуктивної системи та порушення центральних нейромедіаторних механізмів її регуляції у самців-нащадків [10]. Період молочного вигодовування, як свідчать дослідження, є також надзвичайно чутливим до дії стресу [11], але наслідки сполучення цих чинників для становлення та подальшого функціонування репродуктивної системи дорослих особин досліджено недостатньо. Через поширеність стану психоемоційного стресу у матерів під час лактації зростає важливість дослідження його відстроченої дії на стан сперматогенної функції сім'яників та прооксидантно-антиоксидантний баланс у статевозрілих нащадків [12].

З огляду на вищенаведене, метою нашого дослідження було виявлення віддалених наслідків довготривалої дії м'якого емоційного стресу в період молочного вигодовуван-

ня для стану про- та антиоксидантного балансу та сперматогенезу у дорослих самців щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на щурах популяції Вістар у відповідності з «Загальноетичними принципами 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) та Стрес.

Після пологів у групі Стрес з третьої по 15 добу життя був відтворений емоційний стрес нащадків за моделлю «clean bedding», для чого їх відокремлювали від виводку та матері на 15 хв. і розміщували на чисту підстилку. Одночасно у цей період самку поміщали у пусту клітку, де перед цим знаходились самці (експозиція до запаху «чужого» самця) [13]. Нащадків дорощували до 10-місячного віку та виводили з досліду шляхом швидкої декапітації. У самців вивчали параметри спермограми суспензії епідидимальних сперматозоїдів.

В сироватці крові визначали концентрацію оксиду азоту за сумарним вмістом стабільних нітрит-аніонів (NOx) (нітритів та нітратів) за методикою взаємодії NOx з реактивом Гриссу та утворення кольорового розчину. Оптичну густина вимірювали при $\lambda = 546$ нм. Вміст NOx в пробі визначали за калібрувальним графіком стандартного розчину нітриту натрію [14]. Концентрацію вільного аргініну, що є попередником утворення NO в організмі, визначали за методом взаємодії аргініну гідрохлориду зі спиртовим розчином α -нафтолу та гіпобромним реактивом. Оптичну густина кольорового розчину вимірювали при $\lambda = 500$ нм [15].

Зважаючи на нормальний характер розподілу даних у вибірках, оцінку статистичної значущості відмінностей показників між групами проводили з використанням критерію t Ст'юдента. Дані представлено як $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У нашому експерименті спостерігалися ознаки порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу у дорослих особин, які зазнали довготривалої дії м'якого емоційного стресу в період молочного вигодовування. Так, в групі Стрес вміст у сироватці крові оксиду азоту підвищився в 4 рази (табл. 1).

Необхідно зазначити, що оксид азоту в клітинах може синтезуватися не тільки *de*

novo з аргініну, але й шляхом реутилізації за допомогою нітрит- та нітратредуктаз із нітритів та нітратів за умов високих концентрацій кисню [16]. Відомо, що цитотоксичні продукти перетворення оксиду азоту здатні блокувати процеси синтезу ДНК, поділу клітини, утворення енергії в циклі Кребса та перенесення електронів у електронтранспортних ланцюгах. Порушення мітохондрі-

Т а б л и ц я 1
Вміст стабільних метаболітів циклу оксиду азоту та аргініну в сироватці крові контрольних та стресованих щурів

Показник	Контроль (n = 8)	Стрес (n = 8)
(NOx), мкмоль/л	0,15 ± 0,01	0,61 ± 0,02*
Аргінін, мкмоль/л	90,39 ± 1,08	24,68 ± 2,08*

Примітка. * — статистично значущі відмінності від групи Контроль ($P \leq 0,05$).

Параметри спермограми контрольних та стресованих щурів

Показник	Контроль (n = 8)	Стрес (n = 8)
Концентрація сперміїв, млн/мл	72,50 ± 2,57	38,67 ± 5,79*
Рухливі сперматозоїди, %	81,83 ± 3,26	53,67 ± 6,25*
Патологічні форми, %	17,17 ± 1,14	44,17 ± 3,02*

Примітка. Як у табл. 1.

ального окиснення в сім'яниках внаслідок утворення вільних радикалів призводить до зниження рухливості сперміїв [17, 18].

В нашому експерименті у групі Стрес майже на 35 % зменшилась частка рухливих гамет порівняно з групою Контроль (табл. 2), що може свідчити про порушення генеративної функції сім'яників внаслідок оксидативного стресу. Це супроводжувалося зменшенням майже в 4 рази концентрації вільного аргініну (табл. 1), що може бути наслідком посилення експресії відповідних генів ферментів NO-синтаз та інгібування аргінази (перетворення L-аргініну в сечовину та орнітин) внаслідок підвищеного вмісту кисню, оскільки між цими ферментами існує взаємна конкуренція.

Відомо, що аргінін та продукти його перетворення — поліаміни, на які багата спермальна рідина (путресцин, спермін, спермідин та інші), можуть впливати на стан прооксидантно-антиоксидантної системи. Вони здатні перехоплювати радикали та сприяти експресії відповідних протекторних білків при взаємодії з ДНК та проявляти антиоксидантні властивості. Водночас, окиснення поліамінів призводить до утворення надлишку пероксиду водню з розвитком оксидативного стресу [19]. Це, в свою чергу, може посилювати пошкодження ДНК, деструкцію мембран та призводити до загибелі клітин.

В нашому експерименті у групі Стрес концентрація гамет зменшилась майже удвічі, при цьому збільшилась в 2,5 рази частка морфологічно аномальних форм (табл. 2). Оскільки, як відомо, активні форми кисню спроможні окислювати теломерні ділянки хромосом, дихальні ланцюги мітохондрій та інших мембранних структур клітини, це може призводити до передчасного старіння організму таких тварин [20].

Зміни, які ми спостерігали в сім'яниках щурів групи Стрес, корелюють із нашими попередніми дослідженнями, в яких показано, що вміст загального тестостерону в сироватці крові за таких умов зменшується майже в 1,5 рази у порівнянні з групою Контроль [21]. Це може свідчити про порушення інкреторної (синтез та виділення у кровообіг факторів гуморальної регуляції) функції сім'яників. Недостатність продукції тестостерону призводить до порушення сперматогенезу. Оксидативний стрес індукує перекисне окиснення ліпідів, що, у свою чергу, є пусковим фактором порушення ендокринної функції сім'яників, що призводить до зниження концентрації тестостерону.

Таким чином, довготривалий емоційний стрес в період молочного вигодовування призводить до розвитку оксидативного стресу у дорослих самців щурів та порушення сперматогенної функції сім'яників.

ВИСНОВКИ

1. Тривала дія м'якого емоційного стресу в період молочного вигодовування має імпринтинговий ефект, що призводить до розвитку оксидативного стресу та порушення репродуктивної функції у дорослих самців щурів.
2. Зниження концентрації вільного аргініну та підвищення вмісту оксиду азоту в сироватці крові відбиває порушення про- та антиоксидантного балансу та супроводжується розладами сперматогенезу.

ЛІТЕРАТУРА

1. World Health Organization reference values for human semen characteristics [Text] // *J. Hum. Reprod. Update.* — 2010. — № 16. — P. 231–245.
2. Черных, В. Б. Y-хромосома, AZF-микроделеции и идиопатическое бесплодие у мужчин [Текст] / В. Б. Черных, Л. Ф. Курило, Л. В. Поляков // *Проблемы репродукции.* — 2001. — № 5. — С. 35–48.
3. Diemer, T. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis [Text] / T. Diemer, C. Desjardins // *J. Hum. Reprod. Update.* — 1999. — Vol. 5, № 4. — P. 120–140.
4. Алексеева, И. А. Пол организма. Первичные и вторичные половые признаки [Электронный ресурс] / <http://econf.rae.ru/pdf/2010/06/28> с.
5. Hall, E. Male fertility: psychiatric considerations [Text] / E. Hall, V. K. Burt // *J. Fertil. Steril.* — 2012. — Vol. 97, № 2. — P. 434–439.
6. Impact of oxidative stress on male infertility [Text] / R. Hampl, P. Drábková, R. Kandár // *J. Ceska Gynekol.* — 2012. — Vol. 77, № 3. — P. 241–245.
7. Волкова, Ю. В. Влияние иммобилизационного стресса на свободнорадикальное окисление белков и липидов в субклеточных фракциях печени крыс разного возраста [Текст] / Ю. В. Волкова, В. В. Давыдов // *Эксперимент. і клініч. мед.* — 2009. — № 2. — С. 16–22.
8. Herrero, M. B. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa [Text] / M. B. Herrero, E. de Lami-rande, C. Gagnon // *J. Curr. Pharm. Des.* — 2003. — Vol. 9, № 5. — P. 419–425.
9. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite [Text] / E. R. Frears, Z. Zhang, D. R. Blake [et al] // *J. FEBS Lett.* — 1996. — Vol. 381. — P. 21–24.
10. Картавцева, О. В. Вплив соціального стресу щурів у першому триместрі вагітності на репродуктивну систему нащадків [Текст] / О. В. Картавцева // Автореферат — фізіологія людини і тварин (03.00.13.). Захист 07.02.2007 р. 20 с.
11. Effects of suckling on hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress in postpartum lactating women [Text] / M. Heinrichs, G. Meinschmidt, I. Neumann [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* — 2001. — Vol. 86, № 10. — P. 4798–4804.
12. Гайдаев, Ю. О. Дослідження демографічних процесів та проблем системи охорони здоров'я України [Текст] / Ю. О. Гайдаев // *Укр. Мед. Часопис.* — 2007. — Т. 61, № 5.
13. 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.
14. Пат. 31600 Україна, МПК А6G01N33/52. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині / А. В. Коцюрuba, Т. В. Семикопна, О. П. Вікторов, О. І. Мітченко, О. М. Буханевич, М. Н. Гула (UA); Український НДІ кардіології ім. М. Д. Стражеска № 98095152; Заяв. 30.09.1998; Опубл. 15.12.2000, Бюл. № 7, 2000 р. — 2 с.
15. Алейникова, Т. Л. Руководство к практическим занятиям по биохимии [Текст] / Т. Л. Алейникова, Г. В. Рубцова, Н. А. Павлова // М.: Медицина, 2000. — 128 с.
16. Возрастные особенности влияния ишемического прекодиционирования изолированного сердца крыс на метаболизм NO [Текст] / Т. А. Бадова, В. В. Безруков, Ю. П. Коркач [та ін.] // *Пробл. старения и долголетия.* — 2006. — Т. 15, № 4. — С. 291–300.
17. Amaral, A. The Expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm [Text] / A. Amaral // *Human. Reproduction.* — 2007. — Vol. 22, № 6. — P. 1585–1596.
18. Bode-Boger, S. M. The l-arginine paradox: Importance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio [Text] / S. M. Bode-Boger, F. Scalera, L. J. Ignarro // *Pharmacol. Ther.* — 2007. — Vol. 114, № 3. — P. 295–306.
19. Дмитренко, Н. П. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота [Электронный ресурс] / <http://uf.ua/lib/339/>
20. Генетика окислительного стресса [Текст] / Е. П. Гуськов, Т. П. Шкурат, Т. В. Вардуни [и др.] // Ростов н/Д.: СКНЦ ВЦ ЮФУ, 2009. — 156 с.
21. Гормональні зміни у дорослих щурів, що зазнали дії стресу та/або фіто естрогенів під час молочного вигодовування [Текст] / Н. О. Карпенко, О. В. Сомова, Є. М. Коренева [та ін.] // *Ендокринологія.* — 2011. — Т. 16, № 1. — С. 76–82.

РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ТА ПОРУШЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ В ДОРΟΣЛИХ САМЦІВ ЩУРІВ, ЩО ЗАЗНАЛИ ДІЇ М'ЯКОГО ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ В ПЕРІОД МОЛОЧНОГО ВИГОДОВУВАННЯ

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

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

Вивчено стан про- та антиоксидантного балансу та показники сперматогенезу у дорослих самців щурів, які зазнали довготривалої дії м'якого емоційного стресу в період молочного вигодовування. Виявлено, що даний вид стресу викликає імпринтінговий ефект та призводить у дорослих тварин до розвитку оксидативних порушень з 4-кратним збільшенням вмісту оксиду азоту та зниженням у 4 рази концентрації аргініну у сироватці крові. Наслідком цього є порушення функціонування репродуктивної системи, зокрема погіршення параметрів спермограми.

Ключові слова: самці щурів, період молочного вигодовування, емоційний стрес, оксид азоту, L-аргінін, спермограма.

РАЗВИТИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И НАРУШЕНИЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ МЯГКОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА В ПЕРИОД МОЛОЧНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ

Величко Н. Ф., Карпенко Н. О., Смоленко Н. П., Чистякова Э. Е., Коренева Е. М.

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

Изучено состояния про- и антиоксидантного баланса и показатели сперматогенеза у взрослых самцов крыс, подвергшихся длительному воздействию мягкого эмоционального стресса в период молочного вскармливания. Установлено, что данный вид стресса оказывает импринтинговый эффект и приводит у взрослых животных к развитию оксидативных нарушений с 4-кратным увеличением уровня оксида азота и снижением в 4 раза концентрации аргинина в сыворотке крови. Вследствие этого происходит нарушение функционирования репродуктивной системы, в частности ухудшение параметров спермограммы.

Ключевые слова: самцы крыс, период молочного вскармливания, эмоциональный стресс, оксид азота, L-аргинин, спермограмма.

DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS AND DAMAGE OF A SPERMATOGENESIS AT THE ADULT MALE RATS EXPOSED TO THE SOFT EMOTIONAL STRESS DURING SUCKLING

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

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

The state of pro- and antioxidative balance and index of spermatogenesis at adult male rats exposed to the soft emotional stress during suckling has been studied. It has been revealed that the soft emotional stress has imprinting effect and results in the oxidative disturbance with 4-fold increase of nitric oxide level and decrease in 4 times arginine concentration in serum of the adult animals. This disorder is associated with damages of the reproductive system function, in particular, the deterioration of spermogram.

Key words: male rats, suckling, emotional stress, nitric oxide, L-arginine, semen parameters.