

Barbara Macura, Leopold Śliwa

WPLÝW DIETY,
ZRÓŻNICOWANEJ POD WZGLĘDEM
ZAWARTOŚCI FITOESTROGENÓW,
NA UKŁAD ROZRODCZY SAMCÓW MYSZY

Zakład Biologii Rozwoju Człowieka Wydziału Nauk o Zdrowiu
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik Zakładu: dr hab. L. Śliwa

Fitoestrogeny to grupa substancji o charakterze estrogennym występująca naturalnie w wielu roślinach jadalnych. Celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy związki te, podawane w paszy dojrzałym płciowo samcom myszy, mogą wpływać na funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego. Wyniki badań wykazały, że fitoestrogeny mogą zaburzyć płodność osobników męskich.

Hasła kluczowe: fitoestrogeny, układ rozrodczy, samiec, płodność, myszy.
Key words: phytoestrogens, reproductive system, male, fertility, mice.

Organizmy żywe stykają się w środowisku z różnymi związkami chemicznymi. Część z nich można zaliczyć do substancji o działaniu prohormonalnym. Niektóre z nich są związkami naturalnie występującymi w wielu roślinach i z tego powodu nazywane są fitoestrogenami. Budowa cząsteczek fitoestrogenów jest strukturalnie podobna do budowy cząsteczki żeńskiego hormonu płciowego 17β estradiolu, dlatego też związki te mogą zaburzać równowagę hormonalną organizmu (1). Najbogatszym i najbardziej popularnym źródłem fitoestrogenów w diecie wielu organizmów, między innymi człowieka, są soja i produkty sojowe takie, jak kasza i mąka sojowa, mleko sojowe czy serek tofu. Fitoestrogeny występują również, choć w znacznie mniejszej ilości, w innych jadalnych roślinach strączkowych: fasoli, grochu, soczewicy, a także w niektórych warzywach i owocach (1, 2).

Spożywanie pokarmów bogatych w fitoestrogeny cały czas wzrasta. Jest to związane między innymi z doniesieniami o ich korzystnym wpływie na stan zdrowia kobiet w okresie menopauzy, w związku z ich działaniem proestrogennym, uzupełniającym niedobór endogennych estrogenów. Związki te, działają także pozytywnie na stan tkanki kostnej i układu sercowo-naczyniowego, jak również wykazują potencjalne działanie przeciwnowotworowe (1, 3). Z drugiej strony istnieją jednak obawy co do niekorzystnego wpływu fitoestrogenów na funkcjonowanie układu rozrodczego, zwłaszcza męskiego. Celem pracy jest poznanie wpływu fitoestrogenów na męski układ rozrodczy, zwłaszcza podczas długoterminowego spożywania produktów bogatych w te związki.

MATERIAŁ I METODY

72 dojrzałe płciowo samce myszy podzielono na trzy grupy, liczące po 24 zwierzęta. Zwierzęta z każdej grupy żywione były paszą o innej zawartości soi, głównego źródła fitoestrogenów. Zwierzęta z grupy kontrolnej karmione były paszą nie zawierającą soi, zwierzęta z grupy I paszą o pośredniej zawartości soi (2,55 kg soi na 30 kg paszy), a zwierzęta z grupy II paszą o maksymalnej, dopuszczalnej dietetycznie zawartości soi (5,4 kg soi na 30 kg paszy). Maksymalna, przyjęta zawartość soi podyktowana była koniecznością zachowania takiej samej wartości odżywczej i energetycznej, jak w pozostałych paszach. Wszystkie pasze posiadały podobną, odpowiednią dla myszy, zawartość składników mineralnych i witamin.

Po upływie 8, 16 i 24 tyg. karmienia z każdej grupy zabijano, poprzez dyslokację rdzenia kręgowego, po 8 samców. Po zabiciu zwierząt, w czasie sekcji, pobierano jądra i najądrza. W czasie sekcji preparowano vasdeferens (nasieniowody), z których uzyskiwano plemniki, barwione następnie przyżyciowo (roztworem 1% eozyny i 1% nigrozyny) w celu oceny ich żywotności (4). Jedno jądro i najądrze od każdego ze zwierząt utrwalano w płynie *Bouina*, zatapiano w parafinie i przygotowywano z nich standardowo preparaty histologiczne, barwiono hematoksyliną i eozyną. Preparaty oceniano pod mikroskopem świetlnym analizując zmiany histologiczne w cytoarchitekturze kanalików nasiennych i gruczołów *Leydiga*. Dla każdego samca za pomocą śruby mikrometrycznej dokonano pomiaru wysokości 25 losowo wybranych komórek nabłonka w głowie, trzonie i ogonie przewodu najądrza.

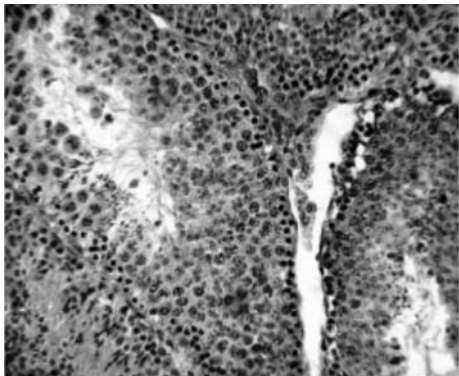
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu t-*Studenta*. Za różnice statystycznie istotnie uznano te, spełniające warunek poziomu istotności poniżej lub równego 0,05 ($p \leq 0,05$), natomiast za różnice wysoce statystycznie istotnie uznano te, spełniające warunek poziomu istotności poniżej 0,01 ($p < 0,01$).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zmiany histologiczne w jądrach. Myszy z grupy kontrolnej po 8, 16 i 24 tyg. wykazywały prawidłową budowę histologiczną jąder, należną do wieku zwierzęcia.

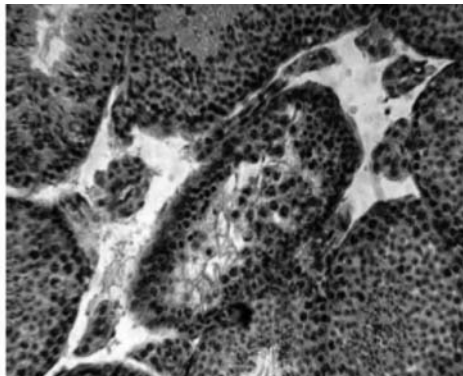
Myszy z grupy I po 8 i 16 tyg. karmienia paszą o pośredniej zawartości fitoestrogenów nie wykazywały zasadniczych i istotnych różnic w budowie histologicznej jąder w porównaniu z grupą kontrolną. Nabłonek płciowy kanalików nasiennych był jednak nieco cieńszy, luźniej utkany. Intensywność podziałów mitotycznych i mejotycznych komórek szlaku spermatogenezy była zmniejszona. Po 24 tyg. pojawiło się znacznie więcej, niż w grupie kontrolnej kanalików nasiennych, noszących cechy degeneracji nabłonka płciowego.

Budowa nabłonka płciowego myszy z grupy II po 8 i 16 tyg. karmienia paszą o większej zawartości soi znacznie różniła się od stanu nabłonka płciowego, obserwowanego u zwierząt z grupy kontrolnej. Nabłonek płciowy jąder był cieńszy, luźniej utkany, z małą ilością komórek spermatogenicznych. Proces spermatogenezy, a więc produkcji plemników, wykazywał liczne nieprawidłowości. Po 24 tyg. pojawiło się u zwierząt w tej grupie więcej, niż w grupach kontrolnej oraz I, zdegenerowanych kanalików nasiennych (fot. 1, 2, 3, 4).



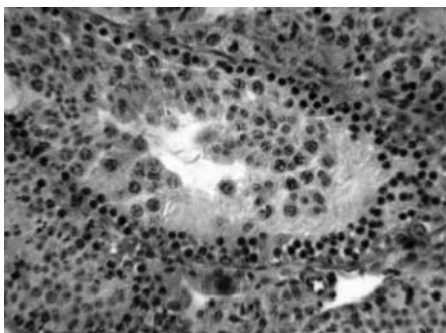
Fot. 1. Przekrój przez kanaliki nasienne samca z grupy I (po 16 tygodniach karmienia paszą o pośredniej zawartości soi), pow. ok. 450X

Fig. 1. Section through the seminiferous tubules of the male from the group I (after 16 weeks of feeding chow with an average soy content), magn. of about 450X



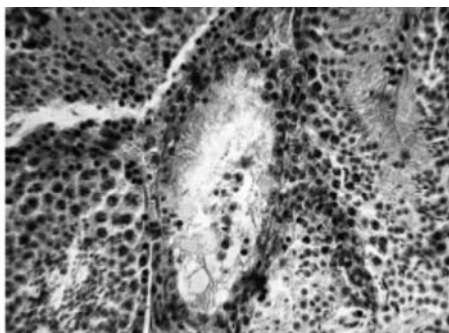
Fot. 2. Przekrój przez kanaliki nasienne samca z grupy II (po 16 tygodniach karmienia paszą o maksymalnej zawartości soi), pow. ok. 450X

Fig. 2. Section through the seminiferous tubules of the male from the group II (after 16 weeks of feeding chow with the highest soy content), magn. of about 450X



Fot. 3. Przekrój przez kanaliki nasienne samca z grupy I (po 24 tygodniach karmienia paszą o pośredniej zawartości soi), pow. ok. 450X

Fig. 3. Section through the seminiferous tubules of the male from the group I (after 24 weeks of feeding chow with an average soy content), magn. of about 450X



Fot. 4. Przekrój przez kanaliki nasienne samca z grupy II (po 24 tygodniach karmienia paszą o maksymalnej zawartości soi), pow. ok. 450X

Fig. 4. Section through the seminiferous tubules of the male from the group II (after 24 weeks of feeding chow with the highest soy content), magn. of about 450X

Zmiany histologiczne w najądrzach. Karmienie samców myszy paszą zawierającą fitoestrogeny miało wpływ na budowę histologiczną najądrzy.

W budowie najądrza zwierząt kontrolnych, karmionych paszą nie zawierającą soi, nie stwierdzono żadnych uchwytanych zmian histologicznych.

W grupach I i II komórki wyścielające przewód najądrza wykazywały cechy typowych komórek nabłonkowych. W grupie I po 8 i 16 tyg. ekspozycji na fitoestrogeny w świetle przewodu najądrza obecnych było mniej plemników, natomiast więcej

Tab e l a I. Wpływ diety, zróżnicowanej pod względem zawartości fitoestrogenów, na średnią wysokość komórek nabłonka w głowie, trzonie i ogonie najądrza myszy dojrziałych płciowo

Tab l e I. Effect of diets containing different amounts of phytoestrogens on mean height of epithelial cells in the head, body and tail (caput, corpus and cauda) of epididymis in adult male mice

	8 tygodni			16 tygodni			24 tygodni		
	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II
Głowa najądrza (μm) \pm SD	9,6 \pm 2,01	10,0 \pm 2,85	9,0 ^{a,b} \pm 2,09	9,3 \pm 2,40	10,1 ^a \pm 2,25	9,3 ^b \pm 1,20	10,8 ^{c,d} \pm 2,46	10,5 ^{c,d} \pm 2,36	8,9 ^{a,b,c,d} \pm 1,40
Trzon najądrza (μm) \pm SD	6,8 \pm 1,02	6,3 ^a \pm 1,35	6,8 ^b \pm 1,05	6,6 \pm 1,22	6,6 ^c \pm 0,91	6,4 ^c \pm 0,96	6,6 ^c \pm 0,93	6,9 ^{a,d} \pm 0,97	6,3 ^{a,b} \pm 0,94
Ogon najądrza (μm) \pm SD	4,7 \pm 0,91	4,8 \pm 1,05	5,0 ^b \pm 1,17	4,8 \pm 1,07	5,0 \pm 1,10	4,8 \pm 0,91	5,3 ^{c,d} \pm 0,86	5,4 ^d \pm 1,12	5,0 ^{a,b} \pm 1,03

a – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) pomiędzy grupą kontrolną a grupami I i II w 8, 16 i 24 tyg.

b – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) pomiędzy grupą I a grupą II w 8, 16 i 24 tyg.

c – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w grupie kontrolnej i grupach I i II pomiędzy kolejnymi okresami.

d – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w grupie kontrolnej i grupach I i II pomiędzy 8 a 24 tyg.

Tab e l a II. Wpływ diety, zróżnicowanej pod względem zawartości fitoestrogenów, na średnią zawartość martwych plemników w vas deferens myszy dojrziałych płciowo

Tab l e II. Effect of diet containing different amounts of phytoestrogens on mean content of dead sperm cells in the deferent duct (vas deferens) of the adult male mice.

	8 tygodni			16 tygodni			24 tygodni		
	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II	Grupa kontrolna	Grupa I	Grupa II
Procent martwych plemników (%) \pm SD	32 \pm 8,5	35 \pm 12,8	38 \pm 8,8	28 \pm 9,4	42 ^b \pm 12,7	47 ^a \pm 10,5	40 ^c \pm 4,8	51 ^d \pm 10,0	51 ^{a,d} \pm 6,1

^{a)} Oznakowanie jak w tab. I.

spermiofagów w porównaniu z grupą kontrolną. Po 24 tyg. w przewodzie najądrza liczba plemników spadła, a liczba spermiofagów wzrosła w porównaniu ze stanem obserwowanym w 8 i 16 tyg. W grupie II, w porównaniu z grupą I, stwierdzono podobne zmiany, lecz o większym nasileniu.

Zmiany dotyczyły również wysokości komórek nabłonka wyścielejających przewód głowy, trzonu i ogona najądrza (tab. I). Reasumując wyniki przedstawione w tabeli, należy stwierdzić, że wysoka zawartość fitoestrogenów w diecie dojrzalych płciowo samców myszy spowodowała spadek wysokości komórek nabłonka w poszczególnych częściach najądrza, co jest widoczne zwłaszcza w grupie II, po 24 tyg. karmienia zwierząt paszą z większą zawartością soi. Jest to widoczne zarówno w stosunku do grupy kontrolnej i grupy I po 24 tyg., jak i w stosunku do grupy II w 8 tyg. (tab. I).

Ż y w o t n o ś ć p l e m n i k ó w. Obecność soi w paszy spowodowała wzrost liczby martwych plemników w vasdeferens samców myszy (tab. II).

Powyższe wyniki badań wykazują, że fitoestrogeny, zawarte między innymi w soi i jej pochodnych produktach, podawane zwierzętom wywołują uchwytne zmiany w budowie ich układu rozrodczego. Również rezultaty innych eksperymentów potwierdzają tę tezę. Po karmieniu dojrzalych płciowo samców myszy paszą zawierającą fitoestrogeny zaobserwowano atrofię nabłonka płciowego w jądrach (5), a także zaburzenia spermatogenezy (6). Podawanie dorosłym samcom szczurów fitoestrogenów w paszy spowodowało nieprawidłowości w procesie powstawania plemników (7). Efektem działania fitoestrogenów był spadek syntezy DNA w kanałikach nasiennych jąder szczurów, a także ograniczenie zdolności odpowiedzi komórek *Leydiga* na bodźce pobudzające steroidogenezę (8). Zaobserwowano także, że fitoestrogeny spowodowały niewielką hiperplazję tkanki śródmiąższowej jądra szczurów (9).

Nie tylko gryzonie, ale także inne ssaki i ptaki również okazały się wrażliwe na ekspozycję na fitoestrogeny, jak na przykład psy czy gąsiorzy (10, 11), u których zaobserwowano zmiany w budowie histologicznej jąder i spadek liczby plemników. Jeden z fitoestrogenów, genisteina, posiada zdolność wywoływania zmian w ekspresji genów w jądrach płodów szczurów, przy równoczesnym braku efektów morfologicznych (12, 13).

Uzyskane wyniki świadczą o dużej sile oddziaływania fitoestrogenów na układ reprodukcyjny. Mogą one spowodować zaburzenia w płodności, a nawet okresową bezpłodność.

Znane są jednak również doniesienia sugerujące brak negatywnego wpływu fitoestrogenów na męski układ rozrodczy (14, 15).

WNIOSKI

Ekspozycja samców myszy na fitoestrogeny powoduje zmiany histologiczne w ich układzie rozrodczym, wskazujące na zaburzenie procesu spermatogenezy.

B. Macura, L. Śliwa

EFFECT OF DIET CONTAINING DIFFERENT AMOUNTS
OF PHYTOESTROGENS ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM IN MALE MICE

Summary

Introduction: Phytoestrogens are the group of substances which naturally can be found in many plants. The richest sources of phytoestrogens in human's diet are soy and soy products. Phytoestrogens have similar structure to main female sex hormone 17 β estradiol, and may be expected to mimic effects of this hormone in the organism. The aim of this work was to investigate if phytoestrogens were able to affect the functions of male reproductive system. Material and methods: Adult male Balb/c mice were fed three kinds of special prepared animal chow that differed in the content of soy, and thereby in the content of phytoestrogens. Results: The histological changes in testes of animals fed the chow with soy showed: disturbance of spermatogenesis, inhibition of germinal cell divisions, degeneration of seminal tubule epithelium, decrease in number of mature sperm cells and their lower viability. Moreover, phytoestrogens affected also the height of epithelial cells in caput, corpus and cauda of the epididymis. Conclusions: The results of experiments show that phytoestrogens can disturb the fertility of adult male mice.

PIŚMIENNICTWO

1. Kraszewska O., Nynca A., Kamińska B., Cierieszko R.: Fitoestrogeny. I. Występowanie, metabolizm i znaczenie biologiczne u samic. Post. Biol. Kom., 2007; 34: 189-205. – 2. Badowski P., Urbanek-Karłowska B.: Fitoestrogeny – występowanie w żywności. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 2001; 52: 203-212. – 3. Nynca A., Kraszewska O., Słomczyńska M., Cierieszko R.: Fitoestrogeny. II. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania w układzie rozrodczym samicy. Post. Biol. Kom., 2007; 34: 207-222. – 4. Śliwa L.: Usability of the hypoosmotic swelling „water test – a simple method to assess sperm membrane integrity in mouse spermatozoa. Folia Biologica, 1993; 41: 29-31. – 5. Cline J.M., Franke A.A., Register T.C., Golden D.L., Adams M.R.: Effects of dietary isoflavoneaglycones on the reproductive tract of male and female mice. Toxicol. Pathol., 2004; 32: 91-99. – 6. Śliwa L.: The influence of soybean riches of phytoestrogens diet in mouse testishistological structure. Folia Med. Cracov., 2005; 46: 121-131. – 7. Assinder S., Davis R., Fenwick M., Glover A.: Adult – only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post – meiotic germ cell. Reproduction, 2007; 133: 11-19. – 8. Svechnikov K., Supornsilchai V., Strand M.L., Wahlgren A., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W., Söder O.: Influence of long-term dietary administration of procymidone, afungicide with anti- androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary – gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. J. Endocrinol., 2005; 187: 117-124. – 9. Papiież M.: The influence of hollyhock extract administration on testicular function in rats. J. Mol. Histol., 2004; 35: 733-740. – 10. Perez-Rivero J.J., Martinez-Maya J.J., Perez-Martinez M., Aguilar-Setien A., Garcia- Suarez M.D., Serrano H.: Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. Vet. Res. Commun., 2009; 33: 87-95.
11. Opalka M., Kugla-Owczarska J., Kamińska B., Puchajda- Skowrońska H., Hryniewicka W., Dusza L.: Effects of dietary meals containing different levels of phytoestrogens on reproductive function in Bilgoraj ganders. Acta Vet. Hung., 2008; 56: 379-391. – 12. Naciff J.M., Hess K.A., Overmann G.J., Torrontali S.M., Carr G.J., Tiesman J.P., Foertsch L.M., Richardson B.D., Martinez J.E., Daston G.P.: Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17{alpha}-ethynyl estradiol, genisteina, or bisphenol A. Toxicol. Sci., 2005; 86: 396-416. – 13. Adachi T., Ono Y., Koh K.B., Takashima K., Tainaka H., Matsuno Y., Nakagawa S., Todaka E., Sakurai K., Fukata H., Iguchi T., Komiyama M., Mori C.: Long – term alteration of gene expression without morphological change in testis after neonatal exposure to genistein in mice: toxicogenomic analysis using cDNA microarray. Food Chem. Toxicol., 2004; 42: 445-452. – 14. Faqi A.S., Johnson W.D., Morrissey R.L., McCormick D.L.: Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. Reprod. Toxicol., 2004; 18: 605-611. – 15. Lee B. J., Kang J.K., Jung E.Y., Yun Y.W., Baek I.J., Yon J.M., Lee Y.B., Sohn H.S., Lee J.Y., Kim K.S., Nam S.Y.: Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy- based commercial diet. J. Vet. Sci., 2004; 5: 227-234.