

НАСЛІДКИ СТРЕСУВАННЯ ПІД ЧАС МОЛОЧНОГО ВИГОДОВУВАННЯ ДЛЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ ДОРΟΣЛИХ САМОК ЩУРІВ

Чистякова Е. Є., Карпенко Н. О., Сомова О. В.

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

На сьогодні доведена роль стресу як однієї з причин розладів чоловічої та жіночої репродуктивної функції, що негативно відображується на демографічній ситуації та генофонді. Крім потужних фізичних стресів значне місце посідають психоемоційні стреси низької та середньої інтенсивності, які у сучасному житті діють практично безперервно. Стрес-індукований гормональний дисбаланс в організмі жінки може мати особливе значення при вагітності через залежність та чутливість процесів статевої диференціації мозку (СДМ) нащадків до змін гормонального фону у цей період [1–3]. Порушення СДМ внаслідок пренатального стресування виявляються в дорослих самок-нащадків послабленням плодючості [4].

Критичним періодом є також час інтенсивної мієлінізації головного мозку, що за-

вершується утворенням зв'язків гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи. У людини ці події охоплюють сьомий місяць вагітності та перші місяці життя, у щурів — пізній пренатальний та ранній післянатальний періоди онтогенезу (22 доба вагітності — 20 доба життя) [5, 6]. Показано, що стрес самки, що годує, викликає відповідну реакцію й у її нащадків [7], навіть під час так званої «стрес-резистентності» (перші два тижні життя [8]), але спостереження про можливі наслідки таких втручань для репродуктивної функції нащадків суперечливі та не враховують продовження формування нервової системи ще й після періоду СДМ. Тому метою нашого дослідження було вивчення наслідків стресування під час молочного вигодовування для репродуктивної функції дорослих самок.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Роботу виконано на дорослих самках-щурках популяції Вістар, які були нащадками інтактних батьків та зазнали психоемоційного стресу в період молочного вигодовування. Для цього з 3 по 15 добу життя у першій половині дня впродовж 15 хв. матерів відсаджували від щурят, останніх поодиночки розміщували на чисту підстилку (група Стрес). Цей час щуриця-матір знахо-

дилась у клітці, з якої були видалені «незнайомі» статевозрілі самці. На 30 добу життя щурят розподіляли за статтю, спостерігали за динамікою маси тіла, зважуючи самок на 60, 90 та 120 доби життя. Репродуктивну функцію піддослідних самок вивчали в 6-місячному віці [9]. Досліджували фазову структуру та загальну тривалість естрального циклу протягом 16 днів. Фертильність

самок оцінювали після запліднення інтактними здоровими самцями. Першу добу вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у ранкових вагінальних мазках. На 20 добу вагітності самок знеживлювали шляхом швидкої декапітації, досліджували стан та масу органів (гіпофіз, тимус, надниркові залози, яєчники, матка, селезінка). В яєчниках підраховували кількість жовтих тіл вагітності, а в матці — кількість місць імплантації та плодів. Визначали рівень передімплантаційних, післяімплантаційних та загальних внутрішньоутробних втрат, розраховували індекси запліднення та вагітності. В крові з хвостової вени, зібраної у стадіях циклу метаеструс-діеструс та проеструс визначали рівні тестостерону (Т), естрадіолу (E_2), прогестерону (Δ_4P) та кортикостерону імуноферментним методом наборами Estradiol ELISA EIA-2693 (DRG, США),

СтероидИФА-тестостерон-01, Стероид-ИФА-прогестерон-01 (АлкорБио, Росія), Corticosteron Elisa EIA-3809 (DRG, США). Вимірювання проводили за допомогою імуноферментного аналізатора Stat FAX.

Щурів утримували при кімнатній температурі, природному освітленні та на рекомендованому для них харчовому раціоні. Результати порівнювали з показниками інтактних тварин (група Контроль), яких утримували в аналогічних умовах.

Дані представлені як середнє арифметичне (\bar{X}) та його похибка ($S_{\bar{X}}$). Статистичний аналіз проводився із застосуванням критерію t Ст'юдента [10]. В окремих випадках використовували двовибірковий F-тест для дисперсій. У таблицях ймовірність різниці між показниками проставлена для значень $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За динамікою маси тіла самки груп Стрес та Контроль статистично значуще не відрізнялися, усі мали естральний цикл. Його тривалість у самок групи Стрес була дещо більшою (на 4%; $P = 0,05$) за рахунок подовження міжтіткової фази (на 8%;

$P < 0,05$, табл. 1), що може відбуватися за рахунок пригнічення фолікулогенезу або пролонгації функції післяовуляторних жовтих тіл [11]. За іншими показниками, що характеризують фазову структуру циклу, різниці між групами не виявлено.

Т а б л и ц я 1

Тривалість та фазова структура естрального циклу самок, стресованих у період молочного вигодовування

Показник		Контроль		Стрес	
		n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Тривалість, доба	циклу	10	$4,3 \pm 0,1$	9	$4,5 \pm 0,4^{1)}$
	тітки	10	$2,0 \pm 0,1$	9	$2,0 \pm 0,1$
	міжтітки	10	$2,3 \pm 0,1$	9	$2,5 \pm 0,4^{1)}$
Тітка / міжтітка		10	$0,9 \pm 0,1$	9	$0,9 \pm 0,1$
Кількість естральних днів		10	$7,5 \pm 0,3$	9	$7,2 \pm 0,5$
Кількість анестральних днів		10	$8,5 \pm 0,3$	9	$8,8 \pm 0,5$

Примітка. ¹⁾ — статистично значущі відмінності від групи Контроль ($P \leq 0,05$).

Показники фертильності, вагітності та ембріонального розвитку плодів самок, стресованих у період вигодовування

Група		Контроль		Стрес	
Показник		n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Кількість (на самку)	жовті тіла	10	11,4 ± 0,7	9	11,4 ± 0,6
	місця імплантації	10	10,8 ± 0,6	9	9,0 ± 1,0
	плоди	10	10,6 ± 0,5	9	8,3 ± 1,2 ¹⁾
Внутрішньоутробні втрати, %	передімплантаційні	10	5,0 ± 1,4	9	21,5 ± 7,3 ¹⁾
	післяімплантаційні	10	1,6 ± 1,1	9	8,7 ± 4,0 ¹⁾
	загальні	10	6,5 ± 1,9	9	28,3 ± 7,9 ¹⁾
Маса плаценти, мг		10	486,0 ± 23,5	9	440,0 ± 21,3
Діаметр плаценти, мм		10	13,7 ± 0,4	9	12,8 ± 0,2 ¹⁾
Кількість плодів	самок	10	4,7 ± 0,7	9	3,4 ± 0,3 ¹⁾
	самців	10	5,9 ± 0,5	9	4,9 ± 1,1 ¹⁾
	загалом	10	10,2 ± 0,6	9	8,3 ± 1,2 ¹⁾
Самки /самці		10	0,9 ± 0,2	9	0,8 ± 0,2
Маса, г	самки	10	2,2 ± 0,1	9	2,1 ± 0,1
	самці	10	2,3 ± 0,1	8	2,2 ± 0,1 ¹⁾
Довжина, мм	самки	10	28,2 ± 1,0	9	26,9 ± 1,0
	самці	10	30,2 ± 1,0	8	27,3 ± 1,0 ¹⁾

Примітка. Як у табл. 1.

Усі самки груп Контроль та Стрес були рецептивними та фертильними (індекс запліднення складав 100%). Через 20 діб усі запліднені самки обох груп виявились вагітними. В яєчниках вагітних щурів групи Контроль кількість жовтих тіл та місць імплантацій не перевищувала такі в самок групи Стрес (табл. 2). Рівень внутрішньоутробних втрат у самок-нащадків, які зазнали стресу в період молочного вигодовування (група Стрес), зростав більш ніж у чотири рази ($P < 0,05$) порівняно з інтактними самками (група Контроль). Це відбувалося за рахунок збільшення як перед-, так і післяімплантаційних втрат. Тому кількість плодів у стресованих щурів (група Стрес) статистично значуще знижувалася (на 22%) порівняно з даними групи Контроль.

За показниками ембріонального розвитку (маса тіла та краніо-каудальний розмір)

плоди жіночої статі самок групи Стрес не відрізнялися від плодів тієї ж статі у самок групи Контроль. На відміну від цього маса тіла та краніо-каудальний розмір плодів чоловічої статі у групі Стрес були меншими — на 4% ($P = 0,05$) та на 10% ($P < 0,05$), відповідно (див. табл. 2). Середній діаметр плацент у вагітних самок групи Стрес зменшувався на 7% ($P < 0,05$) порівняно з таким у інтактних тварин (група Контроль) при незмінній їх масі. Відомо, що основна функція плаценти полягає у забезпеченні харчування, дихання та гормоноутворенні [12], отже, зменшення її діаметру може віддзеркалювати порушення її функціонування, що могло позначитись й на розвитку ембріонів.

Маса тіла вагітних самок групи Стрес була на 10% меншою ($P = 0,05$) за масу тіла самок групи Контроль (табл. 3). На цьо-

Маса тіла та відносна маса органів (мг/100 г маси тіла) вагітних самок, стресованих у період молочного вигодовування

Показник		Контроль		Стрес	
		n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Маса	тіло, г	10	283,2 ± 18,3	9	255,0 ± 11,8 ¹⁾
	яєчники, мг	10	30,90 ± 1,86	9	37,75 ± 2,32 ¹⁾
	матки, мг	10	1251,3 ± 47,2	9	1121,7 ± 93,4
	надниркові залози, мг	10	23,5 ± 1,5	9	22,3 ± 1,3
	селезінка, мг	10	304,7 ± 17,5	9	330,8 ± 31,0
	тимус, мг	10	94,8 ± 5,0	9	102,4 ± 6,0
	гіпофіз, мг	10	3,7 ± 0,2	9	4,1 ± 0,2 ¹⁾

П р и м і т к а. Як у табл. 1.

Рівень статевих гормонів щурів групи Стрес у різні фази естрального циклу

Показник	Контроль		Стрес	
	n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
Дієструс				
Прогестерон, нмоль/л	6	93,45 ± 8,17	6	65,40 ± 6,74 ¹⁾
Естрадіол, пмоль/л	6	67,90 ± 4,13	8	91,66 ± 16,87
Тестостерон, нмоль/л	10	1,63 ± 0,17	6	2,52 ± 0,33 ¹⁾
Тестостерон/естрадіол	11	34,0 ± 7,8	6	20,89 ± 4,89
Прогестерон/естрадіол	11	1440,8 ± 296,4	5	235,5 ± 35,2 ¹⁾
Проєструс				
Прогестерон, нмоль/л	9	38,16 ± 5,78 ²⁾	5	29,7 ± 4,3 ²⁾
Естрадіол, пмоль/л	6	172,39 ± 11,81 ²⁾	5	128,57 ± 10,58 ¹⁾
Тестостерон, нмоль/л	9	2,43 ± 0,29 ²⁾	5	3,25 ± 0,71
Тестостерон/естрадіол	6	17,1 ± 2,1	5	21,5 ± 6,5
Прогестерон/естрадіол	9	308,6 ± 48,6 ²⁾	5	235,5 ± 35,2 ²⁾

П р и м і т к а. ¹⁾ – статистично значущі відмінності від групи Контроль ($P \leq 0,05$); ²⁾ – статистично значуща різниця між стадіями естрального циклу ($P \leq 0,05$).

му тлі відносні показники маси яєчників та гіпофізу в самок групи Стрес збільшувалися на 22 та 12% ($P < 0,05$), відповідно, порівняно до таких в групі Контроль.

Отже, результати наших досліджень переконують у тому, що стресорні впливи у період раннього онтогенезу мають негативні наслідки для репродуктивної функції са-

мок щурів, що проявляється подовженим естральним циклом та відхиленнями у перебігу вагітності (порушення імплантації та виношування плодів, і, як наслідок, зростання внутрішньоутробних втрат). Можна припустити, що це є наслідком порушень центральної регуляції циклічних процесів у жіночій репродуктивній системі, бо відомо, що

будь-які зміни у формуванні мієлінових оболонок нейронів віддзеркаляться на електрофізіологічних процесах у мозку та функціональній активності ЦНС, яка є центральною ланкою регуляції статевих циклів. Підтвердженням цього стали результати визначення гормонів у самок у різні стадії естрального циклу (табл. 4). Перш за все, самки групи Стрес відрізнялися більшим вмістом Т, та нижчим — $\Delta_4\text{P}$ в дієструсі, а у проєструсі у цих тварин був нижчим рівень E_2 . Найважливішими ми вважаємо зміни рисунку гормональних коливань впродовж циклу. Можна бачити, що у інтактних самок (група Контроль) рівень E_2 зростав у проєструсі (порівняно з дієструсом у 2,5 рази), а $\Delta_4\text{P}$ — зменшувався у 2,4 рази, відповідно до чого зменшувалися і співвідношення $\Delta_4\text{P}/\text{E}_2$ та T/E_2 — у 4,7 та 2 рази, відповідно (табл. 4), що узгоджується з даними літератури [12]. У самок, що зазнали у дитинстві стрес (група Стрес), зростання концентрації E_2 становило лише 1,4 рази, тобто

преовуляторний пік естрогену згладжувалася, тому співвідношення $\Delta_4\text{P}/\text{E}_2$ у них знижувалось у 3,2 рази, а величина T/E_2 не відрізнялася від такої у стадії проєструс. Слід також відмітити, що рівень кортикостерону у цих самок був зменшеним на 11% — до $284,0 \pm 2,3$ проти $316,2 \pm 1,5$ нмоль/л у контролі ($p \pm 0,05$). Як показано в наших попередніх дослідженнях [14], відразу після припинення стресування на 23 добу життя рівень гормону у щурят жіночої статі був також вірогідно зменшеним, що узгоджується з даними літератури про наслідки застосованого впливу [14]. Тобто, знайдені відмінності у гормональному стані можуть бути підґрунтям зростання як подовження тривалості естрального циклу (більший рівень Т), так і зростання рівня внутрішньоутробних втрат внаслідок утворення яйцеклітин низької якості (сплощення піку E_2) та порушення імплантації (низький рівень $\Delta_4\text{P}$) [15].

ВИСНОВКИ

1. М'який психоемоційний стрес (відокремлення від матері у перші два тижні життя) у самок-нащадків проявляється зміненим гормональним патерном у різні стадії естрального циклу, наслідком чого є подовження його тривалості.
2. Водночас у самок порушується здатність до виношування плодів, про що свідчать зростання внутрішньоутробних втрат та ознаки пригнічення ембріонального розвитку плодів чоловічої статі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Эндокринология беременности [Текст] / С.И. Жук, А.Е. Шиндлер, Т.Ф. Татарчук, Т.Н. Демина // Мед. аспекты здоровья женщины. — 2010. — № 5-6 (33-34). — С. 17-24.
2. Резников А.Г. Эндокринологические аспекты стресса [Текст] / А.Г. Резников // Междунар. эндокринолог. журн. — 2007. — Т. 4, № 10. — С. 103-111.
3. Татарчук Т.Ф. Стресс и репродуктивная функция женщины [Текст] / Т.Ф. Татарчук // Междунар. эндокринолог. журн. — 2006. — № 3 (5). — С. 66-73.
4. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология [Текст] / А.Г. Резников, В.П. Пишак, Н.Д. Носенко [и др.] — Чернівці: Медакадемія, 2004. — 320 с.
5. Резников А.Г. Половые гормоны и дифференциация мозга [Текст] // А.Г. Резников. — К.: Наукова думка, 1982. — 252 с.
6. Сашков В.А. Роль нейростероидов мозга в его морфофункциональной организации и реализации процессов поведения, обучения и памяти в онтогенезе [Текст] / В.А. Сашков // Альманах Новые исследования. — 2009. — № 1. — С. 134-151.
7. Postnatal stress in mice: does "stressing" the mother have the same effect as «stressing» the pups? [Text] / A. Moles [et al.] // Dev. Psychobiol. — 2004. — Vol. 44, № 4. — P. 230-237.
8. Sexually dimorphic effects on maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain [Text] / L. Desbonnet [et al.] // Jnt. J. Dev. Neurosci. — 2008. — Vol. 26, № 3-4. — P. 259-268.

9. *Вишовець Т. Ф.* Експериментальне вивчення ембріотоксичної дії лікарських засобів. Доклінічні дослідження лікарських засобів [Текст]: метод. рекомендації / за ред. О.В. Стефанова. — К., 2001. — С. 115–138.
10. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. [Текст] / С.Н. Лапач, А.В. Губенко, П.Н. Бабич. — К.: МОРИОН, 2001. — 408 с.
11. Репродуктивная эндокринология [Текст]. В 2-х т. / под ред. С. С. К. Йена, Р. Б. Джаффе. — М.: Медицина, 1998.
12. Молекулярно-биологические аспекты имплантации у человека и животных [Текст] / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Егорова [и др.] // Пробл. репродукции. — 2002. — Т. 8, № 2. — С. 16–28.
13. *Розен В. Б.* Основы эндокринологии [Текст] // В.Б. Розен. — М.: Высшая школа, 1980. — 344 с.
14. Половые особенности последствий стресса в период вскармливания для сомато-полового развития потомков [Текст] / А.И. Гладкова, Е.В. Сомова, Э.Е. Чистякова [и др.] // Эндокринна патологія у віковому аспекті: наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 28–29 жовт. 2010. — Харків. — 2010. — С. 27–29.
15. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation [Text] / D. Suchecki, D. Y. Nelson, H. Van Oers, S. Levine // Psychoneuroendocrinology. — 1995. — Vol. 20. — P. 169–182.

НАСЛІДКИ СТРЕСУВАННЯ ПІД ЧАС МОЛОЧНОГО ВИГОДОВУВАННЯ ДЛЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ ДОРОСЛИХ САМОК ЩУРІВ

Чистякова Е. Є., Карпенко Н. О., Сомова О. В.

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

Для визначення наслідків дії стресу у критичний період фізіологічного молочного вигодовування досліджували репродуктивну функцію дорослих самок щурів, яких піддавали дії стресу відокремлення від матері з 3 по 15 добу життя. Встановлено, що такі умови призводять до змін гормонального фону у різні стадії естрального циклу (більш низький рівень прогестерону та високий — тестостерону в дієструсі, згладжений пік естрадіолу в проєструсі), наслідком чого є подовження тривалості естрального циклу за рахунок міжтичкової фази. Зростання внутрішньоутробних втрат та пригнічення ембріонального розвитку плодів чоловічої статі свідчить про продукування яйцеклітин низької якості та порушення процесів підтримки вагітності у стресованих самок.

К л ю ч о в і с л о в а: стрес відокремлення від матері, молочне вигодовування, естральний цикл, фертильність, гормони.

ПОСЛЕДСТВИЯ СТРЕССИРОВАНИЯ ВО ВРЕМЯ МОЛОЧНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ ДЛЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ВЗРОСЛЫХ САМОК КРЫС

Чистякова Э. Е., Карпенко Н. А., Сомова Е. В.

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

Для изучения последствий стрессирования в критический период физиологического молочного вскармливания исследовали репродуктивную функцию взрослых самок крыс, которых подвергали стрессу отделения от матери с 3 по 15 день жизни. Установлено, что такие условия приводят к изменению гормонального профиля в разные стадии эстрального цикла (более низкий уровень прогестерона и высокий — тестостерона в диэструсе, сглаженный пик эстрадиола в проэструсе), следствием чего является удлинение продолжительности эстрального цикла за счет межтечковой фазы. Увеличение внутриутробных потерь и угнетение эмбрионального развития плодов мужского пола свидетельствуют о продуцировании яйцеклеток низкого качества и нарушениях процессов поддержания беременности у стрессированных самок.

К л ю ч е в ы е с л о в а: стресс отделения от матери, молочное вскармливание, эстральный цикл, фертильность, гормоны.

CONSEQUENCES OF STRESS DURING SUCKLING FOR REPRODUCTIVE FUNCTION OF ADULT FEMALE RATS

E. Ye. Chistyakova, N. O. Karpenko, O. V. Somova

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

For the study of consequences of stress in a critical period of the physiological suckling the reproductive function of adult female rats exposed to mother separation stress from 3rd till 15th day has been examined. It was found that such conditions led to the change of hormonal profile in the different stages of estrus cycle (higher concentration of testosterone, lower progesterone content in diestrus and flattening of estradiol peak in proestrus), that resulted into the prolongation of estrus cycle in the main over the diestrus phase. The body mass decrease, ovaries mass increase and adrenal mass diminishing at pregnant females, increase of intrauterine losses and inhibition of male fetus embryonal development, specify about production of poor quality oocyte and disturbances of pregnancy maintenance at stressed rats.

Key words: mother separation stress, suckling, oestrus cycle, fertility, hormones.