

EWA J. TYRKIEL<sup>1</sup>, MAŁGORZATA M. DOBRZYŃSKA<sup>2</sup>, EDYTA DEREZIŃSKA<sup>2</sup>, JAN K. LUDWICKI<sup>1</sup>

BADANIE WPŁYWU FTALANU BUTYLOBENZYLU (BBP) NA ILOŚĆ  
I JAKOŚĆ GAMET MĘSKICH PRZY SUBCHRONICZNYM NARAŻENIU  
MYSZY LABORATORYJNYCH

EFFECTS OF SUBCHRONIC EXPOSURE OF LABORATORY MICE  
TO BENZYL BUTYL PHTHALATE (BBP) ON THE QUANTITY AND QUALITY  
OF MALE GERM CELLS

<sup>1</sup>Zakład Toksykologii Środowiskowej  
Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: prof. dr hab. J.K. Ludwicki

<sup>2</sup>Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii  
Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: dr K.A. Pachocki

*W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań wpływu 8-tygodniowego, obejmującego pełny cykl spermatogenezy, narażenia samców myszy na ftalan butylobenzylu. Stwierdzono niewielkie zmniejszenie masy gonad i produkcji nasienia oraz istotne pogorszenie się jakości plemników tj. ruchliwości i morfologii.*

**Słowa kluczowe:** ftalany, BBP, komórki płciowe, liczebność i jakość plemników  
**Key words:** phthalates, BBP, germ cells, sperm quantity and quality

WSTĘP

Estry kwasu ftalowego (ftalany), ze względu na swoje właściwości fizyczne, stosowane są w przemyśle jako plastyfikatory przy produkcji tworzyw sztucznych, rozcieńczalniki w farbách i lakierach oraz jako stabilizatory zapachów i barwy w kosmetykach i artykułach pielęgnacyjnych.

Tworzywa sztuczne znajdują szerokie zastosowanie w produkcji opakowań do żywności, drobnego sprzętu medycznego np. sztucznych zastawek serca, cewników, zestawów infuzyjnych, nici chirurgicznych oraz zabawek [6, 7, 8]. Tworzywa sztuczne mogą zawierać od 10 do 60 % wagowych ftalanów. Ftalany nie tworzą wiązań kowalencyjnych z polimerami, z którymi są mieszane, mogą więc swobodnie migrować na powierzchnię wyrobu wykonanego z tworzywa sztucznego, a dalej do żywności, napojów i innych materiałów kontaktujących się z tworzywem sztucznym [40]. Stwierdzono, że w zabawkach, m.in. w gryzakach dla niemowląt znajdować się może do 30% estrów kwasu ftalowego [23]. Od 2005 r. w krajach

Unii Europejskiej niedozwolone jest stosowanie ftalanów: ftalanu dietyloheksylu (DEHP), ftalanu dibutylo (DBP) oraz ftalanu butylo-benzylowego (BBP) w tworzywach używanych do produkcji zabawek [14]. Światowa produkcja ftalanów szacowana jest na 2,7 mln ton rocznie [42].

Do zawodowego narażenia na ftalany dochodzi w przemyśle chemicznym podczas polimeryzacji polichlorku winylu i produkcji wyrobów z PCW oraz w przemyśle gumowym. Stężenie ftalanów na stanowiskach pracy w tych gałęziach przemysłu wynosi do 1,2 mg/m<sup>3</sup> [11, 23]. Narażenie populacji generalnej spowodowane jest występowaniem ftalanów w produktach powszechnego użytku, odbywa się też za pośrednictwem produktów żywnościowych oraz wody do picia [31,45]. Dzielne narażenie osób dorosłych na BBP szacowane jest na 2 µg/kg masy ciała, a narażenie dzieci może być nawet 3-krotnie wyższe [22].

Tworzywa sztuczne zawierające BBP używane są m.in. do wyrobu podłóg winylowych, pokryć dachowych, obić tapicerskich, przylepców oraz uszczelniaczy, zabawek, opakowań do żywności, skóry syntetycznej, rozpuszczalników przemysłowych oraz artykułów pielęgnacyjnych [19], np. w niektórych perfumach maksymalne stężenie BBP wynosi do 62,785 µg/ml [25].

Badania toksycznego oddziaływania estrów kwasu ftalowego na gonady samców wykazały, że związki te mogą indukować atrofię kanalików nasiennych charakteryzującą się zmniejszeniem mejotycznej i postmeiotycznej populacji komórek nabłonka nasieniotwórczego [10]. Są też ftalany, takie jak ftalan di-tert-butylo, które nie wywierają żadnego działania na gonady męskie [15].

BBP wykazuje słabe właściwości estrogenne, które obserwowano zarówno w badaniach prowadzonych w warunkach zarówno *in vivo* [20, 46] jak i *in vitro* [28]. Ftalan ten może powodować m.in. zaburzenia w rozwoju układu rozrodczego samców gryzoni w wyniku narażenia ich matek w czasie ciąży i laktacji [13, 16].

Ponieważ środowiskowe narażenie na ksenoestrogeny może prowadzić do uszkodzeń w układzie rozrodczym, a także powodować redukcję liczebności komórek rozrodczych, celowym wydawało się zbadanie wpływu ftalanu butylo-benzylu, jako przedstawiciela tej licznej grupy związków na zmiany liczebności i jakości gamet w następstwie 8-tygodniowego narażenia samców myszy laboratoryjnych na badany związek.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły samce myszy niekrewniaczego stada Pzh:Sfis w wieku 7-7,5 tygodni w momencie rozpoczęcia doświadczeń. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności oraz w warunkach automatycznie regulowanego cyklu świetlnego (12 godzin światła, 12 godzin ciemności). Karmione były standardową paszą dla gryzoni oraz otrzymywały do picia wodę wodociągową *ad libitum*.

Samcom myszy podawano *per os* zawiesinę ftalanu butylobenzylu w oleju jadalnym 3 razy w tygodniu, przez 8 tygodni, tj. przez pełny cykl spermatogenezy. Samcom kontrolnym podawano sam olej jadalny. BBP podawano w dawkach 1/16 i 1/4 LD<sub>50</sub> czyli odpowiednio 450 mg/kg m.c. i 1800 mg/kg m.c. dziennie. Kolejne grupy zwierząt zabijano w następujących terminach: 4 i 8 tygodni od rozpoczęcia oraz po 4 tygodniach od zakończenia (12 tygodni) podawania oleju lub BBP. Każda grupa doświadczalna lub kontrolna liczyła 5 samców.

W powyższych terminach, myszy były ważone i zabijane, pobierano z nich oba najądrza i oba jądra, które również ważono. Jedno najądrze macerowano przez 5-8 minut w 0,2 ml 1% roztworu cy-

trynianu sodowego, a następnie rozdrabniano. Otrzymaną zawiesinę uzupełniano roztworem cytrynianu sodowego do 2 ml. Po dokładnym wymieszaniu przy pomocy miksera typu vortex, otrzymaną zawiesinę plemników rozcieńczano w stosunku 1:1 roztworem formaliny (50 g  $\text{NaHCO}_3$  + 10 ml 36-40 % formaldehydu w 1000 ml wody destylowanej z dodatkiem błękitu metylowego). Tak przygotowany roztwór przesączano przez sączkę z bibuły i przechowywano w temperaturze 4°C. Plemniki zliczano w zmodyfikowanej komorze *Neubauera* [18, 34]. Zawartość drugiego najądrza wyciskano i umieszczano w 0,2 ml 0,9 % roztworu NaCl o temperaturze 37°C, a następnie mieszano. Pobierano kroplę (6  $\mu\text{l}$ ) zawiesiny i nanoszono na ogrzane do temperatury 37°C podstawowe szkiełko mikroskopowe i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Oceny ruchliwości dokonywano w mikroskopie świetlnym (x 20) z zastosowaniem stolika z podgrzewaczem. W ciągu 5 minut od pobrania najądrza zliczano 200 (2x100) plemników rejestrując liczbę komórek poruszających się i nieruchomych [43].

Ocenę zmian morfologicznych główek plemników przeprowadzono na podstawie metody opisanej przez *Wyrobka* i *Bruce'a* [44]. Zawiesinę plemników z doświadczenia opisanego wyżej rozcieńczano w 0,9 % roztworze NaCl i mieszano, a następnie wykonywano rozmazy na szkiełkach mikroskopowych. Po wysuszeniu i utrwaleniu preparaty barwiono 1 % wodnym roztworem eozyiny Y. Preparaty analizowano pod mikroskopem świetlnym. Oceniano 500 gamet na mysz zliczając plemniki o prawidłowej budowie oraz posiadające główki morfologicznie zmienione (n.p. amorficzne, bez haczyka, bananokształtne).

Test kometowy przeprowadzono na podstawie metody opisanej wcześniej [4, 38]. Jedno jądro z każdego samca umieszczano w 1640 RPMI medium, a następnie rozdrabniano. Otrzymaną zawiesinę komórek płciowych mieszano z żelem agarozowym o niskiej temperaturze topnienia, a następnie nanoszono na podstawowe szkiełka mikroskopowe pokryte uprzednio żelem agarozowym o normalnej temperaturze topnienia. Po zestaleniu się żeli agarozowych, komórki poddawano przez 24 h lizie w obecności detergentu w temperaturze 4°C, a następnie elektroforezie niskonapięciowej. Po zneutralizowaniu komórki barwiono bromkiem etydyny. Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym, rejestrowano komórki o różnym stopniu uszkodzenia DNA (100 komórek/mysz). Następnie oceniano za pomocą programu komputerowego CASP [24].

Oceny statystycznej wyników dokonano za pomocą testów *t-Studenta* oraz *chi-kwadrat*.

## WYNIKI

W Tabeli I przedstawiono średnie masy ciała myszy, ich narządów oraz względne masy narządów po 4, 8 i 12 tygodniach od rozpoczęcia podawania BBP. Średnie masy ciała oraz jąder samców z grup kontrolnych po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia narażenia były nieznacznie wyższe niż u myszy z grup doświadczalnych.

Po 4 tygodniach od zakończenia podawania średnie masy jąder samców, którym podawano BBP w dawce 450 mg/kg m.c. przewyższały o ponad 20% średnie masy jąder myszy kontrolnych ( $p < 0,05$ , *test t-Studenta*), a masy ciała myszy z obu grup doświadczalnych były o około 10% wyższe. W połowie okresu narażania na BBP średnia masa najądrzy była najniższa w grupie otrzymującej 450 mg/kg m.c. (1/16 dawki  $\text{LD}_{50}$ ). Natomiast zarówno po 8 tygodniach od rozpoczęcia jak i po 4 tygodniach od zakończenia podawania BBP, średnia masa najądrzy w tej grupie była najwyższa. Względne masy jąder i najądrzy w grupach doświadczalnych były podobne do względnych mas jąder i najądrzy w grupie kontrolnej. Najwyższą względną masę jąder zanotowano po 4 tygodniach od zakończenia podawania BBP w dawce 450 mg/kg m.c.

W Tabeli II zestawiono wyniki dotyczące ilości i jakości plemników w różnych odstępach czasu od rozpoczęcia podawania BBP. Liczebność plemników w grupach doświadczalnych

Tabela I. Średnie masy jąder i najądrzy samców myszy w różnych odstępach czasu od rozpoczęcia 8-tygodniowego narażenia na BBP  
Mean testes and epididymes weights at different time after the start of exposure of male mice to BBP

Dawka	Czas od rozpoczęcia narażenia	Średni masa ciała (g) ±SD	Średnia masa jąder (mg) ±SD	Relatywna masa jąder (%)	Średnia masa najądrzy (mg) ±SD	Relatywny ciężar najądrzy [%]
Kontrola	4 tygodnie	33,66±3,45	174,8±28,2	0,52	47,6±4,7	0,14
450 mg/kg BBP	4 tygodnie	30,19±1,70	153,2±21,7ns	0,51	36,8±7,0 *	0,12
1800 mg/kg BBP	4 tygodnie	30,69±3,26	152,2±18,8ns	0,50	41,8±7,5 ns	0,14
Kontrola	8 tygodni	39,03±2,45	191,4±30,6	0,49	37,2±8,5	0,10
450 mg/kg BBP	8 tygodni	35,61±2,58	188,2±51,9ns	0,53	45,0±10,1 ns	0,13
1800 mg/kg BBP	8 tygodni	34,46±2,92	173,2±40,9ns	0,50	37,2±8,5 ns	0,11
Kontrola	12 tygodni <sup>a</sup>	34,52±2,85	167,4±16,5	0,48	42,6±6,7	0,12
450 mg/kg BBP	12 tygodni <sup>a</sup>	38,34±1,26	205,6±17,0*	0,54	52,0±5,1 *	0,14
1800 mg/kg BBP	12 tygodni <sup>a</sup>	38,18±1,32	174,0±35,0ns	0,46	42,8±5,2 ns	0,11

Test t-Studenta: ns – nie różni się statystycznie, \*p<0,05

<sup>a</sup> 4 tygodnie po zakończeniu podawania BBP

Tabela II. Ilość i jakość plemników samców myszy w różnych odstępach czasu od rozpoczęcia 8-tygodniowego narażenia na BBP  
Sperm quantity and quality at different time after the start of 8 weeks exposure of male mice to BBP

Dawka	Czas	Liczba plemników x10 <sup>6</sup> ±SD	Odsetek plemników ruchliwych ±SD	Odsetek plemników o nieprawidłowej budowie morfologicznej ±SD	Średni moment ogonowy ±SD
Kontrola	4 tygodnie	2,27±0,54	82,40±6,66	3,76±0,74	1,02±0,69
450 mg/kg BBP	4 tygodnie	1,83±0,77ns	66,40±9,79 ###	4,68±2,08 NS	1,33±0,67ns
1800 mg/kg BBP	4 tygodnie	1,91±0,37ns	66,20±14,43 ###	5,76±1,66 ##	1,52±0,44ns
Kontrola	8 tygodni	4,13±2,10	83,60±6,95	7,44±1,24	0,77±0,70
450 mg/kg BBP	8 tygodni	3,18±2,68 ns	65,80±14,67 ##	9,12±2,59 #	0,77±0,40ns
1800 mg/kg BBP	8 tygodni	2,36±0,52 ns	70,00±15,51 #	9,64±2,60 ##	1,11±0,47ns
Kontrola	12 tygodni <sup>a</sup>	2,14±0,62	65,20±7,43	11,12±2,14	2,26±1,28
450 mg/kg BBP	12 tygodni <sup>a</sup>	2,27±0,51 ns	63,80±7,26 NS	9,00±2,07 #	2,47±2,45ns
1800 mg/kg BBP	12 tygodni <sup>a</sup>	1,73±0,77 ns	70,60±14,91 NS	11,32±3,52 NS	2,37±1,62ns

Test chi-kwadrat: NS – nie różni się statystycznie, #p<0,05, ###p<0,01, ####p<0,001

Test t-Studenta: ns – nie różni się statystycznie

<sup>a</sup> 4 tygodnie po zakończeniu podawania BBP

zmniejszała się w porównaniu do wyników z grupy kontrolnej po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia podawania BBP. Nie obserwowano różnic statystycznie istotnych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Po 4 tygodniach od zakończenia podawania związku, liczebność

plemników w grupie 450 mg/kg mc była nieco wyższa niż u myszy kontrolnych. Odsetek plemników ruchliwych po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia podawania BBP był niższy w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie obserwowano jednak zależności dawka-skutek. Po 4 tygodniach od zakończenia narażania nie obserwowano wyraźnych różnic w ruchliwości plemników samców z grupy kontrolnej i z grup doświadczalnych. Odsetki plemników ruchliwych w grupach 450 mg/kg mc i 1800 mg/kg mc były podobne do uzyskanych wcześniej. Znaczemu obniżeniu uległ natomiast odsetek plemników ruchliwych w grupie kontrolnej. Po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia podawania BBP odsetki plemników o nieprawidłowej budowie morfologicznej zwiększały się wraz ze wzrostem dawki. Wraz z upływem czasu obserwowano także znaczny wzrost udziału plemników zmienionych morfologicznie w grupach kontrolnych. Po 4 tygodniach od zakończenia podawania związku odsetek plemników o nieprawidłowej budowie główki w grupie kontrolnej wynosił około 11%, tj prawie tyle samo, ile w grupie otrzymującej 1/4 dawki LD<sub>50</sub>. Natomiast w grupie otrzymującej BBP w dawce 450 mg/kg m.c. (1/16 LD<sub>50</sub>) był on o około 2 % niższy. Stopień uszkodzenia DNA w gametach myszy, którym podawano BBP był podobny lub nieznacznie wyższy w porównaniu do myszy kontrolnych. Po 4 tygodniach od rozpoczęcia podawania związku średni moment ogonowy zwiększał się wraz ze wzrostem dawki. Po 8 tygodniach od rozpoczęcia oraz po 4 tygodniach od zakończenia narażania nie obserwowano takiego efektu.

## DYSKUSJA

W środowisku człowieka znajduje się wiele związków, które ze względu na budowę chemiczną podobną do naturalnych hormonów wydzielanych w organizmie, mogą zaburzać procesy przemiany materii, blokować działanie hormonów, a w konsekwencji wpływać na procesy reprodukcji i rozwoju [27, 35]. W ostatniej dekadzie XX wieku pojawiły się informacje mówiące o znacznym zmniejszeniu stężenia oraz pogorszeniu się jakości nasienia mężczyzn w wieku reprodukcyjnym w porównaniu z pokoleniem ich dziadków [9, 39]. Za jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy uważa się występowanie w środowisku związków zaburzających procesy wydzielania wewnętrznego (ang. *endocrine disruptors*). Do tej grupy związków należą ftalany, a wśród nich BBP.

Dostępne piśmiennictwo dostarcza danych na temat wpływu BBP na narządy rozrodcze oraz na gamety potomstwa samic narażanych na ten ftalan podczas ciąży i laktacji. Mniej jest publikacji odnośnie wpływu BBP na dorosłe samce.

Wcześniejsze badania wykazały, że komórki płciowe nie są bezpośrednio uszkodzane wskutek działania ftalanów. Estry kwasu ftalowego indukują zmiany w komórkach *Sertolego*, które odgrywają istotną rolę w regulowaniu procesów proliferacji i różnicowania komórek płciowych podczas kolejnych etapów spermatogenezy [1, 17]. Uszkodzenie komórek *Sertolego* może być przyczyną zmniejszenia liczebności oraz pogorszenia jakości np. ruchliwości plemników.

BBP, podobnie jak inne ftalany, może działać jako antyandrogen powodując zmniejszenie produkcji testosteronu u płodów płci męskiej, co prowadzi do deformacji zewnętrznych narządów płciowych, degeneracji kanalików nasiennych oraz zmniejszenia produkcji nasienia [16,36]. Jak wykazały badania *Piersma* i wsp. [33], narażanie samic szczurów podczas ciąży na BBP powoduje zmniejszenie masy jąder oraz opóźnienie dojrzałości płciowej sam-

ców z pokolenia F1. Natomiast *Ashby* i wsp. [5] nie obserwowali zmniejszenia masy jąder ani liczebności plemników u potomstwa samic szczurów narażanych na BBP podczas ciąży i laktacji.

W prezentowanych badaniach młode, dojrzałe płciowo samce myszy były narażane na BBP w dawkach wynoszących 450 lub 1800 mg/kg mc przez okres 8 tygodni. Czas ten obejmował cały cykl spermatogenezy. Podczas podawania badanego związku obserwowano mniejsze przyrosty masy ciała u zwierząt narażanych na BBP, niż u zwierząt z grupy kontrolnej, niewielkie zmniejszenie masy jąder i najądrzy, a także nieznaczny spadek liczebności plemników i zmniejszenie ich ruchliwości. Nie zawsze były to jednak różnice statystycznie istotne.

U dorosłych samców szczurów Fischer 344, 14-dniowe podawanie 2,5% lub 5% BBP w diecie powodowało zmniejszenie masy jąder i najądrzy [3]. *Li* i wsp. [26] po 6 lub 20 tygodniach podawania szczurom BBP w dawkach od 250 do 1000 mg/kg stwierdzili zmniejszenie masy jąder, najądrzy i prostaty oraz liczebności komórek płciowych. Zarówno 10, jak i 25-tygodniowe narażanie samców szczurów F344 na BBP prowadziło do znacznego zmniejszenia stężenia produkowanego nasienia oraz zmniejszenia masy jąder i najądrzy [30]. Podobne efekty, jakkolwiek słabiej zaznaczone zaobserwowano także w niniejszych badaniach w odniesieniu do masy jąder oraz liczebności plemników samców myszy, którym podawano BBP przez 4 i 8 tygodni. Z kolei, w badaniach na szczurach *Sprague-Dawley*, w których samce pokolenia F0 otrzymywały BBP w dawce 500 mg/kg mc przez 12 tygodni poprzedzających kojarzenie, nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w ruchliwości i liczebności plemników między zwierzętami grupy kontrolnej i grupy badanej. Notowano natomiast spadek poziomu stężenia testosteronu w surowicy krwi. Jednocześnie analiza histologiczna gonad wykazała atrofię kanalików nasiennych [29]. W przedstawionych badaniach, obserwowano związek pomiędzy liczebnością plemników a masą jąder i najądrzy. Zmniejszenie liczebności plemników występowało w grupach, w których obserwowano zmniejszoną masę gonad. Natomiast w grupie 450 mg/kg mc BBP, w której po 4 tygodniach od zakończenia podawania związku średnia masa jąder była najwyższa, notowano największą liczebność plemników. Podobną korelację pomiędzy zmniejszoną produkcją nasienia a redukcją masy jąder i najądrzy obserwowali inni autorzy badający wpływ ftalanów na gamety męskie [32, 37].

Podawanie samcom myszy ftalanu butylobenzylu powodowało nie tylko zmniejszenie liczebności plemników, ale także pogorszenie jakości nasienia. Zarówno po 4, jak i po 8 tygodniowym narażeniu notowano zmniejszoną ruchliwość oraz zwiększenie odsetka plemników o nieprawidłowej budowie morfologicznej. Trudno wytłumaczyć fakt pogorszenia się jakości nasienia w grupie kontrolnej po 4 tygodniach od zakończenia podawania samego oleju (kontrola), jakkolwiek również w tym przypadku istnieje korelacja pomiędzy zmniejszoną ruchliwością i zwiększoną częstością występowania główek plemników o nieprawidłowej budowie morfologicznej. Notowany wzrost odsetka plemników ze zmienioną morfologią w zależności od czasu pobierania próby, zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnych może mieć związek z wiekiem samców. Zmniejszoną ruchliwość plemników obserwowano także w następstwie narażenia na inne ftalany, DBP i DEHP [3, 12, 41]. Jak wykazały wcześniejsze badania, plemniki o nieprawidłowej budowie morfologicznej są zazwyczaj mniej ruchliwe oraz charakteryzują się mniejszą zdolnością do zapłodnienia komórek jajowych [21]. Potwierdziły to badania NTP [30], w których wykazano, że po 10-tygodniowym narażeniu samców na BBP doszło jedynie do zaplemnienia, ale nie do zapłodnienia połączonych z nimi samic.

## WNIOSKI

Obejmujące pełny cykl spermatogenezy narażenie myszy na ftalan butylobenzylu powoduje pogorszenie jakości gamet męskich, co może prowadzić do zmniejszenia płodności.

Bardziej wrażliwe na działanie tego ftalanu okazały się komórki haploidalne tj. plemniki i spermatydy.

---

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Komitet Badań Naukowych) w latach 2004-2007 jako projekt badawczy nr 2PO5D 2926.

E.J. Tyrkiel, M.M. Dobrzyńska, E. Derezińska, J.K. Ludwicki

BADANIE WPŁYWU FTALANU BUTYLOBENZYLU NA ILOŚĆ I JAKOŚĆ GAMET MĘSKICH PRZY SUBCHRONICZNYM NARAŻENIU MYSZY LABORATORYJNYCH

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie wpływu 8-tygodniowego narażenia samców myszy na ftalan butylobenzylu (BBP) na liczebność i jakość ich gamet. Do doświadczeń użyto samców myszy Pzh:Sfis, którym podawano *per os* zawiesinę BBP w oleju jadalnym w dawkach 450 mg/kg m.c. (1/16 LD<sub>50</sub>) i 1800 mg/kg m.c. (1/4 LD<sub>50</sub>) dziennie. Mysiom kontrolnym podawano olej jadalny. Grupy zwierząt zabijano po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia podawania oraz po 4 tygodniach od zakończenia podawania. Oceniano liczebność plemników, ich ruchliwość, morfologię oraz częstość występowania pęknięć nici DNA.

Liczebność plemników po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia podawania BBP uległa zmniejszeniu. W tym samym czasie zanotowano zmniejszenie odsetka plemników ruchliwych oraz zależnie od dawki zwiększanie się odsetka gamet o nieprawidłowej budowie morfologicznej oraz nieznaczne zwiększenie się częstości występowania uszkodzeń DNA. Po 4 tygodniach od zakończenia podawania BBP stwierdzono tylko niewielkie zmniejszenie liczebności plemników w grupie 1/4 LD<sub>50</sub>. Obserwowano związek pomiędzy liczebnością plemników, a masą jąder i najądrzy. Najbardziej wrażliwe na działanie BBP okazały się plemniki i spermatydy.

E.J. Tyrkiel, M.M. Dobrzyńska, E. Derezińska, J.K. Ludwicki

EFFECTS OF SUBCHRONIC EXPOSURE OF LABORATORY MICE TO BENZYL BUTYL PHTHALATE ON THE QUANTITY AND QUALITY OF MALE GERM CELLS

Summary

The aim of the study was to investigate the effect of 8-weeks exposure of male mice to benzyl butyl phthalate (BBP) on the sperm count and quality of gametes. Pzh:Sfis male mice exposed *per os* to 450 mg/kg bw (1/16 LD<sub>50</sub>) and to 1800 mg/kg bw (1/4 LD<sub>50</sub>) of BBP in olive oil were used in the study. Control mice were treated with olive oil only. Groups of animals were killed 4 and 8 weeks after the start of exposure and 4 weeks after the end of exposure. Sperm count, motility, morphology and DNA damage in gametes were estimated in the study.

Sperm counts were diminished 4 and 8 weeks after the start of exposure to BBP. In the same time decrease in sperm motility and dose-dependent increase in the frequency of abnormal sperm heads and slight increase in DNA damage were noted. 4 weeks after the end of exposure, slight decrease in sperm counts in the group of 1/4 LD<sub>50</sub> was observed, only. Correlation between sperm count and testes and epididymes weight were noted. The most sensitive to BBP exposure occurred spermatozoa and spermatids.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Ablake M., Itoh M., Terayana H., Hayashi S., Shoji S., Naito M., Takahashi K., Suna S., Jitsunari E.*: Di-(2-ethylhexyl)phthalate induces severe aspermatogenesis, however, subsequent antioxidant vitamins supplementation accelerates regeneration of the seminiferous epithelium. *Int. J. Androl.* 2004, 27(5), 274-81.
2. *Agarwal D.K., Eustis S., Lamb J.C., Reel J.R., Kluwe W.M.*: Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathology, sperm morphology and reproductive performance of male rats. *Environ. Health Perspect.* 1986, 65, 343-350.
3. *Agarwal D.K., Maroonpot R.R., Lamb J.C., Kluwe M.W.*: Adverse effects of butyl benzyl phthalate on the reproductive and hematopoietic systems of male rats. *Toxicology.* 1985, 35(3), 189-206.
4. *Anderson D., Yu T.W., Phillips B.J., Schmezer P.*: The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated damage in human lymphocytes in Comet assay. *Mutat. Res.* 1994, 307, 261.
5. *Ashby J., Timwell H., Lefevre P.A., Odum J., Patson D., Millward S.W., Tittensor S., Brooks A.N.*: Normal sexual development rats exposed to butyl benzyl phthalate from conception to weaning. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1997, 26, 102-18.
6. ATSDR Toxicological profile for Diethyl phthalate (DEP). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, USA, 1995.
7. ATSDR Toxicological profile for Di-n-butyl phthalate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, USA, 2001.
8. ATSDR Toxicological profile for Di(2-ethyl)phthalate (DEHP). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, USA, 2002.
9. *Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebek N.E.*: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 1992, 332, 281-85.
10. *Creasy, D. M., Foster, J. R., Foster, P. M. D.*: The morphological development of di-n-pentyl phthalate induced testicular atrophy in the rat. *J. Pathol.* 1983, 139, 309-321.
11. *Dirven H.A., Van den Broeck P.H.H., Jongeneelen F.J.*: Determination of four metabolites of the plasticizers Di(2-ethyl-hexyl)phthalate in human urine samples. *Int. Arch. Occupat. Environ. Health.* 1993, 64, 549-554.
12. *Dobrzyńska M.M., Czajka U., Tyrkiel E.J.*: Male-mediated F1 effects in mice exposed to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). In: male-mediated developmental toxicity (*Anderson D., Brinkworth M.H.*). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2007, 97-113.
13. *Ema M., Miyawaki E.*: Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late gestation. *Reprod. Toxicol.* 2002, 16, 71-76.
14. European Commission (2005) Press Release 5<sup>th</sup> July 2005. Available at: <http://www.europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP?05/838&format=HTML&tagged=1&language=EN&guilLanguage=en>
15. *Foster P. M. D., Thomas L. V., Cook M. W., Gangolli S. D.*: Study of the testicular effects and changes in Zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1980, 54, 392-398.



16. Gray Jr.L.E., Ostby J., Furr J., Price M., Veeramachaneni D.N., Parks L.: Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* 2000, 58, 350-365.
17. Gray T.J.B., Rowland I.R., Foster P.M.D., Gangoli D.S.: Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol. Lett.* 1982, 11, 141-147.
18. Harrison A., Moore P.C.: Reduction in sperm count and increase in abnormal sperm in the mouse following X-irradiation or injection of Na. *Health Phys.*, 1980, 39, 219.
19. Hauser R., Calafat A.M.: Phthalates and human health. *Occupat. Environm. Med.* 2005, 62, 806-818.
20. Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., Sumpter J.P.: A variety of environmentally persistent chemicals including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 1995, 103, 582-87.
21. Katz D.E., Diel L., Overstreet J.W.: Differences in the movement of morphologically normal as abnormal human seminal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1982, 26(4), 566-70.
22. Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P. Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P., Zacharewski T.: NTP center for evaluation of risks to human reproduction: phthalates expsr panel report on the reproductive and developmental toxicity of benzyl butyl phthalate. *Reprod Toxicol.* 2002, 16, 453-87.
23. Kleinsasser N.H., Kastenbauer E.R., Weissacher H., Muenzenrieder R.K., Harreus U.A.: Phthalates demonstrate genotoxicity on human mucosa of the upper aerodigestive tract. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000, 35, 9-12.
24. Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Góźdź S., Koza Z., Wójcik A.: A ceoss-platform public domain PC image-analysis program for comet assay. *Mutat. Res.* 2003, 534, 15-20.
25. Koo H.J., Lee B.M.: Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health Part A.* 2004, 67, 1901-1914.
26. Li W.L., Ji Y.B., Yang Y.N., Yang B.: Reproductive toxicity and functional mechanism of the environmental hormone butyl benzyl phthalate. *Huan Jing Ke Xue.* 2004, 25(1), 1-6.
27. Mendes A.J.J.: The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40, 781-88.
28. Milligan S. R., Balasubramanian A. V., Kalita J. C.: Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mamalian assay. *Environ. Health Perspect.* 1998, 106, 23-26.
29. Nagao T., Ohta R., Marumo H., Shindo T., Yoshimura S., Ono H.: Effect of buthyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Rep. Toxicol.* 2000, 14, 513-532.
30. NTP- National Toxicology Program NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Butyl Benzyl Phthalate (CAS. No 85-68-7) in Rats (Feed Studies). *Nat. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 1997, 458, 1-195.
31. Page B.D., Lacroix G.M.: The occurrence of phthalate esterand di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packing and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Additives Contam.* 1995, 12, 129-151.
32. Parmer D., Srivastiva S.P., Seth P.K.: Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. *Toxicology.* 1986, 42, 47-55.
33. Piersma A.H., Verkoef A., Biesebeek J.D., Pieters M.N., Slob W.: Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat urinary, a multiple dose study design. *Reprod. Toxicol.* 2000, 14, 417-25.
34. Searle A.G., Beechey C.V.: Sperm count, egg-fertilization and dominant lethality after X-irradiation of mice. *Mutat. Res.* 1974, 22, 69-74.

35. *Schantz, S.L., Wildholm, J.J.*: Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environ. Health Perspect.* 2001, 109, 1197-1206.
36. *Sharpe R.M.*: Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol. Lett.* 2001, 120(1-3), 221-32.
37. *Siddiqui A., Srivastova S.P.*: Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate administration on rat sperm count and sperm metabolic enzymes. *Bull Environm. Contam. Toxicol.* 1992, 48, 115-119.
38. *Singh N.P., Mc Coy M., Tice R.R., Schneider E.L.*: A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, 175, 184.
39. *Swan S.H., Elkin E.P., Fenster L.*: Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environm. Health Perspect.* 1997, 105, 1228-32.
40. *Thomas J. A., Thomas M. J.*: Biological effects of di(2-ethyl hexyl)phthalate and other phthalic acid esters. *Crit. Rev. Toxicol.* 1984, 13, 283-317.
41. *Tsutsumi T., Ichikara T., Kawabe M., Yoshino H., Asamoto M., Suzuki S., Shirai T.*: Renal toxicity induced by folic acid associated with the enhancement of male reproductive toxicity of di(n-butyl)phthalate in rats. *Reprod. Toxicol.* 2004, 18(1), 35-42.
42. *Wezel van A.P., Vlaardingen van P., Posthumus R., Crommentuijn G.H. Sijm D.T.H.M.*: Environmental risk limits for two phthalates, with special emphasis on endocrine disruptive properties. *Ecotoxicol. Ecotoxicol. Safety.* 2000, 46, 305-21.
43. *Working P.K., Bus J. S., Hamm Jr. T.E.*: Reproductive effects of inhaled methyl chloride in the male Fisher 344 rat. II. Spermatogonial toxicity and sperm quality. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1985, 77,144.
44. *Wyrobek A.J., Bruce W.R.*: Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 4425-4429.
45. *Yano K., Hiroshawa N., Sakamoto Y., Katayama H., Moriguchi T., Joung K.E., Sheen Y.Y., Asaoka K.*: Phthalate levels in beverages in Japan and Korea. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 2002, 68, 463-469.
46. *Zacharewski T., Clemons J., Meek M., Wu Z., Fielden M., Matthews J.*: Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 1998, 42, 282-293.

Otrzymano: 2007.05.17