



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Laurynas Orla

**Di(2-etilheksil)ftalato ir dibutilftalato toksinis poveikis
žiurkių jauniklių hipokampo plastiškumui**

Magistro baigiamasis darbas

Biologinės įvairovės studijų programa

Darbo vadovas

asist. dr. Rasa Aukštikalnienė

Studentas

Konsultantas

doc. dr. Grita Skujienė

Darbas atliktas

GMC Biomokslų instituto Zoologijos katedroje

Turinys

Santrumpos ir paaiškinimai	3
Įvadas	4
1. Literatūros apžvalga	5
1.1. Ftalatai.....	5
1.2. Di(2-etilheksil)ftalatas (DEHP)	6
1.3. Di(2-etilheksil)ftalato (DEHP) neurotoksinis poveikis.....	7
1.4. Di-n-butilftalatas (DBP)	9
1.5. Di-n-butilftalato (DBP) toksinis poveikis.....	10
1.6. Hipokampus	11
1.7. Toksikologinių tyrimų modelinis organizmas – žiurkė	13
2. Tyrimo metodai	14
2.1. Tyrimo planas ir leidimai.....	14
2.2. Tyrimo eiga	14
2.3. Tyrimo metodai.....	16
2.3.1. Žiurkių smegenų histologinių blokų ruošimas.....	16
2.3.2. Žiurkių smegenų histologinių pjūvių dažymas pagal Nissl ir analizė	17
2.3.3. Statistikos metodai.....	20
3. Rezultatai	21
3.1. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo pokyčiai ftalatų poveikyje.....	21
3.2. Antros kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo pokyčiai ftalatų poveikyje.....	26
3.3. Abiejų kartų žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 ir CA2 pokyčių ftalatų poveikyje palyginimas.....	31
4. Rezultatų aptarimas	33
Išvados	36
Autoriaus asmeninis indėlis	37
Rezultatų sklaida	38
Padėka	39
Santrauka	40
Abstract	41
Literatūros sąrašas	43
Priedai	53
Priedas A. Leidimas dirbti su laboratoriniais gyvūnais.....	53
Priedas B. Žiurkių jauniklių F1 ir F2 hipokampo morfologijos analizės duomenys	54

Santrumpos ir paaiškinimai

CA1 – galvos smegenų hipokampo regionas *cornu ammonis* 1.

CA3 – galvos smegenų hipokampo regionas *cornu ammonis* 3.

DBP – di-n-butilftalatas, dažniausiai naudojamas kaip plastifikatorius, kurio dedama į daugelį PVC (polivinilchlorido) statybinių medžiagų, randama įvairiuose buitiniuose produktuose, kvepaluose, medicininėje įrangoje. Iki šios dienos DBP draudžiama naudoti visuose žaisluose, vaikų priežiūros prekėse ir kosmetikoje dėl kancerogeninio, mutageninio arba toksinio poveikio reprodukcijai (Europos komisija, 2008a).

DEHP – di(2-etilheksil)ftalatas, kuris dažniausiai naudojamas kaip plastifikatorius PVC (polivinilchlorido) produktų gamyboje, siekiant suteikti plastikui lankstumo savybių. DEHP gali būti randamas įvairiuose produktuose. Šiuo metu DEHP draudžiama naudoti žaisluose, vaikų priežiūros prekėse, kosmetikoje, nes yra laikomas kancerogenine arba toksiška reprodukcijai medžiaga (Europos komisija, 2008b).

DiBP – di-isobutilftalatas, plastifikatorius, kuris dažniausiai naudojamas kartu su kitais ftalatais (Europos Komisija, 2008c).

DiNP – di-isononilftalatas, dažniausiai naudojamas kaip plastifikatorius grindų ir baldų dangos gamyboje (Europos Komisija, 2008d).

F1 – pirmoji karta.

F2 – antroji karta.

Hipokampo plastiškumas – šiame darbe suprantamas kaip hipokampo struktūrinis jautrumas aplinkos ar toksinių veiksnių poveikiui, kuris pasireiškia CA1 ir CA3 regionų storio, bei jose esančių neuronų tankio pokyčiais.

PBS – fosfato buferinis fiziologinis tirpalas, kuriame yra NaCl, KCl, KH₂PO₄ ir Na₂HPO₄ (Di Mei et al., 2020).

PET – tai termoplastinis poliesteris, gaminamas iš tereftalio rūgšties ir etilenglikolio. Jis plačiai naudojamas gaminant plastikinius butelius, maisto pakuotes, tekstilės pluoštus (Benyathiar et al., 2022).

PVC – polivinilchloridas, plačiai naudojamas polimeras, ypač statybose ir medicinoje. Jo sudėtyje paprastai yra daug plastifikatorių, pavyzdžiui, ftalatų (Lithner et al., 2011).

Įvadas

Cheminė tarša tampa vis aktualesne pasauline problema. Į aplinką pačiais įvairiausiais būdais patenka vis daugiau cheminių teršalų, kurie kaupiasi gamtoje ir gali turėti rimtų pasekmių gyviesiems organizmams. Didėjanti plastiko tarša kelia rimtą susirūpinimą jau keletą dešimtmečių, tačiau vis dažniau pradedame girdėti apie plastiko priedų, mikroplastiko ir nanoplastiko taršą. Tarp šių priedų susirūpinimą ypač kelia ftalatai, kurie naudojami pačiose įvairiausiose pramonės srityse kaip plastifikatoriai, tačiau mokslininkams jie jau žinomi kaip endokrininę sistemą ardančios cheminės medžiagos (Henkel et al., 2024). Daugelis pasaulio šalių, tarp jų ir Europos Sąjunga, griežtai reglamentuoja ftalatų naudojimą ir išleidimą į gamtą. Vilniaus vandenys (2021) atkreipia dėmesį, kad nors iki 2033 m. ES narės yra įsipareigojusios pasiekti nulinę ftalatų bei fenolių taršą, realybė visai kitokia. Lietuvos žiniasklaidoje vis dažniau kalbama apie ftalatus, jų naudojimą ir toksinį poveikį. Lietuvoje atliekami ftalatų koncentracijos nuotekų vandenyse monitoringo rezultatai rodo, kad šie viršija leistinas normas. Įmonėms skiriamos didžiulės baudos, už ftalatų koncentracijos išleidimą su nuotekų vandeniu. Daugėjant tyrimų apie ftalatų toksinį poveikį įvairioms organų sistemoms yra išsiaiškinta, kad šie chemikalai sugeba įveikti smegenų – kraujo barjerą ir kauptis nerviniame audinyje. Toks jų veikimas kelia didelį susirūpinimą dėl galimo neurotoksinio poveikio nervų sistemai, ypač hipokampui, kuris yra atsakingas už atmintį, mokymosi procesus ir emocinį reguliavimą. Todėl labai svarbu išsiaiškinti, kokį poveikį žinduolių jauniklių hipokampo plastiškumui gali turėti Lietuvos vandenyse randamos di(2-etilheksil)ftalato (toliau DEHP) ir dibutilftalato (toliau DBP) koncentracijos. Tai leistų numanyti, kokį poveikį galėtų sukelti žmonėms tokių koncentracijų ftalatų ilgalaikis kasdienis vartojimas.

Darbo tikslas – nustatyti di(2-etilheksil)ftalato ir dibutilftalato toksinį poveikį žiurkių jauniklių hipokampo plastiškumui.

Darbo uždaviniai:

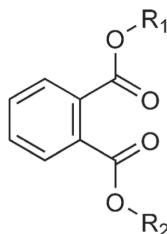
1. Išsiaiškinti ilgalaikį DEHP ir DBP poveikį žiurkių (F1, F2) jauniklių patinų hipokampo CA1 ir CA3 regionų storiui.
2. Nustatyti ilgalaikį DEHP ir DBP poveikį žiurkių (F1, F2) jauniklių patinų hipokampo CA1 ir CA3 regionų neuronų tankiui.
3. Palyginti pirmosios (F1) ir antrosios (F2) kartos eksperimentinių žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 ir CA3 regionų storio bei neuronų tankio rezultatus.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Ftalatai

Plastikas buvo išrastas 1907 m. ir tapo viena pagrindinių priemonių, kurios palengvina žmogaus kasdienį gyvenimą. Nors susintetinta nauja medžiaga atnešė daug naudos, tačiau taip pat išryškėjo ir didelis neigiamas poveikis tiek aplinkai, tiek žmogui ir visiems gyviesiems organizmams, kol galiausiai tapo globaline problema. Žmonės kiekvieną dieną susiduria su nuo plastikų atskilusiomis medžiagomis jiems to nežinant: per užterštą maistą, plastikines pakuotes (tokias kaip vandens buteliukai, medicinos prietaisai ar maisto produktų pakuotės). Įvairias atsiskyrusias plastikų priedų dalis galime rasti ir dulkėse, asmens higienos produktuose, sintetiniuose drabužiuose (Letcher, 2020; Ke et al., 2021). Ilgalaikis plastiko priemonių naudojimas neišvengiamai tik pagausina įvairių sveikatai pavojingų medžiagų išsiskyrimą. Šiuo metu didžiausią susirūpinimą kelia ftalatai, kurie nėra chemiškai sujungti su plastiko polimerais, todėl lengvai išsiskiria iš plastiko gaminių į aplinką (Schug et al., 2016; Grindler et al., 2018; Alam et al., 2024).

Ftalatai – didžiulė, plačiai naudojamų cheminių medžiagų grupė. Jie naudojami įvairiose pramonės srityse: plastiko gamyboje, maisto ir gėrimų pakuočių gamyboje, vaikų žaisluose, kosmetikoje ir medicinos priemonėse. Žmonės ir visi gyvieji organizmai gali būti veikiami ftalatų įvairiais būdais (t. y. nurijus, įkvėpus, per odą ar dėl su medicininėmis priemonėmis susijusios ekspozicijos), nes šie junginiai iš plastiko lengvai patenka į vandenį, maistą, dirvožemį, orą, todėl jie yra visur esantys aplinkos teršalai (Giuliani et al., 2020). Ftalatai yra ftalato rūgšties (1,2-benzendikarboksirūgšties) esteriai (1.1.1 pav.), kurie jau nuo XX a. ketvirtojo dešimtmečio yra pagrindiniai polimerų pramonėje naudojami plastifikatoriai. Nuo 10 % iki 60 % jų dedama į plastikines medžiagas, tokias kaip polivinilchloridą (PVC), polietileno tereftalatą (PET), polivinilacetatą (PVA) ir polietileną (PE), siekiant pagerinti polimerų tamprumą, elastingumą ir minkštumą (De Toni et al., 2017).



1.1.1 pav. Bendra cheminė ftalatų struktūra. R_1 ir $R_2 = C_nH_{2n+1}$, $n = 4 - 15$ (Peijnenburg, 2008)

Ftalatai yra laikomi labai pavojingais teršalais visiems gyviesiems organizmams. Pirmiausia, aplinkoje ftalatai išlieka stabilūs ir akumuliuojasi maisto grandinėje (Schettler, 2006). Jau prieš dešimtmetį (Net et al., 2015; Fang et al., 2016) buvo įrodyta, kad net 67 % visos žmogaus ekspozicijos ftalatais įvyksta būtent per maistą ir gėrimus. Tai reiškia, kad du trečdaliai ftalatų kiekio, su kuriais

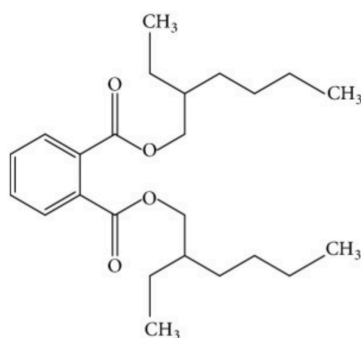
susiduriame kasdien, patenka į organizmą valgant ar geriant. Šie junginiai gali migruoti į maistą iš plastikinių pakuočių ar talpų, ypač šildymo, laikymo ar transportavimo metu (Net et al., 2015; Fang et al., 2016). Taip pat, ftalatai sutrikdo hormonų pusiausvyrą ir neigiamai veikia reprodukcinę sistemą (De Toni et al., 2017; Alam et al., 2024). Palyginti su suaugusiais, vaikai yra pažeidžiamesni ir jautresni ftalatų poveikiui, ypač ankstyvuoju augimo laikotarpiu (Chou et al.; 2009, Holahan & Smith, 2015).

Išsiaiškinus ftalatų neigiamą poveikį daugelyje išsivysčiusių šalių jų naudojimas buvo apribotas. 2001 m. pirmoji šalis uždraudusi naudoti DEHP ir DiNP žaisluose ir pirštinėse, kurios skirtos darbui su maistu, buvo Japonija (Mutsuga et al., 2002). 2007 m. Europos Sąjungos šalyse buvo uždrausta naudoti DEHP, DBP ir BBP visuose PVC ir kitose plastifikatorinėse medžiagose, kurios naudojamos žaislų pramonėje ir vaikų priežiūros produktuose (Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2005/84/EB, 2005). Nuo 2018 m. šį sąrašą papildė DiBP (Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (ES) 2018/2005, 2018). 2008 m. prie draudimų ftalatus naudoti žaisluose ir vaikų prekėse prisidėjo JAV, uždrausdama naudoti DEHP, DBP ir BBP (JAV Kongresas, 2008). Australija uždraudė naudoti tuos pačius ftalatus ne tik vaikams skirtose prekėse, bet ir induose, muzikos instrumentuose, knygose (Australian Competition and Consumer Commission, 2020).

Dėl skirtingų fizikinių ir cheminių savybių ftalatai skirtingai veikia žmones ir aplinką, o jų ryšys su keliomis žmonių ligomis vis dar diskutuojamas, nes mokslininkai vis plačiau aprašo ftalatų įtaką neurologinėms, imuninėms, širdies ir kraujagyslių ligoms, bei kitiems sutrikimams (López-Carrillo et al., 2010; Jeddi et al.; 2015; Mu et al., 2015; Alam et al., 2024). Iš kelių dešimčių per daugelį metų susintetintų ftalatų, Europoje dažniausiai naudojami DEHP, diizodeciltalatas (DIDP), DINP ir di-n-butiltalatas (DBP) (Peijnenburg, 2008).

1.2. Di(2-etilheksil)ftalatas (DEHP)

DEHP – žmogaus susintetintas di(2etilheksil)ftalatas – $C_{24}H_{38}O_4$ (1.2.1 pav.), kuris natūraliai aplinkoje nėra randamas (Rowdhwal & Chen, 2018). DEHP taip pat vadinamas bis(2-etilheksil)ftalatu arba dioktilftalatu (DOP) (Huang et al., 2008).



1.2.1 pav. Di(2-etilheksil)ftalato struktūrinė formulė (Rowdhwal & Chen, 2018)

Šis ftalatas yra beveik bekvapis, bespalvis, klampus skystis, geriau tirpstantis tokiose medžiagose kaip dažų valikliai, benzinai ir alyvos nei vandenyje (Huang et al., 2008). DEHP sunkiai garuoja, todėl šalia gamybos šaltinių koncentracija ore nėra didelė. Kasmet šio ftalato pasaulyje pagaminama daugiau kaip 6 mln. tonų (Bu et al., 2020). Plačiausiai šis ftalatas naudojamas kaip plastifikatorius polivinilchlorido (PVC) gamyboje, norint jį pagaminti minkštesnį ir lankstesnį (CPSC, 2010). PVC kaip sudedamoji dalis yra naudojama labai įvairiose pramonės srityse, o jo gaminimo metu dalis DEHP lieka, todėl jis lengvai patenka į kitus gaminius. Dažniausiai di(2-etilheksil)ftalato randama sienų dangose, staltiesėse, grindų plytelėse, baldų apmušaluose, dušo užuolaidose, sodo žarnose, pripučiamuosiuose baseinuose, lietaus lėkštelėse, kūdikių sauskelnėse, lėkštelėse ir kituose žaisluose, avalynėje, automobilių dalyse, pakavimo plėvelėse, laidų ir kabelių apvalkaluose, medicininiuose vamzdeliuose ir kraujo laikymo maišeliuose (Lay & Miller, 1987; Tickner et al., 2001; Wittassek & Angerer, 2008; Tran et al., 2022).

Di(2-etilheksil)ftalatas į aplinką gausiausiai išsiskiria per atliekas esančias sąvartynuose arba patenka per pramonines bei komunalines nuotekas (Clara et al., 2010). DEHP lengvai absorbuojasi dirvožemyje, vandens telkinių nuosėdose ir vandens organizmuose (Staples et al., 1997).

Dėka gausaus plastikinių pakuočių naudojimo maisto pramonėje, DEHP lengvai patenka ir į žmogaus maisto produktus bei į geriamąjį vandenį. Maisto produktuose, ypač turtinguose riebalais, randama daugiausiai šio ftalato. Didžiausios koncentracijos buvo nustatytos paukštienoje, aliejuje, pieno produktuose. Šiuose maisto produktuose koncentracija dažniausiai viršija 300 µg/kg ribą – nors leistinos paros dozės neviršija, tačiau laikoma aukšta riba pagal Europos maisto saugos tarnybos (EFSA) standartus (Serrano et al., 2014). DEHP randama ir geriamajame vandenyje, ypač PET tipo buteliukuose. Šis ftalatas geriamajame vandenyje iš buteliukų yra nustatytas įvairiomis sąlygomis, tačiau kiekis priklauso nuo temperatūros ir laikymo trukmės (Jeddi et al., 2015; Kavaliauskas, 2019).

Dėl lengvo patekimo į aplinką ir akumuliacijos, bei plataus paplitimo žmogaus aplinkoje, DEHP yra laikomas vienu iš svarbiausių teršalų pasaulyje (Magdouli et al., 2013) ir nuolat yra tiriamas šio ftalato ilgalaikis poveikis žmonėms (Nohynek et al., 2013; De Toni et al., 2017; Alam et al., 2024).

1.3. Di(2-etilheksil)ftalato (DEHP) neurotoksinis poveikis

Vertinant DEHP toksinį poveikį žmogaus sveikatai dažnai pasirenkama žiurkė kaip modelinis organizmas. *In vivo* tyrimų trukmė ir skiriamos dozės skirtinguose eksperimentuose yra labai įvairios: eksperimentai dažniausiai trunka nuo 7 dienų iki 23 savaičių, o dozių koncentracijos svyruoja nuo 200 µg iki 3 g/kg. Dažniausiai tiriamas DEHP toksinis poveikis sėklidėms, kiaušidėms, endokrinei sistemai ir kepenims (Rowdhwal & Chen, 2018; Giuliani et al., 2020; Wang et al., 2021). Dažniausiai

tirtos DEHP dozės sukėlė oksidacinį stresą, citotoksiškumą, apoptozes, steroidinių hormonų sumažėjimą ir lipidų apykaitos sutrikimus (Alam et al., 2024).

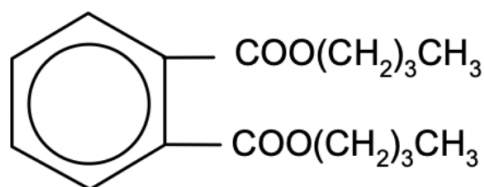
Tyrimais įrodyta, kad di(2-etilheksil)ftalatas toksiškai veikia nervų sistemą ir sutrikdo jos veiklą. Dėl savo cheminių ir fizikinių savybių DEHP gali sutrikdyti neurologinį vystymąsi ir sukelti teratogenines anomalijas, nes pereina placentos barjerą ir patenka į vaisiaus kraujotaką, taip pažeisdamas normalų smegenų vystymąsi (Xu et al., 2007; Lin et al., 2015). Per parą gaunamos 1500 mg/kg DEHP dozės sutrikdo vaisiaus smegenų lipidų metabolizmą, kas sukelia smegenų vystymosi ir augimo anomalijų (Xu et al., 2007).

Tiriant ftalatų neurotoksinį poveikį dažnai vertinamas šių cheminių medžiagų poveikis hipokampui, kuris yra atsakingas už erdvinę orientaciją, prisiminimų formavimo procesus ir atmintį (Bon, 2022). Nustatyta, kad savaitę gauta 10 mg/kg DEHP dozė veikia toksiškai postnatalinių žiurkių patinų hipokampo vystymąsi, tačiau patelėms šis poveikis nepasireiškė (Smith & Holahan, 2014). DEHP poveikyje patelių hipokampe padidėjo fosfatidilcholino ir sfingomielino lipidų koncentracijos, atliekančios neuroapsauginį poveikį, todėl patelėms reikšmingo poveikio ftalatas neturėjo. Patinų hipokampe tokia apsauginė reakcija nesusidarė, todėl pasireiškė DEHP toksinis poveikis. Manoma, kad neuroapsauginis poveikis susidaro patelėse dėl peroksisomų proliferacijos aktyvatorių receptorių (PPAR) ir estrogeno receptorių sąveikos, kuri skatina lipidų kaupimąsi hipokampe ir veikia kaip apsauga nuo neuronų apoptozės (Smith et al., 2015). Tačiau laktacijos metu veikiant postnataliniu laikotarpiu ilgesnį laiką, toksinis poveikis pasireiškia ir žiurkių jauniklių patelėms. Veikiant įvairiomis DEHP dozėmis (1–100) mg/kg nuo 1 iki 60 vystymosi dienos, pasireiškia padidėjęs oksidacinis stresas, padidindamas reaktyviųjų deguonies formų (ROS) kiekį ir sumažindamas antioksidacinių fermentų aktyvumą neuronuose, kuris galėjo pažeisti hipokampą (Solaimuthu et al., 2014).

Aiškinantis chemikalų toksinį poveikį nervų sistemai, dažnai naudojamas neurotoksiniam poveikiui jautrus biomarkeris – smegenų neurotrofinis faktorius (BDNF) – tai baltymas, kurio funkcija yra susijusi su neuronų išlikimu, skatinantis naujų neuronų brendimą ir jų sinapsių diferenciaciją (Huang & Reichardt, 2001). BDNF yra svarbus dendritų augimui ir sinapsinių ryšių tarp neuronų kūrimui, todėl jo raiškos sutrikdymas tiesiogiai ar netiesiogiai sumažina dendritinių spygliukų tankį. Tyrimais nustatyta, kad net nedidelė DEHP dozė (10 mg/kg) turi neigiamą poveikį žiurkių patinų hipokampo BDNF raiškai ir dendritinių spygliukų tankiui (Smith & Holahan, 2014).

1.4. Di-n-butilftalatas (DBP)

DBP – dibutilftalatas ($C_{16}H_{22}O_4$) (1.3.1 pav.), yra bespalvis, aliejingas skystis, turintis esteriams būdingą silpną kvapą (European Chemicals Agency, 2008). DBP dar yra vadinamas di-n-butilftalatu, DnBP, DNBP (Wang & Qian, 2021). Šis sunkiai tirpsta vandenyje, tačiau gerai tirpsta daugelyje organinių tirpiklių, tokių kaip dažai, pesticidai ar peroksidai (Koo & Lee, 2004; Koch et al., 2013).



1.3.1 pav. Dibutilftalato struktūrinė formulė (ATSDR, 2001)

Pasaulyje DBP 2022 m. buvo pagaminama apie 220 tūkstančių tonų ir manoma, kad ateityje šis kiekis tik augs (ChemAnalyst, 2024). Dibutilftalatas dažniausiai naudojamas kaip plastifikatorius polimerų sintezėje, polivinilchlorido (PVC) gaminių pramonėje, keramikoje, propelentuose, kaip metalo apdirbimo skystis (European Chemicals Agency, 2008). Taip pat dėl žemos kainos ir paprasto apdorojimo šis chemikalas plačiai naudojamas keraminių plytelių, dažų, hermetikos, žvakių, kosmetikos, šampūnų, kvepalų, kremų gamyboje (Liao et al., 2018). Tai yra pagrindinis kosmetikoje naudojamas ftalatas, pavyzdžiui, ypač mėgstamas nagų lako gaminiuose (U.S. Food and Drug Administration, 2023) ir kvepaluose (Liao et al., 2018). Atitinkamai, iš 21 nagų lako mėginio devyniolikoje buvo aptiktas DBP, o kvepaluose iš 42 mėginių, šio ftalato buvo rasta vienuolikoje (Koo & Lee, 2004).

Į gyvuosius organizmus dibutilftalatas dažniausiai patenka per maistą, geriamąjį vandenį, įkvepiamą orą, dirvožemį ir odą (CERHP, 2003). Kadangi DBP, kaip plastifikatorius, naudojamas maisto ir gėrimų pakuočių gamyboje, dėl tiesioginio kontakto susidaro tinkamos sąlygos šiam ftalatui patekti į maistą, o iš jo į organizmus – tai yra vienas pagrindinių DBP patekimo į organizmą kelių (Wormuth et al., 2006). Geriamasis vanduo PET buteliukuose, kaip DBP šaltinis, taip pat buvo ne kartą tirtas. Pavyzdžiui, Z. Zhang su bendraautoriais (2016) dibutilftalato įvairiomis koncentracijomis nustatė visuose tirtuose vandens iš butelių mėginiuose, nepriklausomai nuo temperatūros ir laikymo trukmės. Šio ftalato buvo rasta net vandentiekio vandenyje, dėl išsiskyrimo iš plastikinių vamzdžių (Liu et al., 2010).

Ftalatų koncentracija patalpų ore yra 100 – 1000 kartų didesnė nei aplinkos ore, dėl šių chemikalų naudojimo buityje. Patalpose įkvepiamo DBP kiekis gali siekti apie 136 μg per parą (Otake et al., 2004), tuo tarpu pagal Pasaulio sveikatos organizacijos direktyvas leistina DBP paros norma yra tik 10 $\mu\text{g/kg}$ kūno svorio per parą (WHO, 2003). Dėl urbanizacijos ir pramonės vystymosi, dirbami laukai taip pat yra užteršti įvairiausiais teršalais. Ne išimtis ir ftalatai. Augalai per savo šaknų

sistemą iš dirvožemio pasiima DBP, kaupia audiniuose ir taip jis per maisto grandinę patenka į kitus organizmus (Wang et al., 2013; Wang et al., 2020). O DBP naudojimas losjonuose, šampūnuose ir kituose kosmetikos produktuose leidžia šiam chemikalui tiesiogiai patekti į žmogaus organizmą per odą (Sathyanarayana et al., 2008).

Dėl tokio plataus paplitimo ir kaupimosi gamtoje, DBP kartu su kitais ftalatais yra laikomas vienu didžiausiu aplinkos teršalų (Yan et al., 2021).

1.5. Di-n-butilftalato (DBP) toksinis poveikis

Dėl plataus naudojimo įvairiose pramonės srityse, DBP lengvai patenka į žmogaus organizmą, tačiau nesuyra, bet kaupiasi audiniuose. Jo galima aptikti žmogaus šlapime, kraujuje, prakaito liaukose, plaukų folikuluose ir poodiniuose audiniuose (Chatterjee & Karlovsky, 2010; Guo et al., 2013). Didžiausios DBP sankaupos žmogaus organizme yra nustatytos inkstuose, kepenyse, sėklidėse (Braun et al., 2013). Dibutilftalato poveikis yra susijęs su įvairiomis širdies ligomis, nutukimu, kiaušidžių disfunkcija, vaikų autizmu ir įvairiomis uždegiminėmis reakcijomis (Braun et al., 2013; Zhang et al., 2022). Kaip ir DEHP, taip ir DBP yra laikomas endokrininę sistemą ardančia medžiaga (Wang et al., 2021; Zhang et al., 2022). DBP yra atsakingas už spermos kokybės prastėjimą ir testosterono gamybos sutrikimus. Didelio dibutilftalato toksiškumo atvejais atsiranda sėklidžių pažeidimų, raidos sutrikimų, reprodukcinės sistemos apsigimimų ir smegenų anomalijų (Chang et al., 2021).

Aiškinantis DBP poveikį nervų sistemai yra atlikta labai mažai tyrimų, o atlikti eksperimentai rodo, kad šis ftalatas pasižymi neurotoksinio poveikio. Tiriant DBP toksinį poveikį žinduolių nervų sistemai, dažniausiai kaip modelinį organizmą mokslininkai renkasi graužikus (žiurkes, peles) (Li et al., 2013; Lee et al., 2022). D. T. Williams ir B. J. Blanchfield (1975) vieni pirmųjų įrodė, kad po vienkartinės geriamosios dozės (0,27 g/kg), DBP jau yra aptinkamas žiurkių patinų smegenyse. Lėtinis 3 arba 6 mėnesių DBP naudojimas ženkliai padidina jo koncentraciją eksperimentinių gyvūnų nerviniame audinyje, lyginant su vienkartinė doze. Taip buvo įrodyta, kad dibutilftalatas ne tik sugeba pereiti smegenų – kraujo barjerą, bet ir kaupiasi smegenų audinyje (Huang et al., 2014; Wójtowicz et al., 2017; Kassab et al., 2019).

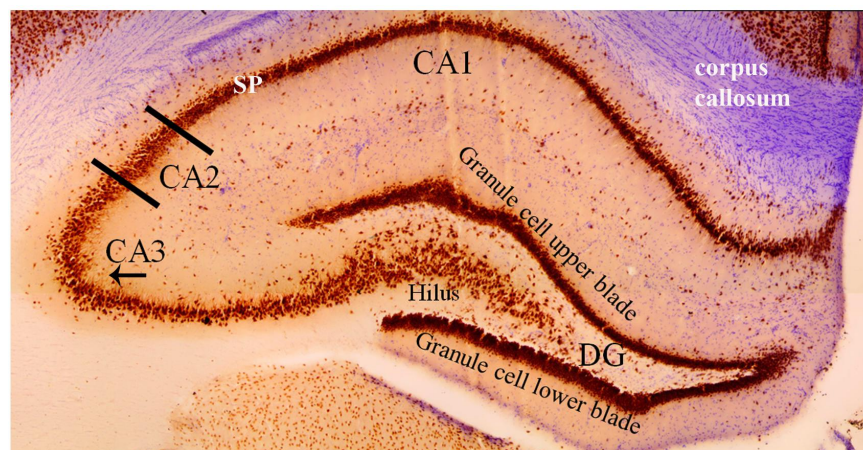
DBP neigiamai veikia žiurkių, kurios prenataliniu laikotarpiu gavo ftalatų, elgseną ir pažinimo gebėjimus (Li et al., 2009; Lien et al., 2015). Atliekant eksperimentus su pelėmis yra nustatyta, kad DBP stabdo naujų neuronų formavimąsi hipokampe, neigiamai veikia mokymąsi ir atmintį (Lee et al., 2022). Tiriant eksperimentinių žiurkių embrionus, yra pastebėta, kad dibutilftalatas sukėlė pirminių neuronų apoptozę, didindamas reaktyvaus deguonies kiekį neuronuose ir sukeldamas jų mitochondrijų disfunkciją. Tokiuose eksperimentiniuose embrionuose sulėtėjo neuronų brendimas, o tai yra susiję su atminties išsaugojimo sutrikimais ir neurokognityvinių funkcijų silpnėjimu (Lee et

al., 2022). Vertinant DBP poveikį žiurkių jaunikių nervų sistemai – buvo nustatyta, kad didelė 500 mg/kg DBP dozė, kurią motinos gavo viso nėštumo ir žindymo laikotarpiu, sukėlė palikuonių neuronų fiziologinius ir hipokampo struktūrinius pokyčius, sumažino presinapsinių pūslelių skaičių, padidino neuronų apoptozės skaičių (Li et al., 2013). Kitame eksperimente suaugusios žiurkės buvo veikiamos DBP ir nustatytas neigiamas poveikis elgsenai. Tyrimas parodė padidėjusį aktyvumą, o tai gali būti siejama su tokiu neurologiniu sutrikimu kaip ADHD (dėmesio trūkumo ir hiperaktyvumo sindromas) (Paulikaitė et al., 2023).

1.6. Hipokampus

Smegenų žievė – viena morfologiškai ir funkciškai sudėtingiausių smegenų sričių. Joje įvyksta visos į smegenis patenkančios informacijos analizė. Smegenų žievė yra atsakinga už sąmonę, mąstymą, atmintį ir gebėjimą apibendrinti. Tarp sudėtingų anatominių smegenų žievės dalių yra ir hipokampus (lot. *hippocampus*) (Bon, 2022).

Hipokampus yra sudarytas iš glaudžiai, į ilgą juostą susitelkusių neuronų, kurie išsidėsto išilgai dorsolateralinėje smilkinio srities dalyje abiejuose smegenų pusrutuliuose (1.6.1 pav.) (Burgess et al., 1999). Abi hipokampo pusės, esančios skirtinguose smegenų pusrutuliuose, yra sujungtos nervinių skaidulų pluoštu (lot. *fornix commissure*) (Bayer, 1982; Bayer et al., 1982). Hipokampus yra skirstomas į tris sritis: *gyrus dentatus* (DG), *cornu ammonis* (CA) ir *subiculum*. CA sritis dar skirstoma į stambiujų ląstelių regionus (CA3, CA2) ir smulkiųjų ląstelių regioną – CA1 (Leung et al., 1995). Dėl piramidinių neuronų tankio ir sudėtingo dendritinio šakotumo hipokampo CA3 ir CA2 regionai yra storesni už CA1 regioną (Amaral & Lavenex, 2007).



1.6.1 pav. Žiurkės hipokampo skerspjūvis, žymėtas NeuN antikūnais. CA1 – *cornu ammonis* 1, CA2 – *cornu ammonis* 2, CA3 – *cornu ammonis* 3, DG – *gyrus dentatus* (Tzakis & Holahan, 2019)

Hipokampe yra du pagrindiniai neuronų grandinių tipai: trisinaptinė ir monosinaptinė. Trisinaptinėje grandinėje sensorinė informacija iš vidinės smilkininės žievės patenka į *gyrus dentatus* ląsteles. Iš jo nervinis impulsas perduodamas į CA3 piramidinių neuronų dendritus, iš kurio toliau Šefero skaidulomis perduodamas į CA1 ir CA2 regiono piramidinių neuronų dendritus. Galiausiai,

CA1 aksonai per *subiculum* sudaro jungtį su smilkinine žieve ir perduoda nervinį impulsą. Monosinaptinėje grandinėje informacija perduodama tiesiogiai iš smilkininės žievės į CA1 piramidinius neuronus, praleidžiant *gyrus dentatus* ir CA3 regiono ląsteles (Seress & Ribak, 1983; Gulyás et al., 1993). Cheminės medžiagos, tokios kaip ftalatai, gali pažeisti sinapsinius ryšius trisinapsinėje ir monosinapsinėje hipokampo grandinėse, mažinant sipansių kiekį ar neuronų plastiškumą. Pažeisti ryšiai sutrikdo nervinio impulso perdavimą ir hipokampo funkcijas (Holahan & Smith, 2015; Kougias et al., 2018).

Darnus informacijos perdavimas tarp smegenų žievės ir hipokampo, bei hipokampo regionų tarpusavyje, užtikrina visas jo funkcijas. Viena iš hipokampo funkcijų yra epizodinė atmintis ir erdvinis kontekstas – gebėjimas saugoti nestruktūrizuotą informaciją ir atkurti konkretų atskirą įvykio prisiminimą, apimantį vietą ir toje vietoje matytą daiktą ar atlygį, o tai labai svarbu palaikant mokymąsi ir emocinę elgseną (Moscovitch et al., 2005; Dere et al., 2008; Dudek et al., 2014; Hamilton et al., 2016). Už asociaciją tarp erdvių, objektų, vietų ir atlygio atsakingi yra CA3 regiono neuronai (Rolls, 2010). Taip pat hipokampo funkcijos svarbios uoslės reakcijai ir kvapų įsiminimui (Dudek et al., 2014; Hamilton et al., 2016). Už panašių prisiminimų atskyrimą ir mažinant skirtingų prisiminimų painiojimą yra atsakingas hipokampo DG regionas. Hipokampo CA1 regionas veikia kaip tiltas tarp hipokampo ir smegenų žievės, dalyvauja informacijos perdavime ir integracijoje (Rolls, 2008). CA2 regionas yra mažiausiai tyrinėjamas hipokampo regionas, tačiau atlieką svarbų vaidmenį. CA2 regiono neuronai perduoda informaciją iš CA3 regiono į CA1 regioną (Chevalleyre et al., 2010). Šių regionų struktūriniai pokyčiai siejami su kognityvinių funkcijų sutrikimais, neurologinėmis ligomis ir toksiniu poveikiu. Hipokampo morfofunkciniai pokyčiai dažniausiai tiriama histologiniais (pvz.: Nissl dažymas) bei imunohistocheminiais metodais (Yassa et al., 2010).

1.7. Toksikologinių tyrimų modelinis organizmas – žiurkė

Žiurkės yra vienas pagrindinių modelinių organizmų naudojamų neurologiniuose, toksikologiniuose ir onkologiniuose tyrimuose (Sengupta, 2013a; Krubaa & Yogitha, 2024). Moksliniuose tyrimuose jos atstoja žmogų kaip eksperimentinį objektą ir maždaug apie 14 % visų mokslo tyrimams naudojamų žinduolių Europoje sudaro žiurkės (Modlinska & Pisula, 2020). Pats pirmasis laboratorinės žiurkės modelis *Wistar (Rattus norvegicus)* (1.7.1 pav.) buvo sukurtas 1906 m. Wistar institute JAV (Krinkle, 2000).



1.7.1 pav. *Wistar (Rattus norvegicus)*. Šaltinis: Inotiv, 2024. *Hsd:WI (Wistar) Outbred Rat*. Prieiga internete: <https://www.inotiv.com/research-model/hsd-wi> [žiūrėta 2025-04-01]

Viena iš priežasčių, kodėl žiurkės yra vienos populiariausių modelinių organizmų – gerai ištirta jų fiziologija ir reprodukcija. Suaugusių žiurkių patelių kūnas yra nuo 18 cm iki 22 cm ilgio, o patinų kūno ilgis svyruoja nuo 20 cm iki 25 cm. Suaugusių žiurkių patelės sveria apie 250 – 300 g, o patinai 400 – 500 g. Patinai lytiškai subręsta 6 – 8 savaitių, o patelės 4 – 6 savaitių. Žiurkių nėštumas vidutiniškai trunka apie 21 – 23 paras, vienoje vadoje atsiveda 6 – 12 jauniklių. Palikuonys atjunkomi maždaug 21 – 28 gyvenimo parą (Sengupta, 2013b). Laboratorinės žiurkės vidutiniškai gyvena apie 2 – 3,5 metų. Lyginant žiurkės gyvenimo trukmę su žmogaus, atliekant tyrimus buvo apskaičiuota, kad vieneri žmogaus metai beveik prilygsta dviem žiurkių gyvenimo savaitėms (13,8 dienos) (Sengupta, 2013a).

Iki šių dienų *Wistar* klonų žiurkės išlieka vienos populiariausių modelinių organizmų (Krubaa & Yogitha, 2024), nes genetiškai šios linijos žiurkės yra ypatingai panašios, kas leidžia gauti itin tikslūs tyrimų rezultatus (Fasman et al., 1987). *Wistar* žiurkių gerai ištirtos fiziologinės ir metabolinės savybės, todėl toksikologiniuose tyrimuose galima efektyviau įvertinti cheminių medžiagų toksinį poveikį (Krubaa & Yogitha, 2024). Taip pat albinosinės žiurkės pasižymi ramiu charakteriu ir lengva priežiūra (Krubaa & Yogitha, 2024).

Nors tyrimuose naudojami gyvūnai atneša daug naudos ir naujų atradimų, gyvūnų naudojimas moksliniuose eksperimentuose yra griežtai reglamentuotas. Atliekant tyrimus reikia laikytis 3 R principo: pakeitimas (Replacement), sumažinimas (Reduction) ir patobulinimas (Refinement) – siekiant sumažinti gyvūnų naudojimą moksliniuose tyrimuose, gauti atitinkamus leidimus ir užtikrinti gyvūnų gerovę ir sveikatą (Europos Parlamentas ir Taryba, 2010; Tannenbaum & Bennett, 2015).

2. Tyrimo metodai

2.1. Tyrimo planas ir leidimai

Tyrimo eiga:

I - bandomųjų gyvūnų laikymas, priežiūra ir procedūros – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute, 2022 metų rugsėjo 15 d. – 2023 metų vasario 17 d.

II – smegenų parafininių blokų ruošimas ir pjaustymas – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Zoologijos laboratorijoje, 2023 metų spalio 15 d. – 2023 metų gruodžio 2 d.

III – histologinių pjūvių dažymas ir analizė – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Zoologijos laboratorijoje, 2023 metų gruodžio 6 d. – 2025 metų kovo 28 d.

Tyrimų leidimai:

Leidimas laboratorijai: Vilniaus universitetas, įm. kodas 211950810, adresas: Saulėtekio al. 7, vet. patvirtinimo Nr. LT 59-13-001, LT 60-13-001, LT 61-13-004, veikla vykdoma Gyvybės mokslų centre, adresu Saulėtekio alėja 7.

Leidimas tyrimui: Vilniaus universitetas, įm. kodas 211950810, adresas: Saulėtekio al. 7, „Mikroelementų ir ftalatų geriamajame vandenyje poveikis žiurkių reprodukcijai, vystymuisi“, vadovė dr. Grita Skujienė.

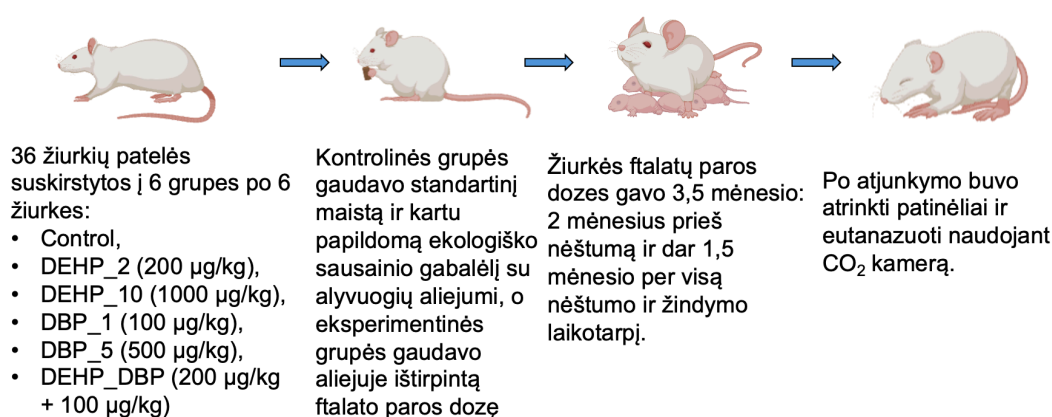
Leidimas dirbti su bandomaisiais gyvūnais: kvalifikacinis pažymėjimas įgytas 2023 m. sausio 25 d. Nr. 604. (Priedas A).

2.2. Tyrimo eiga

Eksperimentas buvo pradėtas 2022 m. rugsėjo 15 d. su 36 *Wistar* linijos 5 – 8 savaičių amžiaus žiurkių patelėmis. Jos buvo suskirstytos į šešias grupes po šešias žiurkes (Festing, 2018), kad grupių svorio vidurkis būtų lygus tarp grupių. Žiurkės buvo laikomos grupėse, nes jos yra socialūs gyvūnai ir gyvenant kartu patiria mažiau streso (Šimkevičienė & Rukšėnas, 2001). Žiurkių pakratai buvo keičiami kartą per savaitę, o sauso maisto ir geriamojo vandens turėjo *ad libitum*.

Žiurkių grupės buvo sudarytos norint įvertinti dviejų ftalatų – di(2-etilheksil)ftalato ir dibutilftalato - toksinį poveikį. Šių ftalatų koncentracijos Lietuvos nuotekų vandenyje randamos didžiausios, lyginant su kitais ftalatais (UAB „Vandens tyrimai“, Ftalatų analizės vandenyje rezultatai, neskelbta vidaus ataskaita, (2022)). Pagal vidutinius žmogaus vandens išgėrimo rodiklius, naudojamus medicinoje, buvo apskaičiuota, kokią vidutiniškai ftalatų koncentraciją žmogus gautų per parą gerdamas jais užterštą vandenį. Pagal specialią metodiką (Reagan-Shaw et al., 2008), buvo perskaičiuota, kokia ftalatų dozė tuomet tektų žiurkei – jei ji išgertų tiek, kiek išgeria žmogus. Apskaičiuotos dozės buvo ištirpintos alyvuogių aliejuje ir lašinamos ant ekologiško sausainio gabalėlio.

Eksperimento schema pateikta 2.2.1 paveiksle. Pirmoji grupė buvo neigiama kontrolė (Control) ir gaudavo sausainio gabaliuką su alyvuogių aliejumi. Antroji grupė (DEHP_2) gaudavo sausainio gabaliuką su aliejuje ištirpinta DEHP 200 µg/kg paros doze, kuri atitinka žmogaus ekspoziciją geriant vandenį, užterštą Lietuvos vandenyse randama di(2-etilheksil)ftalato koncentracija. Trečioji grupė (DEHP_10) gavo penkis kartus padidintą šio ftalato dozę – 1000 µg/kg – teigiama kontrolė. Ketvirtoji grupė (DBP_1) gavo sausainio gabalėlį su aliejuje ištirpinta DBP 100 µg/kg paros doze, kuri atitinka žmogaus ekspoziciją geriant vandenį, užterštą Lietuvos vandenyse randama dibutilftalato koncentracija. Penktoji grupė (DBP_5) gavo penkis kartus padidintą šio ftalato paros dozę – 500 µg/kg – teigiama kontrolė. Šeštoji grupė (DEHP_DBP) gavo abiejų ftalatų, randamų Lietuvos vandenyse, paros dozes kartu – DEHP 200 µg/kg ir DBP 100 µg/kg.



2.2.1 pav. Eksperimento schema, sukurta naudojant BioRender.com

Kiekvieną rytą žiurkės gaudavo sausainio gabaliuką su aliejuje ištirpintomis ftalatų dozėmis, priklausomai nuo grupės, pagal tuometinį svorį. Žiurkių svoris nuolatos buvo stebimas ir fiksuojamas, svėrimas buvo vykdomas du kartus per savaitę. Taip jos buvo maitinamos tris su puse mėnesio. Po dviejų eksperimento mėnesių, patelės buvo sukerčiamos su negavusiais ftalatų patinėliais. Iš vakaro į narvelį su patelėmis buvo įleidžiamas patinas, kitą rytą buvo atliekamas nėštumo tikrinimo testas. Nėštumo laikas buvo pradėtas skaičiuoti nuo tos dienos, kai makštyje buvo randama spermatozoidų. Nėštumo ir žindymo laikotarpiu patelės gaudavo tas pačias ftalatų dozes.

Kai žiurkių jaunikliai buvo atjunkyti, pirmosios kartos jauniklės žiurkių patelės buvo suskirstytos į naujas grupes ir eksperimentas tomis pačiomis ftalatų dozėmis tęsiamas toliau, siekiant gauti antros kartos jauniklius. Pirmos kartos patinėliai buvo eutanazuoti naudojant CO₂ dujų kamerą, laikantis nustatytų dujų koncentracijų bei tėkmės greičio normų pagal 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvą 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (Europos Parlamentas ir Taryba, 2010).

Antros kartos eksperimentas buvo atliekamas analogiškai pirmajai kartai.

Žiurkių laikymas narveliuose, priežiūra, maitinimas vykdytas pagal 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvą 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų

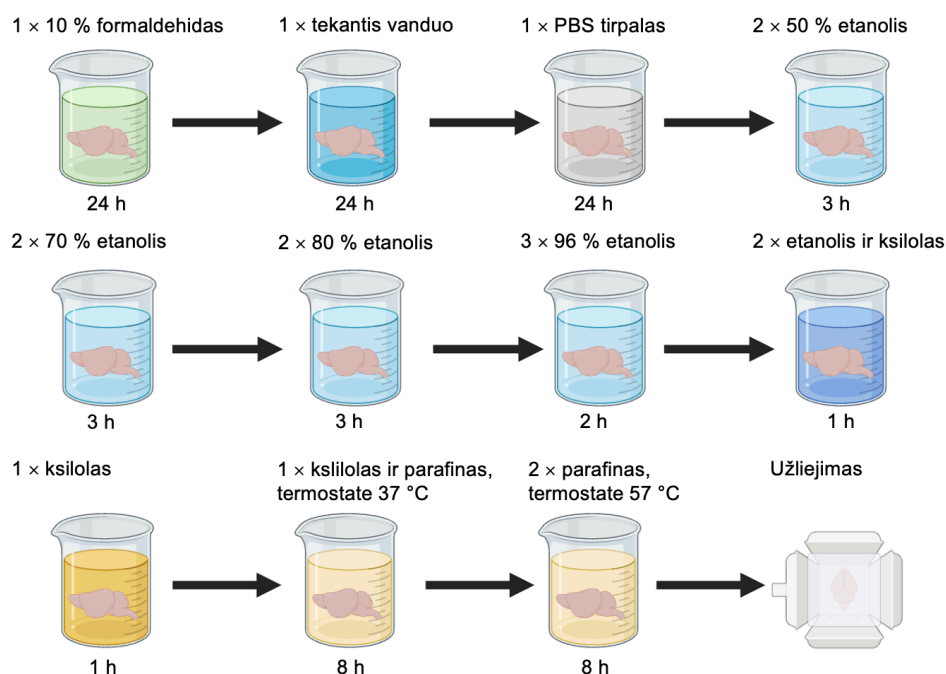
apsaugos ir Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymą (Žin., 1997, Nr. 108 – 2728, Nr. 122 – 6126).

2.3. Tyrimo metodai

2.3.1. Žiurkių smegenų histologinių blokų ruošimas

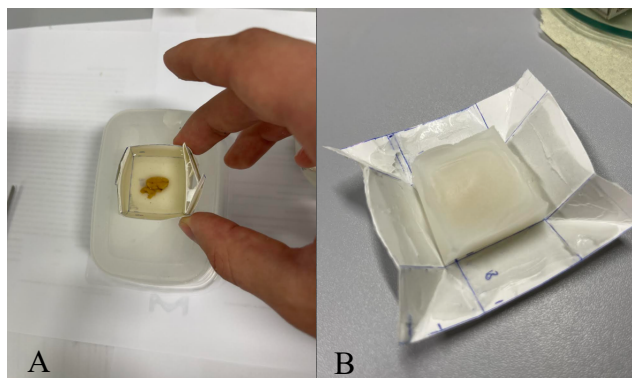
Po eutanazijos, eksperimentinių žiurkių jauniklių patinų smegenys skrodimo metu buvo išpreparuotos ir fiksuotos 10 % formaldehido tirpale tolimesniems tyrimams. Rutininei histologinei analizei, žiurkių jauniklių smegenų blokai paruošti pagal standartinę metodiką (Megías et al., 2019; Zhanmu et al., 2020).

Pirmiausia, fiksuotos smegenys perpjaunamos išilgai pusiau, viena smegenų pusė paliekama formaldehido tirpale, kita ruošiamą įliejimui, pagal schemą 2.3.1.1 paveiksle.



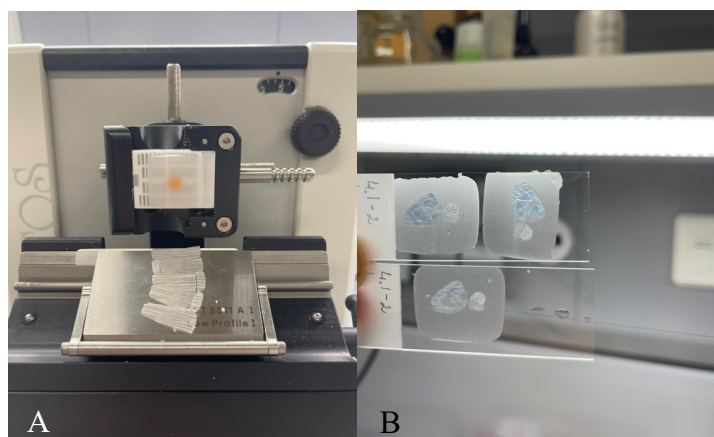
2.3.1.1 pav. Žiurkių jauniklių smegenų parafininių blokų ruošimo schema. Sukurta su Biorender.com

Iš paskutinės parafino porcijos smegenys ištraukiamos karštu pincetu, dedamos į bloko formelę ir užliejamos skystu parafinu. Įliejimo formelė su užlietu mėginiu dedama ant ledo greitesniam sustingimui (2.3.1.2 pav. A). Sustingęs parafino blokas (2.3.1.2 pav. B) išimamas iš įliejimo formelės ir skystu parafinu priklijuojamas prie bloko laikiklio.



2.3.1.2 pav. Smegenų užliejimas parafinu. (A) skystu parafinu užlietas mėginys ledo vonelėje. (B) sustingęs parafino blokas

Taip paruoštas smegenų parafininis blokas fiksuojamas mikrotome (2.3.1.3 pav. A) ir pjaustomas 5 μm storio pjūviais. Pjūviai atsargiai nuo mikrotomo perkeliama į šiltą 37 °C vandenį, kuriame išsilygina, yra atskiriami, perkeliama ant objekcinio stiklelio (2.3.1.3 pav. B) ir paliekami džiūti bent 24 valandoms (Zhanmu et al., 2020).

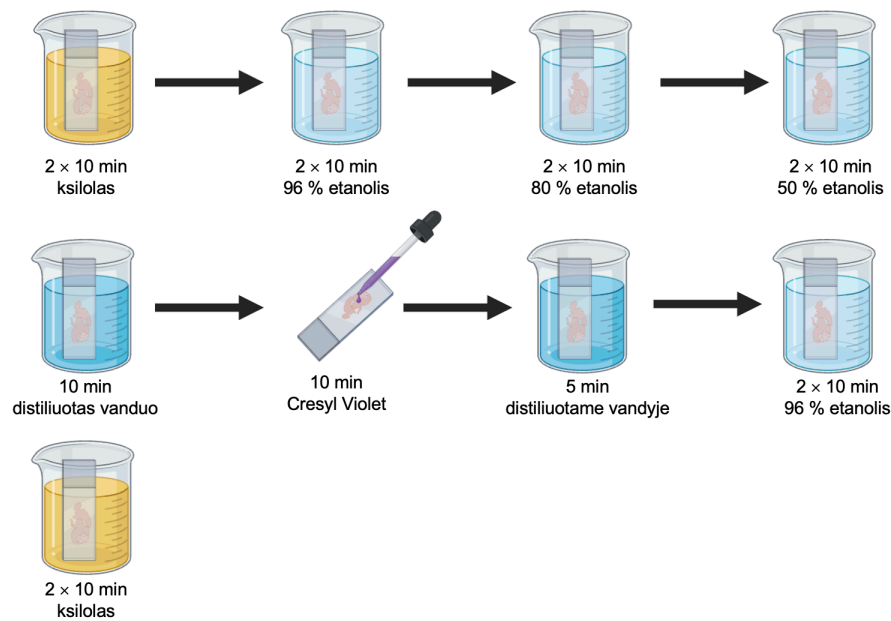


2.3.1.3 pav. Histologinio bloko pjaustymas. (A) parafininio bloko pjaustymas mikrotomu. (B) išsilyginę ir ant histologinio stiklelio perkelti pjūviai

Taip buvo paruošti pirmosios kartos (F1) 8 gyvūnų 24 smegenų pjūviai. Kiti pirmosios ir visi antrosios kartos (F2) – 156 smegenų pjūviai buvo paruošti bendradarbiaujant su Valstybiniu patologijos centru, siekiant pagreitinti procesą.

2.3.2. Žiurkių smegenų histologinių pjūvių dažymas pagal Nissl ir analizė

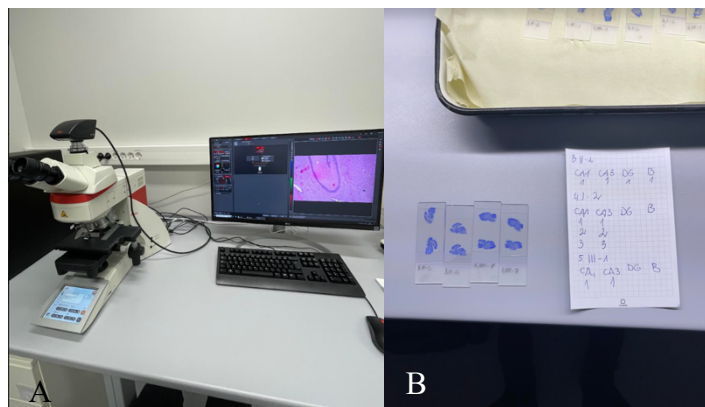
Rutininei histologinei analizei, nervinis audinys dažomas pagal Nissl (Megías et al., 2019). Parafininių smegenų pjūvių deparafinavimo, rehidratacijos ir dažymo schema pateikta 2.3.2.1 paveiksle.



2.3.2.1 pav. Žiurkių jauniklių smegenų preparato dažymo Nissl metodu schema. Sukurta su Biorender.com

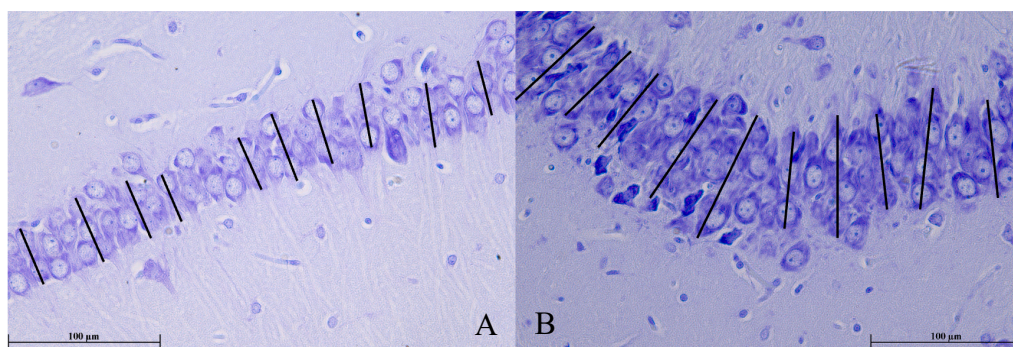
Išimti iš ksilolo preparatai nusausinami ir lašu Kanados balzamo priklijuojamas dengiamasis stiklėlis (Megías et al., 2019).

Nudažyti preparatai buvo mikroskopuojami $400\times$ padidiniu (2.3.2.2 pav.), hipokampo CA1 ir CA3 regionai fotografuojami. Mikroskopinė analizė ir fotografavimas buvo atliekamas naudojant Leica DM6 B šviesinį mikroskopą (Leica Microsystems CMS GmbH, Vokietija), Leica Application Suite X programinę įrangą (versija 3.7.6.25997). Analizės metu, hipokampo nuotraukos buvo užkoduotos, kad išlaikyti nešališkumą (Sun et al., 2013).



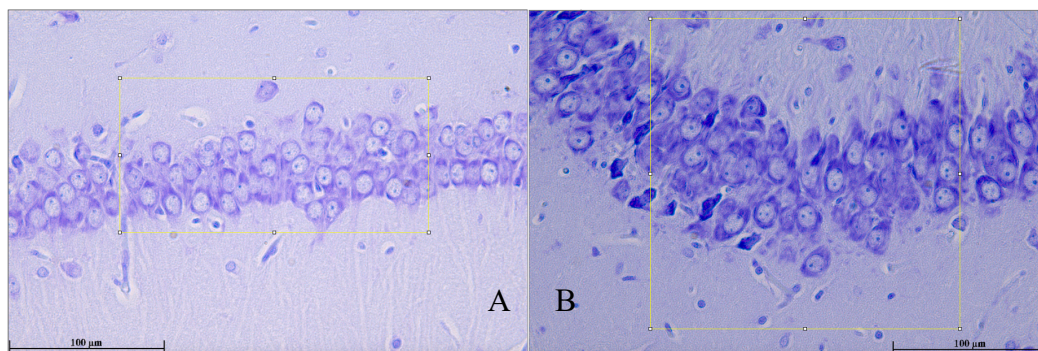
2.3.2.2 pav. Histologinių preparatų analizė. (A) paruoštų preparatų analizė ir fotografavimas Leica DM6 B šviesiniu mikroskopu. (B) nudažyti preparatai

Norit įvertinti hipokampo CA1 ir CA3 regionų storį, yra brėžiama 10 linijų per atitinkamo hipokampo regiono plotį vienam preparatui ir apskaičiuojamas regiono storio vidurkis (2.3.2.3 pav.). Gauti rezultatai lyginami su kontroline grupe (Nairismägi et al., 2006).



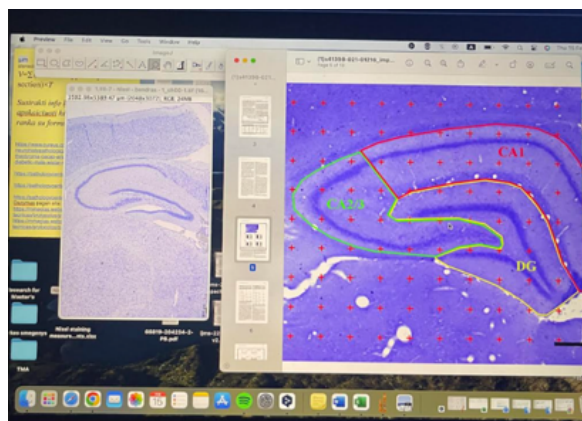
2.3.2.3 pav. Hipokampo sričių storio vertinimo pavyzdys. (A) CA1 regionas. (B) CA3 regionas

Vertinant ftalatų įtaką žiurkių jauniklių smegenų hipokampo neuronų tankiui, buvo brėžiami matavimo laukeliai CA1 ir CA3 regionuose ir juose skaičiuojamas neuronų kiekis. CA1 regione brėžiamas $100\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ dydžio laukelis, o CA3 regione brėžiamas laukelis buvo $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ dydžio (2.3.2.4 pav.). Gauti rezultatai buvo lyginami su kontroline grupe (Kurozumi et al., 2019).



2.3.2.4 pav. Hipokampo neuronų tankio tyrimo laukelis. (A) CA1 regionas, $100 \times 200\ \mu\text{m}^2$. (B) CA3 regionas, $200 \times 200\ \mu\text{m}^2$

Visi hipokampo storio ir neuronų tankio skaičiavimai buvo atlikti su ImageJ programa (2.3.2.5 pav.) (Schneider et al., 2012). Kiekvienų tirtų smegenų buvo analizuojami 3 histologiniai pjūviai (Kurozumi et al., 2019). Iš viso buvo išanalizuota 180 abiejų kartų žiurkių jauniklių smegenų pjūvių: 81 pjūvis pirmos žiurkių jauniklių kartos ir 99 pjūviai antros žiurkių jauniklių kartos.



2.3.2.5 pav. Smegenų histologinių pjūvių nuotraukų analizė ImageJ programa

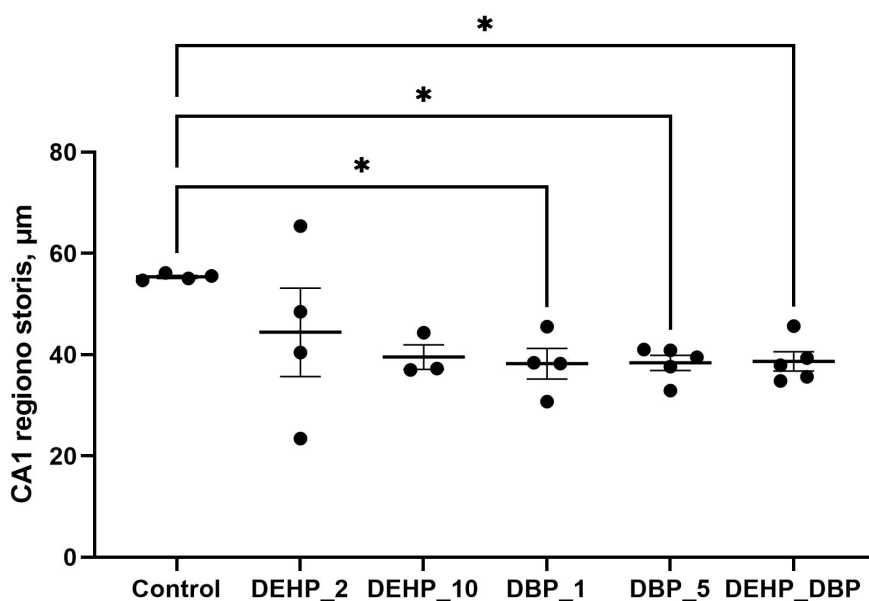
2.3.3. Statistikos metodai

Gautų duomenų analizė ir grafinis atvaizdavimas buvo atliekamas su GraphPad Prism 9.0.0. ir Microsoft Excel programomis. Normalumo prielaidos tikrinimas buvo atliekamas Shapiro-Wilk testu (Bate et al., 2017), o rezultatų skirtumų patikimumas buvo įvertintas ANOVA su *Dunnett* post hoc testu ir *Tukey HSD* post hoc testu (Mooi et al., 2018). Statistiškai reikšmingas skirtumas laikomas, kai $p < 0,05$.

3. Rezultatai

3.1. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo pokyčiai ftalatų poveikyje

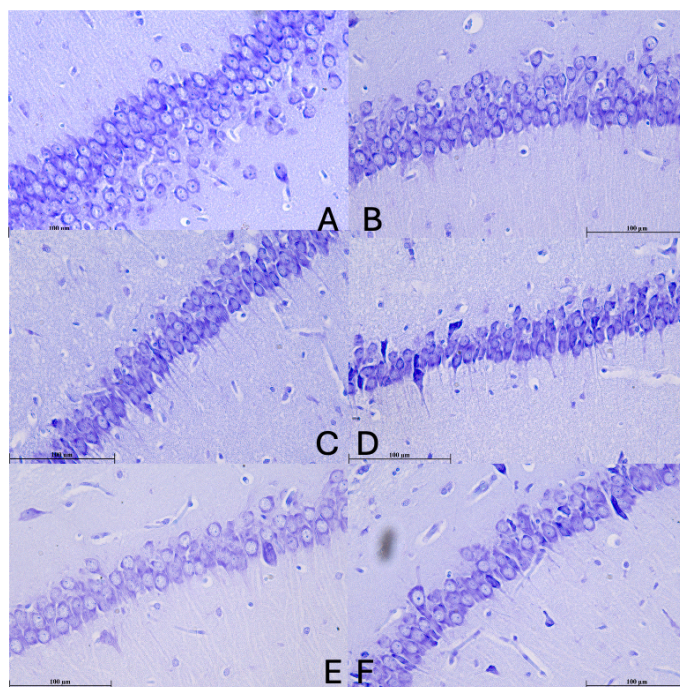
Aiškinantis DEHP ir DBP sukeltus pokyčius žiurkių jauniklių hipokampui buvo analizuojamas CA1 ir CA3 regionų storis ir neuronų tankis (visi duomenys pateikti Priede B). Vertinant ftalatų poveikį pirmos kartos žiurkių jauniklių smegenų hipokampo CA1 regiono storiui, buvo pastebėti statistiškai reikšmingi pokyčiai (3.1.1 pav., 3.1.2 pav.). Kontrolinėje grupėje (Control) vidutiniškai CA1 regiono storis buvo $(55,4 \pm 0,3) \mu\text{m}$. Išanalizavus antrąją grupę – DEHP_2 (Lietuvos vandenyje randama DEHP dozė) reikšmingų analizuojamo regiono storio skirtumų pastebėta nebuvo ($p > 0,05$), nors storis sumažėjo $9 \mu\text{m}$ ir buvo $(44,4 \pm 8,7) \mu\text{m}$, o penkis kartus padidintą DEHP dozę gavusios grupės (DEHP_10) storis sumažėjo statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) ir buvo vidutiniškai $(39,5 \pm 2,4) \mu\text{m}$.



3.1.1. pav. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono storio pokyčiai ftalatų poveikyje. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienvusę ANOVA su *Dunnett* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (* $p < 0,05$)

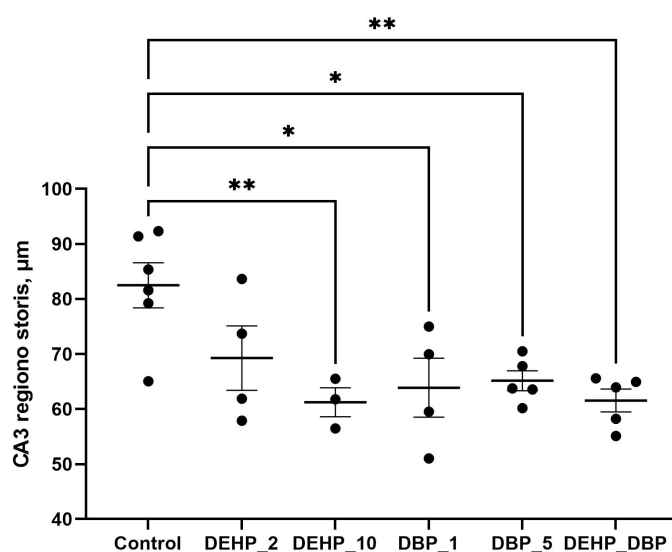
Ketvirtoje (DBP_1) ir penktoje grupėse (DBP_5), gavusiose DBP, (pirmoji – Lietuvos vandenyje randama, antroji – penkis kartus padidinta dozė) CA1 regiono storis statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,05$) lyginant su kontroline grupe. Šių grupių vidutinis storis buvo panašus, atitinkamai $(38,2 \pm 3,0) \mu\text{m}$ ir $(38,4 \pm 1,1) \mu\text{m}$. Šeštosios grupės (DEHP_DBP), gavusios abiejų ftalatų mišinį, taip pat storis statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,05$), $(38,7 \pm 2,2) \mu\text{m}$. Taigi, gauti rezultatai parodė, kad vidutiniškai hipokampo CA1 regiono storis sumažėjo $11 \mu\text{m}$ –

17 μm , lyginant su kontroline grupe, ir buvo nuo $(38,2 \pm 3,0) \mu\text{m}$ iki $(44,4 \pm 8,7) \mu\text{m}$. Nepatikimas skirtumas buvo tik DEHP_2 grupėje.



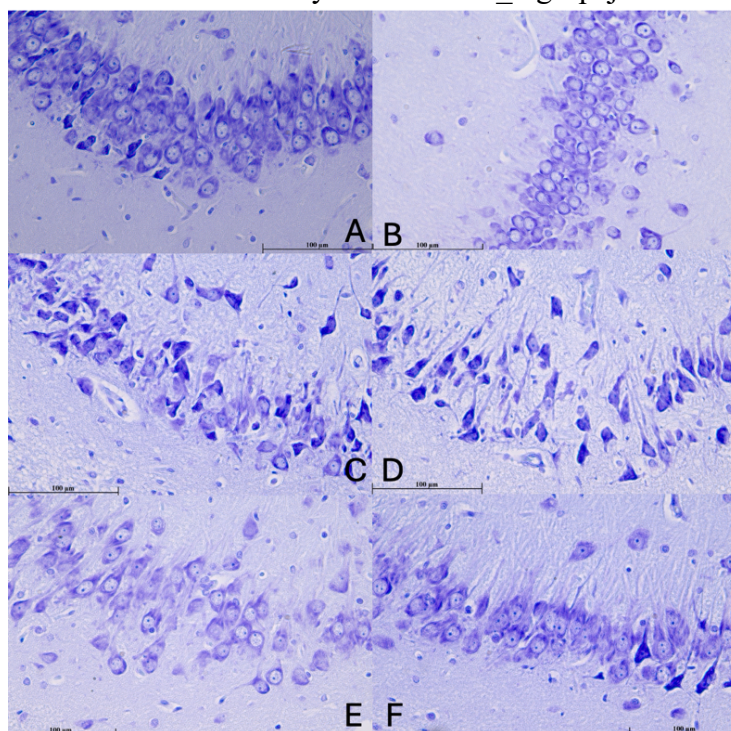
3.1.2 pav. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono neuronai. (A) kontrolinė grupė. (B) DEHP_2. (C) DEHP_10. (D) DBP_1. (E) DBP_5. (F) DEHP_DBP

Analizuojant ftalatų poveikį pirmos kartos žiurkių jauniklių smegenų hipokampo CA3 regiono storiui buvo pastebėti statistiškai reikšmingi pokyčiai (3.1.3 pav., 3.1.4 pav.). Kontrolinėje (Control) grupėje CA3 regiono storis vidutiniškai buvo $(82,5 \pm 4,1) \mu\text{m}$. Išanalizavus antrąją grupę (DEHP_2) reikšmingų skirtumų nebuvo pastebėta ($p > 0,05$), o trečioje grupėje (DEHP_10) hipokampo CA3 regiono storis statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,01$), atitinkamai buvo $(69,3 \pm 5,9) \mu\text{m}$ ir $(61,3 \pm 2,6) \mu\text{m}$.



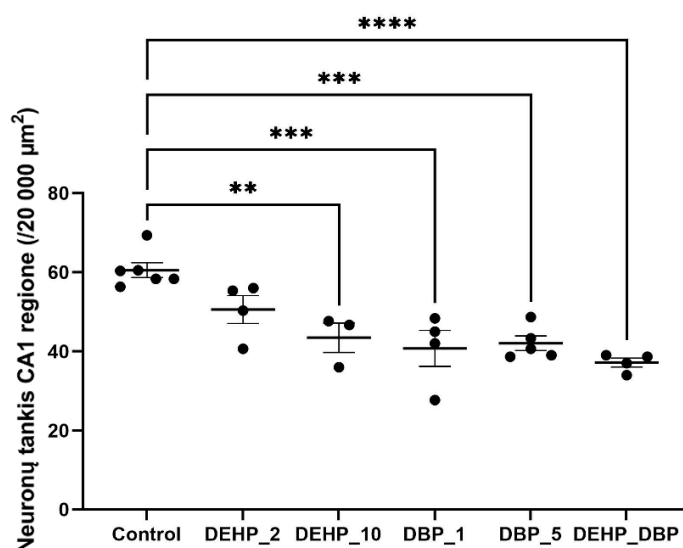
3.1.3 pav. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono storio pokyčiai ftalatų poveikyje. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Dunnett* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Ketvirtoje (DBP_1) ir penktoje grupėse (DBP_5), gavusiose DBP, CA3 regiono storis statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,05$), lyginant su kontroline grupe. Šių grupių vidutinis storis buvo panašus, skyrėsi tik $1,2 \mu\text{m}$, atitinkamai buvo $(63,9 \pm 5,4) \mu\text{m}$ ir $(65,1 \pm 1,8) \mu\text{m}$. Šeštosios grupės (DEHP_DBP), vidutinis CA3 regiono storis taip pat statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,01$), buvo $(61,6 \pm 2,1) \mu\text{m}$. Gauti rezultatai parodė, kad vidutiniškai hipokampo CA3 regiono storis sumažėjo $13 \mu\text{m} - 21 \mu\text{m}$, lyginant su kontroline grupe, ir buvo nuo $(61,3 \pm 2,6) \mu\text{m}$ iki $(69,3 \pm 5,9) \mu\text{m}$. Nepatikimas skirtumas nustatytas tik DEHP_2 grupėje.



3.1.4. pav. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono neuronai. (A) kontrolinė grupė. (B) DEHP_2. (C) DEHP_10. (D) DBP_1. (E) DBP_5. (F) DEHP_DBP

Šio eksperimento metu buvo skaičiuojamas ir neuronų tankis hipokampo CA1 ir CA3 regionuose, atitinkamai $20\,000 \mu\text{m}^2$ ir $40\,000 \mu\text{m}^2$ ploto laukeliuose. Pirmosios kartos žiurkių jauniklių smegenų hipokampo CA1 regiono (3.1.2 pav., 3.1.5 pav.) neuronų tankis kontrolinėje grupėje (Control) buvo vidutiniškai $(60,5 \pm 1,9)$ neuronų/ $20\,000 \mu\text{m}^2$. Antrojoje grupėje (DEHP_2), kurios motinos gavo Lietuvos vandenyje randamą DEHP dozę, neuronų tankis sumažėjo dešimčia neuronų, tačiau statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolės ($p > 0,05$), buvo $(50,6 \pm 3,5)$ neuronų/ $20\,000 \mu\text{m}^2$. Trečiojoje grupėje (DEHP_10), kuri gavo penkis kartus padidintą DEHP dozę, neuronų tankis sumažėjo ženkliai ir statistiškai reikšmingai ($p < 0,01$), lyginant su kontroline grupe, vidutiniškai siekė $(44,4 \pm 3,7)$ neuronų/ $20\,000 \mu\text{m}^2$.

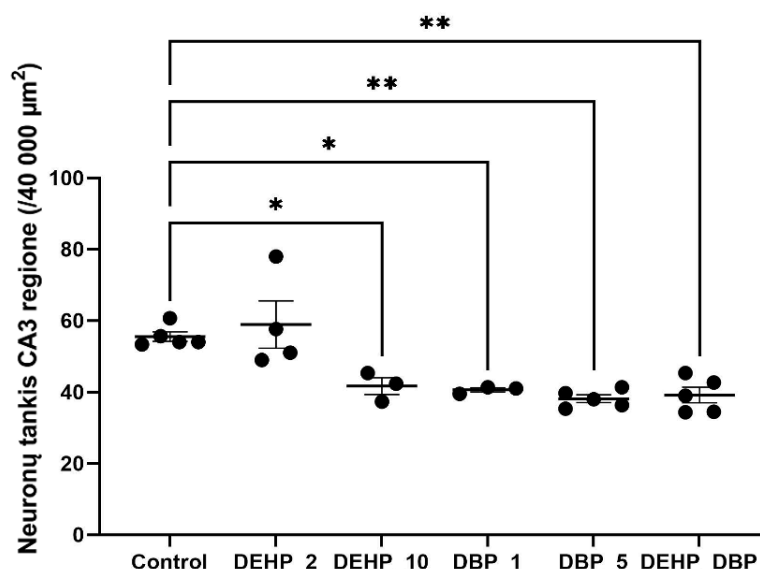


3.1.5 pav. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono neuronų tankio pokyčiai ftalatų poveikyje. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Dunnnett* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

DBP poveikyje neuronų tankis CA1 regione sumažėjo dar labiau. Ketvirtoji grupė (DBP_1), kurių motinos gavo DBP dozes, randamas Lietuvos vandenyje, neuronų tankis buvo dar mažesnis, vidutiniškai siekė tik $(40,8 \pm 4,6)$ neuronų/20 000 μm^2 , sumažėjimas statistiškai reikšmingas ($p < 0,001$). Tačiau penktoje grupėje (DBP_5), kuri gavo penkis kartus padidintą DBP dozę, neuronų tankis sumažėjo šiek tiek mažiau nei ketvirtojoje – iki $(42,1 \pm 1,9)$ neuronų/20 000 μm^2 . Šeštoji grupė, kuri gavo abiejų ftalatų Lietuvos vandenyje randamas koncentracijas, rezultatai nuo kontrolinės grupės statistiškai reikšmingai skyrėsi labiausiai ($p < 0,0001$), vidutinis neuronų tankis siekė tik $(37,2 \pm 1,1)$ neuronų/20 000 μm^2 .

Apibendrinant, gauti rezultatai parodė, kad vidutiniškai hipokampo CA1 regiono neuronų tankis sumažėjo nuo 10 neuronų iki 23 neuronų tirtame plote, lyginant su kontroline grupe, ir buvo nuo $(37,2 \pm 1,1)$ neuronų/20 000 μm^2 iki $(50,6 \pm 3,5)$ neuronų/20 000 μm^2 . Nepatikimas skirtumas buvo tik DEHP_2 grupėje.

Vertinant ftalatų poveikį (3.1.4 pav., 3.1.6 pav.) hipokampo CA3 regiono neuronų tankiui reikia atkreipti dėmesį, kad nors šis regionas storesnis, jame neuronai yra didesni, todėl neuronų tankis panašus į CA1 regiono. Kontrolinėje grupėje (Control) vidutiniškai buvo suskaičiuota $(55,5 \pm 1,3)$ neuronų/40 000 μm^2 . Antrosios grupės (DEHP_2) neuronų tankis statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolinės grupės rezultato ($p > 0,05$), vidutinis neuronų tankis siekė $(58,9 \pm 6,6)$ neuronų/40 000 μm^2 . Trečiojoje grupėje (DEHP_10) vidutinis neuronų tankis $(41,7 \pm 2,3)$ neuronų/40 000 μm^2 statistiškai reikšmingai sumažėjo, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$).



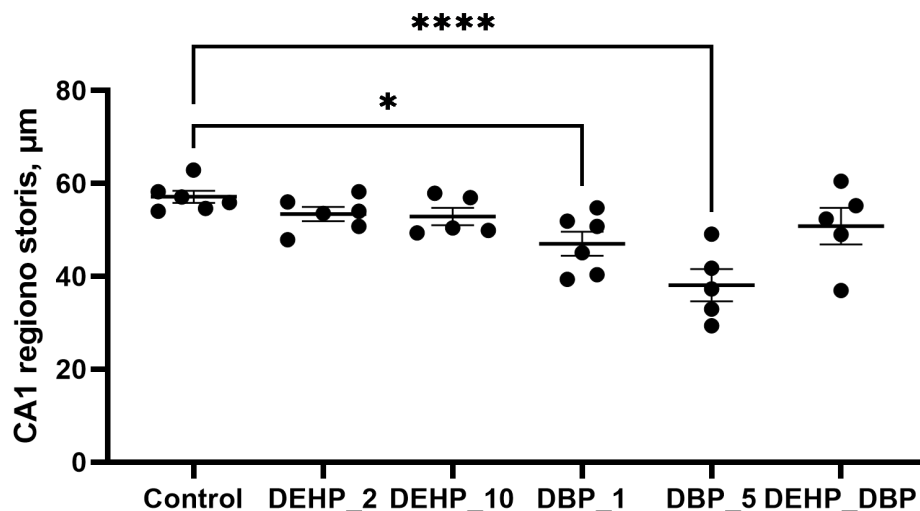
3.1.6. pav. Pirmos kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono neuronų tankio pokyčiai ftalatų poveikyje. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Dunnett* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Ketvirtosios grupės (DBP_1) neuronų tankis CA3 regione taip pat statistiškai reikšmingai sumažėjo lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$), tankis buvo $(40,6 \pm 0,6)$ neuronų/40 000 μm^2 . Penktosios grupės (DBP_5) CA3 neuronų tankis buvo dar mažesnis $(38,1 \pm 1,1)$ neuronų/40 000 μm^2 , ($p < 0,01$). Šeštos grupės (DEHP_DBP) neuronų tankis buvo $(39,2 \pm 2,2)$ neuronų/40 000 μm^2 , sumažėjo statistiškai reikšmingai ($p < 0,01$), lyginant su kontroline grupe. Taigi, gauti rezultatai parodė, kad vidutiniškai hipokampo CA3 regiono neuronų tankis sumažėjo nuo 14 neuronų iki 17 neuronų tirtame plote, lyginant su kontroline grupe, ir buvo nuo $(38,1 \pm 1,1)$ neuronų/40 000 μm^2 iki $(58,9 \pm 6,6)$ neuronų/40 000 μm^2 . Nepatikimas skirtumas buvo tik DEHP_2 grupėje.

Apibendrinant DEHP ir DBP poveikio pirmosios žiurkių jauniklių kartos hipokampo CA1 ir CA3 regionams tyrimo rezultatus, galima teigti, kad šių medžiagų poveikyje kito hipokampo morfologija, stebima neurodegeneracija, tik DEHP_2 grupėje pokyčiai statistiškai nereikšmingi.

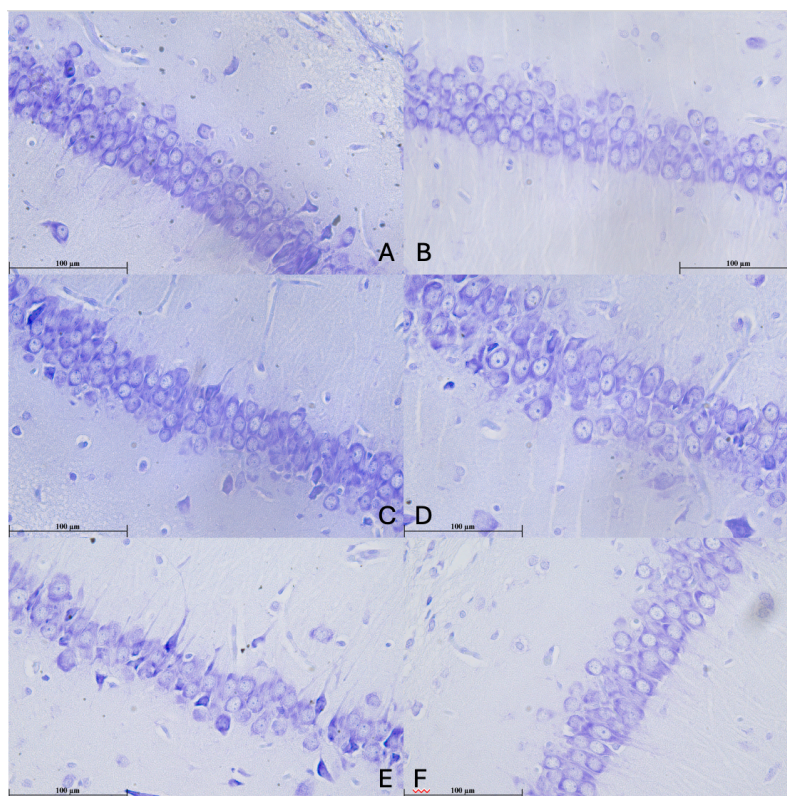
3.2. Antros kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo pokyčiai ftalatų poveikyje

Kaip pirmoje, taip pat ir antroje žiurkių jauniklių kartoje buvo analizuojamas abiejų ftalatų poveikis hipokampo CA1 ir CA3 regionų storiui ir neuronų tankiui (visi duomenys pateikti Priede B). Vertinant ftalatų poveikį antros kartos žiurkių jauniklių smegenų hipokampo CA1 regiono storiui buvo pastebėti statistiškai reikšmingi pokyčiai (3.2.1 pav., 3.2.2 pav.). Kontrolinėje grupėje (Control) vidutiniškai CA1 regiono storis buvo $(57,1 \pm 1,3) \mu\text{m}$. Išanalizavus antrąją grupę – DEHP_2 (Lietuvos vandenyje randama DEHP dozė) ir trečiąją grupę – DEHP_10 (penkis kartus padidinta šio ftalato dozė) reikšmingų skirtumų nebuvo, nors storis sumažėjo atitinkamai $4 \mu\text{m}$ ir $5 \mu\text{m}$, vidutiniškai buvo $(53,4 \pm 1,5) \mu\text{m}$ ir $(52,9 \pm 1,9) \mu\text{m}$.



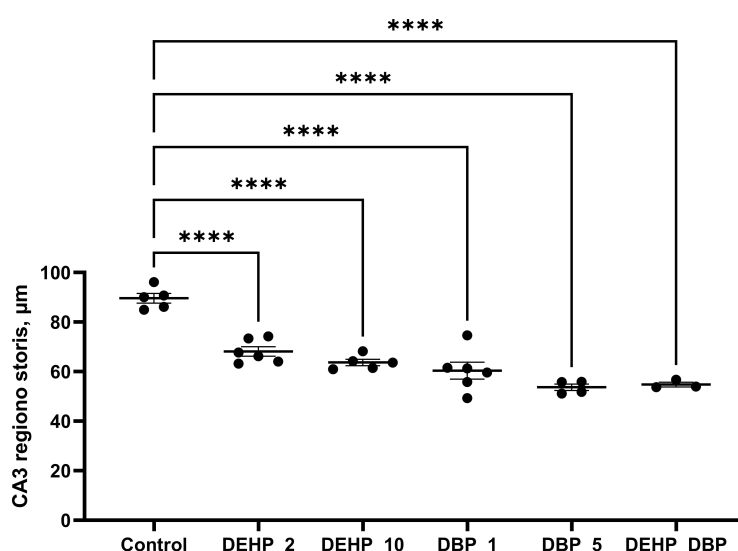
3.2.1. pav. Ftalatų poveikis antros kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono storiui. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Dunnnett* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$)

Ketvirtojoje (DBP_1) ir penktoje (DBP_5) grupėse, gavusiose DBP (pirmoji – Lietuvos vandenyje randama, antroji – penkis kartus padidinta dozė) CA1 regiono storis statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,05$ ir $p < 0,0001$), lyginant su kontroline grupe. Šių grupių vidutinis storis buvo atitinkamai $(47 \pm 2,6) \mu\text{m}$ ir $(38 \pm 3,4) \mu\text{m}$. Šeštosios grupės (DEHP_DBP), gavusios abiejų ftalatų, randamų Lietuvos vandenyje, mišinį, CA1 storis statistiškai reikšmingai nesumažėjo ($p > 0,05$), buvo $(50,9 \pm 3,4) \mu\text{m}$. Taigi, gauti rezultatai parodė, kad antroje kartoje hipokampo CA1 regiono storis sumažėjo nuo $4 \mu\text{m}$ iki $10 \mu\text{m}$, lyginant su kontroline grupe, ir buvo nuo $(47,0 \pm 2,62) \mu\text{m}$ iki $(53 \pm 1,5) \mu\text{m}$. Nors antros kartos DEHP_2, DEHP_10 ir DEHP_DBP tyrimo grupėse stebima hipokampo CA1 regiono storio sumažėjimo tendencija, skirtumai nėra patikimi.



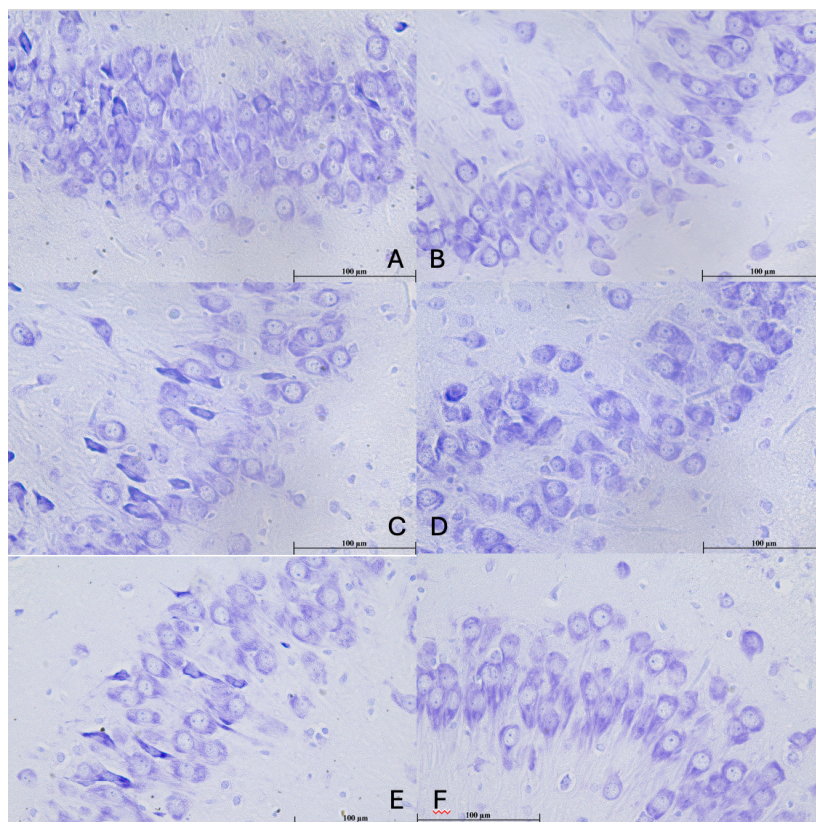
3.2.2 pav. Antros kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono neuronai. (A) kontrolinė grupė. (B) DEHP_2. (C) DEHP_10. (D) DBP_1. (E) DBP_5. (F) DEHP_DBP

Analizuojant ftalatų poveikį antros kartos žiurkių jauniklių smegenų hipokampo CA3 regiono storiui buvo pastebėti statistiškai reikšmingi pokyčiai (3.2.3 pav., 2.3.4 pav.). Kontrolinėje (Control) grupėje CA3 regiono storis vidutiniškai buvo $(89,6 \pm 1,9) \mu\text{m}$. Išanalizavus antrąją grupę (DEHP_2) ir trečiąją grupę (DEHP_10) hipokampo CA3 regiono storis statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,0001$), lyginant su kontroline grupe, atitinkamai buvo $(68,1 \pm 1,9) \mu\text{m}$ ir $(63,7 \pm 1,3) \mu\text{m}$.



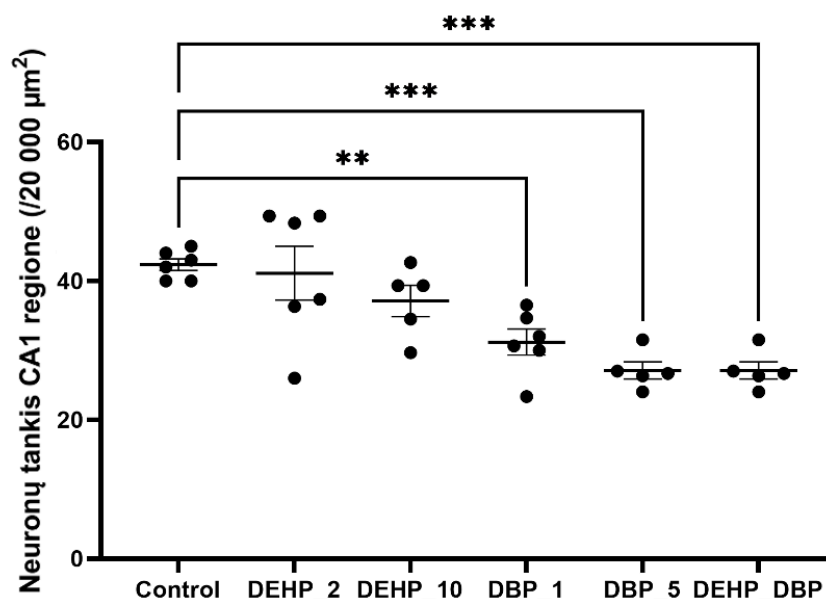
3.2.3 pav. Ftalatų poveikis antrosios kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono storiui. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienvusę ANOVA su *Dunnnett* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (**** $p < 0,0001$)

Ketvirtos (DBP_1) ir penktos (DBP_5) grupių, CA3 regiono storis statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,0001$), lyginant su kontroline grupe, atitinkamai $(60,4 \pm 3,4) \mu\text{m}$ ir $(53,7 \pm 1,3) \mu\text{m}$. Šeštosios grupės (DEHP_DBP), vidutinis storis taip pat statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,0001$), buvo $(54,8 \pm 1,0) \mu\text{m}$. Gauti rezultatai parodė, kad vidutiniškai hipokampo CA3 regiono storis antroje kartoje sumažėjo 21 μm iki 36 μm , lyginant su kontroline grupe ir buvo nuo $(53,7 \pm 1,3) \mu\text{m}$ iki $(68,1 \pm 1,9) \mu\text{m}$. Skirtumai tarp visų eksperimentinių grupių ir kontrolės buvo statistiškai reikšmingi.



3.2.4 pav. Antros kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono neuronai. (A) kontrolinė grupė. (B) DEHP_2. (C) DEHP_10. (D) DBP_1. (E) DBP_5. (F) DEHP_DBP

Eksperimento metu buvo skaičiuojamas hipokampo CA1 ir CA3 neuronų tankis antroje žiurkių jauniklių kartoje. Šios kartos jauniklių smegenų hipokampo CA1 regiono (3.2.2 pav. ir 3.2.5 pav.) neuronų tankis kontrolinėje grupėje (Control) buvo vidutiniškai $(42,3 \pm 0,8)$ neuronų/20 000 μm^2 . Antrojoje grupėje (DEHP_2), kurios motinos gavo Lietuvos vandenyje randamą DEHP dozę, ir trečiojoje grupėje (DEHP_10), kuri gavo penkis kartus padidintą DEHP dozę, neuronų tankis sumažėjo atitinkamai nuo 1 neuronų/20 000 μm^2 iki 5 neuronų/20 000 μm^2 , tačiau reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolinės grupės, buvo $(41,1 \pm 3,9)$ neuronų/20 000 μm^2 ir $(37,0 \pm 2,3)$ neuronų/20 000 μm^2 .



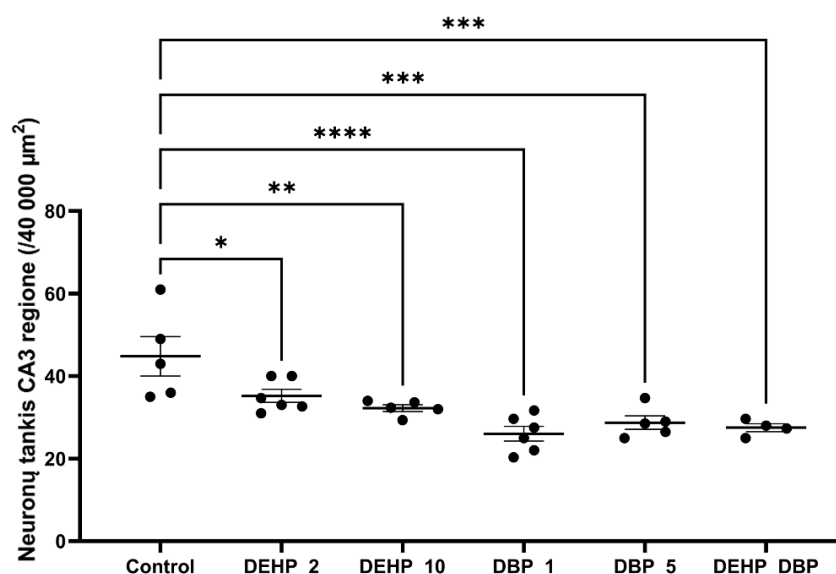
3.2.5 pav. Ftalatų poveikis antrosios kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono neuronų tankiui. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienvpusę ANOVA su post *Dunnett* hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

DBP poveikyje neuronų tankis CA1 regione sumažėjo dar labiau. Ketvirtos grupės (DBP_1), kurių motinos gavo DBP dozes, esančias Lietuvos vandenyse, neuronų tankis dar mažesnis, vidutiniškai siekė tik $(31,2 \pm 1,9)$ neuronų/20 000 μm^2 , sumažėjimas statistiškai reikšmingas ($p < 0,01$). Penktoje grupėje (DBP_5), kuri gavo penkis kartus padidintą DBP dozę, neuronų tankis taip pat sumažėjo statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$) iki $(27,1 \pm 1,2)$ neuronų/20 000 μm^2 . Šeštosios grupės, kuri gavo abiejų ftalatų Lietuvos vandenyje randamas koncentracijas, rezultatai nuo kontrolinės grupės skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$), vidutinis neuronų tankis siekė tik $31,5 \pm 3,47$ neuronų/20 000 μm^2 .

Apibendrinant, gauti rezultatai parodė, kad vidutiniškai hipokampo CA1 regiono neuronų tankis sumažėjo nuo 1 neurono/20 000 μm^2 iki 11 neuronų/20 000 μm^2 , lyginant su kontroline grupe ir buvo nuo $(31,2 \pm 1,9)$ neuronų/20 000 μm^2 iki $(41,1 \pm 3,9)$ neuronų/20 000 μm^2 . Nors antros kartos DEHP_2 ir DEHP_10 tyrimo grupėse stebima hipokampo CA1 neuronų tankio sumažėjimo tendencija, skirtumai nėra patikimi.

Vertinant CA3 regiono neuronų tankį (3.2.4 pav., 3.2.6 pav.), kontrolinėje grupėje (Control) vidutiniškai buvo suskaičiuota $(44,8 \pm 4,9)$ neuronų/40 000 μm^2 . Antrosios grupės (DEHP_2) neuronų tankis statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinės grupės ($p < 0,05$), vidutinis neuronų tankis siekė $(35,2 \pm 1,6)$ neuronų/40 000 μm^2 . Trečiojoje grupėje (DEHP_10), vidutinis neuronų tankis

(($32,3 \pm 0,8$) neuronų/40 000 μm^2) statistiškai reikšmingai sumažėjo, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,01$).



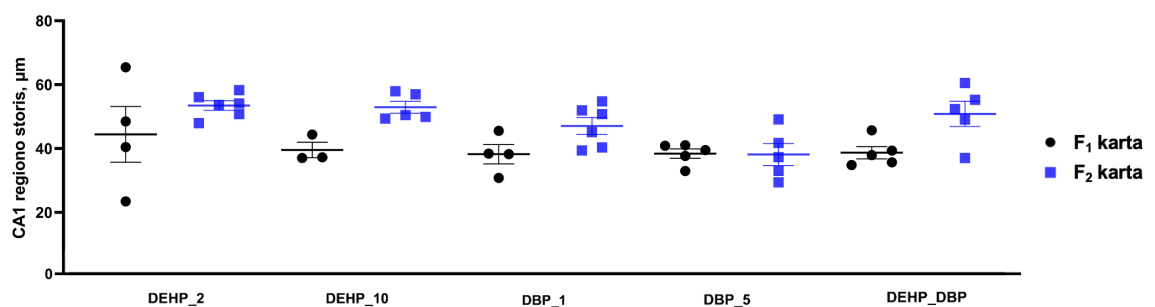
3.2.6 pav. Ftalatų poveikis antrosios kartos žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono neuronų tankiui. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Dunnnett* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Ketvirtosios grupės (DBP_1) neuronų tankis CA3 regione statistiškai reikšmingai sumažėjo, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,0001$), tankis buvo ($26,0 \pm 1,8$) neuronai/40 000 μm^2 . Penktosios grupės (DBP_5) neuronų tankis buvo ($28,7 \pm 1,7$) neuronų/40 000 μm^2 ($p < 0,001$). Šeštosios grupės (DEHP_DBP) neuronų tankis buvo mažesnis nei penktoje – ($27,5 \pm 1,0$) neuronų/40 000 μm^2 , statistiškai reikšmingai sumažėjo ($p < 0,001$), lyginant su kontroline grupe. Taigi, gauti rezultatai parodė, kad vidutiniškai hipokampo CA3 regiono neuronų tankis sumažėjo nuo 10 neuronų/40 000 μm^2 iki 19 neuronų/40 000 μm^2 , lyginant su kontroline grupe ir buvo nuo ($26,0 \pm 1,8$) neuronų/40 000 μm^2 iki ($35,2 \pm 1,6$) neuronų/40 000 μm^2 . Patikimas skirtumas buvo visose grupėse.

Apibendrinant DEHP ir DBP poveikio antros žiurkių jauniklių kartos hipokampo CA1 ir CA3 regionams, galima teigti, kad tirtų medžiagų poveikyje kito hipokampo morfologija, tačiau tik DEHP_2 ir DEHP_10 grupėse pokyčiai statistiškai nereikšmingi CA1 regione.

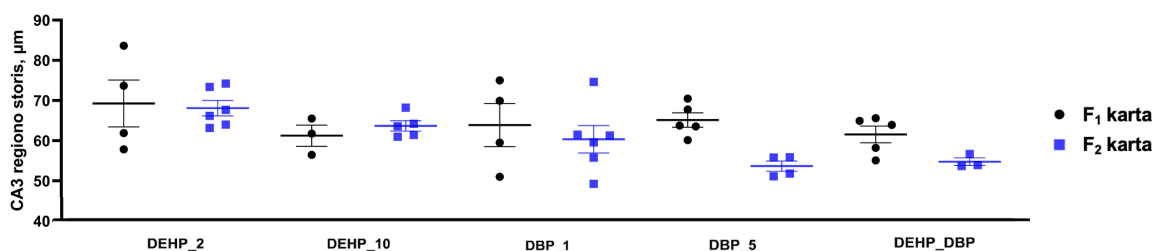
3.3. Abiejų kartų žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 ir CA2 pokyčių ftalatų poveikyje palyginimas

Tiek pirmoje, tiek antroje žiurkių jauniklių kartoje buvo stebimi statistiškai reikšmingi hipokampo pokyčių skirtumai tarp kontrolinės ir tiriamųjų grupių. Norint išsiaiškinti kaip ftalatai veikia hipokampo plastiškumą ilgalaikėje perspektyvoje, buvo lyginami CA1 ir CA3 regionų storio ir neuronų tankio duomenys tarp pirmosios ir antrosios kartos. Lyginant hipokampo CA1 regiono storį tiriamųjų grupių skirtingose kartose statistiškai reikšmingas skirtumas nebuvo pastebėtas (3.3.1 pav.). Nors galime stebėti tendenciją, kad antrosios kartos CA1 regiono storis didesnis arba lygus šiam pirmos kartos regionui, tačiau tai nėra statistiškai reikšmingas skirtumas.



3.3.1 pav. Žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono storio palyginimas tarp pirmosios (F1) ir antrosios (F2) kartos tiriamųjų grupių. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Tukey* post hoc testu. Statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta ($p > 0,05$)

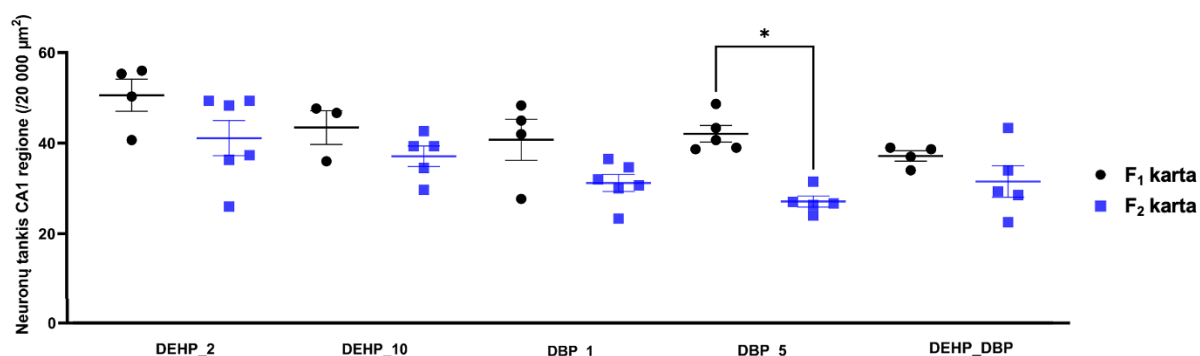
Lyginant hipokampo CA3 regiono storį skirtumus tarp pirmosios ir antrosios kartos tiriamųjų grupių, statistiškai reikšmingų skirtumų taip pat nenustatyta (3.3.2 pav.).



3.3.2 pav. Žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono storio palyginimas tarp pirmosios (F1) ir antrosios (F2) kartos tiriamųjų grupių. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Tukey* post hoc testu. Statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta ($p > 0,05$)

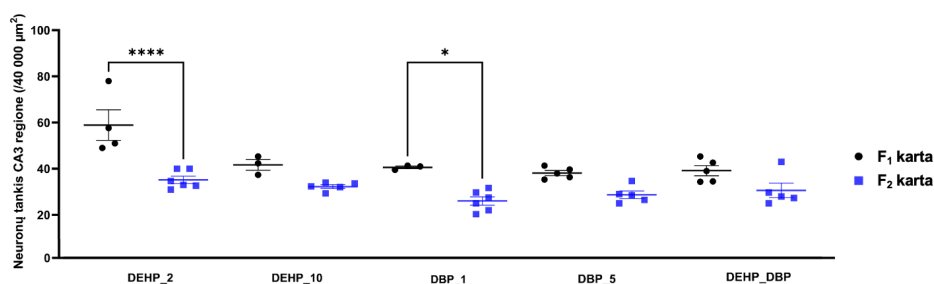
Tiriant neuronų tankio pokyčius pirmosios ir antrosios žiurkių jauniklių kartos hipokampo CA1 regione, statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) buvo nustatytas tik penktoje grupėje (DBP_5) (3.3.3 pav.). Pirmojoje kartoje vidutinis neuronų tankis šiame hipokampo regione buvo beveik du kartus didesnis nei antroje kartoje, atitinkamai buvo $(42,1 \pm 1,9)$ neuronų/20 000 μm^2 ir

($27,1 \pm 1,2$) neuronų/20 000 μm^2 . Nors daugiau statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo pastebėta, neuronų tankis antrojoje kartoje visose grupėse buvo mažesnis.



3.3.3 pav. Žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA1 regiono neuronų tankio palyginimas tarp pirmosios (F1) ir antrosios (F2) kartos tiriamųjų grupių. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Tukey* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (* $p < 0,05$).

Vertinant pirmosios ir antrosios žiurkių jauniklių kartos neuronų tankio pokyčius hipokampo CA3 regione buvo nustatyta daugiau statistiškai reikšmingų skirtumų (3.3.4 pav.). Lyginant kartas buvo pastebėta, kad abiejų ftalatų (tiek DEHP, tiek DBP) Lietuvos vandenyse randamos koncentracijos statistiškai reikšmingai (atitinkamai $p < 0,0001$ ir $p < 0,05$) sumažino neuronų tankį antrojoje kartoje lyginant su pirmąja karta. Pirmoje kartoje, grupės gavusios DEHP, vidutinis neuronų tankis buvo ($59,0 \pm 6,6$) neuronų/40 000 μm^2 , o antroje kartoje tankis statistiškai reikšmingai sumažėjo ir buvo ($35,2 \pm 1,6$) neuronų/40 000 μm^2 , $p < 0,0001$. O grupės, kuri gavo DBP, pirmoje kartoje vidutinis neuronų tankis CA3 regione buvo ($40,6 \pm 0,6$) neuronų/40 000 μm^2 , o antroje kartoje tarp žiurkių jauniklių vidutinis tankis buvo ($26,0 \pm 1,8$) neuronų/40 000 μm^2 , čia rezultatas tarp kartų taip pat skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$). Šie tyrimo rezultatai rodo, kad net mažų dozių, kurios randamos Lietuvos gamtoje, abiejų ftalatų ilgalaikiam poveikiui, patikimai jautresni yra antrosios žiurkių jauniklių kartos hipokampo CA3 regiono neuronai. Nors daugiau statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo pastebėta, tačiau visose antros kartos grupėse galima matyti neuronų tankio sumažėjimo tendencijas.



3.3.4 pav. Žiurkių jauniklių patinų hipokampo CA3 regiono neuronų tankio palyginimas tarp pirmosios (F1) ir antrosios (F2) kartos tiriamųjų grupių. Vertės pateiktos kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM). Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę ANOVA su *Tukey* post hoc testu, rodanti reikšmingą ftalatų poveikį (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$)

Apibendrinant galime teigti, kad ftalatų poveikyje žiurkių jauniklių patinų hipokampo abiejų regionų CA1 ir CA3 storis statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp kartų, nors galime matyti, kad CA1 regiono storis antrojoje kartoje buvo didesnis arba lygus pirmosios kartos storiui, o CA3 regiono storis buvo mažesnis arba lygus pirmosios kartos storiui. O neuronų tankis CA1 ir CA3 regionuose antrojoje kartoje buvo mažesnis. Statistiškai reikšmingai antrojoje kartoje sumažėjo CA1 regiono neuronų tankis penktojoje grupėje (DBP_5) ir CA3 regiono antrojoje grupėje (DEHP_2) ir ketvirtojoje (DBP_1) grupėse.

4. Rezultatų aptarimas

Apžvelgus įvairių mokslinių tyrimų duomenis apie di(2-etilheksil)ftalato ir dibutilftalato toksinį poveikį žiurkių nervų sistemai, buvo pastebėta, kad didžioji dalis visų atliktų tyrimų yra siejamos su didelėmis ftalatų dozėmis, kurios svyruoja nuo 200 µg iki 3 g/kg (Rowdhwal & Chen, 2018; Giuliani et al., 2020; Wang et al., 2021). Ilgalaikio ftalatų poveikio žiurkių jaunikliams tyrimų nėra daug. Daugiausiai šiuose tyrimuose analizuoja perinatalinį ar prenatalinį poveikį nervų, endokrininei ir reprodukcinei sistemoms. Ilgalaikio poveikio tyrimuose dažniausiai dozės svyruoja nuo 0,1 mg/kg iki 760 mg/kg (Culty et al., 2008; Li et al., 2013; Manikkam et al., 2013; Reznikov et al., 2021). Vertinant cheminių medžiagų toksinį poveikį nervų sistemai, dažnai pasirenkama vertinti jų poveikį hipokampo morfologijai, tiriant skirtingas sritis ar aplinkinę neurogliją (Nairismägi et al., 2006; Bhaskar et al., 2017; Lupu et al., 2023). Mūsų atliktame tyrime siekėme išsiaiškinti, kokį poveikį žiurkių jauniklių hipokampo plastiškumui turi Lietuvos vandenyse randamos DEHP ir DBP koncentracijos ilgalaikėje perspektyvoje. Taikant prielaidą, kad toks pat poveikis galėtų būti kitiems žinduoliams, tarp jų ir žmogui. Būtent aplinkos ftalatų koncentracijos poveikio ištyrimas yra svarbus, norint geriau suprasti galimą neigiamą šių chemikalų poveikį žmonių ir gyvūnų sveikatai, taikant prielaidą, kad aplinkos ftalatų koncentracijos imituoja kasdienį poveikį žmonėms.

Šio tyrimo rezultatai parodė, kad DEHP 200 µg/kg paros dozė, kuri randama Lietuvos vandenyje, neturėjo ūminio poveikio žiurkių jauniklių hipokampo tirtų regionų storiui ir neuronų tankiui pirmojoje kartoje, tačiau antrojoje kartoje statistiškai reikšmingai sumažino CA3 regiono storį ir neuronų tankį, lyginant su kontroline grupe ir taip pat statistiškai reikšmingai skyrėsi ir tarp pirmosios ir antrosios kartų. Toks DEHP poveikis galėjo pasireikšti dėl DEHP kaupimosi audiniuose ir ilgalaikės ekspozicijos (Xu et al., 2007; Lin et al., 2015). Tyrimai rodo, kad mažos koncentracijos ir trumpalaikė DEHP ekspozicija sukelia oksidacinį stresą neuronams ir lytinių hormonų disbalansą, kas veikia neurotoksiškai (Safarpour et al., 2022), tačiau hipokampo morfologiniai pokyčiai iškart nepasireiškia. Veikiant DEHP kelias kartas ilgai didėja neuronų jautrumas ir sutrinka daugelio genų, lemiančių neuronų diferenciaciją ir funkciją, raiška, todėl antrojoje kartoje DEHP sukelti hipokampo pažeidimai tampa aiškiai matomi ir įvertinami (Barakat et al., 2018; Mondal &

Bandyopadhyay. 2024). Hipokampo CA3 regione neuronai atlieka svarbias funkcijas atminties procesuose ir informacijos apdorojime (Rolls, 2008; Rolls, 2010). Sumažėjęs regiono storis ir neuronų tankis siejamas su pablogėjusia erdvine atmintimi, sumažėjusiu BDNF (smegenų neurotrofinis faktorius) ekspresijos lygiu (Sousa et al., 2000; Huang & Reichardt, 2001; Wang et al., 2017). Sumažėjęs neuronų tankis gali lemti jautrumą stresui ir emocijų reguliavimo sunkumus (Tata & Anderson, 2010). Ilgainiui tokie pokyčiai yra siejami su depresija, atminties sutrikimais ir neurodegeneracinėmis ligomis (Sousa et al., 2000; Tata & Anderson, 2010; Wang et al., 2017; Almeida-Toledano et al., 2024).

Kaip ir kituose tyrimuose (Smith et al., 2011; Holahan & Smith, 2014; Smith et al., 2015; Dong et al., 2021) taip ir šiame eksperimente didesnė DEHP paros dozė – 1000 µg/kg statistiškai reikšmingai sumažino hipokampo CA1/CA3 neuronų tankį, o CA3 regiono ir storį F1 ir F2 žiurkių jauniklių patinuose, lyginant su kontroline grupe. Ši dozė, kaip teigiama kontrolė, patvirtina DEHP neurotoksinį poveikį žiurkių jauniklių patinų hipokampo morfologijai su literatūroje aprašytais neurotoksiškumo įrodymais (Smith et al., 2011; Holahan & Smith, 2014).

Šiame eksperimente buvo tiriamas ir DBP, randamo Lietuvos vandenyje, poveikis žiurkių jauniklių patinų hipokampo plastiškumui. Rezultatai parodė, kad abiejose kartose DBP neigiamai įtakojo tiek CA1, tiek CA3 regiono storį ir neuronų tankį. Lyginant pokyčius tarp kartų, statistiškai reikšmingai sumažėjo CA3 regiono storis antrojoje kartoje. Abiejose kartose DBP sukelti hipokampo pokyčiai išliko labai panašūs, o tai rodo, kad dibutilftalato poveikis yra stiprus ir sukelia ilgalaikius morfologinius pažeidimus kiekvienai kartai. Kadangi hipokampus yra ypač jautrus embriogenezėje, net mažos ftalatų koncentracijos gali turėti ilgalaikių pasekmių (Holahan & Smith, 2014). Mūsų eksperimento rezultatai įrodo, kad DBP turi neurotoksinį poveikį ir esant mažoms, vandenyje randamoms dozėms, o tai kelia didelį susirūpinimą, apie galimą toksinį poveikį ir žmogui. Dibutilftalato neurotoksinio poveikio tyrimų nėra daug, o juose dažniausiai naudojamos didelės koncentracijos (Li et al., 2013; Farzanehfar et al., 2016; Lupu et al., 2023), tokie tyrimai atskleidžia, kad DBP pasižymi neurotoksinio poveikio ir sukelia neuronų degeneraciją. Sumažėjęs neuronų tankis ir hipokampo CA1/CA3 regionų storis, po DBP ekspozicijos, gali lemti sutrikusią atmintį, mokymosi sunkumus, padidėjusį jautrumą stresui ir emocijų reguliacijos disbalansą (Sousa et al., 2000). Šie pokyčiai taip pat siejami su depresijos, neurodegeneracinių ligų, nerimo išsivystymo ir kognityvinių funkcijų sutrikimo rizika (Tata & Anderson, 2010; Wang et al., 2017; Almeida-Toledano et al., 2024).

Teigiamos DBP kontrolės (500 µg/kg) poveikio tyrimo rezultatas parodė ryškų dibutilftalato neurotoksinį poveikį abiejose kartose ir abiejuose tirtuose hipokampo regionuose: regionų storis ir neuronų tankis statistiškai reikšmingai sumažėjo lyginant su kontroline grupe. Kitų tyrėjų DBP tyrimo eksperimentuose (Li et al., 2009; Lien et al.; 2015, Lee et al., 2022) dažniausiai buvo naudojamos didesnės šio chemikalo dozės, panašiai tokios kaip mūsų tyrimo teigiama kontrolė. Minėtų tyrėjų

eksperimentai patvirtina, kad dibutilftalas neurotoksiškai veikia graužikų jauniklių smegenų vystymąsi, neuronų brendimą, statistiškai reikšmingai mažina neuronų skaičių hipokampe ir sutrikdo sinapsių formavimąsi. Pastebėtas poveikio nuoseklumas, t.y. ftalato poveikis iš kartos į kartą išlieka stiprus, o tai leidžia manyti, kad DBP poveikis gali išsilaikyti ir didinti pažeidimus per kelias kartas (Skinner, 2015). Tai įrodo ir mūsų tyrimo statistiškai reikšmingas hipokampo CA1 neuronų tankio skirtumas tarp F1 ir F2 žiurkių jauniklių patinų.

Šiame eksperimente vertinant dviejų ftalatų mišinio poveikį, rezultatai parodė, kad DEHP ir DBP mišinys statistiškai reikšmingai sumažino pirmos kartos hipokampo CA1 regiono storį ir abiejų regionų neuronų tankį abejose kartose, lyginant su kontrolinėmis grupėmis. Šio tyrimo rezultatai parodo, kad Lietuvoje fiksuotos abiejų ftalatų koncentracijos veikdamos kartu sukelia aiškų neurotoksinį poveikį žiurkių jauniklių hipokampo plastiškumui, tačiau tyrimų su šių ftalatų mišinio poveikiu nėra, todėl svarbu atlikti daugiau eksperimentų, kad išsiaiškinti šio mišinio poveikį hipokampo plastiškumui.

Apibendrinant šio tyrimo rezultatus galime teigti, kad DEHP ir DBP, bei jų mišinys turi tęstinį toksinį poveikį žiurkių jauniklių patinų hipokampo morfologijai. Eksperimentas parodė, kad ilgalaikėje perspektyvoje šie ftalatai pasižymi transgeneraciniu poveikiu, veikiant kelias palikuonių kartas. Jų toksinis poveikis nervų sistemai veikia kognityvines funkcijas ir atmintį bei siejamas su neurologinėmis ligomis. Šiame tyrime pateikti tik jauniklių patinų hipokampo tyrimo rezultatai, tačiau atsižvelgiant į tai, kad ankstesni tyrimai parodė lyčiai specifinį neurotoksiškumo poveikį po DEHP poveikio (Ahmed et al., 2018), ateityje planuojama išanalizuoti ir patelių hipokampo plastiškumą ftalatų poveikyje, kad būtų galima įvertinti galimus biologinius skirtumus tarp lyčių.

Išvados

1. Tęstinis DEHP ir DBP poveikis sutrikdė žiurkių jauniklių patinų neurogenezę, kas pasireiškė hipokampo struktūriniais pokyčiais F1/F2 palikuonių kartose sumažinant regionų storį.
2. Ilgalaikis DEHP ir DBP turėjo toksinį poveikį žiurkių jauniklių patinų hipokampo plastiškumui, statistiškai reikšmingai sumažinant F1/F2 abiejų regionų neuronų tankį.
3. Neurodegeneraciniai hipokampo struktūrų skirtumai F1/F2 įrodė, kad tirti ftalatai gali sukelti transgeneracinį ir daugiakartinį poveikį, pasireiškiantį ne tik tiesiogiai, bet ir vėlesnėse kartose.

Autoriaus asmeninis indėlis

Dalyvavimas eksperimente prižiūrint gyvūnus, atliekant įvairias procedūras (maitinimas, svėrimas, narvų keitimas, ftalatų dozavimas ant sausainių, kraujo ėmimas, nėštumo tikrinimas, skrodimas). Magistrinio darbo idėjos išgryninimas, informacijos paieškos, tyrimo metodų parinkimas ir analizavimas, histologinių pjūvių ruošimas, visų pjūvių dažymas, fotografavimas ir analizė mikroskopu, statistinės analizės testų parinkimas ir taikymas, rezultatų interpretavimas, konsultacijos su neurobiologais. Magistrinio darbo rašymas buvo vykdytas savarankiškai, laikantis akademinio sąžiningumo principų.

Ruošiant magistrinį darbą dalyvauta trijuose LMT studentiškuose projektuose.

Rezultatų sklaida

Autoriaus dalyvavimas mokslinėse konferencijose:

1. **Orla, Laurynas**, Paulikaitė, Edita, Aukštikalnienė, Rasa, Neniškytė, Urtė, Žalgevičienė, Violeta, Skujienė, Grita. The evaluation of environmental neurodegenerative effect in male rat pups // The COINS 2024 : international conference of life sciences : book of abstracts. Vilnius. 2024, p. 92.
2. **Orla, Laurynas**, Paulikaitė, Edita, Aukštikalnienė, Rasa, Neniškytė, Urtė, Žalgevičienė, Violeta, Skujienė, Grita. Toxic Effect of Di(2-ethylhexyl)phthalate and Dibutylphthalate on Hippocampus Neuron Density and Region Thickness // The 18th International Scientific Conference "The Vital Nature Sign 2024": book of abstracts. Kaunas. 2024, p. 77. ISSN:2335-8718.
3. **Orla, Laurynas**, Paulikaitė, Edita, Aukštikalnienė, Rasa, Neniškytė, Urtė, Žalgevičienė, Violeta, Skujienė, Grita. Phthalate-Induced Changes in Hippocampal Morphology in Male Rat Pups // The 6th International Conference "Evolutionary Medicine: How Evolutionary Thinking Can Contribute to Medical and Health Sciences". Vilnius, 2024. Pranešimas išrinktas geriausiu studento žodiniu pranešimu.
4. **Orla, Laurynas**, Paulikaitė, Edita. Žiurkių jauniklių neuronų apoptozės vertinimas taikant Tunel metodą // Studentų vasaros mokslinės praktikos baigiamoji konferencija "Mokslo vasara": Vilnius, 2024
5. **Orla, Laurynas 2024**. Plastikų priedai – dar viena tylioji mirtis, sukelianti chromosomų pažeidimus. *Veritas*, Nr. 1, p. 12-14. Lietuvos jaunųjų mokslininkų sąjunga. Prieiga per: <https://www.ljms.lt/veritas-nr1> [žiūrėta 2025-05-22].
6. **Orla, Laurynas 2024**. VU tyrėjai nustatė, kad Lietuvoje randami plastikų priedų kiekiai pažeidžia chromosomas. *LRT.lt*. Prieiga per: <https://www.lrt.lt/naujienos/mokslas-ir-it/11/2443139/vu-tyrejai-nustate-kad-lietuvoje-randami-plastiku-priedu-kiekiai-pazeidzia-chromosomas> [žiūrėta 2025-05-22].
7. **Orla, Laurynas**, Paulikaitė, Edita, Aukštikalnienė, Rasa, Žalgevičienė, Violeta, Skujienė, Grita. Di(2-etilheksil)ftalato ir dibutilftalato poveikis antros kartos (F₂) žiurkių jauniklių hipokampo morfologijai // Studentų tyrimai semestro metu baigiamoji konferencija "Naujoji karta su LMT": Vilnius, 2025

Padėka

Dėkoju VU medicinos studijų programos studentėms Justinai Alčiauskaitei ir Evitai Sėrikovaitei už pagalbą sveriant žiurkes ir pagalbą ruošiant sausainius. Nuoširdi padėka biologijos doktorantei Editai Paulikaitei už pagalbą ir palaikymą tyrimo metu, prof. dr. Violetai Žalgevičienei už praktinius patarimus, išmokytus naujus dalykus ir profesinį bendradarbiavimą. Didelė padėka dr. Jekaterinai Havelkai už pagalbą atliekant tyrimą ir išmokytus naujus metodus bei darbą su molekulinės laboratorijos įranga. Doc. dr. Gritai Skujienei noriu padėkoti už suteiktą galimybę dalyvauti projekte, išmokytus naujus tyrimo metodus ir eksperimento planavimo, palaikymą bei profesinį bendradarbiavimą. Didelė padėka prof. dr. Urtei Neniškytei už galimybę bendradarbiauti, pagalbą organizuojant tyrimo metodus ir išmokytus naujus dalykus. Na, o didžiausia padėka yra skirta mano darbo vadovei asist. dr. Rasai Aukštikalnienei už palaikymą, ilgas valandas diskutuojant ir tikrinant mano darbus, už įkvėpimą nepasiduoti ir judėti toliau bei už išmokytus naujus dalykus, galimybę dalyvauti LMT finansuojamuose projektuose.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Laurynas Orla

Magistro baigiamasis darbas

**Di(2-etilheksil)ftalato ir dibutilftalato toksinis poveikis žiurkių jauniklių hipokampo
plastiškumui**

SANTRAUKA

Ftalatai yra žmogaus sukurta cheminių medžiagų grupė, kuri plačiai naudojama kaip plastifikatoriai pačiose įvairiausiose pramonės srityse. Šie chemikalai pasižymi endokrininę sistemą ardančiu poveikiu ir yra linkę akumuliuotis organizme. Vis gausėjant šių teršalų gamtoje, labai svarbu išsiaiškinti jų poveikį įvairioms organizmo sistemos, tame tarpe ir nervų sistemai. Šio darbo tikslas: nustatyti di(2-etilheksil)ftalato ir dibutilftalato toksinį poveikį žiurkių jauniklių hipokampo plastiškumui. Eksperimentą patvirtino Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Eksperimentų su gyvūnais etikos komitetas (2022-08/09 Nr. G2-221). Siekiant įvertinti neurotoksinį ftalatų poveikį, buvo atlikta dviejų kartų žiurkių jauniklių patinėlių smegenų hipokampo histologinė analizė.

5 – 8 savaičių amžiaus *Wistar* linijos žiurkių patelės buvo suskirstytos į 6 grupes, kurios kiekvieną eksperimento dieną gavo standartinį maistą ir papildomai ekologišką sausainio gabalėlį su skirtingomis aliejuje ištirpintomis ftalatų paros dozėmis, priklausomai nuo kūno svorio ir eksperimentinės grupės: 1) Control – gavo tik sausainį su alyvuogių aliejumi, 2) DEHP 200 µg/kg; 3) DEHP 1000 µg/kg; 4) DBP 100 µg/kg; 5) DBP 500 µg/kg; 6) ftalatų mišinio (DEHP 200 µg/kg, DBP 100 µg/kg). Taip žiurkių patelės buvo maitinamos 3,5 mėnesius (2 mėnesius iki nėštumo ir 1,5 mėn. nėštumo ir žindymo laikotarpiu). Po atjunkymo buvo atrinkti pirmosios kartos patinėliai ir eutanazuoti naudojant CO₂ kamerą, o patelės buvo paliktos kartoti analogišką antrosios kartos eksperimentą. Praėjus laikui, po atjunkymo, buvo atrinkti ir eutanazuoti antrosios kartos patinėliai. Skrodimo metu išpreparuotos šių gyvūnų smegenys, paruošti jų 5 µm storio histologiniai pjūviai, nudažyti pagal Nissl ir analizuoti ImageJ sistema. Mikroskopuojant vertinti hipokampo CA1/CA3 regionų storio bei neuronų tankio pokyčiai. Statistiniai skirtumai nustatyti naudojant GraphPad Prism 9.0.0. taikant vienkryptę ANOVA.

Rezultatai parodė, kad ilgalaikė di(2-etilheksil)ftalato paros dozė, randama Lietuvos vandenyse, statistiškai reikšmingai sumažino hipokampo CA3 regiono storį ir neuronų tankį antrojoje kartoje, o penkis kartus padidinta šio ftalato dozė statistiškai reikšmingai sumažino CA3 regiono storį ir neuronų tankį abejose kartose ir CA1 neuronų tankį pirmojoje kartoje lyginant su kontroline grupe. Dibutilftalatas statistiškai reikšmingai sumažino abiejų kartų abiejų hipokampo sričių storį ir neuronų tankį, lyginant su kontroline grupe.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Laurynas Orla

Master's thesis

Toxic Effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate and Dibutyl Phthalate on the Plasticity of the Hippocampus of Rat Pups

ABSTRACT

Phthalates are a group of man-made chemicals widely used as plasticizers in a wide variety of industries. These chemicals are known to disrupt the endocrine system and tend to accumulate in the body. With the increasing presence of these pollutants in the environment, it is very important to investigate their effects on various body systems, including the nervous system. The aim of this study was to determine the toxic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and dibutyl phthalate on the plasticity of the hippocampus in young rats. The experiment was approved by the Animal Ethics Committee of the State Food and Veterinary Service (2022-08/09 No. G2-221). To assess the neurotoxic effects of phthalates, histological analysis of the hippocampus of male rat pups was performed in two generations.

Female rats of the *Wistar* strain aged 5–8 weeks were divided into 6 groups, which received standard food and an additional organic biscuit piece with different daily doses of phthalates dissolved in oil on each day of the experiment, depending on body weight and experimental group: 1) Control – received only biscuit with olive oil, 2) DEHP 200 µg/kg; 3) DEHP 1000 µg/kg; 4) DBP 100 µg/kg; 5) DBP 500 µg/kg; 6) phthalate mixture (DEHP 200 µg/kg, DBP 100 µg/kg). The female rats were fed in this manner for 3.5 months (2 months before pregnancy and 1.5 months during pregnancy and lactation). After weaning, the first-generation males were selected and euthanized using a CO₂ chamber, while the females were left to repeat the same experiment in the second generation. After a period of time, the second-generation males were selected and euthanized after weaning. During necropsy, the brains of these animals were dissected, 5 µm thick histological sections were prepared, stained according to Nissl, and analyzed using the ImageJ system. Microscopy was used to evaluate changes in the thickness of the CA1/CA3 regions of the hippocampus and neuron density. Statistical differences were determined using GraphPad Prism 9.0.0. applying a one-way ANOVA.

The results showed that a long-term daily dose of di(2-ethylhexyl)phthalate found in Lithuanian waters statistically significantly reduced the thickness of the CA3 region of the hippocampus and neuron density in the second generation, while a fivefold increase in the dose of this phthalate statistically significantly reduced the thickness of the CA3 region and neuron density in both generations and the CA1 neuron density in the first generation compared to the control group. Dibutyl

phthalate statistically significantly reduced the thickness and neuron density of both hippocampal regions in both generations compared to the control group.

Literatūros sąrašas

- Aitman, T. J., Critser, J. K., Cuppen, E., Dominiczak, A., Fernandez-Suarez, X. M., Flint, J., Gauguier, D., Geurts, A. M., Gould, M., Harris, P. C., Holmdahl, R., Hubner, N., Izsvák, Z., Jacob, H. J., Kuramoto, T., Kwitek, A. E., Marrone, A., Mashimo, T., Moreno, C., Mullins, J., ... Worley, K. (2008). Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nature genetics*, 40(5), 516–522. <https://doi.org/10.1038/ng.147>
- Alam, M. S., Maowa, Z., & Hasan, M. N. (2024). Phthalates toxicity *in vivo* to rats, mice, birds, and fish: A thematic scoping review. *Heliyon*, 11(1), e41277. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e41277>
- Almeida-Toledano, L., Navarro-Tapia, E., Sebastiani, G., Ferrero-Martínez, S., Ferrer-Aguilar, P., García-Algar, Ó., Andreu-Fernández, V., & Gómez-Roig, M. D. (2024). Effect of prenatal phthalate exposure on fetal development and maternal/neonatal health consequences: A systematic review. *The Science of the total environment*, 950, 175080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175080>
- Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. In P. Andersen, R. Morris, D. Amaral (Eds.) & T. Bliss & J. O'Keefe (Ed.), *The hippocampus book* (pp. 37–114). Oxford University Press.
- Australian Competition and Consumer Commission (ACCC), 2020. DEHP in children's plastic items – ban. Prieiga per: <https://www.productsafety.gov.au/business/find-banned-products/dehp-in-childrens-plastic-items-ban> [žiūrėta 2025-04-01]
- Bayer S. A. (1982). Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Experimental brain research*, 46(3), 315–323. <https://doi.org/10.1007/BF00238626>
- Bayer, S. A., Yackel, J. W., & Puri, P. S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4548), 890–892. <https://doi.org/10.1126/science.7079742>
- Barakat, R., Lin, P. C., Park, C. J., Best-Popescu, C., Bakry, H. H., Abosalem, M. E., Abdelaleem, N. M., Flaws, J. A., & Ko, C. (2018). Prenatal Exposure to DEHP Induces Neuronal Degeneration and Neurobehavioral Abnormalities in Adult Male Mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 164(2), 439–452. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy103>
- Bate, S. T., Clark, R. A., & Stanford, S. C. (2017). Using InVivoStat to perform the statistical analysis of experiments. *Journal of psychopharmacology* (Oxford, England), 31(6), 644–652. <https://doi.org/10.1177/0269881116682213>
- Benyathiar, P., Kumar, P., Carpenter, G., Brace, J., & Mishra, D. K. (2022). Polyethylene Terephthalate (PET) Bottle-to-Bottle Recycling for the Beverage Industry: A Review. *Polymers*, 14(12), 2366. <https://doi.org/10.3390/polym14122366>
- Bhaskar, R., Mishra, A. K., & Mohanty, B. (2017). Neonatal Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals Impairs Learning Behaviour by Disrupting Hippocampal Organization in Male Swiss Albino Mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 121(1), 44–52. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12767>
- Bon L.I, Zimatkin S.M, Malykhina A.V. (2022) Rat Hippocampus – Development and Morphological Organization J, Surgical Case Reports and Images 5(2); DOI: 10.31579/2690-1897/106

- Braun, J. M., Sathyanarayana, S., & Hauser, R. (2013). Phthalate exposure and children's health. *Current opinion in pediatrics*, 25(2), 247–254.
<https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32835e1eb6>
- Bu, S., Wang, Y., Wang, H., Wang, F., & Tan, Y., 2020. Analysis of global commonly-used phthalates and non-dietary exposure assessment in indoor environment. *Building and Environment*, 177, 106853. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2020.106853>
- Burgess, N., Jeffery, K. J., & O'Keefe, J. (Eds.). (1999). The hippocampal and parietal foundations of spatial cognition. Oxford University Press.
- Chang, W. H., Herianto, S., Lee, C. C., Hung, H., & Chen, H. L. (2021). The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *The Science of the total environment*, 786, 147371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147371>
- Chatterjee, S., & Karlovsky, P. (2010). Removal of the endocrine disrupter butyl benzyl phthalate from the environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1), 61–73.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2570-y>
- ChemAnalyst, 2024. Dibutyl Phthalate (DBP) Market – Industry Report. Prieiga per:
<https://www.chemanalyst.com/industry-report/dibutyl-phthalate-dbp-market-1823> [žiūrėta 2025-04-15].
- Chevalleyre, V., & Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66(4), 560–572.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013>
- Chou, Y. Y., Huang, P. C., Lee, C. C., Wu, M. H., & Lin, S. J. (2009). Phthalate exposure in girls during early puberty. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*, 22(1), 69–77. <https://doi.org/10.1515/jpem.2009.22.1.69>
- Clara, M., Windhofer, G., Hartl, W., Braun, K., Simon, M., Gans, O., Scheffknecht, C., & Chovanec, A. (2010). Occurrence of phthalates in surface runoff, untreated and treated wastewater and fate during wastewater treatment. *Chemosphere*, 78(9), 1078–1084.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.052>
- Culty, M., Thuillier, R., Li, W., Wang, Y., Martinez-Arguelles, D. B., Benjamin, C. G., Triantafilou, K. M., Zirk, B. R., & Papadopoulos, V. (2008). In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biology of reproduction*, 78(6), 1018–1028.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065649>
- De Toni, L., Tisato, F., Seraglia, R., Roverso, M., Gandin, V., Marzano, C., Padriani, R., & Foresta, C. (2017). Phthalates and heavy metals as endocrine disruptors in food: A study on pre-packed coffee products. *Toxicology reports*, 4, 234–239.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.004>
- Dere, E., Easton, A., Nadel, L., & Huston, J. P. (red.), 2008. Handbook of episodic memory (Vol. 18). Amsterdam: Elsevier.
- Di Mei, Lamaka, S. V., Lu, X., & Zheludkevich, M. L., 2020. Selecting medium for corrosion testing of bioabsorbable magnesium and other metals – A critical review. *Corrosion Science*, 171, 108722. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2020.108722>
- Dudek, J., Skocic, J., Sheard, E., & Rovet, J., 2014. Hippocampal abnormalities in youth with alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 20(2), 181–191.
- Erik Mooi, E. & Sarstedt, M., & Mooi-Reci, I., (2018). "Hypothesis Testing & ANOVA," *Springer Texts in Business and Economics*, in: Market Research, chapter 6, pages 153-214, Springer.

- European Chemicals Agency (ECHA), 2008. Registration dossier (DBP). Helsinki: European Chemicals Agency. Prieiga per: <https://echa.europa.eu/pl/registration-dossier/-/registered-dossier/14862> [žiūrėta 2025-03-09]
- Europos Komisija, 2008a. Dibutyl phthalate (DBP). Iš: Phthalates in school supplies – Glossary. Prieiga per: <https://ec.europa.eu/health/opinions/en/phthalates-school-supplies/glossary/def/dpb-dibutyl-phthalate.htm> [žiūrėta 2025-05-22]
- Europos Komisija, 2008b. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). Iš: Phthalates in school supplies – Glossary. Prieiga per: <https://ec.europa.eu/health/opinions/en/phthalates-school-supplies/glossary/def/dehp-di-2-ethylhexyl-phthalate.htm> [žiūrėta 2025-05-22].
- Europos Komisija, 2008c. Di-isobutyl phthalate (DiBP). Iš: Phthalates in school supplies – Glossary. Prieiga per: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/phthalates-school-supplies/glossary/def/di-isobutyl-phthalate.htm [žiūrėta 2025-04-15].
- Europos Komisija, 2008d. DINP – diisononilftalatas. Iš: Ftalatai mokyklinėse priemonėse – žodynėlis. Prieiga per: <https://ec.europa.eu/health/opinions/en/phthalates-school-supplies/glossary/def/dinp-di-isononyl-phthalate.htm> [žiūrėta 2025-04-15].
- Europos Parlamentas ir Taryba, 2010. Direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. Europos Sąjungos oficialusis leidinys, 2010 m. rugsėjo 22 d., L 276, p. 33–79. Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063> [žiūrėta 2025-04-15].
- Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2005/84/EB, 2005 m. gruodžio 14 d., kuria aštuntą kartą iš dalies keičiama Tarybos direktyva 76/769/EEB dėl tam tikrų pavojingų medžiagų ir preparatų pateikimo rinkai ir jų naudojimo apribojimo (ftalatų naudojimas žaisluose ir vaikų priežiūros reikmenyse). Europos Sąjungos oficialusis leidinys, L 344, 2005-12-27, p. 40–43. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32005L0084>
- Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (ES) 2018/2005, 2018 m. gruodžio 17 d., kuriuo ribojamas 1,2-benzono dikarboksilato (DEHP, DBP, BBP ir DIBP) naudojimas žaisluose ir vaikų priežiūros reikmenyse pagal Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH). *Europos Sąjungos oficialusis leidinys*, L 322, 2018-12-18, p. 14–18. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R2005&from=EN>
- Fagundes, D. J., & Taha, M. O., 2004. Animal disease model: Choice's criteria and current animal specimens. *Acta Cirurgica Brasileira*, 19, 59–65.
- Fang, H., Wang, J., & Lynch, A. R., 2016. Migration of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and di-n-butylphthalate (DBP) from polypropylene food containers. *Food Control*, 73, 1298–1302. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.050>
- Fasman, G. I., Kruczynski, J. A., & Dewsbury, D. A., 1987. Genetic homogeneity and variability in behavioral studies using rats. *Behavioral Brain Research*, 263, 201–209.
- Festing M. F. (2018). On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Laboratory animals*, 52(4), 341–350. <https://doi.org/10.1177/0023677217738268>
- Giuliani, A., Zuccarini, M., Cichelli, A., Khan, H., & Reale, M. (2020). Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact. *International journal of environmental research and public health*, 17(16), 5655. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165655>
- Grindler, N. M., Vanderlinden, L., Karthikraj, R., Kannan, K., Teal, S., Polotsky, A. J., Powell, T. L., Yang, I. V., & Jansson, T. (2018). Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting Chemical,

- Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women. *Scientific reports*, 8(1), 6086. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24505-w>
- Gulyás, A. I., Miles, R., Hájos, N., & Freund, T. F. (1993). Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *The European journal of neuroscience*, 5(12), 1729–1751. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00240.x>
- Guo, X., Wang, L., Wang, X., & Liu, H. (2013). Occurrence and environmental risk assessment of PAEs in Weihe River near Xi'an City, China. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 67(5), 948–958. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.548>
- Hamilton, G. F., Bucko, P. J., Miller, D. S., DeAngelis, R. S., Krebs, C. P., & Rhodes, J. S. (2016). Behavioral deficits induced by third-trimester equivalent alcohol exposure in male C57BL/6J mice are not associated with reduced adult hippocampal neurogenesis but are still rescued with voluntary exercise. *Behavioural brain research*, 314, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.052>
- Henkel, C., Hüffer, T., Peng, R., Gao, X., Ghoshal, S., & Hofmann, T. (2024). Photoaging enhances the leaching of di(2-ethylhexyl) phthalate and transformation products from polyvinyl chloride microplastics into aquatic environments. *Communications chemistry*, 7(1), 218. <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01310-3>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*, 24, 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huang, Y., Li, J., Garcia, J. M., Lin, H., Wang, Y., Yan, P., Wang, L., Tan, Y., Luo, J., Qiu, Z., Chen, J. A., & Shu, W. (2014). Phthalate levels in cord blood are associated with preterm delivery and fetal growth parameters in Chinese women. *PloS one*, 9(2), e87430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087430>
- Huang, P. C., Tien, C. J., Sun, Y. M., Hsieh, C. Y., & Lee, C. C. (2008). Occurrence of phthalates in sediment and biota: relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere*, 73(4), 539–544. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.019>
- Yan, Y., Zhu, F., Zhu, C., Chen, Z., Liu, S., Wang, C., & Gu, C. (2021). Dibutyl phthalate release from polyvinyl chloride microplastics: Influence of plastic properties and environmental factors. *Water research*, 204, 117597. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117597>
- Yassa, M. A., Stark, S. M., Bakker, A., Albert, M. S., Gallagher, M., & Stark, C. E. (2010). High-resolution structural and functional MRI of hippocampal CA3 and dentate gyrus in patients with amnesic Mild Cognitive Impairment. *NeuroImage*, 51(3), 1242–1252. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.03.040>
- Jeddi, M. Z., Rastkari, N., Ahmadkhaniha, R., & Yunesian, M., 2015. Concentrations of phthalates in bottled water under common storage conditions: Do they pose a health risk to children? *Food Research International*, 69, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.057>
- Jungtinių Amerikos Valstijų Kongresas, 2008. Consumer Product Safety Improvement Act of 2008 (CPSIA), Public Law 110–314. <https://www.congress.gov/110/plaws/publ314/PLAW-110publ314.pdf>
- Kassab, R. B., Lokman, M. S., & Essawy, E. A. (2019). Neurochemical alterations following the exposure to di-n-butyl phthalate in rats. *Metabolic brain disease*, 34(1), 235–244. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0341-0>
- Kavaliauskas, V. (2019). Ftalatų nustatymas mineraliniame vandenyje skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (Magistro darbas). Vilniaus universitetas, Chemijos ir geomokslų fakultetas.

- Ke, M., Ye, Y., Zhang, Z., Gillings, M., Qu, Q., Xu, N., Xu, L., Lu, T., Wang, J., & Qian, H. (2021). Synergistic effects of glyphosate and multiwall carbon nanotubes on *Arabidopsis thaliana* physiology and metabolism. *The Science of the total environment*, 769, 145156. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145156>
- Koch, H. M., Lorber, M., Christensen, K. L., Pålme, C., Koslitz, S., & Brüning, T. (2013). Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *International journal of hygiene and environmental health*, 216(6), 672–681. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.12.002>
- Koo, H. J., & Lee, B. M. (2004). Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 67(23-24), 1901–1914. <https://doi.org/10.1080/15287390490513300>
- Kougias, D. G., Sellinger, E. P., Willing, J., & Juraska, J. M. (2018). Perinatal Exposure to an Environmentally Relevant Mixture of Phthalates Results in a Lower Number of Neurons and Synapses in the Medial Prefrontal Cortex and Decreased Cognitive Flexibility in Adult Male and Female Rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 38(31), 6864–6872. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0607-18.2018>
- Krinke J. G., 2000. History, Strains and Models. In: Krinke J.G., *Handbook of Experimental*
- Krubaa, P. & Yogitha, P. S., (2024) Albino Wistar Rats: Advantages and Limitations in Biomedical Research. *SBV Journal of Basic, Clinical and Applied Health Science* 7(2):p 61-65, DOI: 10.4103/SBVJ.SBVJ_22_24
- Kurozumi, A., Hara, T., Sakamoto, S., Araki, D., Iida-Tamada, S., Kuroda-Ishimine, C., & Minagi, S. (2019). Effects of the loss and reconstruction of molar occlusal support on memory retrieval and hippocampal neuron density in rats. *Journal of prosthodontic research*, 63(3), 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.12.009>
- Lay, J. O., Jr, & Miller, B. J. (1987). Plasticizers in pacifiers: direct determination by FAB-MS. *Analytical chemistry*, 59(22), 1323A–1325A. <https://doi.org/10.1021/ac00149a002>
- Lee, S., Lee, W., Yang, S., Suh, Y. J., Hong, D. G., Chang, S. C., Kim, H. S., & Lee, J. (2022). Di-n-butyl phthalate disrupts neuron maturation in primary rat embryo neurons and male C57BL/6 mice. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 85(2), 56–70. <https://doi.org/10.1080/15287394.2021.1973631>
- Letcher, T., 2020. Plastic waste and recycling: Environmental impact, societal issues, prevention, and solutions. Academic Press.
- Leung, L. S., Roth, L., & Canning, K. J. (1995). Entorhinal inputs to hippocampal CA1 and dentate gyrus in the rat: a current-source-density study. *Journal of neurophysiology*, 73(6), 2392–2403. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.6.2392>
- Li, Y., Zhuang, M., Li, T., & Shi, N. (2009). Neurobehavioral toxicity study of dibutyl phthalate on rats following in utero and lactational exposure. *Journal of applied toxicology : JAT*, 29(7), 603–611. <https://doi.org/10.1002/jat.1447>
- Li, X. J., Jiang, L., Chen, L., Chen, H. S., & Li, X. (2013). Neurotoxicity of dibutyl phthalate in brain development following perinatal exposure: a study in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.05.001>
- Liao, C., Liu, W., Zhang, J., Shi, W., Wang, X., Cai, J., Zou, Z., Lu, R., Sun, C., Wang, H., Huang, C., & Zhao, Z. (2018). Associations of urinary phthalate metabolites with residential characteristics, lifestyles, and dietary habits among young children in Shanghai, China. *The Science of the total environment*, 616-617, 1288–1297. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.189>

- Lien, Y. J., Ku, H. Y., Su, P. H., Chen, S. J., Chen, H. Y., Liao, P. C., Chen, W. J., & Wang, S. L. (2015). Prenatal exposure to phthalate esters and behavioral syndromes in children at 8 years of age: Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. *Environmental health perspectives*, 123(1), 95–100. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307154>
- Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymas (Žin., 1997, Nr. 108-2728; 2012, Nr. 122-6126).
- Lin, H., Yuan, K., Li, L., Liu, S., Li, S., Hu, G., Lian, Q. Q., & Ge, R. S. (2015). In Utero Exposure to Diethylhexyl Phthalate Affects Rat Brain Development: A Behavioral and Genomic Approach. *International journal of environmental research and public health*, 12(11), 13696–13710. <https://doi.org/10.3390/ijerph121113696>
- Lithner, D., Larsson, A., & Dave, G. (2011). Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *The Science of the total environment*, 409(18), 3309–3324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038>
- Liu, Y., Chen, Z., & Shen, J. (2013). Occurrence and removal characteristics of phthalate esters from typical water sources in northeast china. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2013, 419349. <https://doi.org/10.1155/2013/419349>
- López-Carrillo, L., Hernández-Ramírez, R. U., Calafat, A. M., Torres-Sánchez, L., Galván-Portillo, M., Needham, L. L., Ruiz-Ramos, R., & Cebrián, M. E. (2010). Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. *Environmental health perspectives*, 118(4), 539–544. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901091>
- Lupu, D. I., Cediell Ulloa, A., & Rüegg, J. (2023). Endocrine-Disrupting Chemicals and Hippocampal Development: The Role of Estrogen and Androgen Signaling. *Neuroendocrinology*, 113(12), 1193–1214. <https://doi.org/10.1159/000531669>
- Magdouli, S., Daghrir, R., Brar, S. K., Drogui, P., & Tyagi, R. D., 2013. Di(2-ethylhexyl)phthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review. *Journal of Environmental Management*, 127, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.013>
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*, 8(1), e55387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055387>
- Megías, M., Molist, P., Pombal, M. A., 2019. Atlas of plant and animal histology. Histological techniques. Retrieved from <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>
- Modlinska, K., & Pisula, W. (2020). The Norway rat, from an obnoxious pest to a laboratory pet. *eLife*, 9, e50651. <https://doi.org/10.7554/eLife.50651>
- Mondal, S., & Bandyopadhyay, A. (2024). Antioxidants in mitigating phthalate-induced male reproductive toxicity: A comprehensive review. *Chemosphere*, 364, 143297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143297>
- Moscovitch, M., Rosenbaum, R. S., Gilboa, A., Addis, D. R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M. P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., & Nadel, L. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of anatomy*, 207(1), 35–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00421.x>
- Mu, D., Gao, F., Fan, Z., Shen, H., Peng, H., & Hu, J. (2015). Levels of Phthalate Metabolites in Urine of Pregnant Women and Risk of Clinical Pregnancy Loss. *Environmental science & technology*, 49(17), 10651–10657. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02617>

- Mutsuga, M., Wakui, C., Kawamura, Y., & Maitani, T. (2002). Isolation and identification of some unknown substances in disposable nitrile-butadiene rubber gloves used for food handling. *Food additives and contaminants*, 19(11), 1097–1103. <https://doi.org/10.1080/02652030210151886>
- Nairismägi, J., Pitkänen, A., Kettunen, M. I., Kauppinen, R. A., & Kubova, H. (2006). Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia*, 47(3), 479–488. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00455.x>
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., & Ouddane, B. (2015). Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environmental science & technology*, 49(7), 4019–4035. <https://doi.org/10.1021/es505233b>
- Nohynek, G. J., Borgert, C. J., Dietrich, D., & Rozman, K. K. (2013). Endocrine disruption: fact or urban legend?. *Toxicology letters*, 223(3), 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.022>
- Otake, T., Yoshinaga, J., & Yanagisawa, Y. (2004). Exposure to phthalate esters from indoor environment. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology*, 14(7), 524–528. <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500352>
- Paulikaitė, E., Alčiauskaitė, J., Zalūba, R., Orla, L., Šerikovaitė, E., Valskys, V., Aukštikalnienė, R., Šimčikas, V., Žalgevičienė, V., & Skujienė, G., 2023. Effect of phthalates on the behavioural changes of rats during an Open Field test. *Toxicology Letters*, 384(suppl. 1), S308, art. no. LP-22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(23\)00987-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(23)00987-6)
- Peijnenburg, W. J. G. M., 2008. Phthalates. In: *Ecotoxicology*, pp. 2733–2738. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00419-5>
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(3), 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
- Reznikov, A., Sachynska, O., Lymareva, A., & Faliush, O., 2021. Developmental, behavioral and endocrine alterations in male rats at early and late postnatal life following in utero exposure to low dose di-n-butylphthalate. *Toxicological Research*, 37(2), 173–181. <https://doi.org/10.1007/s43188-020-00050-5>
- Rolls E. T. (2010). A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. *Behavioural brain research*, 215(2), 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.027>
- Rolls E. T. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in systems neuroscience*, 7, 74. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00074>
- Rowdhwal, S. S. S., & Chen, J. (2018). Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed research international*, 2018, 1750368. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>
- Safarpour, S., Ghasemi-Kasman, M., Safarpour, S., & Darban, Y. M. (2022). Effects of Di-2-Ethylhexyl Phthalate on Central Nervous System Functions: A Narrative Review. *Current neuropharmacology*, 20(4), 766–776. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210713122517>
- Sathyanarayana, S., Karr, C. J., Lozano, P., Brown, E., Calafat, A. M., Liu, F., & Swan, S. H. (2008). Baby care products: possible sources of infant phthalate exposure. *Pediatrics*, 121(2), e260–e268. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3766>

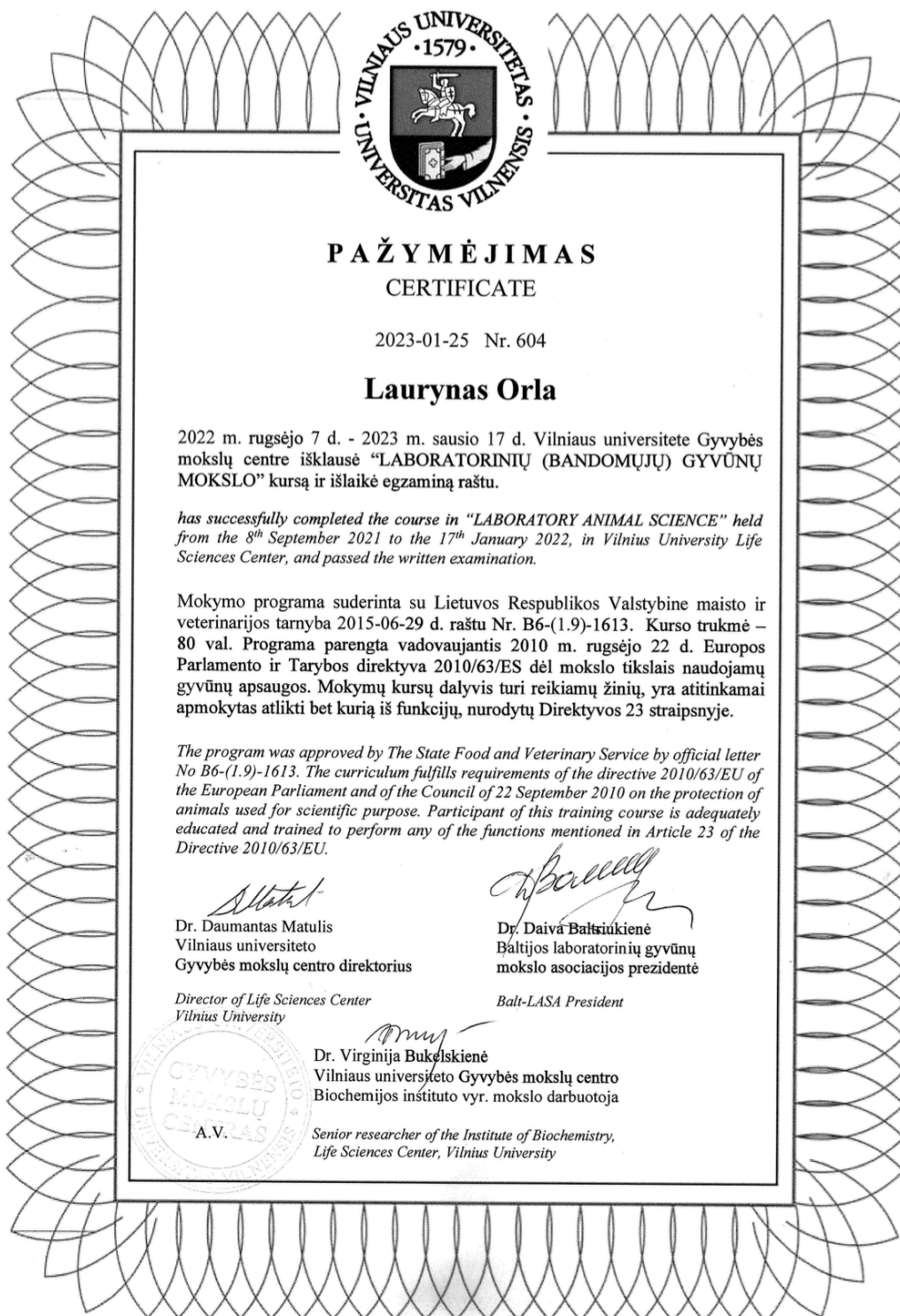
- Schettler T. (2006). Human exposure to phthalates via consumer products. *International journal of andrology*, 29(1), 134–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00567.x>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schug, T. T., Johnson, A. F., Birnbaum, L. S., Colborn, T., Guillette, L. J., Jr, Crews, D. P., Collins, T., Soto, A. M., Vom Saal, F. S., McLachlan, J. A., Sonnenschein, C., & Heindel, J. J. (2016). Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 30(8), 833–847. <https://doi.org/10.1210/me.2016-1096>
- Sengupta P. (2013a). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International journal of preventive medicine*, 4(6), 624–630.
- Sengupta P. (2013b). Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug and chemical toxicology*, 36(3), 353–368. <https://doi.org/10.3109/01480545.2012.710631>
- Seress, L., & Ribak, C. E. (1983). GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Experimental brain research*, 50(2-3), 173–182. <https://doi.org/10.1007/BF00239181>
- Serrano, S. E., Braun, J., Trasande, L., Dills, R., & Sathyanarayana, S. (2014). Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environmental health : a global access science source*, 13(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-43>
- Shelby M. D. (2006). NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *NTP CERHR MON*, (18), .
- Smith, C. A., & Holahan, M. R. (2014). Reduced hippocampal dendritic spine density and BDNF expression following acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in male Long Evans rats. *PloS one*, 9(10), e109522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109522>
- Smith, C. A., Farmer, K., Lee, H., Holahan, M. R., & Smith, J. C. (2015). Altered Hippocampal Lipid Profile Following Acute Postnatal Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Rats. *International journal of environmental research and public health*, 12(10), 13542–13559. <https://doi.org/10.3390/ijerph121013542>
- Somasundaram, D. B., Selvanesan, B. C., Ramachandran, I., & Bhaskaran, R. S. (2016). Lactational Exposure to Di (2-ethylhexyl) Phthalate Impairs the Ovarian and Uterine Function of Adult Offspring Rat. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 23(4), 549–559. <https://doi.org/10.1177/1933719115607995>
- Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F., & Paula-Barbosa, M. M. (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 97(2), 253–266. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00050-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00050-6)
- Staples, C.A.; Peterson, D.R.; Parkerton, T.F.; Adams, W.J. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere* 1997, 35, 667–749, [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(97\)00195-1](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(97)00195-1).
- Sun, X., Xu, H., Meng, X., Qi, J., Cui, Y., Li, Y., Zhang, H., & Xu, L. (2013). Potential use of hyperoxygenated solution as a treatment strategy for carbon monoxide poisoning. *PloS one*, 8(12), e81779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081779>
- Šimkevičienė V., Rukšėnas O., 2001. Laboratorinių gyvūnų mokslo pagrindai. Vilnius, Wistar rats upon sub-chronic exposure: A multigenerational assessment. 778. *Vilniaus universiteto leidykla*. 7-11,36-45p.

- Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 54(2), 120–132.
- Tata, D. A., & Anderson, B. J. (2010). The effects of chronic glucocorticoid exposure on dendritic length, synapse numbers and glial volume in animal models: implications for hippocampal volume reductions in depression. *Physiology & behavior*, 99(2), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.008>
- Tickner, J. A., Schettler, T., Guidotti, T., McCally, M., & Rossi, M. (2001). Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *American journal of industrial medicine*, 39(1), 100–111. [https://doi.org/10.1002/1097-0274\(200101\)39:1<100::aid-ajim10>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1097-0274(200101)39:1<100::aid-ajim10>3.0.co;2-q)
- Tuan Tran, H., Lin, C., Bui, X. T., Ky Nguyen, M., Dan Thanh Cao, N., Mukhtar, H., Giang Hoang, H., Varjani, S., Hao Ngo, H., & Nghiem, L. D. (2022). Phthalates in the environment: characteristics, fate and transport, and advanced wastewater treatment technologies. *Bioresource technology*, 344(Pt B), 126249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126249>
- Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 233. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>
- U.S. Consumer Product Safety Commission (CPSC), 2010a. Memorandum to Michael Babich from Kent Carlson regarding the toxicity review of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Bethesda, MD: U.S. Consumer Product Safety Commission.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2023. *Phthalates in cosmetics*. Prieiga per: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/phthalates-cosmetics> [žiūrėta 2025-04-01]
- Vilniaus vandenys, 2021. Plastiko minkštikliai nuotekose – grėsmingai auganti problema: pramonei būtini griežtesni įpareigojimai. Prieiga per: <https://www.vv.lt/2021/03/16/vilniaus-vandenys-plastiko-minkstikliai-nuotekose-gresmingai-auganti-problema-pramonei-butini-grieztesni-ipareigojimai/> [žiūrėta 2025-04-15].
- Wang, Y., & Qian, H. (2021). Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 9(5), 603. <https://doi.org/10.3390/healthcare9050603>
- Wang, J., Luo, Y., Teng, Y., Ma, W., Christie, P., & Li, Z. (2013). Soil contamination by phthalate esters in Chinese intensive vegetable production systems with different modes of use of plastic film. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 180, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.036>
- Wang, W., Wang, J., Zhang, Y., Wang, X., & Zhang, W., 2020. Phthalate ester pollution in agricultural soils and vegetables in greenhouses: A potential risk to human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110093. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133710>
- Wang, X. X., Li, J. T., Xie, X. M., Gu, Y., Si, T. M., Schmidt, M. V., & Wang, X. D. (2017). Nectin-3 modulates the structural plasticity of dentate granule cells and long-term memory. *Translational psychiatry*, 7(9), e1228. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.196>
- Williams, D. T., & Blanchfield, B. J. (1975). The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-14 C in the rat. *Journal of agricultural and food chemistry*, 23(5), 854–858. <https://doi.org/10.1021/jf60201a047>
- Wittassek, M., & Angerer, J. (2008). Phthalates: metabolism and exposure. *International journal of andrology*, 31(2), 131–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00837.x>

- Wójtowicz, A. K., Szychowski, K. A., Wnuk, A., & Kajta, M. (2017). Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and Neurotoxicity are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but not by Estrogen Receptor Alpha (ER α), Estrogen Receptor Beta (ER β), or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) in Mouse Cortical Neurons. *Neurotoxicity research*, 31(1), 77–89. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9665-x>
- World Health Organization (WHO), 2003. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA): Summary and Conclusions. 61-oji sesija, Roma.
- Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M., & Hungerbühler, K. (2006). What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans?. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*, 26(3), 803–824. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00770.x>
- Xu, Y., Agrawal, S., Cook, T. J., & Knipp, G. T. (2007). Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal rat brain upon maternal exposure. *Archives of toxicology*, 81(1), 57–62. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0143-8>
- Zhang, J., Zhou, K., Cheng, R., Yang, M., Shen, X., Luo, X., & Xu, L. (2022). Maternal Perinatal Exposure to Dibutyl Phthalate Promotes Ovarian Dysfunction in Adult Female Offspring via Downregulation of TGF- β 2 and TGF- β 3. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 29(8), 2401–2413. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00785-y>
- Zhang, Z., Chen, M., Zhang, Y., Zhang, H., & Guan, Y., 2016. Migration of phthalates from plastic packaging materials into bottled water under common storage conditions. *Science of the Total Environment*, 539, 129–138. 10.32598/CJHR.10.1.1921.1
- Zhanmu, O., Yang, X., Gong, H., & Li, X. (2020). Paraffin-embedding for large volume bio-tissue. *Scientific reports*, 10(1), 12639. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68876-5>

Priedai

Priedas A. Leidimas dirbti su laboratoriniais gyvūnais



1 pav. Leidimo dirbti su laboratoriniais gyvūnais kopija

Priedas B. Žiurkių jauniklių F1 ir F2 hipokampo morfologijos analizės duomenys

1 lentelė. Pirmosios žiurkių jauniklių kartos hipokampo CA1 ir CA3 regionų morfologiniai duomenys, vidurkių ir standartinės paklaidos (SEM) skaičiavimai

Group no.	Individ. No	CA1 density	CA1 den mea	SEM	CA1 Thickness	CA1 thick mea	SEM	CA3 density	CA3 den mea	SEM	CA3 Thickness	A3 thick mea	SEM
1	1	58,33			56,12						85,35		
	2	60,5						54			81,58		
	3	60,33			54,68			55,67			79,2		
	4	69,33						54			92,34		
	5	56,33			55,07			60,67			91,38		
	6	58,33	60,525	1,86905279	55,55	55,355	0,31092604	53,33	55,534	1,34091238	65,03	82,48	4,08549222
2	1	50,33			65,41			51			73,7		
	2	56			23,41			78			83,63		
	3	40,67			40,401			49			57,87		
	4	55,33	50,5825	3,53800173	48,44	44,41525	8,72884524	57,67	58,9175	6,62534071	61,88	69,27	5,84812363
3	1	47,67			44,34			37,33			56,46		
	2	36			36,99			45,33			61,77		
	3	46,67	43,4466667	3,73450726	37,24	39,52333333	2,40941441	42,33	41,6633333	2,33333333	65,52	61,25	2,62828842
4	1	48,33			45,5						69,95		
	2	42			38,37			41			51,04		
	3	27,67			38,22			41,33			75	63,8825	
	4	45	40,75	4,54759827	30,73	38,205	3,01551682	39,5	40,61	0,56311633	59,54		5,35568604
5	1	48,67			41			35,33			60,16		
	2	40,67			37,64			41,33			67,78		
	3	39			40,83			36,33			70,48		
	4	38,67			39,46			38			63,75		
	5	43,33	42,068	1,84516232	32,91	38,368	1,49166149	39,67	38,132	1,08877179	63,55	65,144	1,79924595
6	1	38,67			34,8			39			58,24		
	2	34			37,91			45,33			64,93		
	3	37			35,62			42,67			65,59		
	4	39			39,33			34,5			63,93		
	5		37,1675	1,14297401	45,65	38,662	1,9237032	34,33	39,166	2,1847073	55,09	61,556	2,07482433

2 lentelė. Antrosios žiurkių jauniklių kartos hipokampo CA1 ir CA3 regionų morfologiniai duomenys, vidurkių ir standartinės paklaidos (SEM) skaičiavimai

Group no.	Individ. No	CA1 density	CA1 den mea	SEM	CA1 Thickness	CA1 thick mea	SEM	CA3 density	CA3 den mea	SEM	CA3 Thickness	A3 thick mea	SEM
1	1	40			54,615								
	2	45			55,899			61			84,985		
	3	43			62,909			49			86,152		
	4	40			54,022			36			90,082		
	5	42			57,13			35			96,132		
	6	44	42,3333333	0,84327404	58,229	57,134	1,31788715	43	44,8	4,77912126	90,708	89,6118	1,96612874
2	1	49,33			53,589			34,66			66,167		
	2	48,33			54,062			40			64,01		
	3	49,33			58,257			40			67,673		
	4	37,33			47,916			32,66			63,173		
	5	36,33			50,758			31			74,231		
	6	26	41,1083333	3,88464534	56,053	53,4391667	1,50718323	33	35,22	1,58430637	73,397	68,1085	1,91980193
3	1	39,33			49,35			34			68,212		
	2	29,66			56,978			33,66			61,45		
	3	42,66			50,429			29,33			60,99		
	4	34,5			57,905			32			64,214		
	5	39,33	37,096	2,2690628	49,88	52,9084	1,86424914	32,33	32,264	0,82598184	63,589	63,691	1,28531817
4	1	23,33			39,361			29,66			59,607		
	2	30,66			40,338			31,66			74,659		
	3	36,5			50,7765			27,5			61,503		
	3	30			51,923			20,33			61,303		
	5	32			54,763			25			55,765		
	6	34,66	31,1916667	1,86520493	45,087	47,0414167	2,61500728	22	26,025	1,79653695	49,273	60,3516667	3,42178942
5	1	26,66			41,743			26,5			51,832		
	2	31,5			37,286			29			55,832		
	3	26,33			49,102			34,66			55,905		
	4	27			29,392			25			51,157		
	5	24	27,098	1,21996885	32,958	38,0962	3,44417918	28,5	28,732	1,64585054		53,6815	1,27024778
6	1	34			49,053			25			53,935		
	2	22,5			60,4805								
	3	43,33			55,21566			28					
	4	29,33			36,996			27,33			56,678		
	5	28,5	31,532	3,47061003	52,367	50,822432	3,93233729	29,66	27,4975	0,96585347	53,668	54,7603333	0,96192625