

DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-1.49

# Гістологічні та каріометричні зміни медіально-преоптичного ядра гіпоталамуса самців щурів, експонованих до низьких доз дибутилфталату під час внутрішньоутробного розвитку

Л.І. Полякова,  
О.Г. Резніков

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

**Резюме.** Статеві особливості нейроендокринних функцій і поведінки програмується гормонами під час внутрішньоутробного розвитку плоду. Цей процес може порушуватись хімічними речовинами з гормоноподібною активністю, так званими ендокринними дизрапторами (ЕД). Одним із найбільш поширених у довкіллі ЕД є дибутилфталат (ДБФ), який у великих дозах через організм вагітної матері викликає в плоду синдром тестикулярної дисгенезії. Однак віддалені ефекти малих доз вивчені вкрай недостатньо. У попередніх експериментальних дослідженнях на щурах у молодих потомків матерів, експонованих до малих доз ДБФ, виявлені гіперактивна статева поведінка і гіперандрогенний стан на тлі відсутності анатомічних дефектів. Морфологічний субстрат цих змін був невідомий. **Мета** — з'ясувати участь медіально-преоптичного ядра (МПЯ) гіпоталамуса у функціональних змінах репродуктивної системи, індукованих пренатальною експозицією до низьких доз ДБФ у критичному періоді раннього онтогенезу, коли відбувається статева диференціація мозку (СДМ). **Матеріал і методи.** Щури Вістар отримували перорально ДБФ з 15 по 21 день вагітності по 100 мг/кг м. т. на день, контрольні — розчинник препарату. У чоловічого потомства 6- та 18-місячного віку проводили гістологічне та каріометричне дослідження нейронів медіально-преоптичного ядра гіпоталамуса. **Результати.** У молодих тварин виявлено вакуолізацію перикаріонів, наявність пікнотичних нейронів поруч з активними та інші гістологічні ознаки функціонального перенапруження і виснаження МПЯ. У тварин, які старіють, у МПЯ переважали нейрони з меншими розмірами, ніж у контрольних щурів відповідного віку. Розміри ядер нейронів були більш ніж на 50% менші за контрольні показники. **Висновки.** Результати морфологічного дослідження МПЯ молодих щурів, пренатально експонованих до низьких доз ДБФ, свідчать про функціональне перенапруження і виснаження нейронів і узгоджуються з попередніми даними про гіперактивну статеву поведінку та збільшений рівень тестостерону в плазмі крові, що свідчить про залучення МПЯ до порушення СДМ. Гістологічні

## Оригінальні дослідження

і каріометричні характеристики МПЯ піддослідних тварин, які старіють, вказують на його прискорену вікову морфо-функціональну інволюцію, що корелює з суттєво послабленою статевією поведінкою та зменшеним рівнем тестостерону в плазмі крові.

**Ключові слова:** дибутилфталат, пренатальна дія, нейроендокринна система, гіпоталамус, самці щурів.

Поміж етіологічних чинників довкілля, які негативно впливають на стан здоров'я людини й тварин через порушення ендокринної регуляції, привертають увагу хімічні ЕД [1-5]. ЕД здійснюють патогенну дію завдяки здатності взаємодіяти з гормональними рецепторами, безпосередньо пригнічувати синтез і метаболізм гормонів, активувати процеси перекисного окислювання ліпідів та білків, змінювати перебіг біохімічних реакцій.

Найбільш уразливою до ЕД виявилась репродуктивна система [6-9]. Це стосується і фталатів, яким притаманна антиандрогенна активність і які присутні у виробках із пластмас, покритті лікарських засобів, предметах побуту і промисловості [10-13]. Фталати знаходяться у 90-95% зразків амніотичної рідини, крові дітей і дорослих. Подібно до інших ЕД, при надходженні до вагітної або матері, яка годує, фталати здатні проникати в організм плоду або новонародженого і викликати порушення СДМ та віддалені ефекти, такі як безпліддя, аномалії поведінки, тощо [14-18].

Раніше ми повідомили про зміни статевої поведінки і андрогенного статусу в молодих самців щурів і самців щурів, які старіють, матері яких в останній тиждень вагітності отримували ДБФ у дозах, що не викликають тератогенних ефектів у потомства, за винятком незначної транзитornoї зміни аногенітальної відстані [19-20]. Як відомо, нейроендокринний центр чоловічої статевої поведінки гризунів розташований у МПЯ, яке є найважливішим локусом андрогензалежної СДМ [21]. Воно є парним утворенням, що на гістологічних препаратах виглядає як скупчення нервових та нейросекреторних клітин у преоптично-передньогіпоталамічній зоні гіпоталамуса. З огляду на роль МПЯ в СДМ, ми вважали за доцільне порівняти морфологічні характеристики МПЯ чоловічого потомства пренатально

експонованих до ДБФ щурів із раніше виявленим феноменом гіперсексуальної поведінки та гіперандрогенемії і наступним прискоренням інволютивних вікових змін репродуктивної системи.

**Мета роботи** — з'ясувати участь МПЯ у функціональних змінах репродуктивної системи, індукованих пренатальною експозицією до низьких доз ДБФ у критичному періоді раннього онтогенезу, коли відбувається СДМ.

### Матеріал і методи

Досліди проводили на щурах Вістар, отриманих із розплідника Інституту. Умови утримання та використання тварин в експериментах відповідали біоетичним вимогам Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальними та іншими науковими цілями (Страсбург, 18 березня 1986 р.) та Рекомендаціями Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 20 вересня 2001 р.). Проект дослідження схвалено біоетичною комісією ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України» (протокол № 13-КЕ від 25.05.2016 р.).

Після двотижневого цитологічного дослідження вагінальних мазків відбирали для запліднення самиць із регулярними естральними циклами. День появи спермії в мазках після парування з самцями вважали першим днем гестації. Із 15 по 21 день вагітності самицям крізь шлунковий металевий катетер вводили олійний розчин ДБФ (НВП «Альффарус», Україна) у добовій дозі 100 мг/кг м.т. Контрольні тварини отримували розчинник препарату.

Із новонародженого потомства чоловічої статі формували дослідні і контрольні групи по 5-7 тварин, відбираючи в кожну щуренят

із різних послідів. У віці 6 та 18 міс. тварин знеживлювали миттєвою декапітацією під слабким ефірним наркозом. Ділянку мозку, що відповідає розташуванню МПЯ, ізолювали, орієнтуючись на оптичну хіазму, серединне підвищення і мамілярні тіла гіпоталамуса; великі півкулі відсікали на 2-3 мм латеральніше бокової поверхні гіпоталамуса. Тканинний блок фіксували в рідині Буена. Фронтальні серійні зрізи товщиною 7 мкм забарвлювали азур-еозином за Паппенгеймом. Сексдиморфну ділянку гіпоталамуса (МПЯ) визначали як скупчення великих нейронів між *anterior commissure* та *optic chiasm* по обох боках від щілиноподібної порожнини третього шлуночка. Для гістологічних досліджень використовували мікроскоп «Leica DME» («Leica Microsystems», Німеччина). Мікрофотографії знімали цифровою фотокамерою «Canon Power Shot A650 IS» («Canon», Японія).

На мікрофотографіях МПЯ вимірювали два взаємно перпендикулярні діаметри ядер нейронів і вираховували їх об'єм за формулою С.М. Блінкова:  $V=D \times d^2 \times \pi / 6$ . У кожній контрольній тварини (n=5) вимірювали не менше 100 ядер нейронів, у піддослідній — не менше 200 ядер, тому що морфологічні дослідження вказували на значну гетерогенність їх популяції. Проводили розподіл нейронів за розміром їх ядер, розраховували кількість нейронів кожного класу в процентах і будували гістограми.

Вірогідність різниці між чисельними значеннями піддослідної і контрольної груп визначали за t-критерієм Стьюдента з використанням комп'ютерної програми Excel. Різницю вважали статистично вірогідною при значенні  $p < 0,05$ .

## Результати та обговорення

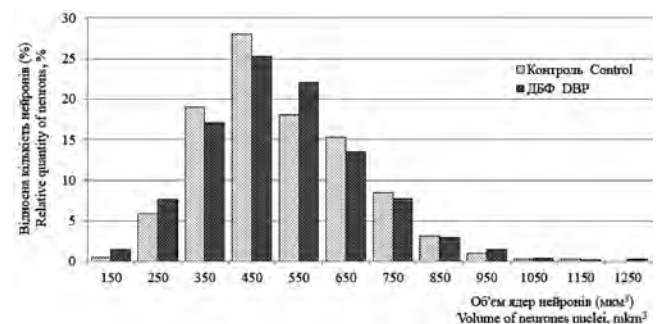
У контрольних самців щурів 6-місячного віку переважна частина нейронів МПЯ мала полігональну форму і містила овальні ядра. Розмір нейронів та їх ядер варіював у широких межах (рис. 1). Більше великих нейронів знаходили в периферичній частині МПЯ, де вони розташовані менш щільно, ніж у центральній (рис. 1А). В їх перикаріонах досить інтенсивно забарвлювався тигроїд. Нейрони з вакуолями в перикаріоні зустрічались дуже рідко.

Невелика частина нейронів забарвлювалась гіперхромно, а також зустрічались зморщені (пікнотичні) нейрони. Значна кількість пікнотичних нейронів була у 2 із 6 тварин цієї групи. У центральній частині МПЯ знаходили скупчення тісно розташованих малих нейронів, у яких навколо дрібних ядер був тоненький шар цитоплазми (рис. 1D).

У молодих щурів, матері яких отримували ДБФ в останній тиждень вагітності, у МПЯ переважали за кількістю нейрони, що мали більші розміри перикаріонів, ніж у контрольних тварин (рис. 2). Цитоплазма перикаріонів у багатьох клітинах була світлішою, ніж у контрольних тварин, вакуолізованою. Їх перикаріони нерідко набували овальної форми. Нейрони мали переважно кулясті великі ядра з чітким великим ядрцем. Пікнотичних нейронів у складі МПЯ було значно більше, ніж у контрольних тварин (рис. 2B); їх знаходили у всіх тварин, експонованих до ДБФ. Щільність розташування нейронів у межах МПЯ була меншою, ніж у контрольних тварин. Привертає увагу збільшена кількість та інтенсивна забарвленість гліальних клітин у центральній та периферичній частинах МПЯ (рис. 2A, 2C).

У молодих щурів контрольної групи середній об'єм ядер нейронів МПЯ дорівнював  $455,00 \pm 18,91$  мкм<sup>3</sup>, у піддослідних  $478,75 \pm 19,70$  мкм<sup>3</sup>, тобто не відрізнявся від контролю ( $p > 0,5$ ). Аналіз гістограм не виявив суттєвих розбіжностей у розподілі нейронів (рис. 3).

У МПЯ контрольних самців щурів 18-місячного віку розмір нейронів варіював у широких межах. Значна частка клітин мала



**Рис. 3.** Гістограми розподілу нейронів МПЯ за об'ємом ядер у 6-місячних щурів контрольної групи та щурів — нащадків матерів, які отримували ДБФ в останній тиждень вагітності.

**Fig. 3.** Histograms of the — distribution of the MPN neurones by nuclei volumes in 6-month-old control rats and offspring of mothers who received DBP in the last week of pregnancy.

## Оригінальні дослідження

гіперхромні перикаріони значно меншого розміру (рис. 4А). Також зустрічали зморщені нейрони. На відміну від молодих щурів, переважна частина нейронів мала великі перикаріони, зазвичай овальної форми, які забарвлювались гіпохромно, оскільки в них містились великі вакуолі (рис. 4В, 4С, 4Е). В ядрах таких нейронів знаходили великі ядрця (рис. 4С, 4Д). Більше великих нейронів було в периферичній частині МПЯ, де вони розташовані менш щільно, ніж у центральній (рис. 4F).

У 18-місячних щурів, матері яких отримували ДБФ в останній тиждень вагітності, у МПЯ переважали нейрони, що мали менші розміри перикаріонів, ніж у контрольних тварин відповідного віку (рис. 5А, 5В). Перикаріони більшості нейронів були полігональної форми, в них інтенсивно забарвлювався тигроїд – скупчення гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (рис. 5С, 5D). Переважно нейрони мали кулясті ядра з чітким великим ядрцем. На відміну від контрольних тварин 18-місячного віку, а також молодих щурів дослідної групи, нейронів із вакуолями в перикаріоні було значно менше. Пікнотичних нейронів у складі МПЯ було не більше, ніж у контрольних тварин.

У 18-місячних контрольних щурів середній об'єм ядер нейронів МПЯ склав  $565,3 \pm 41,6$  мкм<sup>3</sup>, отже зростає проти аналогічного показника в молодих тварин ( $p < 0,05$ ). У піддослідних самців він дорівнював  $339,3 \pm 61,2$  мкм<sup>3</sup>, тобто був значно менший порівняно з відповідним віковим контролем ( $p < 0,05$ ). Аналіз гістограм виявив суттєві розбіжності в розподілі нейронів. Так, у тварин, які зазнали пренатальної експозиції до ДБФ, було значно більше, ніж у контрольних тварин, нейронів із невеликим об'ємом ядер (до 400 мкм<sup>3</sup>) і значно менше з великим об'ємом (більше ніж 750 мкм<sup>3</sup>) (рис. 6).

МПЯ гризунів належить суттєва роль у регуляції важливих фізіологічних функцій – регуляції температурного гомеостазу, реакція на стресові подразники, нейроендокринній регуляції чоловічої статевої поведінки й циклічних процесів у жіночій репродуктивній системі, тощо. Зміни цитоархітекtonіки МПЯ віддзеркалюють стан адаптивних реакцій нейроендокринної системи, гормонального та метаболічного гомеостазу, коливання

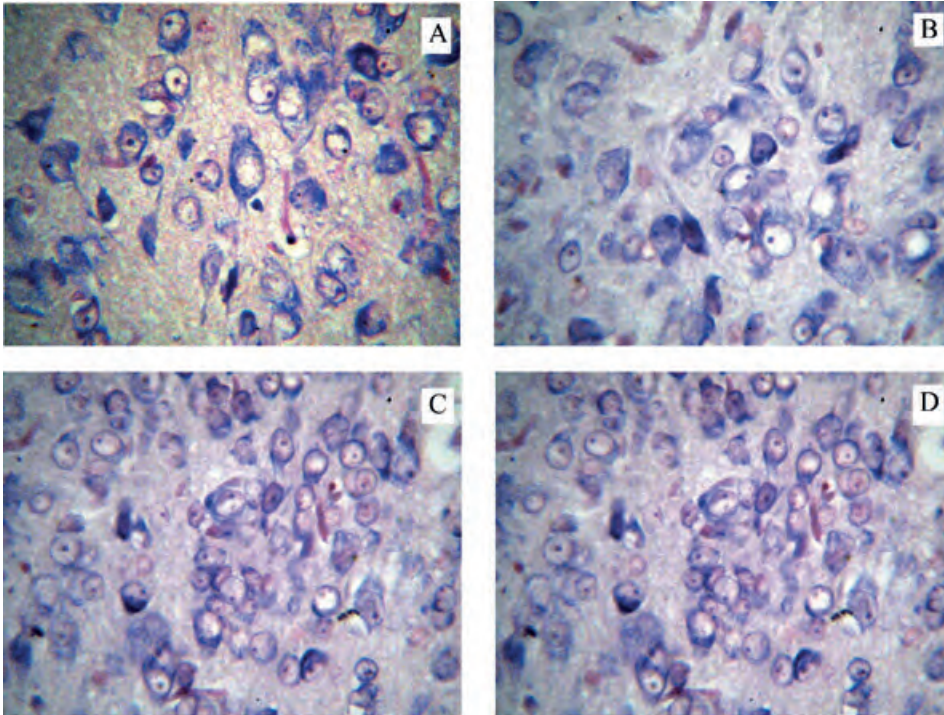
температурного режиму, патологічні процеси в репродуктивній сфері.

Проведене нами гістологічне дослідження МПЯ молодих самців щурів, матері яких отримували ДБФ у порогових дозах щодо анатомічних дефектів потомства, виявило морфологічні ознаки функціонального виснаження активності нейронів. Наявність подекуди досить великої кількості зморщених перикаріонів поруч із вакуолізованими свідчить, скоріш за все, на користь їх перенапруження, а не токсичного впливу ДБФ, адже цей патогенний чинник діяв лише у внутрішньоутробному житті плоду. Ще одним аргументом, на нашу думку, є супутня гіперактивна статеві поведінка дослідних тварин.

Враховуючи, що нейроендокринний центр чоловічої статевої поведінки в гризунів розташований у зоні МПЯ, можна стверджувати, що дані гістологічного дослідження МПЯ піддослідних тварин узгоджуються з гіперактивною статевою поведінкою [19-20]. Результати морфометричного дослідження ядер нейроцитів МПЯ не виявили змін під впливом пренатальної експозиції до ДБФ.

У цілому, морфологічні зміни МПЯ в молодих тварин, індуковані впливом низьких доз ДБФ у критичний період СДМ, підтвердили припущення, що функціональні поведінкові та гормональні відхилення зумовлені певною мірою порушенням розвитку саме цієї сексдиморфної ділянки мозку.

Застосована нами добова доза ДБФ відповідає найменшій дозі щодо побічних анатомічних ефектів у репродуктивній системі і в 5 разів нижче за дозволу оральну добову експозицію людини [14]. На відміну від послаблювальної програмувальної дії великих доз ДБФ (250 мг/кг м. т. і вище) на статевою поведінку самців щурів на тлі порушення тестикулярного стероїдогенезу, сперматогенезу, дисгенезії гонад та інших аномалій [22], низька доза спричинила парадоксальний ефект, що потребувало пояснення. Йдеться про індуковану ДБФ надмірну програмувальну функціональну маскулінізацію мозку, що є досить дивним з огляду на антиандрогенні властивості цієї речовини, зумовлені перш за все пригніченням утворення тестостерону в статевих залозах внутрішньоутробного плоду. Адже саме тестостерон відповідає за СДМ за чоловічим типом.

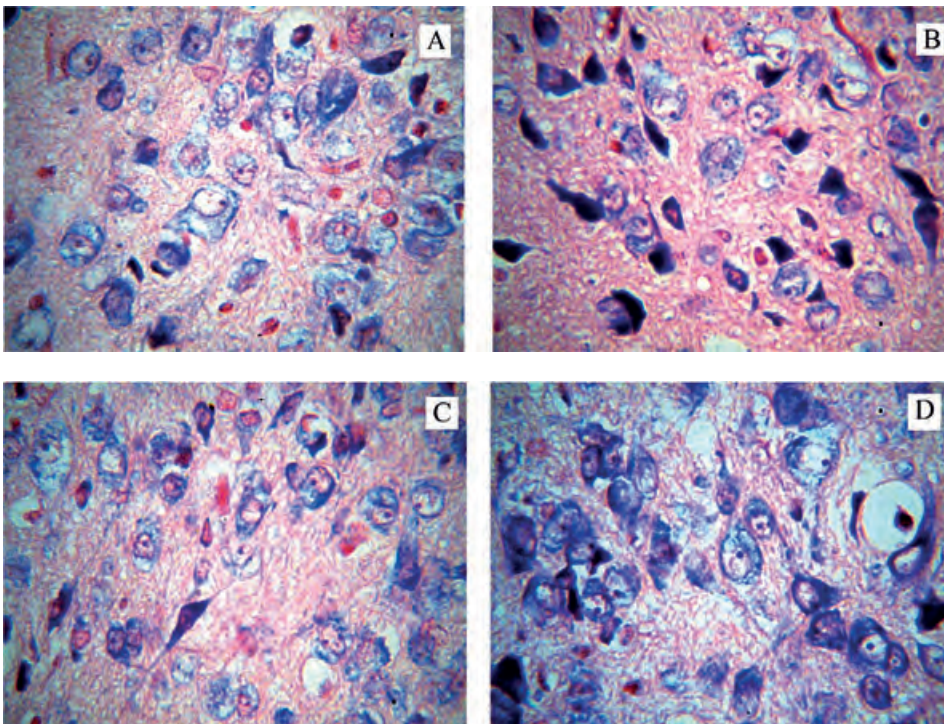


**Рис. 1.** Мікрофотографії МПЯ контрольних самців щурів 6-місячного віку.

*Примітка:* А — периферична частина МПЯ, переважно великі нейрони; В — гіперхромні нейрони в периферичній частині МПЯ; С — центральна частина МПЯ; серед щільного скупчення нейронів є пікнотичні клітини; D — скупчення дрібних нейронів у центральній частині МПЯ. Азур-еозин,  $\times 400$ .

**Fig. 1.** Photomicrographs of the medial preoptic nucleus (MPN) of 6-month-old control male rats.

*Note.* A — peripheral part of the MPN, mostly large neurons; B — hyperchromic neurons in the peripheral part of the MPN; C — the central part of the MPN; there are pyknotic cells among the dense cluster of neurons; D — accumulation of small neurons in central part of the MPN. Azur-eosin.  $\times 400$ .



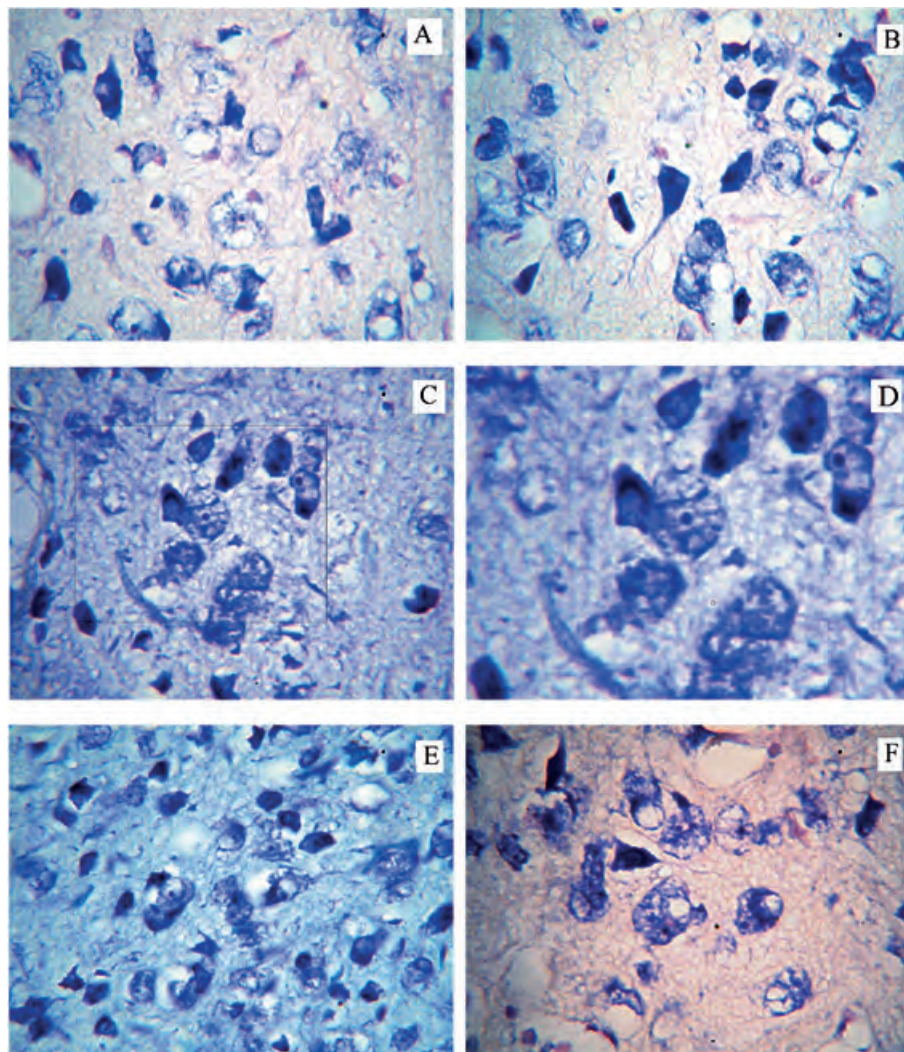
**Рис. 2.** Мікрофотографії МПЯ самців щурів 6 місячного віку матері яких отримували ДБФ в останній тиждень вагітності.

*Примітка:* А — периферична частина МПЯ, великі нейрони з вакуолізованою цитоплазмою перикаріонів поруч з активними нормохромними і пікнотичними нейронами; В — пікнотичні нейрони поруч із нормохромними і світлішими нейронами в периферичній частині МПЯ; С — гіперхромні і нормохромні нейрони в центральній частині МПЯ; D — центральна частина МПЯ. Збільшена кількість гліальних клітин (рожеве забарвлення) в центральній та периферичній частинах МПЯ. Азур-еозин,  $\times 400$ .

**Fig. 2.** Photomicrographs of the MPN of 6-month-old rats whose mothers received dibutyl phthalate (DBP) in the last week of pregnancy.

*Note.* A — peripheral part of the MPN, large neurons with vacuolated cytoplasm of perikaryons next to active normochromic and pyknotic neurons; B — pyknotic neurons next to normochromic and light coloured ones in the peripheral part of the MPN; C — hyperchromic and normochromic neurons in the central part of the MPN; D — the central part of the MPN. Increased number of glial cells (pink color) in the central and peripheral parts of the MPN. Azur-eosin.  $\times 400$ .

## Оригінальні дослідження

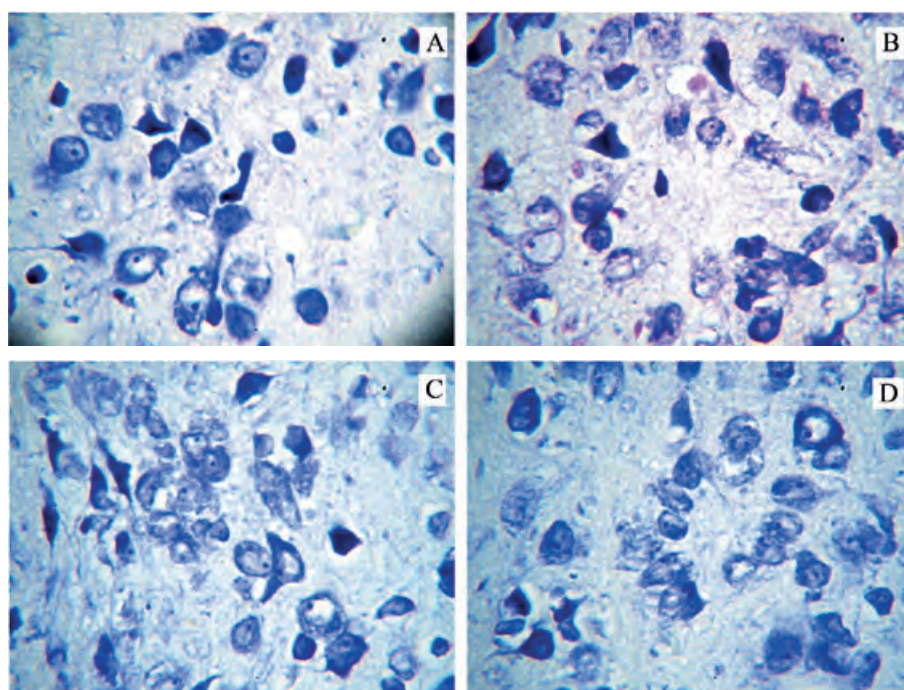


**Рис. 4.** Мікрофотографії МПЯ контрольних самців щурів 18-місячного віку.

*Примітка:* А, В — пікнотичні нейрони поруч зі світлими (вакуольна дистрофія) в периферичній частині МПЯ; С — гіперхромні нейрони поруч із гіпохромними; D — збільшений виділений фрагмент; Е — гетерогенна популяція нейронів у центральній частині МПЯ; F — переважно великі нейрони з вакуолізованою цитоплазмою перикарионів у центральній частині МПЯ. Азур-еозин. А, В, С, D, F —  $\times 400$ ; E —  $\times 200$ .

**Fig. 4.** Photomicrographs of the MPN of 18-month-old control male rats.

*Note.* A, B — pyknotic neurons next to light coloured ones (vacuolar dystrophy) in the peripheral part of the MPN; C — hyperchromic neurons next to hypochromic ones; D — enlarged selected fragment; E — heterogeneous population of neurons in the central part of the MPN; F — mostly large neurons with vacuolized cytoplasm of perikaryons in the central part of the MPN; Azur-eosin. A, B, C, D, F —  $\times 400$ ; E —  $\times 200$ .

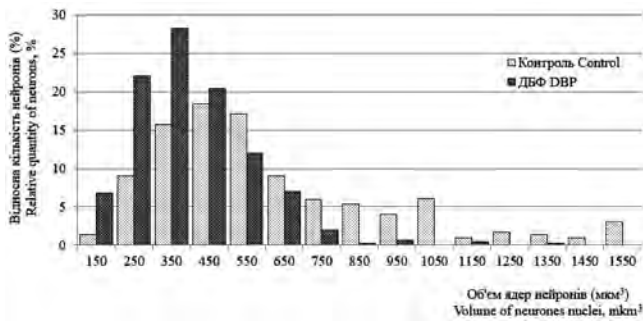


**Рис. 5.** Мікрофотографії МПЯ самців щурів 18-місячного віку, матері яких отримували ДБФ в останній тиждень вагітності.

*Примітка:* А — вакуолі в перикарионах нейронів у периферичній частині МПЯ; В — гіпохромні і пікнотичні нейрони в периферичній частині МПЯ; С, D — нормохромні і гіперхромні нейрони в центральній частині МПЯ. Азур-еозин,  $\times 400$ .

**Fig. 5.** Photomicrographs of the MPN of 18-month-old male rats whose mothers received DBP in the last week of pregnancy.

*Note.* A — vacuoles in the perikaryons of neurons in the peripheral part of the MPN; B — hypochromic and pyknotic neurons in the peripheral part of the MPN; C, D — normochromic and hyperchromic neurons in the central part of the MPN; Azur-eosin.  $\times 400$ .



**Рис. 6.** Гістограми розподілу нейронів МПЯ за об'ємом ядер у 18-місячних щурів контрольної групи та щурів — нащадків матерів, які отримували ДБФ в останній тиждень вагітності.

**Fig. 6.** Histograms of the distribution of the MPN neurones by nuclei volumes in 18-month-old control rats and offspring of mothers who received DBP in the last week of pregnancy.

У попередніх публікаціях [19-20] ми висловили гіпотезу, що маскулінізація мозку, що розвивається, зумовлена транзитornoю активацією тестикулярного стероїдогенезу саме в критичний період СДМ. На доказ цього припущення, згодовування самкам щурів ДБФ із 12 по 19 день гестації в дозі 100 мг/кг м.т. гальмувало секрецію тестостерону сім'яниками плоду, після чого спостерігали ребаунд-ефект, а саме, швидке, протягом 24 год., відновлення рівня гормону у фетальній плазмі і далі — його подальше зростання [23]. У дослідженнях *in vitro* ДБФ та його активний метаболіт стимулювали стероїдогенез у клітинах Лейдига [24, 25].

Одним із патогенетичних механізмів змін у МПЯ може бути токсичний вплив ДБФ на нервові структури, які залучені до регуляції статевої поведінки й можуть бути локусами пошкоджувальної дії ЕД [26]. До них належать нюхова цибулина, ядро ложа кінцевої смужки, медіальна мигдалина, МПЯ, кора головного мозку. Це припущення непрямо підтверджується даними про опосередковану арилгідрокарбонними (діоксиновими) рецепторами нейро- та проапоптотичну токсичність ДБФ у нейронах кори мозку мишей [27].

Результати наших попередніх досліджень вказують на прискорену вікову інволюцію репродуктивних органів і статевої поведінки самців внаслідок пренатальної дії низьких доз ДБФ у критичний період ДБФ [19-20]. Рівні тестостерону в плазмі крові в таких тварин були значно знижені, а сперматогенез і статеві поведінка різко послаблені. Із цим позитивно

корелюють і результати даного нейроморфологічного дослідження. У самців щурів, які старіють, пренатально експонованих до ДБФ, функціональна активність нейронів МПЯ за даними гістологічного і каріометричного досліджень була нижча, ніж у контрольних тварин відповідного віку. На це вказують зменшені розміри перикаріонів і ядер нейронів, скупчення ендоплазматичного ретикулуму та інші ознаки, що свідчать про прискорене згасання системи нейроендокринної регуляції статевої системи в цих тварин, викликане пренатальним впливом ДБФ.

## Висновки

1. Дані гістологічного дослідження МПЯ молодих самців щурів, пренатально експонованих до низьких доз ДБФ в останній тиждень вагітності їх матерів, свідчать про функціональне перенапруження і виснаження нейронів і узгоджуються зі змінами статевої поведінки та збільшеним рівнем тестостерону в плазмі крові, що вказує на залучення МПЯ до порушення СДМ.
2. Гістологічні та каріометричні зміни нейронів МПЯ самців, які старіють і які зазнали пренатальної дії низьких доз ДБФ, узгоджуються з суттєво послабленою статевою поведінкою та зменшеним рівнем тестостерону в плазмі крові.

## Список використаної літератури

1. 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.
2. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015 Jul;40(1):241-58.
3. Gálvez-Ontiveros Y, Páez S, Montegudo C, Rivas A. Endocrine disruptors in food: Impact on gut microbiota and metabolic diseases. *Nutrients.* 2020 Apr 21;12(4):1158.
4. Yilmaz B, Terekeci H, Sandal S, Kelestimur F. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020 Mar;21(1):127-47.
5. Viguié C, Chaillou E, Gayraud V, Picard-Hagen N, Fowler PA. Toward a better understanding of the effects of endocrine disrupting compounds on health: Human-relevant case studies from sheep models. *Mol Cell Endocrinol.* 2020 Apr 5;505:110711.
6. Резников АГ. Репродуктивные мишени эндокринных дизрапторов. Аналитический обзор. *Репрод эндокр.* 2014;17(3):18-25 (Reznikov AG. Reproductive targets of endocrine disruptors. *Reprod Endocrinol.* 2014;17(3):18-25. Russian).
7. Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, Flaws JA. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J Endocrinol.* 2017 Jun;233(3): R109-R129.
8. Sidorkiewicz I, Zaręba K, Wo czyński S, Czerniecki J. Endocrine-

## Оригінальні дослідження

- disrupting chemicals – Mechanisms of action on male reproductive system. *Toxicol Ind Health*. 2017 Jul;33(7):601-9.
9. Axelstad M, Hass U, Scholze M, Christiansen S, Kortenkamp A, Boberg J. EDC IMPACT: Reduced sperm counts in rats exposed to human relevant mixtures of endocrine disrupters. *Endocr Connect*. 2018 Jan;7(1):139-48.
  10. Albert O, Jégou B. A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood. *Hum Reprod Update*. 2014 Mar-Apr;20(2):231-49.
  11. Hannon PR, Flaws JA. The effects of phthalates on the ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 Feb 2;6:8.
  12. 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.
  13. Pallotti F, Pelloni M, Gianfrilli D, Lenzi A, Lombardo F, Paoli D. Mechanisms of testicular disruption from exposure to bisphenol A and phthalates. *J Clin Med*. 2020 Feb 8;9(2):471.
  14. 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(1 Suppl):S97-9.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Caserta D, Pegoraro S, Mallozzi M, Di Benedetto L, Colicino E, Lionetto L, et al. Maternal exposure to endocrine disruptors and placental transmission: a pilot study. *Gynecol Endocrinol*. 2018 Nov;34(11):1001-4.
  19. Резніков ОГ, Сачинська ОВ., Лимарева АА. Вікова динаміка змін статевої поведінки і андрогенного статусу у самців щурів, спричинених пренатальною експозицією до низьких доз дибутілфталату. *Журнал НАМН України*. 2019;25(3):260-7 (Rezников AG, Sachynska OV, Limareva AA. Age dynamics of changes in sexual behavior and androgen status of male rats caused by prenatal exposure to low dose dibutylphthalate. *J NAMN Ukraine*. 2019;25(3):260-7. Ukrainian).
  20. Reznikov A, Sachynska O, Lymareva A, Faliush O. Developmental, behavioral and endocrine alterations in male rats at early and late postnatal life following in utero exposure to low dose di-n-butylphthalate [Internet]. *Toxicol Res*, 2020. [cited 2021 Mar 03]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s43188-020-00050-5>.
  21. Резніков ОГ. Перинатальне програмування розладів ендокринних функцій і поведінки. Київ: Наукова думка, 2019. 272 с. (Reznikov OG. Perinatal programming of disorders of endocrine functions and behavior. Kyiv: Naukova Dumka Publishing House. 2019. 272 p. Ukrainian).
  22. 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;18(5):669-76.
  23. 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.
  24. 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.
  25. 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;36(2):332-8.
  26. Mhaouty-Kodja S, Naulé L, Capela D. Sexual behavior: from hormonal regulation to endocrine disruption. *Neuroendocrinology*. 2018;107(4):400-16.
  27. Wójtowicz AK, Szychowski KA, Wnuk A, Kajta M. Dibutyl phthalate (DBP)-induced apoptosis and neurotoxicity are mediated via the aryl hydrocarbon receptor (AhR) but not by estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), estrogen receptor beta (ER $\beta$ ), or peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in mouse cortical neurons. *Neurotox Res*. 2017;31(1):77-89.

## Подяка

Автори висловлюють подяку канд. біол. наук С.А. Михальському за надану консультативну допомогу в інтерпретації гістологічного матеріалу.

### Гистологические и кариометрические изменения медиально-преоптического ядра гипоталамуса самцов крыс, экспонированных к низким дозам дибутилфталата во время внутриутробного развития

Л.И. Полякова, А.Г. Резников

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

**Резюме.** Половые особенности нейроэндокринных функций и поведения программируются гормонами во время внутриутробного развития плода. Этот процесс может нарушаться химическими веществами с гормоноподобной активностью, так называемыми эндокринными дизрапторами (ЭД). Одним из самых распространенных в окружающей среде ЭД является дибутилфталат (ДБФ), который воздействуя на организм беременной матери в больших дозах вызывает у плода синдром тестикулярной дисгенезии. Однако отдаленные эффекты малых доз изучены крайне недостаточно. В экспериментальных исследованиях на крысах у молодых потомков матерей, экспонированных к малым дозам ДБФ, обнаружены гиперактивное половое поведение и гиперандрогенное состояние на фоне отсутствия анатомических дефектов. Морфологический субстрат этих изменений был неизвестен. **Цель** — выяснить участие медиально-преоптического ядра гипоталамуса (МПЯ) в функциональных изменениях репродуктивной системы, индуцированных пренатальной экспозицией к низким дозам ДБФ в критическом периоде раннего онтогенеза, когда происходит половая дифференциация мозга (ПДМ). **Материал и методы.** Крысы Вистар получали перорально ДБФ с 15 по 21 день беременности по 100 мг/кг м. т. в день, контрольные — растворитель препарата. У мужского потомства 6- и 18-месячного возраста проводили гистологическое и кариометрическое исследование нейронов МПЯ гипоталамуса. **Результаты.** У молодых животных выявлена вакуолизация перикарионов, наличие пикнотических нейронов наряду с активными и другие гистологические признаки функционального перенапряжения и истощения МПЯ. У стареющих животных в МПЯ преобладали нейроны с меньшими размерами, чем у контрольных крыс соответствующего возраста.



та. Размеры ядер нейронов были более чем на 50% меньше контрольных показателей. **Выводы.** Результаты морфологического исследования МПЯ молодых крыс, пренатально экспонированных к низким дозам ДБФ, свидетельствуют о функциональном перенапряжении и истощении нейронов и согласуются с предыдущими данными о гиперактивном половом поведении и повышенном уровне тестостерона в плазме крови, что свидетельствует об участии МПЯ в нарушении ПДМ. Гистологические и кариометрические характеристики МПЯ стареющих подопытных животных указывают на его ускоренную возрастную морфофункциональную инволюцию, что коррелирует с существенно ослабленным половым поведением и уменьшенным уровнем тестостерона в плазме крови.

**Ключевые слова:** дибутилфталат, пренатальное действие, нейроэндокринная система, гипоталамус, самцы крыс.

## Histological and karyometric changes in the medial-preoptic nucleus of the male rat hypothalamus exposed to low doses of dibutyl phthalate during fetal development

L.I. Polyakova, A.G. Reznikov

SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**Abstract.** Sexual features of neuroendocrine functions and behavior are programmed by hormones during fetal development. This process can be disrupted by chemicals with hormone-like activity, so-called endocrine disruptors (ED). One of the most common EDs in the environment is dibutyl phthalate (DBP), which in large doses through maternal placenta causes testicular dysgenesis in the fetus. However, the long-term effects of small doses have been poorly studied. Previous experimental studies on young rat offspring of mothers exposed to small doses of DBP revealed hyperactive sexual behavior and hyperandrogenic condition in the absence of anatomical defects. The morphological substrate of these changes was unknown. **The aim** is to determine the involvement of the medial preoptic nucleus of the hypothalamus (MPN) in the functional changes of the reproductive system induced by prenatal exposure to low doses of DBP in the critical period of early ontogenesis, when sexual differentiation of the brain (SDB) occurs. **Material and methods.** Wistar rats received oral DBP (100 mg/kg b. w. per day) from 15 to 21 days of pregnancy, controls — the solvent of the drug. Histological and karyometric examination of neurons of the MPN of the hypothalamus was carried out in male offspring at 6 and 18 months of age. **Results.** Vacuolization of perikaryons, the presence of pyknotic neurons along with active ones and other histological signs of functional overstrain and depletion of MPN were detected in young animals. In aging animals, neurons with smaller sizes than those of control rats of the appropriate age were dominated in the MPN. The size of the nuclei in neurons was more than 50% smaller than

that of the control values. **Conclusions.** The results of the morphological study of the MPN in young rats prenatally exposed to low doses of DBP are consistent with previous data on hyperactive sexual behavior and increased plasma testosterone levels, indicating the involvement of MPN in SDB. Histological and karyometric characteristics of MPN of aging experimental animals indicate its accelerated age-related morphofunctional involution, which correlates with significantly weakened sexual behavior and decreased plasma testosterone levels.

**Keywords:** dibutyl phthalate; prenatal action, neuroendocrine system, hypothalamus; male rats.

**Для цитування:** Полякова ЛІ, Резніков О.Г. Гістологічні та кариометричні зміни медіально-преоптичного ядра гіпоталамуса самців щурів, експонованих до низьких доз дибутилфталату під час внутрішньоутробного розвитку. *Ендокринологія*. 2021;26(1):49-58. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-1.49.

**Адреса для листування:** Резніков Олександр Григорович, reznikov39@gmail.com, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, Київ 04114, Україна.

**Відомості про авторів:** Любов Іванівна Полякова, старш. наук. співроб. відділу ендокринології репродукції та адаптації, ORCID0000-0001-9957-7624; Олександр Григорович Резніков, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН України, акад. НАМН України, завідувач відділу ендокринології репродукції та адаптації, ORCID: 0000-0002-0018-399X.

**Особистий внесок:** Полякова Л.І. — проведення гістологічних і кариометричних досліджень, аналіз результатів, підготовка ілюстрацій; Резніков О.Г. — ідея і дизайн дослідження, аналіз результатів, написання і оформлення статті, підготовка до друку, переклад резюме.

**Фінансування:** дослідження проводилось в рамках бюджетного фінансування за планом науково-дослідних робіт ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», № державної реєстрації теми: 0117U000481.

**Декларація з етики:** автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

**Стаття:** надійшла до редакції 04.03.2021 р.; перероблена 04.03.2021 р.; прийнята до друку 04.03.2021 р.; надрукована 30.03.2021 р.

**Для цитирования:** Полякова Л.И., Резников А.Г. Гистологические и кариометрические изменения медиально-преоптического ядра гипоталамуса самцов крыс, экспонированных к низким дозам дибутилфталата во время внутриутробного развития. *Эндокринология*. 2021;26(1):49-58. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-1.49.

**Адрес для переписки:** Резников Александр Григорьевич, reznikov39@gmail.com, ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины», ул. Вышгородская, 69, Киев 04114, Украина.

**Сведения об авторах:** Любовь Ивановна Полякова — старший научный сотрудник отдела эндокринологии репродукции и адаптации, ORCID: 0000-0001-9957-7624; Александр Григорьевич Резников — д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Украины, акад. НАМН Украины, заведующий отделом эндокринологии репродукции и адаптации, ORCID: 0000-0002-0018-399X.

**Личный вклад:** Полякова Л.И. — проведение гистологических

## Оригінальні дослідження

и кариометрических исследований, анализ результатов, подготовка иллюстраций; Резников А.Г. — идея и дизайн исследования, анализ результатов, написание и оформление статьи, подготовка к печати, перевод резюме.

**Финансирование:** исследование проводилось в рамках бюджетного финансирования по плану научно-исследовательских работ ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины», № государственной регистрации темы: 0117U000481.

**Декларация по этике:** авторы задекларировали отсутствие конфликта интересов и финансовых обязательств.

**Статья:** поступила в редакцию 04.03.2021 г.; переработана 04.03.2021 г.; принята к печати 04.03.2021 г.; напечатана 30.03.2021 г.

**For citation:** Polyakova LI, Reznikov AG. Histological and karyometric changes of the medial-preoptic nucleus of the male rat hypothalamus exposed to low doses of dibutylphthalate during fetal development. *Endokrynologia*.2021.26(1):49-58. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-1.49.

**Correspondence address:** Reznikov Alexander Grigorievich, reznikov39@gmail.com, State Institution «VP Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Vyshgorodskaya str., 69, Kiev 04114, Ukraine.

**Information about the authors:** Lubov Ivanivna Polyakova — Senior Researcher of the Department of Endocrinology of Reproduction and Adaptation, ORCID:0000-0001-9957-7624; Alexander Grigorievich Reznikov — Dr. Sci. (Medicine), Prof., Cor. Member of the NAS of Ukraine, Acad. of the NAMS of Ukraine, Head of the Department of Endocrinology of Reproduction and Adaptation,; ORCID: 0000-0002-0018-399X.

Personal contribution: Polyakova L.I. — histological and karyometric researching, analysis of results, preparation of illustrations; Reznikov A.G — research idea and design, analysis of results, writing and preparation the article for printing, translation of resume.

**Funding:** The study was carried out within the framework of budgetary funding of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine according to the plan of research work of the SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», State registration number of the study: 0117U000481.

Declaration of Ethics: The authors have declared no conflicts of interest or financial obligations.

**Article:** received 04 March 2021; revised 04 March 2021; accepted 04 March 2021; published 30 March 2021.