



# Вікова динаміка змін статевої поведінки й андрогенного статусу в самців щурів, спричинених пренатальною експозицією до низьких доз дибутилфталату

**О. Г. Резніков** 

**О. В. Сачинська**

**А. А. Лимарєва**

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ 04114, Україна

Метою роботи було дослідження статевого дозрівання, гормональної активності сім'яників і статевої поведінки самців щурів лінії Вістар, народжених матерями, які протягом останнього тижня вагітності отримували перорально ди-п-бутилфталат (ДБФ) у дозі 100 мг/кг маси тіла, яка не спричинює анатомічних вад розвитку. Чоловічу статево поведінку оцінювали за процептивними реакціями, тривалістю латентних і рефрактерних періодів та кількістю садок, інтромісій та еякуляцій у присутності рецептивної самиці. Жіночу статево поведінку оцінювали за лордозними реакціями орхідектомованих та активованих введенням естрадіолу й прогестерону самців у присутності нормального самця. Пренатальне застосування ДБФ призвело до акселерації статевого дозрівання. У молодих статевозрілих самців (6 міс.) виявлено неочікуваний для ендокринних дизрапторів феномен, а саме, гіперандрогенний стан, який характеризувався гіперактивними центральним (мотиваційним) і периферійним (копуляційним та еякуляційним) компонентами чоловічої статевої поведінки та вдвічі підвищеним рівнем тестостерону в плазмі крові. У віці 10 міс. у них спостерігали гомосексуальну й посилену лордозну поведінку. У старіючих тварин (18 міс.) гіперандрогенізм змінюється на діаметрально протилежний стан: більш ніж дворазове зменшення рівня тестостерону в плазмі крові на межі вірогідності й послаблення чоловічої статевої поведінки, як порівняти з контрольними щурами. Водночас у них виявлена відсутність лордозних реакцій поряд з посиленням гомосексуальної мотиваційної поведінки. Отримані дані свідчать про епігенетичні порушення програми статевої диференціації мозку (гіпермаскулінізація в сполученні із фемінізацією мозку) і регуляції гормональної функції статевих залоз, а також про передчасне старіння репродуктивних функцій унаслідок пренатального впливу низької дози ДБФ. Висунуте уявлення про пренатально детермінований ДБФ-синдром. Обговорюються можливі механізми виявлених змін репродуктивної системи.

**Ключові слова:** дибутилфталат, пренатальна дія, статева поведінка, тестостерон, самці щурів.

**Для цитування:** Резніков ОГ, Сачинська ОВ, Лимарєва АА. Вікова динаміка змін статевої поведінки й андрогенного статусу в самців щурів, спричинених пренатальною експозицією до низьких доз дибутилфталату. Журнал Національної академії медичних наук України. 2019;25(3):260-67

**Резніков** 

Олександр Григорович

ORCID: 0000-0002-0018-399X

reznikov39@gmail.com

Стаття надійшла до редакції 20 червня 2019 року | Направлена на рецензування 2 вересня 2019 року | Прийнята до друку 18 вересня 2019 року

## ВСТУП

Хімічні полютанти навколишнього середовища, що здатні порушувати гормональний гомеостаз чи спотворювати гормональні ефекти природних гормонів, або «ендокринні дизраптори», визнані важливими етіологічними чинниками вродженої або набутої патології репродуктивної системи людини і тварини [1, 2, 3, 4, 5]. Ендокринні диз-

раптори «звинувачують» у зменшенні фертильного потенціалу населення багатьох країн світу, бо репродуктивна система виявилася вкрай чутливою до ураження ними. В організмі вагітної жінки, яка зазнає впливу подібних речовин, їх концентрація набагато перевищує таку в невагітних. Вони здатні перетинати плацентарний бар'єр і суттєво впливати на розвиток внутрішньоутробного плоду. Репродуктивна патологія в чоловіків або самців тварин

виявляється у формі оліго- або аспермії, появі патологічних форм спермій, крипторхізмі, гіпоспадії, синдромі тестикулярної дисгенезії [6, 7, 8, 9], у жінок або самиць тварин – у порушеннях фолікулогенезу в яєчниках, ендометріозі, гіпоплазії матки [10, 11].

Одним з недостатньо вивчених ендокринних дизрапторів є ди-п-бутилфталат (ДБФ). Фталати використовуються в промисловості як пластифікатори при виготовленні пластмас для надання їм еластичних властивостей. Вони наявні в косметичних та пакувальних виробках, лікарських засобах, покриттях підлоги тощо. Фталати легко відокремлюються від полімерних матеріалів і забруднюють повітря, воду, харчові продукти.

Тератогенні ефекти в статевій сфері, гіпогонадизм та іншу репродуктивну патологію в чоловічого потомства спостерігали при введенні вагітним щурам ДБФ у дозах понад 250 мг/кг [12]. Вони пояснюються здатністю фталатів переходити від материнського організму до кровносною системи плоду [13] і блокувати андрогенні ефекти тестостерону [14]. Але функціональні порушення при введенні низьких (субпорогових щодо анатомічних вад розвитку) доз ДБФ залишалися поза увагою. Натомість однією з особливостей ендокринних дизрапторів є відсутність лінійної залежності «доза-ефект».

Повідомлялося, що чимало самців щурів, перинатально експонованих до великих доз ди(2-етилгексил)фталату протягом вагітності матерів і лактаційного періоду, були сексуально неактивними в присутності рецептивної самиці й це не корелювало з морфологічними аномаліями, що свідчило про ізольоване порушення статевої диференціації мозку плоду [15]. Пренатальний вплив ДБФ на статево поведінку досліджено вкрай недостатньо.

Раніше ми вперше повідомили про несподіваний біологічний ефект – ознаки гіперсексуальності в чоловічого потомства самиць щурів, які під час вагітності отримували ДБФ у низькій дозі [16]. **Метою цієї роботи** було дослідити у віковому аспекті репродуктивні ефекти пренатального застосування низьких доз ДБФ з позиції концепції функціональної тератології [17], зробивши акцент на статевій диференціації мозку. З цією метою ДБФ вводили вагітним щурам протягом останнього триместру, коли відбувається андрогензалежне програмування чоловічої статевої поведінки та інших нейроендокринних функцій, притаманних особинам чоловічої статі [18].

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Щурів лінії Вістар утримували у віварії Інституту на харчуванні стандартним гранульованим комбікормом з вільним доступом до води. Усі маніпуляції з тваринами відбувалися за положенням Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.) та національним біоетичним рекомендаціям. Проект досліджень отримав схвалення біоетичної комісії Інституту.

Для запліднення відбирали самиць (200–220 г) із регулярними естральними циклами, які досліджували щоденно шляхом мікроскопічного аналізу вагінальних мазків

протягом двох тижнів. День виявлення сперматозоїдів у вагінальних мазках уважали першим днем вагітності. З 15-го до 21-го дня гестації в шлунок через металевий зонд вводили 10%-й олійний розчин ДБФ (дибутиловий ефір фталевої кислоти, чда, НВП «Альфарус», Україна) у щоденній дозі 100 мг/кг м.т. Контрольні тварини отримували розчинник у такий же спосіб.

З новонародженого потомства чоловічої статі формували дослідні й контрольні групи по 5–7 тварин, відбираючи в кожну щуренят з різних послідів. На 2, 7 та 10 дні після народження в них вимірювали штангенциркулем аногенітальну відстань та визначали масу тіла. У подальшому спостерігали за статевим розвитком.

Статево поведінку самців за чоловічим типом досліджували у віці 6 (молоді статевозрілі) та 18 (старіючі) місяців за методикою Holson et al. [19] та описом Hull and Dominguez [20]. Жіночу статево поведінку самців досліджували у віці 10,5 та 18 місяців.

Тестування статевої поведінки проводили в темному приміщенні зі слабким червоним освітленням. Тварини перебували протягом 4 год у темряві. Самців за 5 хв до тестування поміщали в порожню клітку для адаптації, після чого підсаджували на 15 хв рецептивну оварієктомовану самицю, якій за 48 год перед тестуванням внутрішньом'язово вводили 0,1 мг естрадіолу діацетату («Sigma», США), а за 4 год перед тестуванням – 0,5 мг прогестерону («Біофарма», Україна) в олійному розчині. Протягом 15 хв реєстрували такі показники чоловічої статевої поведінки: тривалість латентних періодів першої садки та першої інтромісії, першої еякуляції, постеякуляційний період, кількість еякуляцій, садок без інтромісій і загальна кількість садок з інтромісіями. Тестування поведінки проводили двічі, з інтервалом 1 тижд.

Здатність до проявів жіночої статевої поведінки (лордозних реакцій), що залежить від чутливості поведінкових центрів мозку до жіночих статевих гормонів, досліджували на попередньо кастрованих самцях, яким вводили гормональні препарати за вищезазначеною аналогічною самицям схемою, після чого підсаджували до сексуально досвідченого самця, який до цього перебував у клітці щонайменше 5 хв. Тестування тривало протягом 10 хв або до 10 садок активного самця. Вираховували лордозний індекс як відношення кількості лордозних реакцій до загальної кількості садок активного самця, помножене на 100. Водночас реєстрували випадки процептивної і гомосексуальної поведінки.

Частина самців з отриманого потомства декапітували у віці 6 і 18 місяців. Кров збирали в гепаринізовані пробірки, центрифугували й зберігали відібрані зразки плазми при -20°C до аналізу. У плазмі крові визначали вміст загального тестостерону імуноферментним методом за допомогою комерційних наборів (Testosterone ELISA; «DRG», Німеччина).

Результати опрацьовували з використанням критерію *t* Стьюдента за допомогою комп'ютерної програми Excel або за критерієм *U* Вілкоксона-Манна-Вітні для непараметричного розподілу варіант. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На відміну від більшості опублікованих робіт, у яких вивчався вплив ендокринних дизрапторів, застосованих протягом ембріо- та фетогенезу, нами вибірково досліджено епігенетичне репрограмування розвитку нейроендокринної системи й поведінки, яке відбувається після завершення ембріогенезу, зокрема в критичному періоді статевої диференціації мозку. Тому ми дослідили наслідки пренатальної експозиції щурів через материнський організм відносно малими дозами дибутилфталату в терміні, у які відбувається андрогензалежне програмування мозку плода щура, тобто в останній тиждень вагітності.

У межах Національної токсикологічної програми США були проведені дослідження на чоловічому потомстві щурів, які отримували дибутилфталат з харчовим раціоном протягом 12–20-го днів вагітності. Мінімальна щоденна доза, яка не викликала помітних ефектів стосовно репродуктивних аномалій (NOAEL), дорівнює 66 мг/кг/день [21]. Щодо експериментальних досліджень на щурах, то обрана нами доза 100 мг/кг/день наближається до NOAEL, а тому вважається низькою.

У новонароджених самців були відсутні зовнішні анатомічні вади, крім незначного зменшення аногенітальної відстані в дослідних групах на 2, 7 і 10 дні постнатального життя в розрахунку на одиницю маси тіла (у контрольній групі –  $0,56 \pm 0,01$ ,  $0,59 \pm 0,02$ ,  $0,51 \pm 0,01$  відповідно, у дослідній –  $0,51 \pm 0,01$ ,  $0,52 \pm 0,01$ ,  $0,47 \pm 0,01$  відповідно,  $p < 0,05$ ). Імовірно, це зумовлено дещо більшою масою тіла в дослідних тварин ( $16,20 \pm 0,45$  г проти  $14,74 \pm 0,45$  г

у контролі на 10 день після народження,  $p < 0,05$ ). Але в абсолютному вимірюванні вірогідна різниця була виявлена лише на 2-й день після народження ( $3,35 \pm 0,07$  мм проти  $3,63 \pm 0,11$  мм у контролі ( $p < 0,05$ ), і в подальшому вона зникала. Ці дані свідчать про слабку антиандрогенну дію ДБФ в обраній дозі, котра виявляється і в менших дозах [12]. Під впливом ДБФ в узагальненій дослідній групі ( $n = 47$ ) пубертація, ознакою якої було опущення сім'яників у калитку, у середньому завершувалася на  $33,18 \pm 0,12$  день після народження, а в контрольній ( $n = 28$ ) – на  $38,54 \pm 0,14$  день ( $p < 0,001$ ). Отже, є підстави стверджувати про значне прискорення статевого дозрівання під впливом ДБФ.

При першому тестуванні чоловічої статевої поведінки 6-місячних контрольних самців привернула увагу відносно низька сексуальна активність, про що свідчать подовжені латентні періоди першої садки та першої інтромісії (послаблення мотиваційного компоненту статевої поведінки), а також відсутність еякуляції протягом 15-хвилинного тестування, незначна кількість садок з інтромісіями (послаблення копуляційного компоненту). Імовірно, це пояснюється тим, що тестування проводили в грудні, тоді як відомо, що в зимовий період зменшується, як порівняти з весняно-літнім, секреція тестостерону та репродуктивна активність щурів [22]. Натомість при другому тестуванні після набуття тваринами сексуального досвіду спостерігали значно вищу статеву активність, яка виявлялася в появі еякуляції, драматичному скороченні тривалості латентних періодів першої садки й першої інтромісії, збільшенні кількості садок з інтромісіями (табл. 1).

## ТАБЛИЦЯ 1 / TABLE 1

ПОКАЗНИКИ ЧОЛОВІЧОЇ СТАТЕВОЇ ПОВЕДІНКИ САМЦІВ ЩУРІВ ВІКОМ 6 міс. ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ДІЇ ДБФ. (М). ЧАС ТЕСТУВАННЯ 15 хв / INDICATORS OF MALE SEXUAL BEHAVIOR IN MALE RATS AGED 6 MONTHS AFTER THE PRENATAL ACTION OF DBP. (M). TESTING TIME 15 min

Показник / Feature	Перше тестування / First test		Друге тестування / Second test	
	Інтактні (контроль) / Control	ДБФ / DBP	Інтактні (контроль) / Control	ДБФ / DBP
<b>Латентний період, с: / Latency period, s:</b>				
першої садки / first mount	109,4 (10–219)	15,2* (3–40)	3,8** (2–9)	20,4* (2–73)
першої інтромісії / first intromission	125,2 (15–259)	21,2* (8–51)	28,0** (3–113)	30,8 (9–88)
першої еякуляції / first ejaculation	>900 (900)	490,6 (315–743)	361,4** (244–602)	451,0 (273–658)
Постеякуляторний рефрактерний період, с: / Post-ejaculatory refractory period, s:	>900 (900)	267,8* (3–585)	416,2** (167–656)	129,4* (22–255)
<b>Кількість: / Number:</b>				
садок без інтромісій / mounts without intromission	3,8 (1–6)	2,4 (2–3)	4,0 (3–5)	2,8*** (2–4)
садок з інтромісіями / mounts with intromission	9,8 (1–19)	18,8* (17–25)	17,4 (11–35)	26,6** (20–32)
Еякуляцій / ejaculations	0 (0)	1,2* (1–2)	1,2** (1–2)	1,8*** (1–2)

**Примітка:** 5 щурів у кожній групі. У дужках діапазон індивідуальних коливань; статистичне опрацювання вірогідності за критерієм U Вількоксона-Манна-Вітні.

\*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$ , як порівняти з контрольними самцями.

\*\*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$ , як порівняти з тією самою групою тварин у першому тестуванні.

**Note:** 5 rats in each group. In brackets the range of individual indices; statistical processing of significance according to the Wilcoxon-Mann-Whitney U test.

\*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$  compared to control males.

\*\*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$  compared to the same group of animals in the first testing.

На протизагу сексуальному патерну в нормальних тварин у ДБФ-групі 6-місячних тварин спостерігали в обох сеансах тестування сексуальну гіперактивність, яка розповсюджувалася на всі показники, що характеризують центральний і периферійний компоненти статевої поведінки (табл. 1). Під пренатальним впливом ДБФ тривалість латентних періодів першої садки в першому тестуванні скоротилася в середньому в 7 разів, першої інтромісії – у 6 разів, кількість садок з інтромісіями зростає вдвічі. У другому тестуванні пренатально введений ДБФ спричинив збільшення кількості еякуляцій у півтора раза, більш як триразове скорочення постеякуляторного рефрактерного періоду, натомість зростає тривалість латентних періодів першої садки.

Як з'ясувалося при дослідженні статевої поведінки старіючих самців 18-місячного віку, підвищена активність молодих тварин мала транзиторий характер. До того ж, вона змінилася прискореним старінням репродуктивної системи, імовірно, завдяки її виснаженню.

Природно, що статевая потенція з віком регресує, що засвідчується, по-перше, утратою здатності третини самців до спарювання із самицями та майже триразовим зростанням часу до першої інтромісії в першому тестуванні чоловічої поведінки контрольних старіючих самців. Особливо показовими були характеристики другого тестування поведінки контрольних 18-місячних самців: тривалість латентних періодів першої садки зростає в 7 разів, першої інтромісії – майже вдвічі, кількість садок без інтромісій – в 1,7 раза, хоча деякі показники навіть покращилися, зокрема латентний період першої еякуляції скоротився в 1,6 раза, кількість еякуляцій зростає в півтора раза (табл. 1, 2).

Проте навіть на тлі вікової інволюції статевої активності, у ДБФ-групі, як порівняти з відповідним контролем, суттєво погіршилися досліджені показники: за час спостереження були відсутні еякуляції в обох тестуваннях, у другому тестуванні латентний період першої інтромісії подовжився у 9,3 раза, кількість садок без інтромісій зменшилася у 2,4 раза, з інтромісіями – у 9,5 раза.

Для з'ясування патогенезу передчасного статевого дозрівання та сексуальної гіперактивності дослідних молодих (6-місячних) самців, а також передчасного виснаження статевої потенції в старіючих (18-місячних) тварин вимірювали рівень тестостерону в плазмі крові. Зокрема, це було зумовлено суперечливими даними літератури про рівень тестостерону в плазмі крові дорослих самців, пренатально експонованих в останній триместр вагітності матерів ДБФ у щоденній дозі 100 мг/кг м.т. Вони свідчили і про відсутність змін [23], і про зменшення рівня тестостеронемії [24] або навіть підвищення [25].

За нашими даними, у самців активного репродуктивного віку (6 міс.), що зазнали пренатальної дії ДБФ, середня концентрація тестостерону в плазмі крові була вдвічі вищою за контроль і дорівнювала відповідно 7,53 ± 1,45 нг/мл і 3,76 ± 0,85 нг/мл ( $p < 0,05$  за критерієм *t* Стьюдента), що свідчить про значну гіперандрогенізацію тварин. Майже дворазове підвищення концентрації тестостерону виявлено також у дорослих самців щурів (6 міс.), народжених матерями, які протягом 14–21 днів вагітності щоденно отримували *per os* ДБФ у дозі 100 мг/кг м.т. [25]. Саме це, на нашу думку, є рушійною силою індукованої ДБФ гіперсексуальності та, імовірно, передчасного статевого дозрі-

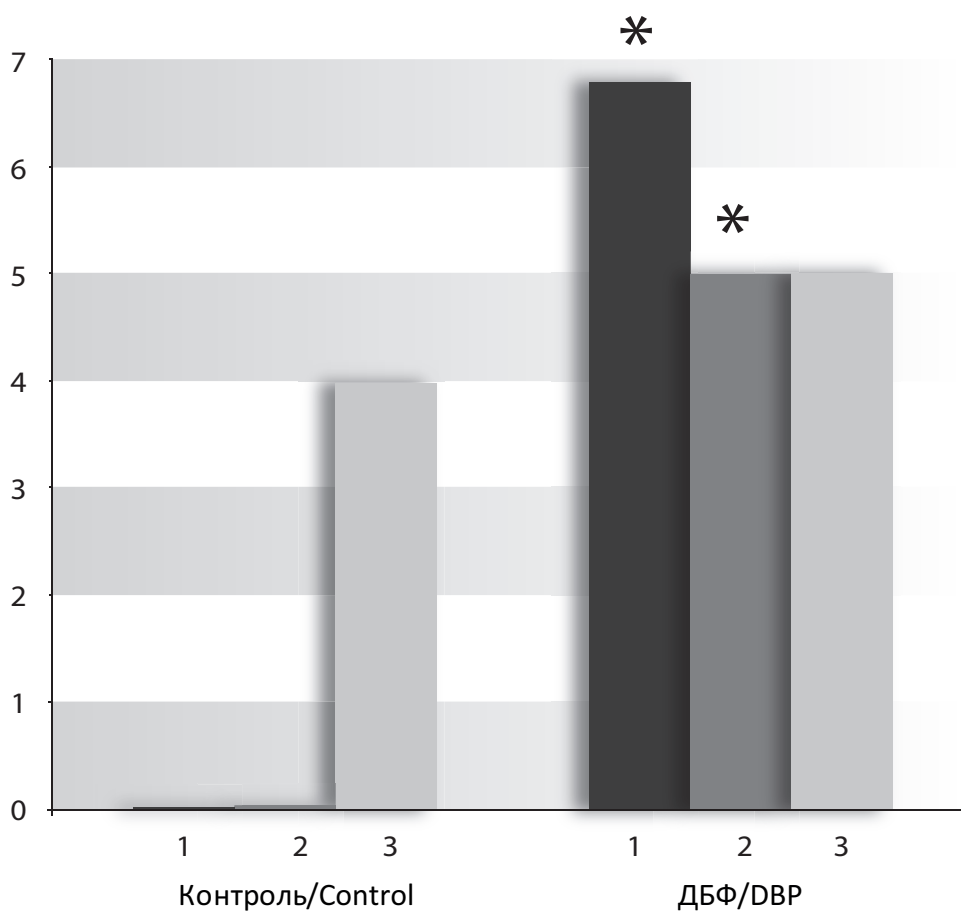
**ТАБЛИЦЯ 2 / TABLE 2**

ПОКАЗНИКИ ЧОЛОВІЧОЇ СТАТЕВОЇ ПОВЕДІНКИ САМЦІВ ЩУРІВ ВІКОМ 18 МІС. ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ДІЇ ДБФ. (М). ЧАС ТЕСТУВАННЯ 15 ХВ / INDICATORS OF MALE SEXUAL BEHAVIOR OF MALE RATS AGED 18 MONTHS AFTER THE PRENATAL ACTION OF DBP. (M). TESTING TIME 15 min

Показник / Feature	Перше тестування / First test		Друге тестування / Second test	
	Інтактні (контроль) (n=6, з них 2 неактивних) / Control (n=6, 2 of them sexually passive)	ДБФ (n=5, з них 1 неактивний) / DBP (n=5, 1 of them sexually passive)	Інтактні (контроль) / Control (n=5)	ДБФ / DBP (n=5)
<b>Латентний період, с: / Latency period, s:</b>				
першої садки / first mount	53,7 (7–100)	63,5 (11–147)	27,0 (1–60)	27,0 (18–39)
першої інтромісії / first intromission	299,7 (76–900)	101,0 (35–240)	51,4** (18–138)	478,8* (42–878)
першої еякуляції / first ejaculation	751,7 (307–900)	>900* (900)	223,4** (125–349)	>900* (900)
Постеякуляторний рефрактерний період, с: / Post-ejaculatory refractory period, s:	823,2 (593–900)	>900* (900)	347,0 (205–530)**	>900* (900)
<b>Кількість: / Number:</b>				
садок без інтромісій / mounts without intromission	5,5 (4–8)	5,0 (4–7)	6,60 (5–7)	2,8* (1–5)
садок з інтромісіями / mounts with intromission	7,5 (0–19)	5,5 (1–9)	24,8 ** (20–32)	2,6 * (0–5)
Еякуляцій / ejaculations	0,2 (0–1)	0 *	1,8 ** (1-3)	0*

**Примітка:** У дужках діапазон індивідуальних коливань; статистичне опрацювання вірогідності за критерієм U Вількоксона-Манна-Вітні. \*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$ , як порівняти з контрольними самцями. \*\*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$ , як порівняти з тією ж групою тварин у першому тестуванні.

**Note:** In brackets the range of individual indices; statistical processing of significance according to the Wilcoxon-Mann-Whitney U test. \*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$  compared to control males. \*\*  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$  compared to the same group of animals in the first testing.

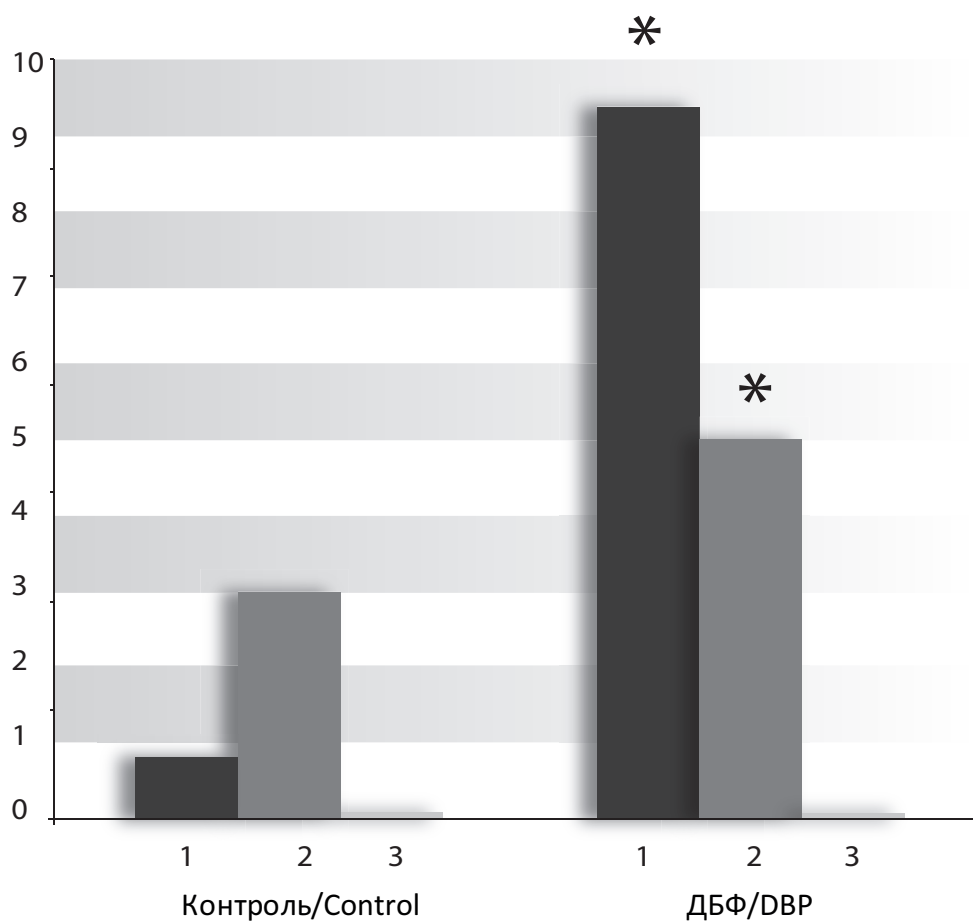


**Рис. 1.** Показники статевої поведінки за гомосексуальним і жіночим типами в самців щурів віком 10 міс. після пренатального застосування дибутилфталату

**Примітки:** по 5 щурів у кожній групі. К – контроль, ДБФ – дибутилфталат; 1 – кількість садок дослідного самця на активного нормального самця, 2 – кількість самців з гомосексуальною поведінкою, 3 – кількість самців з лордозними реакціями;  $p < 0,05$ , як порівняти з відповідним контролем

**Fig. 1.** Indicators of sexual behavior for homosexual and female types in male rats aged 10 months. after prenatal use of dibutyl phthalate

**Notes:** 5 rats in each group. K – Control, DBP – dibutyl phthalate. 1 – the number of cages of the test male on an active normal male, 2 – the number of males with homosexual behavior, 3 – the number of males with lordosis reactions;  $p < 0.05$  compared with the corresponding control



**Рис. 2.** Показники статевої поведінки за гомосексуальним і жіночим типами в самців щурів віком 18 міс. після пренатального застосування дибутилфталату

**Примітки:** див. рис. 1

**Fig. 2.** Indicators of sexual behavior by homosexual and female types in male rats 18 months of age after prenatal use of dibutyl phthalate

**Note:** see fig. 1

вання. У старіючих нормальних щурів статистично значущого вікового зменшення рівня тестостерону в плазмі ( $2,48 \pm 0,71$  нг/мл) не виявлено ( $p > 0,05$ , як порівняти з контрольними молодими), а в ДБФ-групі він дорівнював  $1,04 \pm 0,17$  нг/мл, тобто різниця наближалася до вірогідної ( $0,1 > p > 0,05$ ). Це повністю відповідає передчасній регресії репродуктивного потенціалу, тому що саме тестостерон є гормональним активатором гіпоталамічних нейроендокринних центрів і кори головного мозку. Унаслідок цього відбувається стимуляція статевого потягу до самиці і, відповідно, процептивної поведінки, що й було зареєстровано в молодих дослідних самців. Що ж до активного метаболіту тестостерону –  $5\alpha$ -дигідротестостерону, – то він активує переважно симпатичні й парасимпатичні центри спинного мозку, забезпечуючи статеві рефлекси ерекції, парування та еякуляції [26].

Характеристики чоловічої статевої поведінки та андрогенного статусу дослідних самців свідчать про надмірну маскулінізацію мозку, яка гіпотетично може бути зумовлена індукованою ДБФ гіперсекрецією тестостерону сім'яниками внутрішньоутробного плоду під час статевої диференціації мозку. Аргументом на користь цього припущення є відомості про прямий стимулювальний вплив ДБФ та його метаболіту – монобутилфталату в малих концентраціях на синтез тестостерону в культурі мишачих клітин Лейдига MLTC-1 [27, 28]. Активація стероїдогенезу відбувалася завдяки збільшенню синтезу мітохондріального стероїдогенного регуляторного білка StAR, який залучений до транспорту холестерину з цитозолу до внутрішньої мембрани мітохондрій. Проте у великих концентраціях обидві сполуки гальмували стероїдогенез на рівні відщеплення бокового ланцюга молекули холестерину та  $17\beta$ - і  $3\beta$ -гідроксистероїддегідрогенази.

На перший погляд, результатам експериментів на культурі клітин Лейдига суперечать дані про гальмування стероїдогенезу фетальними сім'яниками щурів на тлі застосування низьких доз ДБФ *in vivo* у так зване вікно статевої диференціації мозку, тобто протягом останнього тижня внутрішньоутробного розвитку [25, 29, 30, 31, 32]. Натомість у роботі [13] є підтвердження нашому припущенню про транзиторну гіперсекрецію тестостерону фетальними сім'яниками щурів в умовах застосування ДБФ. Згодкування самицям щурів ДБФ у дозі 100 мг/кг м.т. з 12 до 19 дня вагітності спричинювало гальмування секреції тестостерону фетальними сім'яниками з подальшим швидким (протягом 24 год) відновленням рівня гормону у фетальній плазмі й далі – його подальшим зростанням завдяки ребаунд-ефекту. Це зростання в критичному періоді статевої диференціації мозку плодів чоловічої статі, на нашу думку, може бути причиною його гіпермаскулінізації.

Хоча й незначне, але вірогідне зменшення аногенітальної відстані в пренатально експонованих до ДБФ щуренят у перші дні після народження, яке є маркером антиандрогенної активності препарату, нібито суперечить припущенню про гіперсекрецію тестостерону сім'яниками внутрішньоутробного плода. Але це протиріччя можна вважати необґрунтованим, якщо взяти до уваги здатність ДБФ взаємодіяти з андрогенними рецепторами в тестах *in vivo* [14], але не *in vitro* [31], тому що вони не задіяні

в андрогензалежній диференціації мозку, що реалізується естрогенними метаболітами тестостерону [33, 18].

Зважаючи на отримані нами дані про пренатальне програмування гіперсексуальної чоловічої поведінки, дещо несподіваними стали результати дослідження жіночої статевої поведінки 10-місячних самців, які свідчать про посилену фемінізацію їхнього нейроендокринного репродуктивного фенотипу, як порівняти з контролем (Рис. 1).

В умовах вилучення шляхом кастрації андрогенного чинника з гормональної регуляції статевої поведінки й естроген-прогестинової підготовки виявлено посилену чутливість нейроендокринних центрів дослідних самців до стимулювальної дії естрогенів. Тварини демонстрували вдвічі збільшену кількість лордозних реакцій при наближенні нормального активного самця, лордозний індекс дорівнював 100, проти 65 у контрольній групі. Водночас, на протигагу контрольним самцям, вони здійснювали садки на нормального самця (в середньому 6,8), що розглядається як гомосексуальна поведінка. Останню виявляли в усіх тестованих самців, тоді як у контрольній групі гомосексуальні прояви не виявлені. Гомосексуальна поведінка зберігалася в усіх дослідних самців і в 18-місячному віці (в середньому 9,4 садки при 0,8 у контролі), а лордозні реакції не виявлені як у дослідній, так і в контрольній групах (Рис. 2).

З огляду на надмірну маскулінізацію мозку під час його раннього програмування ймовірним поясненням одночасної фемінізації може бути ушкодження нейроендокринних структур продуктами індукованого ДБФ оксидативного стресу [1, 34, 35].

Отже, унаслідок уведення щурам в останній тиждень вагітності порогової щодо тератогенного ефекту дози ДБФ у чоловічого потомства формуються порушення нейроендокринної регуляції поведінки й гормональної функції гонад, які можна назвати «пренатальним ДБФ-синдромом». Він маніфестується такими ознаками: а) передчасне статеве дозрівання; б) підвищений рівень тестостерону в плазмі крові; в) гіперактивна чоловіча статеві поведінка; г) гомосексуальна поведінка; ґ) здатність до проявів жіночої статевої поведінки за умови кастрації та наступної естроген-прогестинової стимуляції; д) передчасне згасання статевої потенції з віком при одночасному збереженні гомосексуальної поведінки.

## ВИСНОВКИ

**1** Пренатальна експозиція внутрішньоутробних плодів щурів чоловічої статі до порогової дози ДБФ протягом останнього тижня гестації програмує передчасне статеве дозрівання, гіперандрогенний стан, гіперсексуальний і гомосексуальний типи поведінки в статевозрілому віці.

**2** Одним з наслідків пренатальної дії порогової дози ДБФ на самців є посилені фемінізація мозку, що в умовах естроген-прогестинового навантаження виявляється збільшенням частоти лордозних реакцій на присутність нормального активного самця.

**3** У старіючих дослідних самців відбувається передчасне згасання статевої потенції при одночасному збереженні гомосексуальної поведінки.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Reznikov AG (2014) Reproductive targets of endocrine disruptors. *Reprod Endocrinol* 17(3):18–25 [In Rus.]. ISSN 2309-4117
2. Yaglova NV, Yaglov VV. Endocrine disruptors are a novel direction of endocrinologic scientific investigation. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012 June;(3):56–61. Available: <https://vestnikramn.spr-journal.ru/jour/article/view/333/271>.
3. Andersson AM, Frederiksen H, Grigor KM, Toppari J, Skakkebaek NE. Special issue on the Impact of endocrine disruptors on reproductive health. *Reproduction*. 2014 Mar 4;147(4):E1. DOI: 10.1530/REP-14-0060.
4. Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol*. 2011 Apr;31(3):363–73. DOI: 10.1016/j.reprotox.2010.12.055.
5. Vaiserman A. Early-life exposure to endocrine disrupting chemicals and later-life health outcomes: an epigenetic bridge? *Aging Dis*. 2014 Jan 28;5(6):419–29. DOI: 10.14336/AD.2014.0500419.
6. Albert O, Jüggou B. A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis topothalates from fetal life to adulthood. *Hum Reprod Update*. 2014 Mar-Apr;20(2):231–49. DOI: 10.1093/humupd/dmt050.
7. Axelstad M, Hass U, Scholze M, Christiansen S, Kortenkamp A, Boberg J. Reduced sperm counts in rats exposed to human relevant mixtures of endocrine disruptors. *Endocr Connect*. 2018 Jan;7(1):139–148. Epub 2017 Dec 4. DOI:10.1530/EC-17-0307.
8. Peretz J, Vrooman L, Rieke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser et al. Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and humanevidence, 2007–2013. *Environ Health Perspect*. 2014 Aug; 122(8):775–86. DOI:10.1289/ehp.1307728.
9. Marques-Pinto A, Carvalho D. Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocr Connect*. 2013 Sep 17; 2 (3):R15–29. DOI: 10.1530/EC-13-0036.
10. Hannon PR, Flaws JA. The effects of phthalates on the ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 Feb 2;6:8. DOI: 10.3389/fendo.2015.00008.
11. Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, Flaws JA. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *Endocrinol*. 2017 Jun;233(3):R109–R129. DOI: 10.1530/JOE-17-0023.
12. Zhang Y, Jiang X, Chen B. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL. *Reprod Toxicol*. 2004 Jul;18(5):669–76. DOI: 10.1016/j.reprotox.2004.04.009.
13. Clewell RA, Kremer JJ, Williams CC, Campbell JL, Sochaski MA, Andersen ME et al. Kinetics of selected di-n-butyl phthalate metabolites and fetal testosterone following repeated and single administration in pregnant rats. *Toxicology*. 2009 Jan 8;255(1-2):80–90. DOI: 10.1016/j.tox.2008.10.010.
14. Lee BM, Koo HJ. Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J Toxicol Environ Health A*. 2007 Aug;70(15-16):1365–70. DOI: 10.1080/15287390701432285.
15. Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect*. 2001 Mar;109(3):229–37. DOI: 10.1289/ehp.01109229.
16. Reznikov AG, Sachynska OV, Limareva AA, Falyush OA, Perchik IG (2017) Hypersexual behavior and hyperandrogenism in F1 male rats caused by dibutylphthalate treatment of pregnant. *Fiziol Zh* 63(5):13–20 [In Ukr.]. Available: [https://fz.kiev.ua/.../2017\\_063/2017\\_5/5-13-20](https://fz.kiev.ua/.../2017_063/2017_5/5-13-20).
17. Reznikov AG. Pathophysiological and clinical aspects of functional teratology. *The art of healing*. 2007. No. 1, C.10–15. [In Rus.]. Available: <https://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/>.
18. Reznikov AG. Hormone-neurotransmitter imprinting in the neuroendocrine control of reproduction. *Harwood: Harwood Acad Publ*. 1994; 90 p. DOI: 10.18370/2309-4117.2016.29.8-15.
19. Holson RR, Gough B, Sullivan P, Badger T, Sheehan DM. Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1995;17:393–401.
20. Hull EM, Dominguez JM. Sexual behavior in male rodents. *Horm. Behav*. 2007; 52(1):45–55.
21. Foster PM, Cattley RC, Mylchreest E. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food Chem Toxicol*. 2000;38: S97–9. PMID: 10717378.
22. Lisakovskaia OV, Kropotov AV, Khotimchenko IuS (2001) Seasonal features of the effect of adaptogens on sex behavior of experimental animals. *Eksp Klin Farmakol* 60(6):60–2 [In Rus.]. ISSN 0869-2092.
23. Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Felisbino SL et al. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(13-14):972–84. DOI: 10.1080/15287391003751760.
24. Motohashi M, Wempe MF, Mutou T, Okayama Y, Kansaku N, Takahashi H, et al. In utero-exposed di(n-butyl) phthalate induce dose dependent, age-related changes of morphology and testosterone-biosynthesis enzymes/associated proteins of Leydig cell mitochondria in rats. *J Toxicol Sci*. 2016 Apr;41(2):195–206. DOI: 10.2131/jts.41.195.
25. Drake AJ, van den Driesche S, Scott HM, Hutchison GR, Seckl JR, Sharpe RM. Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology*. 2009 Nov;150(11):5055–64. DOI: 10.1210/en.2009-0700.
26. Gladkova AI (1999) The regulation of male sexual behavior by the sex hormones. *Usp Fiziol Nauk* 30(1):97–105 [In Rus.]
27. Chen X, Zhou QH, Leng L, Chen X, Sun ZR, Tang NJ. Effects of di(n-butyl) and monobutyl phthalate on steroidogenesis pathways in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013 Sep;36(2):332–8. DOI: 10.1016/j.etap.2013.04.013.
28. Wang Y, Song L, Hong X, Cui L, Zhang Z, Xiao H et al. Low concentrations mono-butyl phthalate stimulates steroidogenesis by facilitating steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse Leydig tumor cells (MLTC-1). *Chem Biol Interact*. 2006 Dec 1;164(1–2):15–24. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.08.022.
29. Johnson KJ, McDowell EN, Viereck MP, Xia JQ. Species-specific dibutyl phthalate fetal testis endocrine disruption correlates with inhibition of SREBP2-dependent gene expression pathways. *Toxicol Sci*. 2011 Apr;120(2):460–74. DOI: 10.1093/toxsci/kfr020.
30. Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci*. 2004 Sep;81(1):60–8. DOI: 10.1093/toxsci/kfh169.
31. Shultz VD, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW. Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl)phthalate. *Toxicol Sci*. 2001 Dec;64(2):233–42. DOI: 10.1093/toxsci/64.2.233.
32. Struve MF, Gaido KW, Hensley JB, Lehmann KP, Ross SM, Sochaski MA et al. Reproductive toxicity and pharmacokinetics of di-n-butyl phthalate (DBP) following dietary exposure of pregnant rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009 Aug;86(4):345–54. DOI: 10.1002/bdrb.20199.
33. Reznikov AG. Sex hormones and brain differentiation. *Kiev: Naukova Dumka*, 1982, 252 p. [In Rus.]
34. Aly HA, Hassan MH, El-Beshbishy HA, Alahdal AM, Osman AM. Dibutyl phthalate induces oxidative stress and impairs spermatogenesis in adult rats. *Toxicol Ind Health*. 2016 Aug;32(8):1467–77. DOI: 10.1177/0748233714566877.
35. Sidorkiewicz I, Zarkba K, Woiczyski S, Czerniecki J. Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system. *Toxicol Ind Health*. 2017 Jul;33(7):601–9. DOI: 10.1177/0748233717695160.



## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Alexander G. Reznikov** – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Cor. Member of the NAS of Ukraine, Full Member of the NAMS of Ukraine, Head of the Department of Endocrinology of Reproduction and Adaptation, *ORCID: 0000-0002-0018-399X*

**Olha V. Sachynska** – Cand. Sci. (Biology), Chief Researcher

**Anna A. Lymareva** – Senior Research Fellow



## ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

**Резніков Олександр Григорович** – завідувач відділу ендокринології репродукції та адаптації, д.м.н., проф., чл.-кор. НАН України, академік НАМН України, *ORCID: 0000-0002-0018-399X*

**Сачинська Ольга Володимирівна** – провідний науковий співробітник, к.б.н.

**Лимарева Анна Анатоліївна** – старший науковий співробітник



## SUMMARY

**Age dynamics of changes in sexual behavior and androgen status of male rats caused by prenatal exposure to low dose dibutylphthalate****Alexander G. Reznikov** , **Olha V. Sachynska**,  
**Anna A. Lymareva***V. P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, NAMSU, 69 Vyshgorodska, Kyiv 04114, Ukraine*

The aim of this work was to study the sexual maturation, testicular hormonal activity and sexual behavior of Wistar male rats, which were born to mothers treated intragastrically with di-n-butylphthalate (DBP) for 15-21 days of their pregnancy, at a daily dose of 100 mg/kg b.w., that do not cause visible developmental morphological abnormalities. Their sexual behaviour was analyzed via the proceptive reactions, the latent and refractory periods of time and number of mounts, intromissions and ejaculations at the presence of a receptive female. Female sexual behaviour was evaluated by lordosis responses of orchidectomized and activated with estradiol and progesterone males in the presence of a normal male. Prenatal administration of DBP induced an accelerated onset of puberty. In young mature males (6-month old), it was, unexpectedly (as for endocrine disruptors), discovered that was featured by hyperactive central (motivational) and peripheral (copulative and ejaculatory) components of male sexual behavior and a two-fold increase in the average levels of plasma testosterone. In 10-month old rats, we found both homosexual and enhanced lordotic behavior. In aging animals (18 months), hyperandrogenism had switched to quite the opposite condition: more than two-fold decrease in the levels of plasma testosterone, close to statistical significance; and a lessening of male sexual behavior compared to controls. These findings show the presence of epigenetic alterations in the programming of the parts of the brain responsible for sexual differentiation (the hypermasculinization combined with feminization) and a regulation of testicular hormonopoeisis, as well as premature aging of the reproductive organs resulting from the prenatal influence of low dose DBP. Thereby we proposed the original concept of prenatally determined DBP syndrome. And, finally, the possible mechanism of these changes in the reproductive system are discussed.

**Key words:** dibutylphthalate; prenatal effect; sexual behavior; testosterone; male rats.

**For citation:** Reznikov AG, Sachynska OV, Lymareva AA. Age dynamics of changes in sexual behavior and androgen status of male rats caused by prenatal exposure to low dose dibutylphthalate. *Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.* 2019;25(3):260–67

The article was received on June 20, 2019 | For review, September 2, 2019 | Accepted for publication on September 18, 2019



**Alexander G. Reznikov**  
ORCID: 0000-0002-0018-399X  
reznikov39@gmail.com



## РЕЗЮМЕ

**Возрастная динамика изменений полового поведения и андрогенного статуса самцов крыс, вызванных пренатальной экспозицией к низким дозам дибутилфталата****А. Г. Резников** , **О. В. Сачинская**, **А. А. Лимарева***Государственное учреждение «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины», ул. Вышгородская, 69, Киев 04114, Украина*

Целью работы было исследование полового созревания, гормональной активности семенников и полового поведения самцов крыс линии Вистар, рожденных матерями, которые в течение последней недели беременности получали перорально ди-н-бутилфталат (ДБФ) в дозе 100 мг/кг массы тела, которая не вызывает анатомических дефектов развития. Мужское половое поведение оценивали по процептивным реакциям, продолжительности латентных и рефрактерных периодов и количеству садок, интромиссий и эякуляций в присутствии рецептивной самки. Женское половое поведение оценивали по лордозным реакциям орхидэктомизированных и активированных введением эстрадиола и прогестерона самцов в присутствии нормального самца. Пренатальное применение ДБФ привело к акселерации полового созревания. У молодых половозрелых самцов (6 мес.) обнаружен неожиданный для андрогенных дисрапторов феномен, а именно гиперандрогенное состояние, которое характеризовалось гиперактивными центральным (мотивационным) и периферическим (копуляционным и эякуляционным) компонентами мужского полового поведения и повышенным в 2 раза уровнем тестостерона в плазме крови. В возрасте 10 мес. у них наблюдали гомосексуальное и усиленное лордозное поведение. У стареющих животных (18 мес.) гиперандрогенизм меняется на диаметрально противоположное состояние: более чем двукратное снижение уровня тестостерона в плазме крови на грани достоверности и ослабление мужского полового поведения в сравнении с контрольными крысами. В то же время их характеризовало отсутствие лордозных реакций наряду с усилением гомосексуального мотивационного поведения. Полученные данные свидетельствуют об эпигенетических нарушениях программы половой дифференциации мозга (гипермаскулинизация в сочетании с феминизацией мозга) и регуляции гормональной функции половых желез, а также о преждевременном старении репродуктивных функций в результате пренатального воздействия низкой дозы ДБФ. Выдвинуто представление о пренатально детерминированном ДБФ-синдроме. Обсуждаются возможные механизмы выявленных изменений репродуктивной системы.

**Ключевые слова:** дибутилфталат, пренатальное действие, половое поведение, тестостерон, самцы крыс.

**Для цитирования:** Резников АГ, Сачинская ОВ, Лимарева АА. Возрастная динамика изменений полового поведения и андрогенного статуса самцов крыс, вызванных пренатальной экспозицией к низким дозам дибутилфталата. *Журнал Национальной академии медицинских наук Украины.* 2019;25(3):260–67

Статья поступила в редакцию 20 июня 2019 | Направлена на рецензирование 2 сентября 2019 | Принята в печать 18 сентября 2019