

# WPLYW FTALANU DI-N-BUTYLU (DBP) NA KOMÓRKI SOMATYCZNE MYSZY LABORATORYJNYCH

## THE EFFECTS OF DI-N-BUTYL PHTHALATE ON THE SOMATIC CELLS OF LABORATORY MICE

Małgorzata M. Dobrzyńska<sup>1</sup>, Ewa J. Tyrkiel<sup>2</sup>, Agnieszka Hernik<sup>2</sup>, Edyta Derezińska<sup>1</sup>,  
Katarzyna Góralczyk<sup>2</sup>, Jan K. Ludwicki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Toksykologii Środowiskowej  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny

**Słowa kluczowe:** ftalan di-n-butylu, mikrojądra, test kometowy, bioakumulacja

**Key words:** di-n-butyl phthalate, micronuclei, comet assay, bioaccumulation

### STRESZCZENIE

Ftalany są powszechnie stosowane przy produkcji tworzyw sztucznych oraz jako rozpuszczalniki w środkach higieny, w kosmetykach i preparatach farmaceutycznych. Ftalan dibutylu (DBP) stosowany jest jako plastyfikator, a także jako środek do impregnacji tekstyliów i jako rozpuszczalnik w farbach drukarskich. Celem badań była ocena uszkodzeń DNA w komórkach wątroby i szpiku kostnego oraz ocena stężenia DBP w krwi obwodowej w następstwie przedłużonej ekspozycji na ftalan dibutylu. Badania wykonano na samcach myszy Pzh:Sfis. Zwierzęta otrzymywały przez 8 tygodni, 3 razy w tygodniu, per os DBP w postaci zawiesiny w oleju jadalnym w dawkach 500 mg/kg m.c. (1/16 LD<sub>50</sub>) i 2000 mg/kg m.c. (1/4 LD<sub>50</sub>). Kolejne grupy myszy zabijano po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia podawania oraz po 4 tygodniach od jego zakończenia. Wykazano zmniejszenie masy ciała myszy, istotnie statystycznie obniżenie masy wątroby oraz relatywnej masy wątroby w następstwie 8-tygodniowego podawania DBP w dawce 2000 mg/kg m.c. W tym samym czasie notowano większy, choć nieistotny statystycznie poziom uszkodzeń DNA w komórkach wątroby mierzony testem kometowym. DBP nie indukowało zwiększonego powstawania uszkodzeń DNA w komórkach szpiku kostnego. W wyniku 8-tygodniowego podawania DBP w dawce 2000 mg/kg m.c. obserwowano znaczne podwyższenie stężenia DBP we krwi obwodowej utrzymujące się również po 4 tygodniach od zaprzestania podawania związku. Wyniki badań potwierdziły, że DBP jest słabym mutagenem w stosunku do DNA komórek somatycznych. Wydaje się jednak, że związek ten w następstwie przedłużonej ekspozycji może być wolniej metabolizowany i czasowo kumulowany w krwi obwodowej.

### ABSTRACT

Phthalates are widely used as plasticizers in manufacture of synthetic materials and as solvents in sanitary products, cosmetics and pharmaceutical products. Dibutyl phthalate (DBP) is used as a plasticizers and as a textile lubricating agent and as solvent in printing ink. The study aimed the evaluation of the magnitude of DNA damage in liver and bone marrow cells and estimation of dibutyl phthalate (DBP) concentration in peripheral blood following prolonged exposure to DBP. Experiments were conducted on the Pzh:Sfis male mice. Animals were exposed 8 weeks, 3 days per week per os to DBP suspension in oil in doses of 500 mg/kg bw (1/16 LD<sub>50</sub>) and 2000 mg/kg bw (1/4 LD<sub>50</sub>). Following groups of mice were sacrificed 4 and 8 weeks after the start of exposure and 4 weeks after the end of exposure. Decreased body weight of mice and statistically significant decreased liver and relative liver weights were observed following 8-weeks exposure to 2000 mg/kg bw DBP. In the same time higher, however not statistically significant level of DNA damage measured by Comet assay in liver cells were noted. DBP did not induce enhanced frequency of DNA damage in bone marrow cells. Following 8-weeks exposure to the dose of 2000 mg/kg bw DBP the increased level of DBP in peripheral blood was observed. Enhanced levels of DBP were still noted 4 weeks after the termination of exposure. Results confirmed that DBP acts as a weak mutagen for DNA of somatic cells. However, following prolonged exposure this compound seems to undergo slower metabolism and was reaching temporarily higher levels in peripheral blood.

**Adres do korespondencji:** Małgorzata M. Dobrzyńska, Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. 4822 54 21 253, fax 4822 54 309, e-mail: mdobrzyńska@pzh.gov.pl

## WSTĘP

Estry kwasu ftalowego są powszechnie stosowane jako plastyfikatory przy wytwarzaniu tworzyw sztucznych używanych do produkcji opakowań do żywności, sprzętu medycznego, zabawek, oraz jako rozpuszczalniki w środkach higieny (mydła, szampony), w kosmetykach (perfumy, lakiery do paznokci) i w preparatach farmaceutycznych. Ftalany nie są trwale wiązane z polimerami i mogą migrować z tworzywa sztucznego do środowiska zewnętrznego [9].

Narażenie na te związki może mieć miejsce przy produkcji podczas polimeryzacji polichlorku winylu oraz w następstwie kontaktu z produktami zawierającymi ftalany. Estry kwasu ftalowego znajdowano w wielu różnych elementach środowiska, ale stężenie poszczególnych ftalanów nie było wysokie. Związki te mogą jednak niekorzystnie oddziaływać na rozródność organizmów żywych za pośrednictwem procesów związanych z regulacją hormonalną, działając jako antyandrogeny i ksenoestrogeny [15, 22]. Wykazano, że niektóre ftalany są odpowiedzialne za uszkodzenie gonad męskich i obniżenie produkcji plemników u mężczyzn [5]. Wykazano także, że ftalan 2-etyloheksylu (DEHP) powoduje wzrost proliferujących komórek w hodowli komórek raka piersi człowieka oraz wykazuje działanie hepatokancerogenne w badaniach na zwierzętach [17, 21].

Ftalan dibutyłu (DBP) stosowany jest jako plastyfikator, a także jako środek do impregnacji tekstyliów oraz jako rozpuszczalnik w farbach drukarskich [8]. DBP, podobnie jak i inne ftalany, nie kumuluje się w środowisku i szybko ulega degradacji. Całkowita degradacja DBP w warunkach tlenowych jest stosunkowo szybka, natomiast w warunkach beztlenowych jest znacznie wolniejsza. Niektóre jednak badania sugerują, że DBP może być persystentny w glebie [11].

Toksyczność ostra DBP jest stosunkowo niska. Dla szczurów  $LD_{50}$  wynosi 8000 – 20000 mg/kg m.c. po narażeniu *per os* [21]. W badaniach subchronicznych wykonanych na szczurach obserwowano podwyższenie względnej masy wątroby w odniesieniu do masy ciała przy dawce 359 mg/kg m.c./dzień. W badaniach wykonywanych na myszach toksyczne działanie przy najwyższych ze stosowanych poziomów w diecie tj. 5000 ppm, 8000 ppm i 20000 ppm manifestowało się obniżeniem masy ciała, obniżeniem masy nerek oraz zwiększeniem względnej masy wątroby [21].

Stwierdzono, że DBP jest szybko usuwany z organizmu. Bioakumulacja nie występuje lub jest bardzo niska. Obserwowana obecność (wzrost poziomu) w wątrobie i nerkach jest wynikiem procesu ekskrecji a nie depozytu. [4]. Główny metabolit DBP, ftalan mono-*n*-butyłu (MBP), usuwany jest z organizmu człowieka

i gryzoni głównie za pośrednictwem nerek [10]. Podobnie jak i inne ftalany, DBP podawany w dawkach, powyżej 1000 mg/kg m.c. dziennie przy subchronicznej ekspozycji, wywiera toksyczne działanie na gonady badanych zwierząt laboratoryjnych [30].

Badania dotyczące genotoksycznego działania DBP wykazały, że ftalan ten można rozpatrywać jako związek o słabym działaniu mutagennym, nie jest on bezpośrednio genotoksyczny [6] ale powoduje wzrost częstości wymiany chromatyd siostrzanych, a także wzrost częstości pęknięć i fragmentacji materiału genetycznego [33]. Stwierdzono też, że DBP indukuje fragmentację DNA w komórkach nabłonka jamy nosowej i gardła [18].

Dane dotyczące oddziaływania DBP na materiał genetyczny komórek somatycznych są stosunkowo nieliczne, a uzyskane wyniki niejednoznaczne. Uzasadnione więc wydawało się wykonanie badań w warunkach przedłużonej ekspozycji na badany związek w celu oceny uszkodzeń DNA w komórkach szpiku kostnego i wątroby. Biorąc pod uwagę charakter uszkodzeń, stwierdzonych przez innych autorów, celowe wydawało się zbadanie przydatności testów kometowego i mikrojądrowego do ich badania. Oceniono też stężenie DBP we krwi obwodowej jako próbę znalezienia ewentualnych zależności między poziomami DBP w krwi a skutkiem genotoksycznym *in vivo*.

## MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na samcach myszy laboratoryjnych niekrewniaczego stada Pzh:Sfis. Zwierzęta w czasie trwania doświadczenia przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności w warunkach automatycznie regulowanego cyklu świetlnego (12 godzin światła, 12 godzin ciemności), karmione były standardową paszą dla gryzoni oraz otrzymywały wodę wodociągową *ad libitum*.

Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej.

W momencie rozpoczęcia doświadczenia samce myszy liczyły 42-46 dni. Przez 8 tygodni, 3 razy w tygodniu zwierzęta otrzymywały DBP *per os* w postaci zawiesiny w oleju jadalnym. Myszy z grup doświadczalnych otrzymywały DBP w następujących dawkach: 1/16  $LD_{50}$  i 1/4  $LD_{50}$ , co odpowiadało dawkom: 500 i 2000 mg/kg m.c./dzień. Samcom kontrolnym podawano sam olej jadalny.

Kolejne grupy zwierząt zabijano po 4 i 8 tygodniach od rozpoczęcia i po 4 tygodniach od zakończeniu (12 tydzień) podawania DBP lub oleju. Każda grupa kontrolna i doświadczalna liczyła po 5 samców. W powyższych terminach zwierzęta były ważone, a następnie pobierano od nich szpik kostny z kości udowych do oceny

mikrojąder i analizy komet, wątrobę do analizy komet oraz krew z żyły wątrobowej do określenia pozostałości DBP we krwi.

Ocenę mikrojąder dokonano wg metody opisanej przez *Hayashi* i wsp. [13]. Szpik kostny wypłukiwano z kości udowych przy użyciu płodowej surowicy cielęcej, po odwirowaniu zawiesinę komórek z osadu umieszczano na szkiełku podstawowym pokrytym uprzednio na gorąco roztworem oranżu akrydynowego. Wszystkie preparaty oceniano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (filtr B-2A: wzbudzający - 50-490 nm i barierowy 520 nm). Analizy preparatów dokonywano w ciągu 2-3 dni. Zliczano liczbę erytrocytów polichromatycznych przypadających na 200 erytrocytów normochromatycznych. Stosunek erytrocytów polichromatycznych (PCE<sub>s</sub>) do erytrocytów normochromatycznych (NCE<sub>s</sub>) w szpiku kostnym wykorzystywano jako wskaźnik toksycznego działania DBP na komórki szpiku kostnego. Prawidłowa wartość stosunku erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych wynosi 0,6–1,2. Erytrocyty polichromatyczne emitują czerwono-pomarańczową fluorescencję, mikrojądra emitują zieloną fluorescencję a erytrocyty normochromatyczne nie wykazują żadnej fluorescencji [14].

Szpik kostny z drugiej kości udowej zawieszano w RMPI medium, a następnie wykorzystywano do testu kometowego, który przeprowadzono według metodyki *Singh* i wsp. [27] z późniejszymi modyfikacjami *Anderson* i wsp. [2] Pobierano 10 µl zawiesiny szpiku kostnego w RMPI, mieszano z 75 µl agarozy o niskiej temperaturze topnienia (LMPA) i nanoszono na szkiełka mikroskopowe pokryte uprzednio warstwą agarozy o normalnej temperaturze topnienia (NMPA). Preparaty przykrywano szkiełkami nakrywkowymi i umieszczano na 5 minut w temperaturze 4°C w celu zestalenia się agarozy. Po naniesieniu kolejnej warstwy agarozy preparaty ponownie umieszczano w temperaturze 4°C na 5 minut. Następnie umieszczano je w buforze lizującym w temperaturze 4°C na około 20 h. Po wyjęciu preparatów z buforu lizującego i osuszeniu, komórki inkubowano w buforze do elektroforezy w środowisku zasadowym przez 20 minut. Następnie przeprowadzono elektroforezę niskonapięciową (19 V, 300 mA) w obecności detergentu. Po zneutralizowaniu, komórki barwiono bromkiem etydyny. Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym, rejestrowano komórki o różnym stopniu uszkodzenia DNA (100 komórek/mysz) i oceniano za pomocą programu komputerowego CASP [19]. Jako parametr charakteryzujący uszkodzenia DNA wybrano moment ogonowy, który odzwierciedla zarówno zawartość procentową DNA w ogonie komety, jak i długość ogona komety (migrację DNA).

Do oceny pozostałości DBP we krwi zastosowano metodę ekstrakcji zaadaptowaną z publikacji *Pollack* i wsp. [23]. Polega ona na ekstrakcji ciecz-ciecz z octanem etylu. Ilościowe oznaczanie wykonano techniką HPLC/UV. W badaniach wykorzystano kolumnę LiChrospher 60 RP-select B (5µm), a warunki pracy aparatu były następujące: eluent: 93% metanolu i 7% wody, przepływ fazy ruchomej: 1 ml/min, temperatura kolumny: 35°C, długość fali: 225 nm, objętość nastrzyku: 10 µl.

Parametry walidacyjne wyznaczone zostały dla DEHP jako analitu reprezentatywnego dla tej grupy związków. W ramach walidacji wyznaczono średni odzysk, który wynosił 82,4%, powtarzalność RSD = 16,57% i granicę oznaczalności 0,12 µg/ml. Do analiz potwierdzających wykorzystano chromatograf gazowy ze spektrometrem mas jako detektorem (GC/MS), przy czym parametry aparaturowe były następujące: kolumna DB5-MS (0,25 mm i.d. x 30 m, 0,25 µm grubość filmu); temperatura pieca: 60°C (1 min), 10°C min<sup>-1</sup> – 260°C (14 min); przepływ: 1,25 ml min<sup>-1</sup>; temperatura dozownika: 260°C; objętość nastrzyku: 1µl; temperatura detektora: 170°C; gaz nośny: hel. Do potwierdzania tożsamości ww. związków wybrano jony charakterystyczne dla poszczególnych estrów: DBP – 149, 223 [m/z] i dla DEHP – 149, 279 [m/z]. Oceny statystycznej dokonano za pomocą testu *t-Studenta*.

## WYNIKI

Wyniki dotyczące zmian masy ciała i wątroby oraz indukcji uszkodzeń DNA w komórkach wątroby samców myszy otrzymujących DBP zestawiono w tabeli 1.

Stwierdzono, że myszy eksponowane na DBP w najwyższym stężeniu tj. 2000 mg/kg m.c. charakteryzowały się mniejszym przyrostem masy ciała. Przyrost ten po 8 tygodniach narażenia badanych samców na 500 lub 2000 mg/kg m.c. wynosił odpowiednio 8,3 g i 7,2 g masy ciała w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej, u których przyrost masy wynosił 11,6 g. Różnice te utrzymywały się 4 tygodnie po zaprzestaniu podawania DBP. Były jednak statystycznie nieistotne. Stwierdzono natomiast statystycznie istotne obniżenie całkowitej i względnej masy wątroby u myszy otrzymujących 2000 mg/kg m.c. po 8 tygodniach od rozpoczęcia doświadczenia. Utrzymywało się ono przez 4 tygodnie po zakończeniu narażenia, wyniki jednak nie były już statystycznie znamienne. Wartości momentu ogonowego wskazujące na zwiększenie uszkodzeń DNA zwiększały się w komórkach wątroby wraz ze wzrostem dawki po 4 i po 8 tygodniach od rozpoczęcia podawania DBP. Po 4 tygodniach od zakończenia narażenia moment ogonowy osiągnął najwyższe wartości

Tabela 1 Wpływ DBP na masy ciała i wątroby myszy oraz na indukcję uszkodzeń DNA w komórkach wątroby (test kometowy)

Effects of DBP exposure on the body and liver weight and on the induction of DNA damage in liver's cells (Comet assay)

Dawki DBP (mg/kg m.c.)	Czas od rozpoczęcia ekspozycji	Średnia masa ciała (g) ±SD	Średnie przyrosty masy ciała	Średnia masa wątroby (g) ±SD	Relatywna masa wątroby [%]	Moment ogonowy komet komórkach wątroby ±SD
Kontrola	0 tygodni	29,66±2,62				
500	0 tygodni	30,49±0,66				
2000	0 tygodni	28,81±0,68				
Kontrola	4 tygodnie	36,71±2,17	6,96	2,09±0,11	5,69	0,78±1,03
500	4 tygodnie	37,34±1,09	6,81	1,95±0,22ns	5,22	1,30±2,02ns
2000	4 tygodnie	35,90±2,43	7,07	1,96±0,20ns	5,46	2,92±2,24ns
Kontrola	8 tygodni	41,38±2,34	11,63	2,28±0,31	5,51	2,39±0,95
500	8 tygodni	38,87±2,19	8,34	1,94±0,31ns	4,99	7,11±9,42ns
2000	8 tygodni	36,06±2,28	7,20	1,81±0,22*	5,02	9,89±13,64ns
Kontrola	12 tygodni <sup>a</sup>	41,93±2,16	12,18	2,22±0,28	5,30	6,14±1,38
500	12 tygodni <sup>a</sup>	40,51±1,46	9,18	1,99±0,31ns	4,91	8,69±4,02ns
2000	12 tygodni <sup>a</sup>	37,76±1,74	8,90	1,88±0,20ns	4,98	5,64±1,48ns

ns – nieistotne statystycznie, \*p<0,05 w teście *t-Studenta*

Relatywna masa wątroby: średnia masa wątroby / średnia masa ciała x 100

<sup>a</sup> 4 tygodnie po zakończeniu ekspozycji

po zastosowaniu DBP w dawce 1/16 LD<sub>50</sub>. Wyniki nie były statystycznie istotne. Najwyraźniejszy efekt biologiczny obserwowano po 8 tygodniach od rozpoczęcia narażenia. Moment ogonowy po zastosowaniu DBP w dawce 500 mg/kg m.c. prawie 3-krotnie, a po narażeniu na DBP w dawce 2000 mg/kg m.c. ponad 4-krotnie przewyższał wynik uzyskany dla myszy kontrolnych.

Tabela 2. Zmiany w materiale genetycznym komórek szpiku kostnego myszy w następstwie 8-tygodniowej ekspozycji myszy na DBP

Changes in genetic material of mouse bone marrow cells following 8-weeks exposure to DBP

Dawki DBP (mg/kg m.c.)	Czas od rozpoczęcia ekspozycji	PCEs/NCEs	MN/1000 PCE ±SD	Moment ogonowy komet w limfocytach szpiku kostnego ±SD
Kontrola	4 tygodnie	0,970	2,0±0,71	0,84±1,53
500	4 tygodnie	0,940	2,2±1,64ns	0,85±2,07ns
2000	4 tygodnie	0,995	2,8±0,77ns	1,01±0,37ns
Kontrola	8 tygodni	0,940	2,8±1,30	5,31±0,87
500	8 tygodni	0,910	3,8±0,64ns	5,84±2,07ns
2000	8 tygodni	0,860	4,4±2,70ns	4,40±1,37ns
Kontrola	12 tygodni <sup>a</sup>	0,850	2,0±2,00	2,23±0,95
500	12 tygodni <sup>a</sup>	0,940	4,4±2,07ns	2,93±1,16ns
2000	12 tygodni <sup>a</sup>	0,870	3,8±1,64ns	3,55±1,19ns

ns – nieistotne statystycznie w teście *t-Studenta*<sup>a</sup> - 4 tygodnie po zakończeniu ekspozycji

PCEs – erytrocyty polichromatyczne

NCEs – erytrocyty normochromatyczne

W tabeli 2 przedstawiono dane dotyczące potencjalnego toksycznego oddziaływania DBP na komórki szpiku kostnego oraz uszkodzeń DNA w limfocytach i erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego. Stosunek erytrocytów normochromatycznych do polichromatycznych był prawidłowy. Nie stwierdzono istotnego statystycznie wzrostu częstości występowania mikrojąder zarówno po 4 i 8 tygodniach narażenia badanych zwierząt, jak i po kolejnych 4 tygodniach od zakończenia ekspozycji na żadną ze stosowanych dawek. Jakkolwiek efekt biologiczny był widoczny po 8-tygodniowym podawaniu związku i 4 następnym tygodniach. Po 4 tygodniach od rozpoczęcia podawania DBP wartości momentu ogonowego w limfocytach krwi obwodowej były podobne jak u zwierząt kontrolnych. Bezpośrednio po zakończeniu 8-tygodniowego podawania DBP stwierdzono niewielkie zwiększenie uszkodzeń DNA u myszy otrzymujących badany związek w dawce 1/16 LD<sub>50</sub> podczas gdy u zwierząt, którym podawano DBP w dawce 1/4 LD<sub>50</sub> DBP notowano niewielkie zmniejszenie poziomu uszkodzeń DNA. Z kolei po 4 tygodniach od zakończenia podawania DBP moment ogonowy wykazywał tendencje wzrostową w zależności od dawki. Wyniki nie różniły się jednak statystycznie od kontrolnych.

Rezultaty dotyczące stężenia pozostałości DBP we krwi badanych zwierząt przedstawiono w tabeli 3. Średnie stężenie DBP wynosiło 0,068 do 2,915 µg/ml i zwiększało się wraz z upływem czasu od rozpoczęcia podawania DBP będąc bezpośrednią konsekwencją przedłużonej ekspozycji na ten związek. Stężenie DBP we krwi obwodowej zwierząt, którym podawano DBP w dawce 2000 mg/kg m.c. było około 7-krotnie wyższe niż

u zwierząt kontrolnych i utrzymywało się również po 4 tygodniach od zakończenia narażenia na DBP. Chociaż stężenie DBP we krwi myszy kontrolnych było w tym czasie znacznie wyższe niż w próbkach pobranych po 4 i 8 tygodniowej ekspozycji, to jednak stężenie DBP w próbkach badanych ponad 2-krotnie przewyższało wyniki uzyskane u zwierząt kontrolnych.

Tabela 3. Średnie stężenia DBP w krwi obwodowej narażanych myszy w zależności od dawki i czasu ekspozycji

Mean concentration of DBP in exposed mice blood samples by dose a time of exposure

Czas od rozpoczęcia ekspozycji	Średnie stężenie DBP (µg/ml)		
	Kontrola	500 mg/kg m.c.	2000 mg/kg m.c.
4 tygodnie	0,479	0,068	0,154
8 tygodni	0,464	0,665	2,915
12 tygodni <sup>a</sup>	1,116	2,369	2,626

<sup>a</sup> - 4 tygodnie po zakończeniu ekspozycji

## DYSKUSJA

Ftalanu należą do dużej i zróżnicowanej grupy związków chemicznych określanych jako proliferatory peroksysomów (PPs). Obecnie przypuszcza się, że poprzez zmiany ekspresji genów i oddziaływanie na fenotyp uszkodzonych komórek indukują one nowotwory podobnie jak hormony steroidowe, takie jak estrogeny i androgeny [11]. Większość prac odnośnie wpływu ftalanów na organizmy żywe dotyczy wpływu tych związków na komórki płciowe zwierząt doświadczalnych [7, 21]. Stosunkowo mało prac opisuje efekty indukowane w komórkach somatycznych. Stwierdzono m.in. hepatokancerogenne właściwości DBP [16, 25]. U szczurów otrzymujących paszę zawierającą 1% DBP obserwowano hepatomegalię [31]. W przypadku ekspozycji szczurów na DBP podczas ciąży i laktacji oraz w okresie pourodzeniowym, u potomstwa notowano wzrost masy wątroby [21]. Z kolei *Walsedth i Nilsen* [28] nie wykazali wpływu DBP na masę wątroby. W niniejszych badaniach stwierdzono istotne statystycznie obniżenie masy wątroby po 8 tygodniowym narażeniu badanych myszy na DBP w dawce 2000 mg/kg m.c. W tym samym czasie i przy zastosowaniu tej samej dawki badanego ftalanu obserwowano też największe, chociaż nieistotne statystycznie, uszkodzenia DNA w komórkach wątroby.

Na podstawie wyników badań wykonanych w warunkach *in vitro* DBP zaliczono do kategorii słabych mutagenów [5] działających po uprzedniej aktywacji enzymatycznej [5, 33]. *Woodward* i wsp. [32] stwierdzi-

li, że DBP nie jest bezpośrednio genotoksyczny jakkolwiek powoduje wzrost częstości wymiany chromatyd siostrzanych i pęknięcia chromosomów. Również w raporcie *IPCS* [17] po analizie dostępnych wyników badań wykazano, że DBP nie jest genotoksyczny.

W piśmiennictwie brak informacji dotyczących indukcji mikrojąder w somatycznych komórkach po podaniu DBP. *Douglas* i wsp. [10] nie obserwowali wzrostu częstości wymiany chromatyd siostrzanych ani częstości występowania mikrojąder w komórkach krwi obwodowej w następstwie ekspozycji na DEHP. W przedstawionych badaniach w wyniku 8 tygodniowego narażenia na DBP nie stwierdzono istotnego statystycznie wzrostu częstości indukcji mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego, chociaż zanotowano słaby efekt biologiczny. Pod wpływem DBP zaobserwowano także w komórkach wątroby niewielką nieistotną statystycznie indukcję uszkodzeń DNA w komórkach somatycznych mierzoną testem kometowym. We wcześniejszych badaniach *in vitro* wykazano, że niektóre ftalany powodowały zwiększenie uszkodzeń DNA w leukocytach ludzkich [3]. Podobnie, *Kleinsasser* i wsp. [18] w badaniach *in vitro*, stosując test kometowy w środowisku alkalicznym wykazali genotoksyczne właściwości DBP w stosunku do komórek nabłonkowych i śluzówkowych.

W celu uniknięcia zanieczyszczenia próbek ftalanami z plastikowych elementów naczyń laboratoryjnych, podczas ich analizowania w materiale biologicznym, każdą próbkę zbierano i wirowano w szklanych próbkach oraz przenoszono szklanymi pipetami. Mimo tego wszystkie próbki z grupy kontrolnej zawierały DBP. Wynika to prawdopodobnie z zanieczyszczenia ftalanami wszystkich elementów środowiska laboratoryjnego. Stwierdzane niespodziewanie wysokie poziomy DBP w próbkach krwi pobranych po 4 tygodniach od zakończenia podania DBP w dawce 1/16 LD<sub>50</sub> są trudne do wyjaśnienia, choć podkreślić należy, że w próbkach krwi komplementarnej grupy kontrolnej również wykryto stosunkowo wysokie poziomy tych związków. Zanotowano szeroki rozrzut stężeń DBP u poszczególnych zwierząt doświadczalnych w obrębie obu grup. Podobne spostrzeżenia dotyczące DEHP we krwi zwierząt odnotował *Ljungvall* i wsp. [20]. Przyczyną uzyskiwania tego typu wyników są prawdopodobnie indywidualne różnice w metabolizmie ftalanów u poszczególnych zwierząt doświadczalnych.

DBP jest metabolizowany przez niespecyficzne esterazy do ftalanu mono-n-butyłu (MBP) [24, 29]. Wysokie narażenie drogą pokarmową na DBP może przekraczać możliwości esterazy obecnej w jelitach, powodującej przekształcenie DBP w MBP, a w konsekwencji zmiany we wchłanianiu tych związków. Możliwości kumulacji w tkance tłuszczowej szczurów opisane zostały przez *Williams i Blanchfield* [30]. We

wcześniejszych badaniach własnych [9] nie stwierdzono DBP w gonadach, prawdopodobnie ze względu na zbyt krótki okres półtrwania i szybki metabolizm tego związku do jego monoestrów oraz ich wydalanie z moczem i kałem [1, 12, 26]. W badaniach tych nie analizowano poziomów MBP, jednakże wysoki poziom DBP w krwi obwodowej w wyniku 8-tygodniowego podawania związku w dawce 2000 mg/kg m.c. może sugerować mniejsze tempo wydalania lub spowolnienia metabolizmu do MBP. Tę hipotezę potwierdzają również wyniki po 4 tygodniach od zaprzestania podawania DBP wskazujące, że stężenie badanego związku było w tej grupie ponad 2-krotnie wyższe niż u zwierząt kontrolnych. W celu dokładniejszego wyjaśnienia czy taki mechanizm jest rzeczywiście odpowiedzialny za utrzymywanie się wysokich poziomów DBP przez 4 tygodnie po zaprzestaniu narażenia celowe byłoby przeprowadzenie badań z użyciem zwierząt doświadczalnych zapewniających większą ilość materiału do badań analitycznych.

## WNIOSKI

1. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że ftalan dibutyli nie jest mutagenem w odniesieniu do materiału genetycznego komórek somatycznych badanych myszy.
2. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że metabolizm DBP początkowo szybko wydalanego z organizmu, w następstwie przedłużonej ekspozycji może ulegać zahamowaniu powodując w rezultacie dłuższe utrzymywanie się tego związku we krwi obwodowej.

## Podziękowanie

Badania finansowane częściowo przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2004-2007 w ramach projektu badawczego nr 2PO5D 2926.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Albro P.W., Hass J.R., Peck C.C., Jordan S.T., Schroeder J.*: Applications of isotope differentiation for metabolic studies with di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J. Environ. Sci. Health B* 1982, 17(6), 701-14.
2. *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, 261-71.
3. *Anderson D., Yu T.W., Hincal F.*: Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1999, 19, 275-280.
4. *Artel B.D.*: Metabolism of DEHP. Effects prefeeding and dose variation, and comparative studies in rodents and cynomolgus monkey CMA studies. *Drug Metabol. Rev.* 1989, 21, 33-53.
5. *ATSDR.* Di-n-butylphthalate. Toxic profile. Prepared by: Life Systems Inc. Under Subcontract to: Clement Associates, Inc.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service 1990.
6. *Barber E., Cifone M., Rundell J., Przygoda R., Astill B., Moran E., Mulholland A., Robinson E.*: Results Of the L5178Y mouse lymphoma assay and the Balb/3 cell in vitro transformation assay for eight phthalate esters: *J. Appl. Toxicol.* 2000, 20, 69-80.
7. *Boekelheide K., Johnson K.J., Richburg J.H.*: Sertoli cell toxicants. In: *Skinner M.K., Griswold M.D.* (eds.) Sertoli cell biology. Elsevier Academic Press San Diego, 2004, pp 1-115.
8. *CIRC* – Find report on the safety assessment on dibutyl phthalate, dimethyl phthalate and diethyl phthalate. *J. Am. Coll. Toxicol.* 1985, 4, 287-303.
9. *Dobrzyńska M., Tyrkiel E.J., Hernik A., Derezińska E., Góralczyk K., Ludwicki J.K.*: The effects of di-n-butyl phthalate on the germ cells of laboratory mice. *Roczn. PZH* 2009, 60, 317-323.
10. *Douglas G.R., Hugenhalts A.P., Blakey D.H.*: Genetic toxicology of phthalate esters. Mutagenic and other genotoxic effects. *Environmental Health Perspect.* 1986, 65, 255-262.
11. *Green S.*: Peroxisome proliferators a model for receptor mediated carcinogenesis. *Cancer Surv.* 1992, 14, 221-232.
12. *Hauser R., Calafat A.M.*: Phthalates and human health. *Occupat. Environ. Med.* 2005, 62, 806-818.
13. *Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M. Jr.*: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 1990, 245, 245-249.
14. *Hayashi M., Sofuni T., Ishidate M. Jr.*: An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.* 1983, 120, 241-247.
15. *Herdell L., Ohlson C.G., Fredrikson M.*: Occupational exposure to polyvinyl chloride as a risk factor for testicular cancer evaluated in a case control study. *J. Int. Cancer* 1997, 73, 828-30.
16. *Huber W.W., Gasl-Kraupp B., Schulte-Hermann R.*: Hepatocarcinogenic potential of di (2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications in human risk. *Crit. Rev. Toxicol.* 1996, 26(4), 365-381.
17. *IPCS* – Environmental Health Criteria, 189. D-n-butyl phthalate ISBN 9241571896, WHO Geneva, 1997.
18. *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.
19. *Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wójcik A.*: A cross-platform public domain PC image-analysis program for comet assay. *Mutat. Res.* 2003, 534, 15-20.
20. *Ljungvall K., Tienpont B., David F., Magnusson U., Törneke K.*: Kinetics of orally administered di(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite, mono (2-ethylhexyl) phthalate, in male pigs. *Arch. Toxicol.* 2004, 78, 384-389.

21. *Marsman D.S.*: NTP- Technical report on toxicity studies of dibutyl phthalate (CAS Nr. 84-74-2) administered in feed to F 344 rats and B6C3F1 mice NiH Publication 95-3353. National Toxicology Program. Research Triangle Park, 1995.
22. *Mylchesteer E., Cattley R.C., Foster P.M.*: Male reproductive tract malformation in rats following gestation and lactation exposure to di(n-buthyl) phthalate on antiandrogen mechanism. *Toxicol. Sci.* 1998, 43(1), 47-60.
23. *Pollack G.M., Slaughter R.L., Buchanan J.F., Shen D.D.*: A high performance liquid chromatographic procedure for the determination of di-(2-ethylhexyl) phthalate in human blood specimens: Problems of variable extraction yield and the use of standard addition for calibration. *J. Chromatogr.* 1984, 311, 101-108.
24. *Rawland I.R.*: Metabolism of di-(2-ethylhexyl)phthalate by the contents of the alimentary tract of the rat. *Food Cosmet. Toxicol.* 1974, 12, 293-302.
25. *Richmond R.E., Carter J.H., Carter H.W., Daniel F.B., Deangelo A.B.*: Hepatocyte expression of tumor associated aldehyde dehydrogenase (ALDH-3) and p21 Ras following diethylmitrosoamine (DEN) initiation and chronic exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Carcinogenesis* 1996, 17(8), 1647-1655.
26. *Schmid P., Schlatter C.*: Excretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in man. *Xenobiotica* 1985, 15, 251-56.
27. *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, 184-91.
28. *Walseth, F., Nilsen, O.G.*: Phthalate esters. Part II. Effects of inhaled dibutylphthalate on cytochrome P-450 mediated in rat liver and lung, *Arch. Toxicol.* 1984, 55(2), 132-36.
29. *White R.D., Carter D.E., Earnest D., Mueller J.*: Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine. *Food Toxicol.* 1980, 18, 383-386.
30. *Williams D.T., Blanchfield B.*: The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate -14C in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 1975, 23, 854-858.
31. *Wine R.N., Li L.H., Barners L.H., Gulati D.K., Chapin R.E.*: Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.* 1997, 105, 102-107.
32. *Woodward K.N., Smith A.M., Mariscotti S.P., Tomlinson N.J.*: Review of the toxicity of the esters of o-phthalic acid (phthalate esters). Health and Safety Executive. London, 1986.
33. *Zeiger E., Haworth S., Mortelmans K., Speck W.*: Mutagenicity testing of di(-ethylheksyl)phthalate and related chemicals in Salmonella. *Environ. Mutagen.* 1995, 7, 213-232.

Otrzymano: 15.04.2009

Zaakceptowano do druku: 30.10.2009

