

DOI 10.29254/2077-4214-2023-4-171-90-98

UDC 612.63.2:159.944.2:612.61

¹Gevorkyan A. R., ¹Bondarenko T. V., ^{1,2}Volokhov I. V., ²Laryanovska Yu. B.,

¹Sergienko L. Yu., ¹Misiura K. V.

INFLUENCE OF SOCIAL-EMOTIONAL STRESS OF PREGNANT WOMEN ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF ADULT MALE DESCENDANTS

¹State Institution "V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine" (Kharkiv, Ukraine)

²National University of Pharmacy (Kharkiv, Ukraine)

ipep_pathohistology@ukr.net

The decline in the population's reproductive potential is an urgent medical problem. The results of experimental and clinical studies indicate that one of the factors contributing to the development of pathologies of the reproductive system is a violation of the conditions of intrauterine development, namely the mother's socio-emotional stress during pregnancy. Under the influence of maternal stress, genetically programmed processes of individual development are modified in the fetus, which can contribute to changes in sexual differentiation of the brain, disruption of the coordinated functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal system and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, as well as a decrease in the hormone-producing activity of the gonads in adult offspring. This study aims to determine the morphological and functional features of the reproductive system of adult male offspring born from stressed mothers during the entire pregnancy. The study was conducted on 22 male offspring of 10-month-old non-linear rats obtained from intact mothers and mothers exposed to socio-emotional stress during pregnancy. The histological structure of the testes was investigated, the levels of sex hormones were determined, and the fertility of 10-month-old male offspring from intact and gestationally stressed females was studied. It was found that prenatally stressed males at the age of 10 months have long-term effects on the reproductive system, which are reflected in: a decrease in the number of tubules with mature spermatozoa, a decrease in activated Leydig cells, a decrease in the number of motile spermatozoa, an increase in the percentage of pathological forms, which together contribute to a decrease in fertility. Violation of the conditions of intrauterine development of offspring caused by socio-emotional stress of mothers during pregnancy leads to destructive changes in the histological structure of the testes, a decrease in spermatogenic function and fertility, which creates prerequisites for a reduction of reproductive capacity in adulthood.

Key words: socio-emotional stress of pregnant women, reproductive system of male offspring, morphological structure of the testes, sex hormones, male fertility.

Connection of the publication with planned research works.

This work is a fragment of the research work "Investigation of the influence of female stress during pregnancy on the premature development of involutional processes in the reproductive system of offspring and the creation of innovative approaches to their inhibition (experimental study)", state registration number 0120U103482.

Introduction.

The decline in the population's reproductive potential is an urgent problem of modern medicine. The results of experimental and clinical studies indicate that one of the factors contributing to the development of pathologies of the reproductive system is a violation of the conditions of intrauterine development, namely the mother's socio-emotional stress during pregnancy [1]. Given the high-stress reactivity of the female body [2], it can be assumed that it is socio-emotional stress, as a type of psycho-emotional stress, that has the most negative impact on both the pregnant woman and her fetus [3]. The period of pregnancy is characterised by instability of functional relations in the neuroendocrine system, which can not only complicate the course of pregnancy but also affect the development of the fetus,

causing suppression of the functional activity of various systems, as well as structural changes in organs and tissues, manifested by the development of pathologies in offspring at any stage of postnatal life [3]. The hypothesis linking changes in the external/internal environment of the fetus to the onset of childhood diseases, both immediately after birth and in adulthood, is called the theory of "prenatal programming of adult chronic diseases" [4, 5].

Stress during pregnancy contributes to an increase in the concentration of glucocorticoids in the mother's body, which leads to a weakening of the protective function of the fetoplacental barrier and an increase in the level of glucocorticoids in the fetus, which activates catabolic processes in its tissues [6, 7]. Prenatal stress leads to delayed fetal development, which can be a risk factor for cardiovascular, metabolic, neuropsychiatric and neuroendocrine diseases, as well as changes in reproductive potential in adulthood [7, 8, 9].

Under the influence of pregnant women's stress, genetically programmed processes of individual development in the fetus are modified, which can contribute to changes in sexual differentiation of the brain, disruption of the coordinated functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal system and the hypothalamic-pituitary-

gonadal axis, as well as a decrease in the hormone-producing activity of the gonads in adult offspring [10, 11].

It has been established that in the early stages of gestation, socio-emotional stress leads to an increase in the incidence of fetal loss in pregnant women and a decrease in gonadotropic function and fertility in their male offspring [11]. In later stages, it can contribute to delayed intrauterine development, which is a risk factor for developing various diseases in adulthood [3]. Stress in the second trimester of pregnancy is manifested in offspring by disorders of somato-sexual development and reproductive system functioning, as well as a decrease in libido [11].

Unlike other functional systems, the reproductive system develops and reaches functional maturity at a time quite distant from birth. The duration of the reproductive system's full functioning is also limited, so there is a need to study aspects of preventing and delaying the initial processes of its decline, which also plays a role in the ageing of the whole organism. At the same time, it should be noted that the pregnancy period is a rather long process, and the literature has limited data on what changes in the reproductive system of offspring are observed when socio-emotional stress accompanies the entire pregnancy, which is typical for our society.

The aim of the study.

To evaluate the peculiarities of the morphological and functional state of the reproductive system of male offspring born from stressed mothers during the entire pregnancy.

Object and research methods.

The study was conducted following the National "General Ethical Principles for Animal Experiments" (Ukraine, 2001), which are consistent with the provisions of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985) [12] and the "Regulations on the Ethics (Bioethics) Committee", 2012 [13]. Animals were kept in standard vivarium conditions, on a recommended diet with free access to drinking water [14].

The study was conducted on 10-month-old nonlinear rats, namely on 22 first-generation male offspring obtained from intact females (GIM) and females stressed during pregnancy (GSM).

Females 6 months of age (n=22) with a normal oestrous cycle, which was established by cytological evaluation of vaginal smears, and males seven months of age (n=22) were involved in mating. Mating was performed on a one-male, one-female basis. The day when spermatozoa were found in the vaginal smear was considered the first day of pregnancy [15]. From that time, the social and emotional stress was reproduced in the females of the experimental group. Pregnancy in the control group of rats occurred without any peculiarities under appropriate conditions.

Maternal socio-emotional stress (n=11) was modelled from day 1 to day 20 of pregnancy by changing the group of pregnant females daily, in which the female of the experimental group stayed for 6 hours during the daytime. The next day, the pregnant female was transferred to another rat community. The procedure of changing the environment was repeated throughout the pregnancy, each time changing the community representatives [16]. The birth resulted in offspring of intact

and experimental animals. One female was randomly selected from each offspring [17].

All offspring were raised to 10 months of age for further study of their reproductive system. The offspring were divided into two groups: a control group (from intact mothers – n=11) and an experimental group (from mothers who experienced stress during pregnancy – n=11). The offspring were weighed and euthanised in accordance with the rules of euthanasia.

The study of the concentration of sex hormones in the blood serum was performed by enzyme-linked immunosorbent assay using standard ELISA kits on a Stat-Fax 2100 enzyme-linked immunosorbent photometric analyser (USA).

For histological studies, the testes were removed from all animals, fixed in a 10% neutral formalin solution, dehydrated in alcohols, embedded in paraffin, and then sections were made 4-5 μm thick [18]. The microsections were stained with hematoxylin-eosin and examined using a Primo Star light microscope (Carl Zeiss, Germany) with a built-in Canon G 10 camera.

In rats, the functional state of spermatozoa was also assessed by their concentration, motility, and the number of pathological forms [19].

Statistical data analysis was performed using the statistical software package Excel 2010 and Statistica 10.0. For intergroup comparison, according to the nature of the distribution of the data obtained, the Mann-Whitney U test was used. The results are presented in the form Me [Q_1 - Q_3], where Me is the median, Q_1 is the first quartile, and Q_3 is the third quartile. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ [20].

Research results and their discussion.

To determine the presence of changes in the reproductive system of prenatally stressed offspring that reached ten months of age, the morphological structure of the testes and the state of epididymal sperm were studied, and the levels of sex hormones in the blood serum of intact and experimental animals were determined.

The study of the histological structure of the testes of 10-month-old GIM revealed typical features inherent in animals of this species and age, namely, the lobules of the organ are filled with concentric or flattened profiles

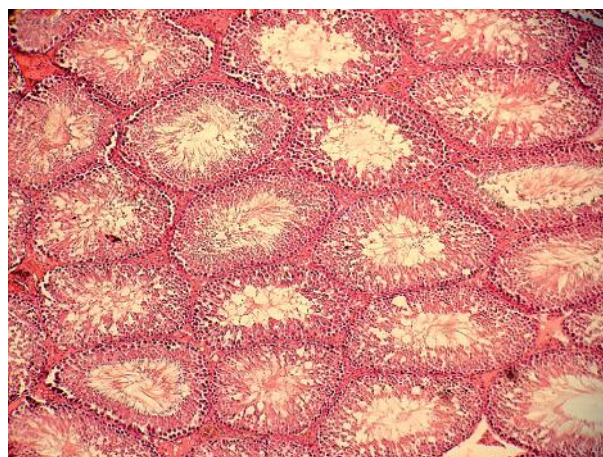


Figure 1 – The testis of a mature male rat offspring of an intact mother. The seminiferous tubules are tightly adjacent to each other and are normal in size. The ribbon of spermatogenic epithelium in the tubules reaches 4-5 rows of cells. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: $\times 100$.

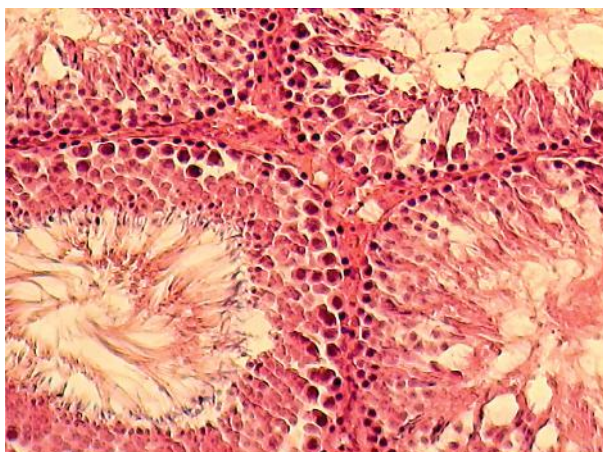


Figure 2 – Testis of a mature male rat offspring of an intact mother. Both spermatogenesis and spermiogenesis are clearly visible in the tubules. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x400.



Figure 3 – The testis of a male offspring of a rat stressed during the entire period of gestation. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x100.

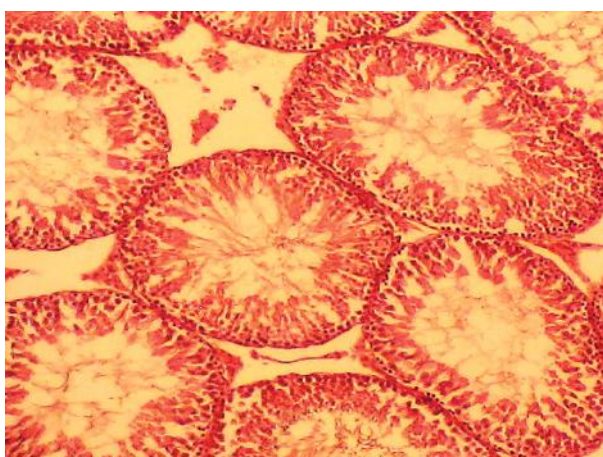


Figure 4 – The testis of a male offspring of a rat stressed during the entire period of gestation. Visual reduction in the number of tubules with mature spermatozoa. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

of sections of convoluted seminiferous tubules, which were quite tightly adjacent to each other (fig. 1).

The size of the tubules, their own membrane, protein and vascular membranes of the organ are normal. In the tubules, 3-4 generations of spermatogenic cells at different stages of development were observed. The cells are arranged in concentric layers in an orderly pattern in accordance with the stages of the spermatogenic

cycle. Quite numerous Sertoli cells are seen near the tubular lining. In all rats, not only spermatogenesis but also spermiogenesis can be clearly seen in the tubules (fig. 2).

In the gaps between the tubules in the connective tissue, more often around the blood vessels, Leydig cells were grouped with a rounded polygonal shape. A significant proportion of them were activated, as evidenced by the presence of large rounded normochromic nuclei and a larger cytoplasmic volume. Low-activity elements with small nuclei and small cytoplasmic volume were observed. Both functionally active and inactive elements were present in the intertubular locus among Leydig cells.

In 10-month-old GSMs, the histological structure of the testes has the following features. The spermatogenic epithelium ribbon is wide and contains germ cells of different stages of development. There are no changes in the association of germ cells of different levels of differentiation in the tubules. Sertoli cells are visually unchanged (fig. 3).

At the same time, there was a decrease in the number of tubules containing mature germ cells – spermatozoa (fig. 4). Also, most of the nuclei were smaller in the islets of hormone-producing Leydig cells. They had less chromatin expression than in control animals, which may indicate a certain decrease in their secretory activity. There was an increase in functionally inactive cells among activated Leydig cells.

Thus, based on the above, it can be concluded that prenatal stress leads to some morphological changes in the testes in mature animals, which are manifested by a decrease in the number of tubules with mature forms of germ cells (spermatozoa) and activated forms of hormone-producing cells (Leydig cells).

The next stage of our work was the study of the concentration of sex hormones in intact and experimental animals, presented in table 1.

As can be seen from table 1, there are no statistically significant differences in sex hormone levels in the GSM group compared to the GIM group, although the testosterone concentration and testosterone to estradiol ratio are slightly higher by 15.89% and 30.04%, respectively, compared to GIM.

The morphological and hormonal studies were supplemented by a fragment on the assessment of male fertility (table 2).

The data analysis in table 2 shows that prenatally stressed animals had a statistically significantly lower body weight by 16.07% and absolute testicular weight by 13.94% ($p < 0.05$) compared to the control.

Spermatogenesis is one of the most dynamic processes in the human body and the most sensitive to the effects of damaging factors.

The study of epididymal spermatozoa in 10-month-old offspring showed that in the GSM group, compared with the GIM group, the number of motile spermatozoa was significantly lower by 14.04%, and the level of pathological forms was almost 1.5 times higher, indicating a violation of spermatogenic function in GSM.

Male offspring of 10-month-old stressed mothers show decreased fertilisation ability when mating with intact females. In the GSM group, compared to the GIM, a reduction of the number of inseminated and pregnant females was recorded: the fertilisation index and preg-

nancy index were lower by 26.66% and 25.71%, respectively.

Thus, according to the results of the above studies, it was found that in male GSM at the age of 10 months, there are long-term effects of pre-natal stress on the reproductive system, which are reflected in: a decrease in the number of tubules with mature spermatozoa, a decrease in activated Leydig cells, a reduction of the number of motile spermatozoa, an increase in the percentage of pathological forms, which together contribute to a decrease in fertility.

Conclusions.

Violation of the conditions of intrauterine development of offspring caused by socio-emotional stress of mothers during pregnancy leads to destructive changes in the histological structure of the testes, a decrease in spermatogenic function and fertility, which constitutes prerequisites for a reduction of reproductive capacity in adulthood.

Prospects for further research.

The results obtained indicate the expediency of further studying the long-term effects of pre-natal stress on the functioning of the reproductive system, as well as the need to find pharmaceutical agents that would minimise the negative impact of socio-emotional stress of pregnant women on the organs and systems of the mother and fetus, and help reduce the risk of reproductive disorders in the adult body.

Table 1 – Sex hormone concentrations in male offspring of intact and gestationally stressed females

Indicator	Statistics	Animal group (n=11)	
		offspring of intact mothers	offspring of stressed mothers
Progesterone, nmol/l	Me [Q ₁ -Q ₃]	3,00 [2,82-3,12]	3,13 [2,96-3,27]
Estradiol, nmol/l	Me [Q ₁ -Q ₃]	0,19 [0,17-0,20]	0,18 [0,17-0,19]
Testosterone, nmol/l	Me [Q ₁ -Q ₃]	18,06 [16,90-20,58]	20,93 [17,89-24,42]
Testosterone/estradiol ratio, c. u.	Me [Q ₁ -Q ₃]	87,87 [86,95-124,64]	114,27 [95,22-142,56]

Notes: n – number of animals in the group; Me – median; Q₁ – first quartile; Q₃ – third quartile; c.u. – conventional units.

Table 2 – Indicators of body weight, testicular weight, epididymal sperm condition and fertility of males, Me [Q₁-Q₃]

Indicator		Animal group (n=11)	
		offspring of intact mothers	offspring of stressed mothers
Body weight, g		280,00 [257,25-296,50]	235,00 [198,00-251,50]*
Testicular weight	absolute, g	1,65 [1,54-1,72]	1,42 [1,31-1,47]*
	relative, %	0,60 [0,55-0,66]	0,63 [0,58-0,69]
Sperm concentration, million/ml		18,00 [17,00-19,00]	17,00 [15,00-21,00]
Number of motile spermatozoa, %		57,00 [56,00-61,00]	49,00 [47,00-53,00]*
Pathological forms, %		11,00 [9,00-12,00]	16,00 [15,00-18,00]*
Fertilisation index, %		93,33	66,67
Pregnancy index, %		85,71	60,00

Notes: n – number of animals per group; * – statistical significance of differences (p<0.05).

DOI 10.29254/2077-4214-2023-4-171-90-98

УДК 612.63.2:159.944.2:612.61

¹Геворкян А. Р., ¹Бондаренко Т. В., ¹Волохов І. В., ²Лар'яновська Ю. Б.,
¹Сергієнко Л. Ю., ¹Місюра К. В.

ВПЛИВ СОЦІАЛЬНО-ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ ВАГІТНИХ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ ДОРΟΣЛИХ НАЩАДКІВ САМЦІВ

¹Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології
ім. В. Я. Данилевського НАМН України» (м. Харків, Україна)

²Національний фармацевтичний університет (м. Харків, Україна)

ipep_pathohistology@ukr.net

Зниження репродуктивного потенціалу населення є актуальною проблемою медицини. Результати експериментальних та клінічних досліджень свідчать про те, що одним з факторів, що сприяє розвитку патологій репродуктивної системи є порушення умов внутрішньоутробного розвитку, а саме соціально-емоційний стрес матері під час вагітності. Під впливом стресу вагітних у плода модифікуються генетично запрограмовані процеси індивідуального розвитку, які можуть сприяти зміні у статевої диференціації мозку, порушенню злагодженого функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи та вісі гіпоталамус-гіпофіз-гонади, а також зниженню гормонпродукуючої активності статевих залоз у нащадків дорослого віку. Метою даної роботи є визначення морфофункціональних особливостей репродуктивної системи дорослих самців-нащадків, народжених від стресованих матерів під час всієї вагітності. Дослідження проведено на 22 нащадках-самцях нелінійних щурів 10-місячного віку, отриманих від інтактних матерів та матерів, які були піддані дії соціально-емоційного стресу під час вагітності. Досліджена гістологічна структура сім'яників, визначені рівні статевих гормонів та вивчена фертильність 10-місячних нащадків-самців від інтактних та гестаційно стресованих самоць. Встановлено, що у пренатально стресованих самців у віці 10 місяців спостерігаються

віддалені наслідки для репродуктивної системи, які відображаються у: зменшенні кількості каналців із зрілими сперматозоїдами, зменшенні активованих клітин Лейдіга, зниженні кількості рухливих форм сперматозоїдів, підвищенні відсотка патологічних форм, що разом сприяє зниженню запліднювальної здатності. Порушення умов внутрішньоутробного розвитку нащадків, викликане соціально-емоційним стресом матерів під час вагітності, призводить до деструктивних змін гістоструктури сім'яників, зниження сперматогенної функції та запліднювальної здатності, що складає передумови для зниження репродуктивних можливостей у зрілому віці.

Ключові слова: соціально-емоційний стрес вагітних, репродуктивна система нащадків чоловічої статі, морфоструктура сім'яників, статеві гормони, фертильність самців.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дана робота є фрагментом НДР «Дослідження впливу стресу самиць під час вагітності на передчасний розвиток інволюційних процесів в репродуктивній системі нащадків та створення інноваційних підходів до їх гальмування (експериментальне дослідження)», номер державної реєстрації 0120U103482.

Вступ.

Зниження репродуктивного потенціалу населення є актуальною проблемою сучасної медицини. Результати експериментальних та клінічних досліджень свідчать про те, що одним з факторів, що сприяє розвитку патологій репродуктивної системи є порушення умов внутрішньоутробного розвитку, а саме соціально-емоційний стрес матері під час вагітності [1]. Враховуючи високу стрес-реактивність жіночого організму [2], можна припустити, що саме соціально-емоційний стрес, як різновид психоемоційного стресу, справляє найбільш негативний вплив як на вагітну, так і на її плід [3]. Для періоду вагітності характерна нестабільність функціональних відношень у нейроендокринній системі, що може не тільки ускладнювати перебіг вагітності, а й впливати на розвиток плода, викликаючи пригнічення функціональної активності різних систем, а також структурні перебудови органів та тканин, що проявляються розвитком патологій у нащадків на будь-якому з етапів післянатального життя [3]. Гіпотеза, що пов'язує зміни в зовнішньо/внутрішньому середовищі плода з появою захворювань дитини, як безпосередньо після народження, так і в дорослому житті, отримала назву теорії «пренатального програмування хронічних захворювань дорослих» [4, 5].

Стрес під час вагітності сприяє зростанню концентрації глюкокортикоїдів, в організмі матері, що призводить до ослаблення захисної функції фетоплацентарного бар'єру та підвищення рівня глюкокортикоїдів у плода, які здійснюють активацію катаболічних процесів в його тканинах [6, 7]. Пренатальний стрес призводить до затримки розвитку плода, що може бути фактором ризику серцево-судинних, метаболічних, нейропсихічних і нейроендокринних захворювань, а також зміни репродуктивного потенціалу в дорослому віці [7, 8, 9].

Під впливом стресу вагітних у плода модифікуються генетично запрограмовані процеси індивідуального розвитку, які можуть сприяти змінам у статевій диференціації мозку, порушенню злагодженого функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи та вісі гіпоталамус-гіпофіз-гонади, а також зниженню гормонпродукуючої активності статевих залоз у нащадків дорослого віку [10, 11].

Встановлено, що на ранніх термінах гестації соціально-емоційний стрес призводить до підвищення частоти втрати плодів у вагітних, зниження гонадотропної функції та фертильності у їх нащадків чоловічої статі [11], а на більш пізніх термінах може сприяти затримці внутрішньоутробного розвитку, що є фактором ризику розвитку різних захворювань у дорослому віці [3]. Стрес у другому триместрі вагітності проявляється у нащадків розладами соматостатевого розвитку та функціонування репродуктивної системи, а також зниженням лібідо [11].

На відміну від інших функціональних систем, репродуктивна система розвивається і досягає функціональної зрілості у часі, досить віддаленому від дати народження. Тривалість повноцінного функціонування репродуктивної системи теж обмежена, тому виникає необхідність вивчення аспектів попередження та відтермінування початкових процесів її згасання, яке також відіграє роль у старінні всього організму. Разом з тим слід відзначити, що період вагітності - це досить тривалий процес, а в літературі обмежені дані щодо того, які зміни в репродуктивній системі нащадків спостерігаються, коли соціально-емоційний стрес супроводжує всю вагітність, що характерно для нашого суспільства.

Мета дослідження.

Оцінити особливості морфофункціонального стану репродуктивної системи самців-нащадків, народжених від стресованих матерів під час всієї вагітності.

Об'єкт і методи дослідження.

Дослідження проведені відповідно до Національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з Положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) [12] та «Положеннями про Комітет з питань етики (біоетики)», 2012 [13]. Тварин утримували в стандартних умовах віварію, на рекомендованому раціоні з вільним доступом до питної води [14].

Дослідження проведено на нелінійних щурах 10-місячного віку, а саме на 22 нащадках-самцях першого покоління, отриманих від інтактних самиць (НІМ) та самиць, стресованих під час вагітності (НСМ).

До спаровування залучали самиць 6-місячного віку (n=22) з нормальним естральним циклом, який встановлювали методом цитологічної оцінки вагінальних мазків, та самців віком 7 міс (n=22). Спаровування проводили за умовами «один самець – одна самиця». День, коли у вагінальному мазку були знайдені сперматозоїди, вважали першим днем вагітності [15], з моменту якого у самиць дослідної групи відтворено соціально-емоційний стрес. Вагітність

щурів контрольної групи відбувалася без особливостей в належних умовах.

Материнський соціально-емоційний стрес ($n=11$) моделювали з 1 до 20 доби вагітності шляхом щоденної зміни угруповання вагітних самиць, в якому самиця піддослідної групи перебувала протягом 6 годин в денний час доби. Наступного дня вагітну самицю підсаджували в іншу щурячу спільноту. Процедуру зміни оточення повторювали протягом усієї вагітності, кожного разу змінюючи представників спільноти [16]. В результаті пологів отримані нащадки інтактних та дослідних тварин. З кожного посліду, рандомним методом, відібрано по одній самиці [17].

Всіх нащадків дорощували до 10-місячного віку для подальшого вивчення їх репродуктивної системи. Нащадки були розділені на 2 групи: контрольну групу (від інтактних матерів – $n=11$) та дослідну групу (від матерів, які зазнали стрес під час вагітності – $n=11$). Нащадків зважували та знеживлювали, дотримуючись правил евтаназії.

Дослідження концентрації статевих гормонів в сироватці крові проводили імуноферментним методом за допомогою стандартних ІФА-наборів на імуноферментному фотометричному аналізаторі «Stat-Fax» 2100 (США).

Для проведення гістологічних досліджень сім'яники вилучали в усіх тварин та фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спиртах, заливали в парафін, після чого виготовляли зрізи завтовшки 4-5 мкм [18]. Мікропрепарати забарвлювали гематоксиліном-еозином та вивчали за допомогою світлового мікроскопа «Primo Star» (Carl Zeiss, Німеччина) з вмонтованою камерою Canon G 10.

У щурів також оцінювали функціональний стан сперматозоїдів за їх концентрацією, рухливістю та кількістю патологічних форм [19].

Статистичний аналіз отриманих даних проведено за допомогою пакету статистичних програм Excel 2010 та Statistica 10.0. Для міжгрупового порівняння, згідно характеру розподілу отриманих даних, використовували U-критерій Манна-Уїтні. Результати представлені у вигляді $Me [Q_1-Q_3]$, де Me – медіана; Q_1 – перший квантиль; Q_3 – третій квантиль. Відмінності вважали статистично значущими при $P<0,05$ [20].

Результати дослідження та їх обговорення.

Для встановлення наявності змін у репродуктивній системі пренатально стресованих нащадків, які досягли 10-місячного віку, була вивчена морфоструктура сім'яників та стан епідидимальних сперміїв, встановлені рівні статевих гормонів у сироватці крові у інтактних та піддослідних тварин.

При дослідженні гістологічної будови сім'яників 10-ти місячних НІМ зафіксовані типові ознаки, притаманні тваринам даного виду та віку, а саме: часточки органа заповнені концентричними або сплюсненими профілями зрізів звивистих сім'яних канальців, які достатньо щільно прилягали один до одного (рис. 1).

Розмір канальців, їх власна оболонка, білкова та судинна оболонка органу відповідають нормі. В канальцях простежено 3-4 генерації сперматогенних клітин, що знаходилися на різних стадіях розвитку. Клітини розташовані концентричними шарами, впорядковано, у відповідності до стадій сперма-

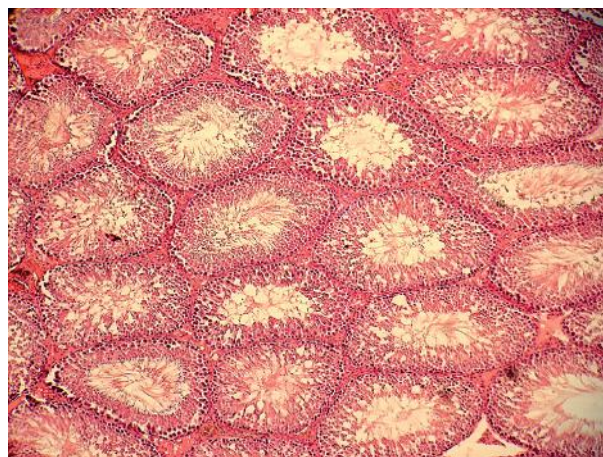


Рисунок 1 – Сім'яник зрілого самця щура-нащадка інтактної матері. Сім'яні канальці щільно прилягають один до одного, звичайні за розміром. Стрічка сперматогенного епітелію у канальцях досягає 4-5 рядів клітин. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення: $\times 100$.

тогенного циклу. Біля власної оболонки канальця видно доволі численні клітини Сертолі. У всіх щурів в канальцях чітко простежується не тільки сперматогенез, а й сперміогенез (рис. 2).

У щілинах між канальцями у сполучній тканині, частіше навколо кровоносних судин, групувалися клітини Лейдига, які мали округло-полігональну форму. Значна їх частина була активованою, про що свідчить наявність великих округлих нормохромних ядер та більший об'єм цитоплазми. Спостерігались малоактивні елементи з маленькими ядрами і незначним об'ємом цитоплазми. В міжканальцевому локусі серед клітин Лейдига присутні як функціонально активні, так і малоактивні елементи.

У 10-ти місячних НІМ гістологічна будова сім'яників має наступні особливості. Стрічка сперматогенного епітелію широка, містить статеві клітини різних етапів розвитку. Змін асоціації статевих клітин різних рівнів диференціювання у канальцях не виявлено. Клітини Сертолі візуально не змінені (рис. 3).

В той же час, спостерігається зменшення кількості канальців, які містять зрілі статеві клітини – сперматозоїди (рис. 4). Також у острівцях гормонпродукуючих клітин Лейдига більша частина ядер мала менший розмір та меншу хроматинову виразність, ніж

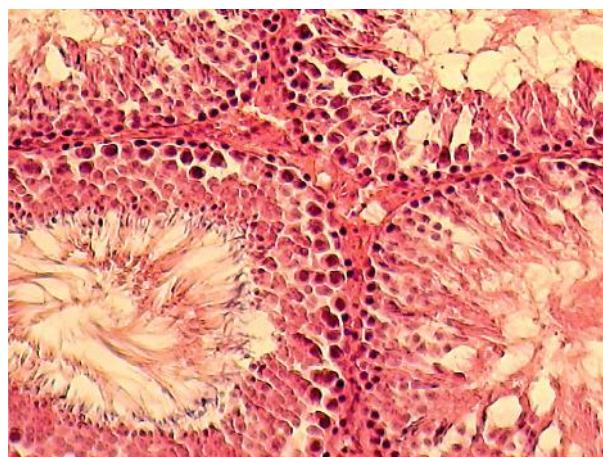


Рисунок 2 – Сім'яник зрілого самця щура-нащадка інтактної матері. В канальцях чітко простежується як сперматогенез, так і сперміогенез. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення: $\times 400$.

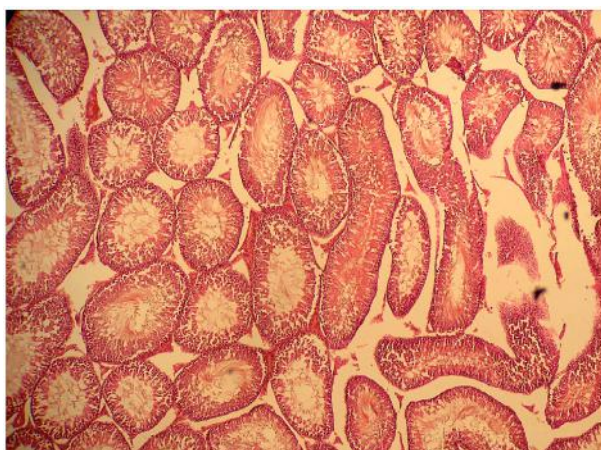


Рисунок 3 – Сім'яник самця щура-нащадка стресованої протягом всього періоду гестації матері. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення: x100.

у контрольних тварин, що може свідчити про певне зниження їх секреторної активності. Спостерігається збільшення функціонально неактивних клітин серед активованих клітин Лейдіга.

Отже, на підставі вищезазначеного можна зробити висновки про те, що пренатальний стрес призводить до деяких морфологічних змін сім'яників у зрілих тварин, які проявляються зменшенням кіль-

Таблиця 1 – Показники концентрації статевих гормонів у самців-нащадків інтактних та гестаційно стресованих самиць

Показник	Статистики	Група тварин (n=11)	
		нащадки інтактних матерів	нащадки стресованих матерів
Прогестерон, нмоль/л	Me [Q ₁ -Q ₃]	3,00 [2,82-3,12]	3,13 [2,96-3,27]
Естрадіол, нмоль/л	Me [Q ₁ -Q ₃]	0,19 [0,17-0,20]	0,18 [0,17-0,19]
Тестостерон, нмоль/л	Me [Q ₁ -Q ₃]	18,06 [16,90-20,58]	20,93 [17,89-24,42]
Співвідношення тестостерон/естрадіол, ум. од.	Me [Q ₁ -Q ₃]	87,87 [86,95-124,64]	114,27 [95,22-142,56]

Примітки: n – кількість тварин у групі; Me – медіана; Q₁ – перший квартиль; Q₃ – третій квартиль; ум. од. – умовні одиниці.

Таблиця 2 – Показники маси тіла, ваги сім'яників, стану епідидимальних спермій та запліднюючої здатності самців, Me [Q₁-Q₃]

Показник		Група тварин (n=11)	
		нащадки інтактних матерів	нащадки стресованих матерів
Маса тіла, г		280,00 [257,25-296,50]	235,00 [198,00-251,50]*
Вага сім'яників	абсолютна, г	1,65 [1,54-1,72]	1,42 [1,31-1,47]*
	відносна, %	0,60 [0,55-0,66]	0,63 [0,58-0,69]
Концентрація сперматозоїдів, млн/мл		18,00 [17,00-19,00]	17,00 [15,00-21,00]
Кількість рухливих сперматозоїдів, %		57,00 [56,00-61,00]	49,00 [47,00-53,00]*
Патологічні форми, %		11,00 [9,00-12,00]	16,00 [15,00-18,00]*
Індекс запліднення, %		93,33	66,67
Індекс вагітності, %		85,71	60,00

Примітки: n – кількість тварин у групі; * – статистична значущість відмінностей (p<0,05).

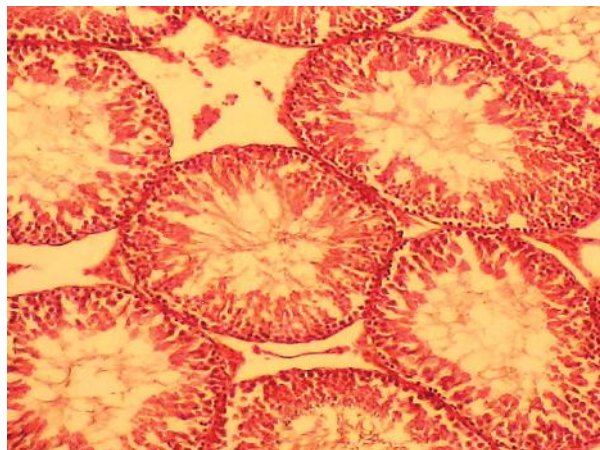


Рисунок 4 – Сім'яник самця щура-нащадка стресованої протягом всього періоду гестації матері. Візуальне зменшення кількості канальців із зрілими сперматозоїдами. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення: x200.

кості канальців із зрілими формами статевих клітин (сперматозоїдами) та активованих форм гормонпродукуючих клітин (клітин Лейдіга).

Наступним етапом нашої роботи було вивчення концентрації статевих гормонів у інтактних та піддослідних тварин, яка представлена в **таблиці 1**.

Як видно з **табл. 1**, в групі НСМ порівняно з групою НІМ статистично значущих відмінностей показників рівня статевих гормонів не спостерігається, хоча показники концентрації тестостерону та співвідношення тестостерону до естрадіолу є дещо більшими на 15,89% та 30,04%, відповідно, у порівнянні з НІМ.

Морфологічні та гормональні дослідження були доповнені фрагментом з оцінки фертильності самців (**табл. 2**).

Аналіз даних **табл. 2** свідчить, що пренатально стресовані тварини мали статистично значуще меншу, по відношенню до контролю, масу тіла на 16,07% та абсолютну вагу сім'яників на 13,94% (p<0,05).

Сперматогенез є одним з найбільш динамічних процесів в організмі людини і найбільш чутливим до дії ушкоджуючих факторів.

Дослідження епідидимальних спермій у 10-місячних нащадків показало, що у групі НСМ, порівняно із групою НІМ, кількість рухливих сперматозоїдів вірогідно менша на 14,04%, а рівень патологічних форм був більшим майже у 1,5 рази, що свідчить про порушення сперматогенної функції у НСМ.

Самці-нащадки 10-місячного віку від стресованих матерів демонструють зниження здатності до запліднення при спаровуванні з інтактними самицями. В групі НСМ, при порівнянні з НІМ, зафіксовано зниження кількості осім'янених та вагітних самиць: індекс запліднення та індекс вагітності є меншим на 26,66% та 25,71%, відповідно.

Отже, за результатами вищенаведених досліджень встановлено, що у НСМ чоловічої статі у віці 10 місяців спостерігаються віддалені наслідки пренатального стресу для репродуктивної системи, які відображаються у: зменшенні кількості канальців із зрілими сперматозоїда-

ми, зменшенні активованих клітин Лейдига, зниженні кількості рухливих форм сперматозоїдів, підвищенні відсотка патологічних форм, що разом сприяє зниженню запліднювальної здатності.

Висновки.

Порушення умов внутрішньоутробного розвитку нащадків, викликане соціально-емоційним стресом матерів під час вагітності, призводить до деструктивних змін гістоструктури сім'яників, зниження сперматогенної функції та запліднювальної здатності, що

складає передумови для зниження репродуктивних можливостей у зрілому віці.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати свідчать про доцільність подальшого вивчення віддалених наслідків пренатального стресу для функціонування репродуктивної системи, а також про необхідність пошуку фармацевтичних засобів, які б мінімізували негативний вплив соціально-емоційного стресу вагітних на органи та системи матері й плода, та сприяли зменшенню ризику репродуктопатій у дорослого організму.

References / Література

1. Bar-Sadeh B, Rudnizky S, Pnueli L, Bentley GR, Stöger R, Kaplan A, et al. Unravelling the role of epigenetics in reproductive adaptations to early-life environment. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Sep;16(9):519-33. DOI: [10.1038/s41574-020-0370-8](https://doi.org/10.1038/s41574-020-0370-8).
2. Heck AL, Handa RJ. Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology*. 2019 Jan;44(1):45-58. DOI: [10.1038/s41386-018-0167-9](https://doi.org/10.1038/s41386-018-0167-9).
3. Brunton PJ. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction*. 2013;146(5):R175-89. DOI: [10.1530/REP-13-0258](https://doi.org/10.1530/REP-13-0258).
4. Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol*. 2002 Dec;31(6):1235-9. DOI: [10.1093/ije/31.6.1235](https://doi.org/10.1093/ije/31.6.1235).
5. Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004 Dec;23(6):588S-595S. DOI: [10.1080/07315724.2004.10719428](https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719428).
6. Cottrell EC, Seckl JR, Holmes MC, Wyrwoll CS. Foetal and placental 11 β -HSD2: a hub for developmental programming. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014 Feb;210(2):288-95. DOI: [10.1111/apha.12187](https://doi.org/10.1111/apha.12187).
7. Facchi JC, Lima TAL, Oliveira LR, Costermani HO, Miranda GDS, de Oliveira JC. Perinatal programming of metabolic diseases: The role of glucocorticoids. *Metabolism*. 2020 Mar;104:154047. DOI: [10.1016/j.metabol.2019.154047](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154047).
8. Goldstein JM, Handa RJ, Tobet SA. Disruption of fetal hormonal programming (prenatal stress) implicates shared risk for sex differences in depression and cardiovascular disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014 Jan;35(1):140-58. DOI: [10.1016/j.yfrne.2013.12.001](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.12.001).
9. Sánchez-Garrido MA, García-Galiano D, Tena-Sempere M. Early programming of reproductive health and fertility: novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. *Hum Reprod Update*. 2022 May 2;28(3):346-75. DOI: [10.1093/humupd/dmac005](https://doi.org/10.1093/humupd/dmac005).
10. Reznikov OH, Nosenko ND, Tarasenko LV, Sinitsyn PV, Lymariyeva AA. Neuroendokrynny ta povedinkovi efekty prenatalnoi dii stresu ta ahonista HAMK. *Zhurn. NAMN Ukrainy*. 2015;21(2):135-41. [in Ukrainian].
11. Serhiienko LYU. Sotsialno-emosiyni stres materiv na rannikh etapakh vaitnosti yak prychyna endokrynopatii ta porushen u hormonalno zaleznykh systemakh nashchadkiv (eksperymentalne doslidzhennia) [avtoreferat dysertatsii]. Kharkiv; 2013. 42 s. [in Ukrainian].
12. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. *European Treaty Series № 123* Strasbourg, 18.03.1986. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53 p. Available from: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommentSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007a67b>.
13. Verkhovna Rada Ukrainy. Polozhennia pro Komitet z pytan etyky (bioetyky): zatv. M-vom osvity, nauky, molodi ta sportu Ukrainy. Nakaz № 1287 vid 19.11.2012. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v1287736-12#Text>. [in Ukrainian].
14. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. National Research Council (US). Washington (DC): National Academies Press; 2011. 246 p. DOI: [10.17226/12910.16](https://doi.org/10.17226/12910.16).
15. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62(4A):609-14. DOI: [10.1590/s1519-69842002000400008](https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008).
16. Pratt NC, Lisk RD. Effects of social stress during early pregnancy on litter size and sex ratio in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Reprod Fertil*. 1989 Nov;87(2):763-9. DOI: [10.1530/jrf.0.0870763](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870763).
17. Romero E, Ali C, Molina-Holgado E, Castellano B, Guaza C, Borrell J. Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Aug;32(8):1791-804. DOI: [10.1038/sj.npp.1301292](https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301292).
18. Suvarna SK, Layton CH, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8th ed. New York: Elsevier Limited; 2019. 557 p.
19. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol*. 1996 May-Jun;10(3):237-44. DOI: [10.1016/0890-6238\(96\)00028-7](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00028-7).
20. Atramentova LO, Utevska OM. Statistical methods in biology. Kharkiv: V.N. Karazin Kharkiv National University; 2007. 288 p. [in Ukrainian].

ВПЛИВ СОЦІАЛЬНО-ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ ВАГІТНИХ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ ДОРОСЛИХ НАЩАДКІВ САМЦІВ

Геворкян А. Р., Бондаренко Т. В., Волохов І. В., Лар'яновська Ю. Б., Сергієнко Л. Ю., Місюра К. В.

Резюме. Зниження репродуктивного потенціалу населення наразі є актуальною проблемою сучасної медицини. Результати експериментальних та клінічних досліджень свідчать про те, що одним з факторів, що сприяє розвитку патологій репродуктивної системи є порушення умов внутрішньоутробного розвитку, а саме соціально-емоційний стрес матері під час вагітності. Під впливом стресу вагітних у плода модифікуються генетично запрограмовані процеси індивідуального розвитку, які можуть сприяти змінам у статевій диференціації мозку, порушенню злагодженого функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи та вісі гіпоталамус-гіпофіз-гонади, а також зниженню гормонпродукуючої активності статевих залоз у нащадків дорослого віку. На ранніх термінах гестації соціально-емоційний стрес призводить до підвищення частоти втрати плодів у вагітних, зниження гонадотропної функції та фертильності у їх нащадків чоловічої статі, а на більш пізніших термінах може сприяти затримці внутрішньоутробного розвитку, що є фактором ризику різних захворювань у дорослому віці.

Метою даної роботи є визначення морфофункціональних особливостей репродуктивної системи дорослих самців-нащадків, народжених від стресованих матерів під час всієї вагітності. Дослідження проведено на 22 нащадках-самцях нелінійних щурів 10-місячного віку, отриманих від інтактних та гестаційно стресованих самиць.

Досліджена гістологічна структура сім'яників, визначені рівні статевих гормонів та вивчена фертильність 10-місячних нащадків-самців від інтактних та гестаційно стресованих самиць.

Встановлено, що у пренатально стресованих самців у віці 10 місяців спостерігаються віддалені наслідки для репродуктивної системи, які відображаються у: зменшенні кількості каналців із зрілими сперматозоїдами, зменшенні активованих клітин Лейдига, зниженні кількості рухливих форм сперматозоїдів, підвищенні відсотка патологічних форм, що разом сприяє зниженню запліднювальної здатності.

Таким чином, порушення умов внутрішньоутробного розвитку нащадків, викликане соціально-емоційним стресом матерів під час вагітності, призводить до деструктивних змін гістоструктури сім'яників, зниження сперматогенної функції та запліднювальної здатності, що складає передумови для зниження репродуктивних можливостей у зрілому віці.

Ключові слова: соціально-емоційний стрес вагітних, репродуктивна система нащадків чоловічої статі, морфоструктура сім'яників, статеві гормони, фертильність самців.

INFLUENCE OF SOCIAL-EMOTIONAL STRESS OF PREGNANT WOMEN ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF ADULT MALE DESCENDANTS

Gevorkyan A. R., Bondarenko T. V., Volokhov I. V., Laryanovska Yu. B., Sergienko L. Yu., Misiura K. V.

Abstract. The reduction of the reproductive potential of population is actual problem of modern medicine. The experimental and clinical studies results indicate that one of the factors was contributing to the development of pathologies of the reproductive system is a violation of the conditions of intrauterine development, namely, the social-emotional stress of the mother during pregnancy. The genetically programmed processes of individual development are modified under the influence of maternal organism stress that leads to changes in the sexual differentiation of the brain, disturbance of the hypothalamic-pituitary-adrenal system and hypothalamic-pituitary-gonadal axis, as well as a decrease of the gonad's hormone-producing activity in adult descendants of pregnancy. The social-emotional stress leads to an increasing frequency of fetal loss in pregnant female, a decrease in gonadotropic function and fertility in their male descendants in the early stages. At later stages it causes delay of intrauterine development in later stages that is a risk factor of development for various diseases in adult.

The purpose of this work is the study the morphofunctional features of the reproductive system of adult male descendants, which were born from stressed during pregnancy mothers. The study was done on 22 nonlinear male rats of 10-month-old obtained from intact and gestationally stressed females.

The histological structure of the testes, the levels of sex hormones, and the fertility of 10-month-old male descendants from intact and gestationally stressed females was studied.

There were that the prenatally stressed males at the age of 10 months have long-term effects: a decrease of the tubules number with mature spermatozoa, a decrease in activated Leydig cells, a decrease of motile forms of spermatozoa number, an increase of pathological forms percentage that finally leads to decrease in fertility.

Thus, the stress of mothers during pregnancy causes the intrauterine development conditions of the descendant's disturbance that leads to destructive changes of the histostucture of the testes, decrease of spermatogenic function and fertilizing capacity, which is a predisposition for a decrease in reproductive capabilities in adulthood.

Key words: social-emotional stress of pregnant women, reproductive system of male descendants, morpho-structure of testes, sex hormones, male fertility.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Gevorkyan A. R.: <https://orcid.org/0009-0009-7502-2216>^{BD}

Bondarenko T. V.: <https://orcid.org/0009-0001-9548-7928>^{BD}

Volokhov I. V.: <https://orcid.org/0000-0001-6138-5889>^{BC}

Laryanovska Yu. B.: <https://orcid.org/0000-0003-4164-9415>^{BD}

Sergienko L. Yu.: <https://orcid.org/0000-0002-1474-222X>^{AE}

Misiura K. V.: <https://orcid.org/0000-0002-0258-9109>^F

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Gevorkyan Aida Rubenivna / Геворкян Аїда Рубенівна

State Institution "V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" / Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»

Ukraine, 61002, Kharkiv, 10 Alchevskikh str. / Адреса: Україна, 61002, м. Харків, вул. Алчевських 10

Tel.: 0509693790 / Тел.: 0509693790

E-mail: ipep_pathohistology@ukr.net

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті

Received 24.05.2023 / Стаття надійшла 24.05.2023 року
Accepted 08.11.2023 / Стаття прийнята до друку 08.11.2023 року