

# Забруднювач довкілля бісфенол А порушує програмування статевої поведінки у жіночого потомства щурів

О.Г. Резніков, О.В. Сачинська, А.А. Лимарєва, Л.І. Полякова, І.Г. Перчик

Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», Київ; e-mail: reznikov39@gmail.com

Бісфенол А (БФА) є поширеним забруднювачем довкілля і завдяки естрогенним властивостям може викликати розлади репродуктивної та інших фізіологічних систем організму. Відомо, що у самців щурів він порушує статеву диференціацію мозку (СДМ) внутрішньоутробного плоду. При дослідженні ефектів перинатальної експозиції плодів і новонароджених самиць через материнський організм в умовах тривалого введення БФА протягом вагітності і лактації не спостерігали суттєвих змін СДМ. Метою нашої роботи було виявлення віддалених ендокринних, нейроморфологічних і поведінкових наслідків експозиції внутрішньоутробних плодів самиць щурів до низької дози БФА, застосованої до матерів протягом останнього тижня вагітності, який відповідає часовому «вікну» СДМ. Щурам перорально через шлунковий зонд вводили БФА, суспендований у гелі Дорфмана, у щоденній дозі 25 мкг/кг, яка у 200 разів менша за NOAEL (no observed adverse effect level) для щурів або як позитивний контроль естрадіолу діацетат (Е<sub>2</sub>Д) підкирно у дозі 10 мкг/кг протягом 15–21 дня вагітності. Контрольні тварини отримували гель без БФА. У жіночого потомства в статевозрілому віці вивчали вміст естрадіолу, тестостерону і кортикостерону в плазмі крові, реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-адrenalової системи (ГГАС) на гострий іммобілізаційний стрес, статеву поведінку та гістологічну будову і каріометричні параметри нейроцитів медіально-преоптичних ядер (МПЯ) гіпоталамуса. Слід відмітити, що пренатальна експозиція до БФА або Е<sub>2</sub>Д знижувала концентрацію естрадіолу в плазмі крові щурів, натомість вміст тестостерону і кортикостерону залишався в межах норм. У самиць спостерігали маскулінізацію статевої поведінки (садки на рецептивну самицю, наближення до неї тощо), яка за кількістю лордозних реакцій в присутності сексуально досвідченого самця не супроводжувалась її дефемінізацією. Зміни морфології МПЯ, яке належить до секс-диморфної зони мозку, корелювали з маскулінізацією статевої поведінки самиць внаслідок пренатального впливу низької дози БФА. Каріометрія нейроцитів МПЯ гіпоталамуса щурів не виявила різниці між контрольною і групою тварин, яким вводили БФА. Реакція ГГАС на іммобілізаційний стрес не змінювалась в обох дослідних групах. Таким чином, вперше встановлено, що тижнева експозиція через материнський організм внутрішньоутробних жіночих плодів щурів до наднизької відносно NOAEL дози БФА під час критичного періоду СДМ порушує програмування статевої поведінки в напрямку її маскулінізації і викликає гіпоестрогенію у статевозрілому віці. Розлади статевої поведінки корелюють з морфологічними змінами МПЯ гіпоталамуса. Однакова спрямованість функціональних розладів, індукованих пренатальним впливом БФА і референтного естрогенного препарату Е<sub>2</sub>Д, свідчить про те, що вони зумовлені естрогенними властивостями обох речовин.

Ключові слова: бісфенол А; пренатальна дія; статеву поведінку; тестостерон; естрадіол; кортикостерон; стрес; самиці; щури.

## ВСТУП

У переліку патогенних хімічних чинників довкілля, які супроводжують людину протя-

гом усього життя, помітне місце належить так званім ендокринним дисрапторам (ЕД). Свою назву вони отримали завдяки здатності

© О.Г. Резніков, О.В. Сачинська, А.А. Лимарєва, Л.І. Полякова, І.Г. Перчик

втручатися в механізми гормональної регуляції на етапах біосинтезу гормонів, рецепції, взаємодії з транскрипційними факторами тощо через притаманні їм деякі гормональні або антигормональні властивості. Не виключається й прямий токсичний вплив на залози внутрішньої секреції.

Особливо небезпечною є експозиція ембріона та внутрішньоутробного плоду до ЕД через материнський організм. Це стосується і бісфенолу А (БФА), який використовують у виробництві полімерних матеріалів. Він забруднює воду, ґрунт, повітря, а крім того, наявний у численних промислових товарах, зокрема в упаковках для напоїв, їжі, у предметах домашнього побуту. Через обмежену спроможність метаболізувати БФА незрілі фізіологічні системи плоду більш вразливі до нього, ніж у дорослому віці [1].

БФА є типовим ксеноестрогеном, йому притаманна слабка естрогеноподібна активність. Репродуктивна система дорослих і плодів виявилася найбільш уразливою до патогенної дії БФА і багатьох інших ЕД. Зокрема, це було продемонстровано нами та іншими дослідниками на прикладі перинатального програмування ендокринних функцій і поведінки [2–6].

Раніше ми продемонстрували значний пошкоджувальний вплив низької дози БФА, яку вагітні щури отримували протягом критичного періоду формування нейроендокринної системи репродукції чоловічих плодів, на копулятивну поведінку і нейроморфологію медіального преоптичного ядра (МПЯ) гіпоталамуса дорослих самців [7]. Роботу було продовжено на жіночому потомстві щурів першого покоління, тому що переважна більшість публікацій на цю тему стосувалася перинатальних ефектів БФА, тобто наслідків введення дисраптора матерям протягом вагітності і лактації чи навіть до року [8]. Вони продемонстрували морфологічні зміни в яєчниках, погіршення пам'яті, підвищення вмісту

статевих і наднирниковозалозних гормонів, послаблення гормональної відповіді у стані стресу, розлади материнської поведінки [9–12]. Залишалось невідомим, чим зумовлені ці зміни фізіологічних функцій – порушенням розвитку нейроендокринної системи через естрогенну активність БФА чи його прямим токсичним впливом на гіпоталамус та інші структури мозку. Крім того, продовжується дискусія стосовно безпеки низьких доз БФА для плодів.

Мета нашого дослідження полягала у виявленні віддалених ендокринних і поведінкових наслідків експозиції внутрішньоутробних плодів самиць щурів до низької дози БФА, застосованої до матерів протягом останнього тижня вагітності, який відповідає часовому «вікну» статевої диференціації мозку (СДМ).

## МЕТОДИКА

Експерименти виконано на щурах лінії Вістар (200–220 г), отриманих з розплідника інституту. Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні і вільному доступі до води. Умови утримання та використання тварин відповідали вимогам Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

Для планового запліднення відбирали щурів з регулярними естральними циклами та статевозрілих самців. Першим днем вагітності вважали дату появи сперматозоїдів у вагінальних мазках. Вагітним самицям з 15-го до 21-го дня гестації вводили у шлунок через металевий зонд БФА (“Sigma”, США), суспендований у гелі Дорфмана (0,5% карбоксиметилцелюлози в 0,9%-му розчині натрію хлориду з додаванням 4% твіну-80 та 0,9% бензилового спирту) у щоденній дозі 25 мкг/кг або гель без БФА (контроль). Враховуючи естрогенні властивості БФА, як позитивний контроль використовували групу вагітних щурів, яким вводили підшкірно естрадіол діацетат (Е<sub>2</sub>Д) у дозі 10 мкг/кг.

Дослідні групи з 5-6 тварин формували рівномірним розподілом новонароджених щурів жіночої статі з різних послідів. Усі подальші експерименти проводили після досягнення самицями віку 6 або 10 міс.

У плазмі крові, отриманої миттєвою декапітацією щурів, вимірювали концентрацію естрадіолу і тестостерону імуноферментним методом за допомогою наборів Estradiol ELISA kit і Testosterone ELISA kit («DRG», Німеччина) та імуноферментного аналізатора Stat Fax (США). Концентрацію кортикостерону визначали спектрофлуориметричним мікрометодом на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 (Японія). Для оцінювання реакції на стрес частину тварин кожної групи піддавали протягом години жорсткій іммобілізації в стані на спині з наступною декапітацією і забором крові.

Для тестування статевої поведінки у самиць формували групи по 5 тварин. Статеву поведінку за жіночим типом у них вивчали за загальноприйнятою методикою [13]. За тиждень до експерименту у самиць видаляли яєчники, викликали еструс введенням  $E_2D$  (0,1 мг на тварину внутрішньом'язово) за 48 год та прогестерону (0,5 мг на тварину внутрішньом'язово) за 4 год до тестування. Спостереження проводили в темній кімнаті при слабкому червоному світлі на тваринах, що перебували в темряві до моменту тестування протягом не менше ніж 4 год. Сексуально досвідченого самця поміщали в клітку за 5 хв до тестування для його адаптації до умов дослідження. До кожного самця підсаджували дослідну самицю, яка знаходилась у клітці впродовж 10 хв або до 10 садок самця. Реєстрували ознаки процептивної поведінки (наближення, обнюхування статевих органів, підсакування, покусування вух) та рецептивну поведінку (кількість лордозних реакцій). Обчислювали лордозний індекс, тобто кількість лордозних реакцій відносно загальної кількості садок самця.

Для тестування статевої поведінки за чоловічим типом до дослідної самиці під-

саджували на 10 хв рецептивно активну самицю, у якої викликали еструс за тією самою схемою. Спостерігали за наближенням тварини до рецептивної самиці, обнюхування нею статевих органів (чоловіча процептивна поведінка), а також реєстрували кількість садок (чоловіча псевдокопулятивна поведінка).

На 6-місячних нащадках проводили морфологічне дослідження МПЯ, яке є головною структурою так званої секс-диморфної ділянки гіпоталамуса. З мозку вирізали фрагмент, орієнтуючись на оптичну хіазму, серединне узвишся, мамілярні тіла. Фрагменти фіксували в рідині Буена, проводили через спирти висхідної концентрації і заливали в парафін. Виготовляли фронтальні серійні зрізи товщиною 7 мкм, які забарвлювали азур-еозином за Паппенгеймом. Для гістологічних досліджень використовували мікроскоп Leica DME («Leica Microsystems», Німеччина). Мікрофотографії знімали цифровою фотокамерою Canon Power Shot A650 IS («Canon», Японія). МПЯ визначали як скупчення великих нейронів між передньою комісурою та оптичною хіазмою по обох боках від щілинноподібної порожнини третього шлуночка. У МПЯ вимірювали взаємно перпендикулярні розміри ядер нейронів і вираховували їхній об'єм за формулою Блінкова:

$$V = D \times d^2 \times \pi/6 \text{ мкм}^3$$

де:  $D$  і  $d$  – взаємно перпендикулярні «діаметри» клітини.

У кожній контрольній тварини ( $n = 5$ ) вимірювали не менше як 100 ядер нейронів, у дослідній з групи БФА ( $n = 5$ ) – не менше ніж 200 ядер, тому що морфологічні дослідження вказували на значну гетерогенність їх популяції. Аналіз результатів каріометрії проводили вираховуванням відсоткової кількості нейронів із певним розміром ядер і побудови гістограм.

Результати представлені як  $M \pm m$  та оброблені комп'ютерною програмою Excel за допомогою одновекторного аналізу незалежних експериментів з використанням

критерію *t* Стьюдента. Різницю вважали значущою при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Гормональні показники.** Концентрація тестостерону в плазмі крові дорослих нащадків жіночої статі не відрізнялась у тварин усіх трьох груп, натомість концентрація естрадіолу була вірогідно нижчою у самиць, що зазнали пренатальної дії  $E_2D$  або БФА (табл. 1).

Не виявлено статистичної різниці між базальними концентраціями кортикостерону в плазмі крові самиць контрольної та дослідних груп. Виражена адренкортикальна реакція на гострий стрес спостерігалась також у всіх групах тварин – вміст кортикостерону після

годинної іммобілізації зростав у середньому від 1,3 до 1,5 раза (табл. 2).

**Статева поведінка.** Тестування статевої поведінки за жіночим типом 10-місячних самиць, матері яких отримували БФА чи  $E_2D$ , показало відсутність змін порівняно з контрольними тваринами (табл. 3). Усі дослідні самиці демонстрували активну процептивну (стрибки, різноманітні перебіжки, наближення та ін.) і рецептивну поведінку. Кількість лордозних реакцій і лордозний індекс були однакові в дослідних і контрольній групах.

На тлі відсутності змін жіночої статевої поведінки, у дослідних самиць в присутності рецептивної самиці спостерігалися прояви чоловічої статевої поведінки у вигляді садок і псевдокопулятивних рухів, натомість

**Таблиця 1. Концентрації статевих гормонів (нмоль/л) у плазмі крові 6-місячних самиць щурів першої генерації ( $M \pm m$ )**

Схема досліджу	Естрадіол	Тестостерон
Контроль (n = 6)	0,25 ± 0,01	1,57 ± 0,06
Бісфенол А (n = 6)	0,20 ± 0,01*	1,86 ± 0,33
Естрадіолу діацетат (n = 5)	0,17 ± 0,02*	1,45 ± 0,10

\* $P < 0,05$  порівняно з контролем.

**Таблиця 2. Концентрації кортикостерону (нмоль/л) у плазмі крові 6-місячних самиць щурів першої генерації ( $M \pm m$ )**

Схема досліджу	Базальний рівень	Одногодинний стрес
Контроль (n = 6)	349,1 ± 45,9	554,7 ± 63,8*
Бісфенол А (n = 5)	401,8 ± 48,3	531,2 ± 48,3*
Естрадіолу діацетат (n = 5)	343,8 ± 27,0	467,6 ± 20,3*

\* $P < 0,001$  відносно базального рівня.

**Таблиця 3. Показники статевої поведінки 10-місячних самиць щурів за жіночим типом ( $M \pm m$ ; n = 5)**

Схема досліджу	Кількість лордозів	Лордозний індекс	Кількість самиць	
			з процептивною поведінкою	з рецептивною поведінкою
Контроль	10,0 ± 0,0	100	5/5	5/5
Естрадіолу діацетат	8,4 ± 0,9	100	5/5	5/5
Бісфенол А	9,6 ± 0,4	100	5/5	5/5

у тварин контрольної групи така реакція була відсутня. Крім того, самиці цих груп характеризувалися достовірною активізацією процептивного компонента чоловічої статевої поведінки: у них вірогідно (більш ніж удвічі) збільшувалася кількість наближень до ре-цептивної самиці (табл. 4).

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок про те, що введення БФА чи Е<sub>2</sub>Д щурам протягом останнього тижня вагітності у нащадків жіночої статі призводить до маскулінізації статевої поведінки, проте вона не супроводжується її дефемінізацією.

Таблиця 4. Показники статевої поведінки самиць щурів за чоловічим типом ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

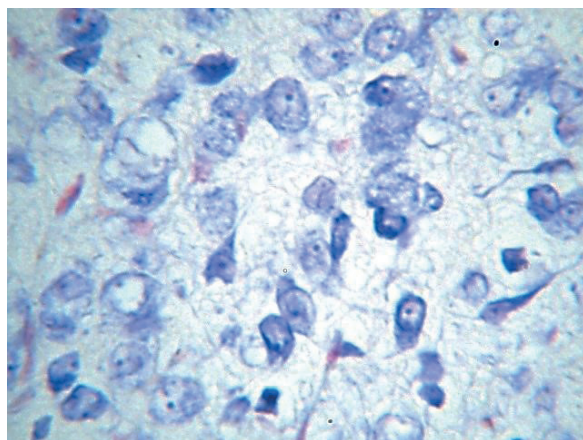
Схема досліджу	Кількість		Кількість самиць	
	наближень до самиці	садок	з процептивною поведінкою	з псевдо-копулятивною поведінкою
Контроль	7,0 ± 0,7	0	5/5	0/5
Бісфенол А	15,8 ± 2,2*	6,2 ± 1,3*	5/5	5/5
Естрадіолу діацетат	15,2 ± 0,4*	3,0 ± 0,8*	5/5	4/5

\* $P < 0,01$  порівняно з контролем.

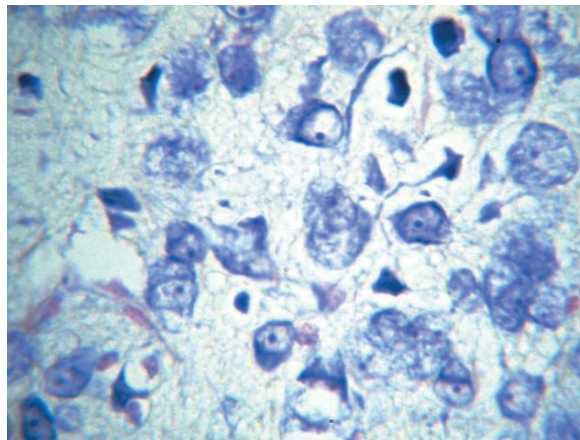
**Нейроморфологія МПЯ.** Гістологічне дослідження МПЯ контрольних самиць виявило, що нейрони були розташовані досить розріджено. Переважали дрібні нейрони, що мали невеликі перикаріони з інтенсивно забарвленою або помірно вакуолізованою цитоплазмою і невеликі ядрця. Значну частку популяції нейронів становили гіперхромні нейрони (рис. 1, а). Нейронів з високим ступенем вакуолізації цитоплазми, що є ознакою посиленої функціональної активності клітин, було

небагато. У всіх тварин знаходили скупчення дрібних клітин у каудальній частині МПЯ.

МПЯ самиць, матері яких отримували БФА, також складалося переважно з дрібних та середнього розміру нейронів. Проте в МПЯ містилося дещо більше активованих нейронів, що мали помірно вакуолізовану цитоплазму, та нейронів з великими вакуолями у перикаріонах і більшими ядрцями (рис. 1, б). Можливо, за рахунок таких клітин щільність нейронів в МПЯ дослідних тварин, які отримали



а



б

Рис. 1. Мікрофотографії нейронів медіально-преоптичних ядер 6-місячних самиць щурів. а – контроль, б – експозиція до БФА. Азур-еозин; збільшення у 400 разів

БФА, здавалася вищою. Дещо менше, ніж у контрольних самиць, було гіперхромних нейронів з гомогенною цитоплазмою і тонкими дендритами. В цілому, об'єм перикаріонів був більшим, ніж у контрольних тварин, що дає змогу припустити їхню більшу функціональну активність.

Наукові дані ідентифікують МПЯ гризунів як нейроендокринний центр, який під час критичного періоду СДМ під впливом ендогенного (у чоловічих ембріонів) або екзогенного (у самиць) тестостерону диференціюється за чоловічим типом. Ключову роль у процесі СДМ відіграють естрогенні метаболіти тестостерону. Після статевого дозрівання це проявляється у вигляді чоловічої статевої поведінки та секс-специфічних особливостей нейроендокринної регуляції статевих залоз [3]. Результати морфологічного дослідження МПЯ збігаються з отриманими даними щодо маскулізації статевої поведінки самиць внаслідок пренатального впливу низької дози БФА з одночасним збереженням типової поведінки за жіночим типом.

У контрольних самиць об'єм ядер нейроцитів МПЯ в середньому становив  $323,1 \pm 21,1$  мкм<sup>3</sup>, а у шурів, пренатально експонованих до БФА, –  $306,9 \pm 27,5$  мкм<sup>3</sup> ( $P > 0,05$ ). Аналіз гістограм не виявив суттєвих розбіжностей у розподілі нейроцитів за розмірами ядер (рис. 2).

У дослідних тварин було дещо більше нейроцитів з об'ємом ядер 300–400 мкм<sup>3</sup>, які є найбільш функціонально активними щодо синтетичних процесів, про що свідчить інтенсивне забарвлення їх цитоплазми базофільними барвниками та наявність великих ядерець. Натомість кількість нейроцитів з ядрами розміром значно більшими за середній (>600 мкм<sup>3</sup>), характерних для клітин у стадії напруження, виявилася дещо меншою. Можливо це пов'язано з тим, що в таких нейроцитах значно розширюються цистерни ендоплазматичного ретикулума, і цитоплазма набуває пінистого вигляду. Це перекриває контури ядер на зрізах, як і в нейроцитах з сильно вакуолізованою цитоплазмою, що знаходяться у стадії виснаження.

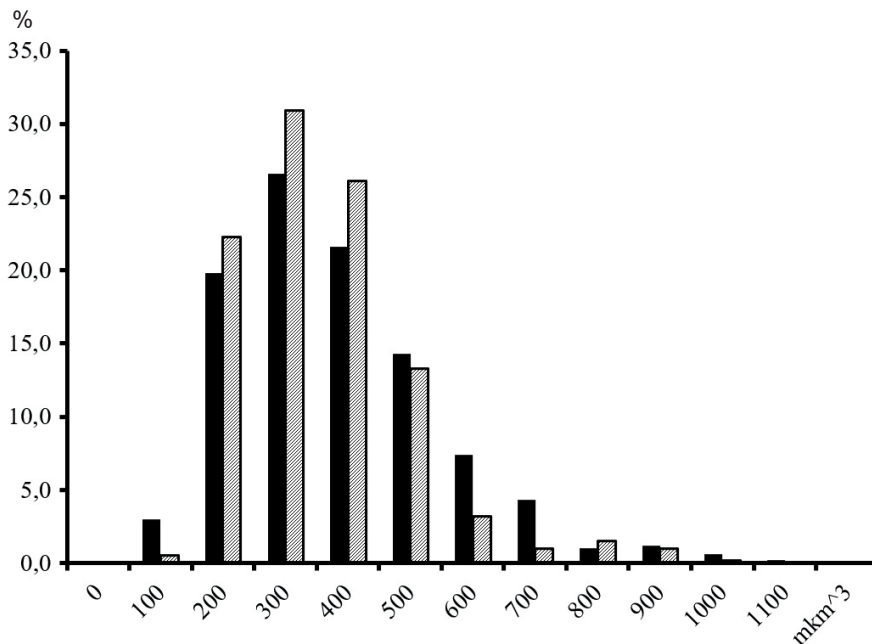


Рис. 2. Відсотковий розподіл нейроцитів медіально-преоптичних ядер за об'ємом ядер самиць шурів контрольної групи (чорні стовпчики) та шурів – нащадків матерів, які отримували бісфенол А у останній тиждень вагітності (сірі стовпчики)

ЕД можуть розглядатися як стресогенні чинники, які здатні порушувати програмування фізіологічних систем у ранні періоди життя [14]. Найбільший шкідливий вплив вони здійснюють на систему репродукції людини і тварин [15]. БФА безперешкодно долає плацентарний бар'єр і потрапляє у кровоносну систему плоду. Численні дослідження доводять наявність БФА та його метаболітів у тканинах плаценти і плоду, у пуповинній крові та навколоплідних водах [16–19]. Застосована нами доза 25 мкг/кг БФА менша за NOAEL (no observed adverse effect level) у 200 разів. Навіть короткочасна експозиція вагітних щурів і, відповідно, внутрішньоутробних самиць, до наднизької дози БФА здатна викликати розлад генетично зумовленого програмування нейроендокринної системи, відповідальної за статеву поведінку і регуляцію функції яєчників.

Основним джерелом статевих гормонів у самиць є яєчники. Ймовірно, знижений вміст естрадіолу в групі тварин, яким вводили БФА, зумовлений зменшенням кількості фолікулів та їхньою дисфункцією [8, 12]. Також не виключено, що водночас зменшується активність ферментів, які беруть участь у біосинтезі естрадіолу в яєчниках.

Отримані результати відрізняються від даних Moustafa та Ahmed [20], які повідомили про підвищення вмісту естрадіолу, спричинене пренатальною дією БФА. Інші дослідники спостерігали аналогічні нашим зміни вмісту статевих гормонів [21]. Дослідження, проведене в рамках проекту CLARITY-BPA, не виявило впливу перинатального введення БФА на вміст естрадіолу у самиць першої генерації різного віку [8]. Експозиція вагітних щурів та новонароджених самиць до БФА по-різному впливає на біосинтез статевих гормонів, що залежить від дози, способу і терміну його введення, а також віку тварин на момент обстеження. Особливістю біологічної дії ЕД є відсутність пропорційної залежності ефекту від дози, через що малі

нерідко спричинюють значно більший біологічний ефект, ніж великі.

Дослідження ефектів низькодозованої експозиції БФА вагітних щурів (40 мкг/кг щоденно протягом усієї вагітності і лактації) у нащадків жіночої статі в пубертатному віці показало підвищення базального вмісту кортикостерону в крові та зменшення експресії глюкокортикоїдних рецепторів у гіпоталамусі. Вони демонстрували погіршення просторової пам'яті, тривожну поведінку і послаблену відповідь кортикостерону на стрес (плавання) та відсутність зменшення експресії глюкокортикоїдних рецепторів, яке зазвичай відбувається у стані стресу [10]. Ймовірно, саме тривалістю введення БФА вагітним щурам можна пояснити відмінність цих даних від наших. Згідно з нашими результатами короткочасне введення БФА не змінює ні базального вмісту кортикостерону, ні реакцію на стрес. В іншій праці [22] також не спостерігали змін базальної концентрації кортикостерону у статевозрілих нащадків щурів, які отримували БФА з 10-ї доби вагітності по 7-му добу після пологів.

Наше дослідження виявило досить суттєві зміни статевої поведінки самиць. Хоча поведінка за жіночим типом не змінювалася, дослідні самиці демонстрували сексуальну мотивацію до контактів із рецептивними тест-самицями і псевдокопулятивну поведінку. Отже, йдеться про часткову маскулінізацію мозку внутрішньоутробних плодів, тобто порушення СДМ.

Характерна для біологічної дії ЕД відсутність прямої залежності ефекту від дози цілком стосується й БФА. Згідно з дослідженнями Farabollini та співавт. [23], застосування великих доз БФА з 14-го дня вагітності до 6-го дня лактації не спричиняє ознаки маскулінізації мозку жіночого потомства щурів. Аналогічні дані отримано при застосуванні добової дози 25 мкг/кг з 6-го по 21-й день вагітності з продовженням його введення новонародженим самицям протягом 3 тиж [24], а також після додавання

дисраптора матерям у дозах 2–200 мкг/кг протягом усієї вагітності і лактації [9, 25]. Farabollini і співавт. [23] висловили слушну думку, що тривала експозиція до БФА створює умови для задіяння компенсаторних механізмів стосовно можливих порушень СДМ під впливом естрогенної активності дисраптора. Ймовірно, за короткочасної експозиції, що припадає на критичний період СДМ, компенсаторні механізми не встигають сформуватися.

Згодовування щурам БФА в широкому діапазоні доз з 6-ї по 11-ту доби вагітності і протягом лактації не виявило змін розміру так званого секс-диморфного ядра преоптичної ділянки гіпоталамуса, яке зазвичай у самиць менше, ніж у самців [26–28]. Проте гістологічна картина МПЯ, які є основною структурою секс-диморфної зони мозку гризунів, в наших експериментах змінювалась і корелювала із поведінковими аномаліями у дослідних самиць. Це збігається з даними про дефемінізацію соціально-сексуальної поведінки ювенільних самиць, народжених від матерів, які отримували низьку дозу БФА протягом вагітності і лактації [29].

Відомо, що маскулінізація мозку, що розвивається, відбувається за безпосередньої участі естрогенних посередників [2]. Гормональний профіль і статева поведінка під впливом БФА і  $E_2D$  у нашому дослідженні змінювались в однаковому напрямку. Це свідчить про те, що маскулінізація мозку плодів самиць, що зазнали пренатального впливу БФА в останній тиждень вагітності, скоріш за все пояснюється естрогенною активністю БФА.

## ВИСНОВКИ

1. Вперше встановлено, що тижнева експозиція через материнський організм внутрішньоутробних жіночих плодів щурів до наднизької відносно NOAEL дози БФА під час критичного періоду СДМ спричинює прояви маскулінізації статевої поведінки і гіпоестрогенію у статевозірому віці.

2. Розлади статевої поведінки корелюють з морфологічними змінами МПЯ гіпоталамуса.

3. Однакова спрямованість функціональних розладів, індукованих пренатальним впливом БФА і референтного естрогенного препарату  $E_2D$ , свідчить про те, що вони зумовлені естрогенними властивостями обох речовин.

4. В умовах нашого дослідження функція ГГАС не порушувалася.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**A.G. Reznikov, O.V. Sachynska, A.A. Lymareva, L.I. Polyakova, I.G. Perchyk**

## ENVIRONMENTAL POLLUTANT BISPENOL A DISRUPTS THE PROGRAMMING OF SEXUAL BEHAVIOR IN FEMALE RAT OFFSPRING

*State Institution V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: reznikov39@gmail.com*

Bisphenol A (BPA) is a common environmental pollutant and, due to its estrogenic properties, can cause disorders of the reproductive and other physiological systems of the body, especially in males. It is known that in male rats it disrupts the sexual differentiation of the brain (SDB) of the fetus *in utero*. Studies of the effects of perinatal exposure of fetuses and newborn females through the mother's body under the conditions of long-term administration of BPA during pregnancy and lactation did not reveal significant changes in SDB. Identification of long-term endocrine, neuromorphological, and behavioral consequences of exposure of female rat fetuses to a low dose of BPA administered to mothers during the last week of pregnancy, which corresponds to the temporal period of SDB, was the aim of this study. Rats were orally administered BPA suspended in Dorfman gel at a daily dose of 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w., which is 200 times less than the NOAEL (no observed adverse effect level) for rats, via a gavage, or, as a positive control, estradiol diacetate ( $E_2D$ ) subcutaneously at a dose of 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w., during 15-21 days of pregnancy. Control animals received gel without BPA. The



levels of estradiol, testosterone, and corticosterone in blood plasma, the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis to acute immobilization stress, sexual behavior, and the histological structure and karyometric parameters of neurocytes of the medial-preoptic nuclei (MPN) of the hypothalamus were studied in adult female offspring. Prenatal exposure to BPA or E<sub>2</sub>D decreased the concentration of estradiol in the blood plasma, while the levels of testosterone and corticosterone remained normal. In the females of the BPA and E<sub>2</sub>D groups, a masculinization of sexual behavior (mounting to a receptive female, approaching her, etc.) was observed, which, according to the number of lordosis reactions in the presence of a sexually experienced male, not accompanied by her defeminization. Changes in the morphology of the MPN, which belongs to the sex-dimorphic area of the brain, conformed to the masculinization of female sexual behavior due to prenatal exposure to a low dose of BPA. Karyometry of neurocytes of the hypothalamic MPN of rats revealed no difference between the control and the BPA group. The response of the HPA axis to immobilization stress did not change in both experimental groups. It is found for the first time that maternal exposure of *in utero* female rat fetuses to an ultra-low relative to the NOAEL dose of BPA during the last gestational week, which corresponds to the critical period of SDB impairs programming of sexual behavior in the direction of its masculinization and causes hypoestrogenemia at adulthood. Disorders of sexual behavior conformed to morphological changes of the hypothalamic MPN. The unidirectionality of functional disorders induced by prenatal exposure to BPA and the reference estrogenic drug E<sub>2</sub>D indicates that they are caused by the estrogenic properties of both substances.

Key words: bisphenol A; prenatal action; sexual behavior; testosterone; estradiol; corticosterone; stress; females; rats.

## REFERENCES

- Nahar MS, Liao C, Kannan K, Dana C, Dolinoy DC. Fetal liver bisphenol A concentrations and biotransformation gene expression reveal variable exposure and altered capacity for metabolism in humans. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013;27(2):116-23.
- Reznikov AG. Hormone-neurotransmitter imprinting in the neuroendocrine control of reproduction. New York: Harwood Academic Publishers. 1994.
- Reznikov AG. Perinatal programming of disorders of endocrine functions and behavior. Kyiv: Naukova dumka. 2019. [Ukrainian].
- Reznikov AG. Developmental neuroendocrinology of reproduction and adaptation: Lessons from animal research. *Fiziol Zh.* 2021;67(3):54-74.
- Johnson SA, Javurek AB, Painter MS, Ellersieck MR, Welsh TH Jr, Camacho L, Lewis SM, Vanlandingham MM, Ferguson SA, Rosenfeld CS. Effects of developmental exposure to bisphenol A on spatial navigational learning and memory in rats: A CLARITY-BPA study. *Horm Behav.* 2016;80:139-48.
- 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. *Toxicol Res.* 2021;37(2):173-81.
- Reznikov AG, Sachynska OV, Lymareva AA, Polyakova LI. Sexual behavior, profile of steroid hormones, and morphology of the medial preoptic nuclei in F1 male rat progeny prenatally exposed to low-dose bisphenol A. *Neurophysiology.* 2020;52(5):388-96.
- Patel S, Brehm E, Gao L, Rattan S, Ziv-Gal A, Flaws JA. Bisphenol A exposure, ovarian follicle numbers, and female sex steroid hormone levels: results from a CLARITY-BPA study. *Endocrinology.* 2017;158(6):1727-38.
- Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE Jr. In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicol Sci.* 2010;114(1):133-48.
- Panagiotidou E, Zerva S, Mitsiou DJ, Alexis MN, Kitraki E. Perinatal exposure to low-dose bisphenol A affects the neuroendocrine stress response in rats. *J Endocrinol.* 2014;220(3):207-18.
- Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser R, Padmanabhan V, Taylor HS, Swan SH, VandeVoort CA, Flaws JA. Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environ Health Perspect.* 2014;122(8):775-86.
- Santamaria C, Durando M, Muñoz de Toro M, Luque EH, Rodriguez HA. Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;158:220-30.
- Canchola E, Rodríguez-Medina M, Dueñas-Tentori H, Mercado E, Rosado A. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin system: participation in the progesterone-induced facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen-primed rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54(2):403-7.
- Burgueno AL, Astiz M, Dagnino-Subiabre A. Editorial: Early life stress and its impact on physiological fitness. *Front Physiol.* 2022;13:1037409.
- Marques-Pinto A, Carvalho D. Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocr Connect.* 2013;2(3):R15-29.
- Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(4):393.e1-7.
- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJR, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2010;118(8):1055-70.
- Gerona RR, Woodruff TJ, Dickenson CA, Pan J, Schwartz JM, Sen S, Friesen MW, Fujimoto VY, Hunt PA. Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environ Sci Technol.*

- 2013;47(21):12477-85.
19. Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol.* 2008;28(4):258-63.
  20. Moustafa GG, Ahmed AAM. Impact of prenatal and postnatal exposure to bisphenol A on female rats in a two generational study: Genotoxic and immunohistochemical implications. *Toxicol Rep.* 2016;3:685-95.
  21. Mahalingam S, Laura Ther L, Gao L, Wang W, Ziv-Gal A, Flaws JA. The effects of in utero bisphenol A exposure on ovarian follicle numbers and steroidogenesis in the F1 and F2 generations of mice. *Reprod Toxicol.* 2017;7:150-57.
  22. Chen F, Zhou L, Bai Y, Zhou R, Chen L. Sex differences in the adult HPA axis and affective behaviors are altered by perinatal exposure to a low dose of bisphenol A. *Brain Res.* 2014;1571:12-24.
  23. Farabollini F, Porrini S, Dessì-Fulgherit F. Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects behavior in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999;64(4):687-94.
  24. Ferguson SA, Law CD, Kissling GE. Developmental treatment with ethinyl estradiol, but not bisphenol A, causes alterations in sexually dimorphic behaviors in male and female Sprague Dawley rats. *Toxicol Sci.* 2014;140(2):374-92.
  25. Jones BA, Shimell JJ, Watson NV. Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Horm Behav.* 2011;59(2):246-51.
  26. McCaffrey KA, Jones B, Mabrey N, Weiss B, Swan SH, Patisaul HB. Sex specific impact of perinatal bisphenol A (BPA) exposure over a range of orally administered doses on rat hypothalamic sexual differentiation. *Neurotoxicology.* 2013;36:55-62.
  27. Kwon S, Stedman DB, Elswick BA, Cattley RC, Welsch F. Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci.* 2000;55(2):399-406.
  28. Arambula SE, Fuchs J, Cao J, Patisaul HB. Effects of perinatal bisphenol A exposure on the volume of sexually-dimorphic nuclei of juvenile rats: A CLARITY-BPA consortium study. *Neurotoxicology.* 2017;63:33-42.
  29. Porrini S, Belloni V, Della Seta D, Farabollini F, Giannelli G, Dessì-Fulgheri F. Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats. *Brain Res Bull.* 2005;65(3):261-6.

*Матеріал надійшов до  
редакції 07.12.2022*