

## БЛИЖАЙШИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЭСТРОГЕНИЗАЦИИ ДЛЯ СПЕРМАТОГЕННОЙ ФУНКЦИИ КРЫС

Гладкова А. И., Сидорова И. В.

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

Основным источником образования эстрогенов у самцов являются половые железы, в клетках которых происходит ароматизация тестостерона в эстрадиол. В настоящее время известно, что в мужском организме эстрадиол является не только продуктом инактивации андрогенов, но и выполняет ряд физиологических функций, таких как регуляция развития гамет, в частности на стадиях гоноцитов и сперматид, эпидидимального созревания спермиев [1]. Эстрадиол необходим для активации мужского полового поведения в пубертате [2], для опосредованной стимуляции действия ФСГ на клетки-мишени [3]. Положительные эффекты эстрогенов в мужском организме реализуются, однако, лишь при действии их физиологических концентраций. Гиперэстрогения у самцов, напротив, ведет к нарушению репродуктивных функций, что было подтверждено многочисленными клиническими и экспериментальными исследованиями [4–6]. Позже было установлено, что важное значение имеет не только абсолютный уровень эстрадиола в мужском организме, но и его соотношение с тестостероном, при изменении которого наблюдаются такие патологические процессы, как гинекомастия, нарушения сперматогенеза и полового поведения [7–9].

Несмотря на многочисленность исследо-

ваний и кажущуюся изученность проблемы, остается нерешенным вопрос о продолжительности сохранения вызванных эстрогенизацией отклонений, без чего затруднен прогноз восстановления нарушенных функций. Решение этого вопроса может иметь практическое значение, поскольку и сегодня в клинической практике эстрогены используют у мужчин для лечения опухолей предстательной железы, идиопатического остеопороза, некоторых сердечно-сосудистых заболеваний [10, 11]. Имеются даже данные литературы [12] о том, что эстрогенные лекарственные препараты более эффективно связываются эстрогеновыми рецепторами  $\alpha$ , по сравнению с рецепторами  $\beta$ , активными связывающими эндогенный эстрадиол, в частности, на клетках сперматогенного эпителия [1].

Таким образом, терапевтическое использование эстрогенов у мужчин обосновывает актуальность изучения динамики последствий эстрогенизации для репродуктивной функции, в частности сперматогенеза как ее основной мишени.

Целью нашего исследования было изучение в эксперименте влияния эстрогенизации на разные этапы сперматогенеза и установление периода восстановления количественных и качественных параметров спермограммы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на молодых половозрелых (3–4-месячных) самцах крыс популяции Вистар, которым ежедневно на протяжении 7 дней внутримышечно вводился эстрадиола дипропионат (Е<sub>2</sub>ДП) в разовой дозе 50 мкг на 100 г массы тела.

Исследования проведены с соблюдением «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Украина, 2001).

Забой крыс с последующим изучением параметров спермограммы осуществляли в разные сроки после прекращения 7-дневного введения Е<sub>2</sub>ДП, исходя из имеющихся сведений о продолжительности всего процесса сперматогенеза (от сперматогоний до сперматозоидов) и отдельных его этапов у крыс [13].

В качестве контроля использованы интактные самцы, сопоставимые с подопытными по возрасту и массе тела (200–300 г).

При забое у контрольных и подопытных животных исследовался ряд показателей состояния репродуктивной функции, таких как масса андрогензависимых органов, содержание фруктозы в семенных пузырьках [14]. Иммуноферментным методом определяли содержание половых гормонов в сыворотке крови. В суспензии, полученной при дозированном отмывании в физиологическом растворе продольно разрезанного эпидидимиса, определяли концентрацию сперматозоидов, процент подвижных и морфологически аномальных клеток [15].

Статистический анализ предполагал проверку нормальности распределения данных с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение между группами проведено с помощью t критерия Стьюдента, различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эстрогенизация самцов негативным образом отразилась практически на всех изученных показателях. Степень проявления полученных изменений зависела от срока, прошедшего после введения Е<sub>2</sub>ДП.

Через 14 дней после эстрогенизации обнаружено значительное снижение массы семенных пузырьков, эпидидимисов и предстательной железы (табл. 1). Снижение массы андрогензависимых органов на фоне достоверного повышения массы гипофиза косвенным образом свидетельствовало об угнетении тестикулярного андрогенопоэза.

Выполненные нами гормональные исследования действительно обнаружили падение уровня тестостерона у эстрогенизированных самцов. Через две недели после окончания введения Е<sub>2</sub>ДП концентрация тестостерона в крови составляла  $14,01 \pm 1,81$  против  $27,18 \pm 1,59$  нмоль/л у интактных животных ( $p < 0,001$ ). Уровень эстрадиола в крови был повышен ( $0,28 \pm 0,01$  против  $0,18 \pm 0,05$  нмоль/л), а затем снижался до контрольных значений. Такой же подавляющий эффект экзогенного эстрадиола на

уровень тестостерона у самцов крыс ранее наблюдали и другие исследователи [5], которые объясняли его уменьшением количества ЛГ/ХГЧ-рецепторов в тестикулярных тканях.

Через 47 суток после эстрогенизации ее негативный эффект на массу андрогензависимых органов был уже не таким значительным (см. табл. 1). К норме возвращалась масса гипофиза и семенных пузырьков, в то же время масса эпидидимисов и простаты оставалась пониженной.

Обращает на себя внимание, что наибольшее угнетающее влияние эстрогенизация оказывала на массу семенных пузырьков и предстательной железы, органов, своей секреторной активностью обеспечивающих жизнедеятельность эякулированных половых клеток. Так, снижение массы семенных пузырьков привело к тому, что в пересчете на всю массу органа содержание фруктозы, являющейся энергетическим субстратом для подвижности сперматозоидов, через 14 дней после эстрогенизации упало до  $135,20 \pm 32,28$  мкг против

Относительная масса органов репродуктивной системы крыс в разные сроки после эстрогенизации

Группа	Стат. показатель	Масса тела, г	Масса органов, мг / 100 г массы тела				
			семенники	семенные пузырьки	эпидидимис	простата	гипофиз
1. Интактный контроль (n = 13)	$\bar{X}$ $S_{\bar{X}}$	236,15 5,42	1220,00 50,00	514,92 30,27	362,62 9,80	205,54 13,94	3,16 0,11
2. E <sub>2</sub> ДП, 14 суток после отмены (n = 5)	$\bar{X}$ $S_{\bar{X}}$ p <sub>1-2</sub>	201,00 13,65 < 0,05	1160,0 130,00 > 0,1	219,40 77,28 < 0,01	256,50 40,88 < 0,05	95,60 24,99 < 0,002	6,10 0,46 < 0,001
3. E <sub>2</sub> ДП, 47 суток после отмены (n = 5)	$\bar{X}$ $S_{\bar{X}}$ p <sub>1-3</sub>	263,00 54,45 > 0,1	879,00 136,08 < 0,05	407,40 56,28 > 0,1	204,00 12,39 < 0,01	151,40 22,68 < 0,05	3,96 0,23 > 0,1

412,15 ± 26,06 мкг в контроле (p < 0,001). К 47 суткам, вместе с восстановлением массы семенных пузырьков, содержание в них фруктозы (473,60 ± 53,13 мкг) вернулось к норме.

Качество процесса сперматогенеза наиболее точно отражают такие показатели, как концентрация сперматозоидов в эякуляте, их подвижность и количество морфологически аномальных (патологических) форм. Поскольку у мелких лабораторных животных получение нативной спермы технически затруднительно, у них применяют методику вымывания сперматозоидов из эпидидимиса в среде дозированного количества физиологического раствора. При помощи такой методики мы получили из придатка семенника интактных крыс суспензию, содержащую в среднем 47,62 млн. сперматозоидов в 1 мл раствора, 74 % которых обладали подвижностью. Аномалии морфологического строения, в основном в виде изгиба шейки, деформации головки и хвостовой части, обнаружены у 38 % сперматозоидов. Жизнеспособность (подвижность в среде физиологического раствора) половые клетки интактных самцов сохраняли в течение 268 минут.

Как известно, продолжительность про-

цесса сперматогенеза (серии цитологических преобразований, приводящих к образованию способных к автономному существованию сперматозоидов) является величиной постоянной и видоспецифичной. У крыс между началом развития определенной популяции сперматогониев (клеток начального этапа сперматогенеза) и их выходом в придаток семенника в виде сформированных сперматозоидов проходит 48 суток [13]. В течение последующих 8 суток крысиные сперматозоиды проходят созревание в эпидидимисе, приобретая подвижность. Из данных о продолжительности отдельных этапов сперматогенеза у крыс [13] следует, что в нашем эксперименте через 14 суток после 7-дневного введения E<sub>2</sub>ДП в придаток семенника уже поступили сперматозоиды, которые в период эстрогенизации самца проходили последний этап сперматогенеза — стадию сперматид. Показатели спермограммы этих животных (группа 2) представлены в таблице 2.

В этот период исследования нами обнаружено значительное ухудшение качества спермограммы по сравнению с интактным контролем: почти семикратное снижение концентрации сперматозоидов, уменьшение на 19% количества подвижных клеток на

## Спермограмма крыс в разные сроки после эстрогенизации

Группа	Стат. показ.	Концентрация сперматозоидов, млн/мл	Подвижность, %	Патологические формы, %	Жизнеспособность, мин
1. Интактный контроль	$\bar{X}$ $S_{\bar{X}}$	47,62 4,47	74,38 1,20	38,15 3,18	268 9,03
2. Е <sub>2</sub> ДП, 14 суток после отмены (n = 5)	$\bar{X}$ $S_{\bar{X}}$ p <sub>1-2</sub>	7,80 3,57 < 0,001	55,80 6,16 < 0,01	64,60 4,20 < 0,001	213 44,80 > 0,1
3. Е <sub>2</sub> ДП, 47 суток после отмены (n = 5)	$\bar{X}$ $S_{\bar{X}}$ p <sub>1-3</sub>	4,40 0,63 < 0,001	49,40 6,93 < 0,02	80,40 2,31 < 0,001	124 14,60 < 0,001
4. Е <sub>2</sub> ДП, 71 сутки после отмены (n = 6)	$\bar{X}$ $S_{\bar{X}}$ p <sub>1-4</sub>	38,22 3,16 > 0,1	68,42 4,29 > 0,1	49,18 4,06 < 0,1	

фоне увеличения количества патологических форм. Только жизнеспособность половых клеток у животных этой группы осталась на уровне интактного контроля.

Через 47 суток после 7-дневного введения Е<sub>2</sub>ДП в придатке семенника содержались сперматозоиды, которые в период эстрогенизации самца проходили самый начальный этап своего развития — стадию сперматогоний. Негативные последствия эстрогенизации для показателей спермограммы в этот период исследования (табл. 2, группа 3) оказались еще более выраженными. По сравнению с интактным контролем концентрация сперматозоидов претерпела десятикратное снижение, количество подвижных клеток уменьшалось на 25 %, а количество патологических форм возрастало вдвое при значительной потере жизнеспособности.

Поскольку, как видно из представленных в таблице 2 данных (группы 2 и 3), после 7-дневной эстрогенизации изменения в спермограмме наблюдались в течение всего цикла сперматогенеза, период наблюдения нами был продлен до 71 дня (группа 4). Сперматозоиды, поступившие к этому сроку в придаток семенника, характеризуются тем, что они являются продуктом уже новой волны сперматогенеза, непосредственно

не подвергшейся влиянию эстрогенизации. У животных этой группы обнаружена практически полная нормализация показателей спермограммы: концентрация сперматозоидов, количество подвижных и патологических форм достоверно не отличались от интактного контроля.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что даже не очень длительное по времени (7 дней) введение эстрадиола самцам вызывает выраженные изменения репродуктивной функции. Превышение физиологического уровня эстрадиола в крови сопровождается падением уровня тестостерона, снижением массы андрогензависимых органов и угнетением их секреторной активности, в частности снижением содержания фруктозы в семенных пузырьках. Эти нарушения сопровождаются негативными изменениями количественных (концентрация) и качественных (подвижность и морфологические аномалии) показателей активности сперматогенеза.

Как показано ранее, угнетающее действие эстрадиола на спермато- и стероидогенез может быть как прямым (путем уменьшения количества ЛГ/ХГЧ-рецепторов в тестикулярной ткани и блокады действия ФСГ) [5], так и опосредованным (че-

рез подавление активности гипоталамо-гипофизарной системы) [16]. Кроме того, экзогенный эстрадиол может индуцировать явление окислительного стресса в клетках семенников, вызывая, тем самым, апоптоз герминативных клеток [17], что проявляется снижением концентрации сперматозоидов в эякуляте.

Показатели спермограммы, полученные нами в разные сроки после введения эстрадиола (см. табл. 2), свидетельствуют о большей чувствительности сперматогоний, по сравнению с клетками поздних этапов сперматогенеза, к действию гиперэстрогении. Также обращает внимание длитель-

ность сохранения отклонений показателей спермограммы после введения эстрадиола. По крайней мере, на протяжении полного цикла сперматогенез остается неполноценным как в количественном, так и в качественном отношении. С другой стороны, изучение показателей спермограммы в новом цикле сперматогенеза, через 71 день после введения эстрадиола, показало их возвращение к норме, на основании чего можно заключить, что негативные последствия эстрогенизации для сперматогенеза, по крайней мере в условиях нашего эксперимента, являются обратимыми.

## ВЫВОДЫ

1. Введение эстрадиола самцам крыс приводит к угнетению инкреторной и генеративной функции семенников, проявляющемуся падением концентрации тестостерона в крови, снижением массы андрогензависимых органов, негативными изменениями количественных и качественных показателей сперматогенеза.

2. Сперматогонии более чувствительны к негативному действию гиперэстрогении по сравнению с клетками поздних этапов сперматогенеза.

3. Негативные последствия эстрогенизации самца для сперматогенной функции являются обратимыми.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Carreau S. Estrogens and male reproduction [Text] // *Folia Histochem. Cytobiol.* — 2000. — Vol. 38, № 2 — P. 47–52.
2. Temple J. L. Lack of functional estrogen receptors beta gene disrupts pubertal male sexual behavior [Text] / J. L. Temple, E. M. Scordalakes, C. Bado // *Horm. Behav.* — 2003. — Vol. 44, № 5 — P. 427–434.
3. MacCalman C. D. Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-Cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells [Text] / C. D. MacCalman, S. Getsion, R. Farookhi // *Endocrinology.* — 1999. — Vol. 138, № 1 — P. 41–48.
4. Bisvas N. M. Effect of corticosterone on serum concentrations of  $\alpha$ 24-globulin and on spermatogenesis in oestrogen-treated rats [Text] / N. M. Bisvas, R. K. Ghosh, O. W. Neuhaus // *J. Endocrinol.* — 1982. — Vol. 92, № 2 — P. 309–314.
5. Rao M. V. Effects of estradiol benzoate on rat testis and adrenals [Text] / M. V. Rao., N. J. Chinoy // *Exp. and Clin. Endocrinol.* — 1986. — Vol. 88, № 2 — P. 181–184.
6. Kalla N. R. Demonstration of direct effect of estrogen on rat spermatogenesis [Text] // *Acta Eur. Fert.* — 1987. — Vol. 18, № 4. — P. 293–302.
7. Ruitz S. Serum concentration of estradiol and testosterone in patients with oligoasthenozoospermia and asthenozoospermia [Text] / S. Ruitz, M. Gordillo, T. Lili // *Ginecol. Obstet. Mex.* — 1991. — Vol. 59. — P. 313–315.

8. Itoh N. Studies on the production rate of estradiol in the testis in male infertiling [Text] / N. Itoh, J. Kumamoto, H. Maruta // *Nippon. Naibunpi Uakkai Zasshi.* — 1992. — Vol. 68, № 12. — P. 1276–1293.
9. Бондаренко В. А. Андроген-эстрогенные отношения у молодых мужчин при идиопатических патоспермиях [Текст] / В. А. Бондаренко, А. С. Минухин, В. А. Кожемяка // Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті. — Науково-практична конференція. — Харків, 2009. — С. 129–130.
10. Komessaroff P. A. Low-dose estrogen supplementation improves vascular function in hypogonadal men [Text] / P. A. Komessaroff, M. Fullerton, M. D. Esler // *Hypertension.* — 2001. — Vol. 38, № 5. — P. 1011–1016.
11. Bone turnover markers and sex hormones in men with idiopathic osteoporoses [Text] / P. Pietschmann, S. Kudlachek, J. Grisar [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 31, № 5. — P. 444–451.
12. Mosselman S. ER $\beta$ : Identification and characterization of a novel human estrogenreceptor [Text] / S. Mosselman, J. Polman, R. Dijkema // *FEBS Lett.* — 1996. — Vol. 392, № 1. — P. 49–53.
13. Райцина С. С. Цикл сперматогенного эпителия и кинетика сперматогенеза у млекопитающих [Текст] / Н. С. Бурнашева, С. А. Габаева, Л. В. Данилова и др. // Современные проблемы сперматогенеза. — М., 1982. — С. 73–107.
14. Бокуняева Н. И. Выделения половых органов

[Текст] // Справочник по клиническим лабораторным методам / под ред. Е. А. Кост. — М.: Медицина, 1975. — С. 331–340.

15. Саноцкий И. Ф. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм [Текст] / И. Ф. Саноцкий, В. М. Фоменко — М.: Медицина, 1979. — 232 с.

16. The importance of oestrogens in males [Text] / W. de Ronde, H. A. Pols, J. van Leewen, F. H. de Yong // Clin. Endocrinol. — 2003. — Vol. 58, № 5. — P. 529–542.

17. Estradiol treatment induces testicular oxidative stress and germ cell apoptosis in rats [Text] / S. P. Chaki, M. M. Misro, D. K. Gautam [et al.] // Apoptosis. — 2006. — Vol. 11, № 8. — P. 1427–1437.

## НАЙБЛИЖЧІ ТА ВІДДІЛЕНІ НАСЛІДКИ ЕТРОГЕНІЗАЦІЇ ДЛЯ СПЕРМАТОГЕННОЇ ФУНКЦІЇ ЩУРІВ

Гладкова А. І., Сидорова І. В.

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

Уведення естрадіолу самцям щурів пригнічує інкреторну та генеративну функцію сім'яників, що виявляється падінням концентрації тестостерону в крові, зниженням маси андрогензалежних органів, негативними змінами кількісних та якісних показників сперматогенезу. Сперматогонії більш чутливі до негативного впливу гіперестрогенії у порівнянні з клітинами пізніх етапів сперматогенезу. Відновлення показників спермограми у новому циклі сперматогенезу свідчить про зворотність негативних наслідків гіперестрогенії.

К л ю ч о в і с л о в а: самці, гіперестрогенія, сперматогенез.

## БЛИЖАЙШИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЭСТРОГЕНИЗАЦИИ ДЛЯ СПЕРМАТОГЕННОЙ ФУНКЦИИ КРЫС

Гладкова А. И., Сидорова И. В.

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

Введение эстрадиола самцам крыс угнетает инкреторную и генеративную функцию семенников, что проявляется падением концентрации тестостерона в крови, снижением массы андрогензависимых органов, негативными изменениями количественных и качественных показателей сперматогенеза. Сперматогонии более чувствительны к негативному действию гиперэстрогении по сравнению с клетками поздних этапов сперматогенеза. Возвращение к норме показателей спермограммы в новом цикле сперматогенеза указывает на обратимость негативных последствий гиперэстрогении.

К л ю ч е в ы е с л о в а: самцы, гиперэстрогения, сперматогенез.

## THE NEAREST AND REMOTE CONSEQUENCES OF ESTROGENIZATION FOR RATS SPERMATOGENESIS

Gladkova A. I., Sidorova I. V.

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

The estradiol application to male rats leads to suppression of the testis incretory and generative function, showing by decreases of testosterone concentration in blood, negative changes of quantitative and quality indexes of spermatogenesis. Spermatogones are more sensitive to negative action of estrogenization in comparison with cells of serotinal stages of spermatogenesis. Returning to norm of spermogram indexes in a new cycle of a spermatogenesis specifies in convertibility of estrogenization negative consequences.

K e y w o r d s: male rats, estrogenization, spermatogenesis.