

WPLYW BISFENOLU A I SKOJARZONEGO DZIAŁANIA BISFENOLU A I PROMIENIOWANIA X NA KOMÓRKI SOMATYCZNE SZPIKU KOSTNEGO I WĄTROBY MYSZY

THE INFLUENCE OF BISPHENOL A AND OF COMBINED EXPOSURE TO X-RAYS AND BISPHENOL A TO SOMATIC CELLS OF THE BONE MARROW AND LIVER OF MICE

Aneta Gajowik, Joanna Radzikowska, Małgorzata Dobrzyńska

Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

Słowa kluczowe: bisfenol A, promieniowanie X, test kometowy, skojarzone działanie

Key words: bisphenol A, X-ray, comet assay, combined exposure

STRESZCZENIE

Celem pracy było zbadanie wpływu bisfenolu A (BPA) i skojarzonego działania promieniowania X i BPA na komórki somatyczne szpiku kostnego i wątroby myszy. Samce myszy szczepu Pzh: Sfis przez 8 tygodni napromieniano dawką 0,05 Gy lub podawano im bisfenol A (5 mg/kg mc, 10 mg/kg mc, 20 mg/kg mc) albo poddawano skojarzonemu działaniu obu czynników (0,05 Gy + 5 mg/kg BPA). Próby pobierano po 24h, 1, 4 i 8 tygodniach po zakończeniu ekspozycji. Niniejsze badania wykazały, że BPA może indukować, mierzone testem kometowym, uszkodzenia DNA w limfocytach szpiku kostnego. Natomiast nie stwierdzono zmian w DNA w komórkach somatycznych wątroby. Po zastosowaniu obu czynników jednocześnie zaobserwowano w obu narządach większą migrację DNA niż po podaniu samego bisfenolu A. Prawdopodobnie promieniowanie X potęguje genotoksyczność BPA.

ABSTRACT

The aim of study was to estimate the effects of bisphenol A (BPA) and combined exposure to X-rays and BPA to somatic cells of the bone marrow and liver of mice. Male mice Pzh: Sfis were irradiated with 0.05 Gy or treated with BPA (5 mg/kg mc, 10 mg/kg mc, 20 mg/kg mc) or exposed to a combination of both (0.05 Gy + 5 mg/kg BPA) for 8 weeks. Samples were taken at 24h, 1, 4 and 8 weeks after the end of exposure. Our study showed, that BPA can induce, measured by Comet assay, DNA damage in lymphocytes of the bone marrow. The induction of DNA damage in somatic cells of the liver was not detected. After combined exposure to both agents a greater migration of DNA in cells of both organs than after the exposure to bisphenol A alone was observed. Probably the X-rays intensify the genotoxicity of BPA.

WSTĘP

Bisfenol A (BPA, dian, 2,2-bis(*p*-hydroksyfenylo)propan), jest organicznym związkiem chemicznym z grupy fenoli. Stanowi on bardzo popularny surowiec do produkcji poliwęglanu, przezroczystego i sztywnego plastiku oraz żywic epoksydowych. Można go zatem odnaleźć m. in. w wysokojakościowych wyrobach z przezroczystych tworzyw sztucznych, w wewnętrznych powłokach puszek do napojów i żywności, cy-sternach do przechowywania wina, mleka lub wody, w rurach wodociągowych, butelkach dla niemowląt,

materiałach do wypełnień dentystycznych, soczewkach czy plastrach opatrunkowych [22].

Bisfenol A budzi dziś szczególne zainteresowanie, gdyż należy on do grupy tzw. ksenoestrogenów czyli związków o działaniu słabych estrogenów [1, 35]. W związku z tym może on łączyć się z receptorami estrogenowymi odpowiedzialnymi za wiązanie naturalnego hormonu. Może to w konsekwencji prowadzić do zaburzenia metabolizmu organizmu [6].

Niewielkie ilości BPA mogą być uwalniane z tworzyw sztucznych z poliwęglanu lub powłok wykonanych z żywicy wchodzących w skład opakowań

Adres do korespondencji: Aneta Gajowik, Zakład Ochrony Radiologicznej Radiobiologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. 22 54 21 253, fax 22 54 21 309, e-mail: agajowik@pzh.gov.pl

artykułów spożywczych i przedostawać się do pokarmów i napojów. Może to nastąpić w wyniku uszkodzenia tworzywa sztucznego lub powłoki wykonanej z żywicy, jak również podczas dekompozycji wyrobu zawierającego BPA pod wpływem działania wysokiej temperatury [22].

Na podstawie badań na myszach i szczurach laboratoryjnych wykazano, że BPA może powodować powstawanie takich zmian jak: nowotwory, przerost prostaty oraz gruczołu piersiowego, wady rozwojowe cewki moczowej, zmniejszenie produkcji nasienia, wcześniejsze dojrzewanie płciowe samic, cysty jajników, włókniaki macicy, wzrost masy ciała oraz nadmierną aktywność psychoruchową [23, 34]. Na poziomie komórkowym BPA może wywoływać efekty teratogenne, kancerogenne i mutagenne, a także zaburzać proces rozdzielania chromosomów podczas mejozy [28].

Promieniowanie jonizujące z kolei jest stale obecne w środowisku człowieka. Jego naturalnym źródłem w przyrodzie są wszechobecne radioizotopy różnych pierwiastków oraz promieniowanie kosmiczne. Promieniowanie jonizujące jest pochłaniane przez żywą tkankę, w wyniku czego może dochodzić do wzbudzenia atomów (w wyniku przejścia jednego z elektronów na wyższy poziom energetyczny) lub jonizacji (tj. oderwania elektronu od atomu lub cząsteczki), a w konsekwencji do zapoczątkowania szeregu reakcji biologicznych w komórce, takich jak radioliza wody czy uszkodzenie łańcucha DNA (np. rozerwanie nici DNA, mutacje punktowe, aberracje chromosomowe). Powstałe mutacje mogą powodować śmierć komórki lub zaburzenie jej funkcji, co może być bezpośrednią przyczyną wystąpienia zmian nowotworowych [12].

Wpływ promieniowania jonizującego na żywą tkankę zależy od wielkości i mocy dawki oraz od swoistej wrażliwości eksponowanych komórek, która jest tym większa im większa jest ich aktywność proliferacyjna i im mniejsze jest zróżnicowanie tkanki. Do szczególnie promieniowrażliwych zalicza się więc szpik kostny i pozostałą część układu krwiotwórczego, które u dorosłego człowieka uszkadza już dawka około 0,5 Gy, a także soczewki oczu (2-5 Gy) i gonady (0,15-3,5 Gy). Pozostałe narządy i tkanki człowieka są znacznie bardziej odporne na działanie promieniowania jonizującego, np. wątroba nie wykazuje uszkodzenia nawet po dawce 40 Gy [12].

Niewiele jeszcze wiadomo na temat wpływu skojarzonego działania promieniowania X i bisfenolu A, dlatego też celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu tego związku oraz skojarzonego działania promieniowania X i bisfenolu A na indukcję pęknięć nici DNA w limfocytach szpiku kostnego i wątroby myszy.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczenia wykorzystano 8-tygodniowe samce myszy pochodzące z niewsobnego stada Pzh:S-fis. Zwierzęta w czasie trwania badań przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności z automatycznie regulowanym dobowym cyklem świetlnym (12h ciemności / 12h światło). Samce narażano na promieniowanie X lub/i podawano im bisfenol A rozpuszczony w niewielkiej ilości 70% alkoholu etylowego, a następnie rozcieńczony do odpowiedniej dawki w wodzie do picia. Zwierzęta poddawano działaniu badanych czynników przez okres 8 tygodni.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie. Jako źródło promieniowania wykorzystywano terapeutyczny aparat rentgenowski THX-250 firmy Medicor (parametry: 170kV, 20mA, filtracja dodatkowa 0,5 mm Cu, warstwa połówkowa 0,8 mm Cu). Moc dawki wynosiła 0,20 Gy/min na całe ciało. Badana dawka promieniowania X wynosiła 0,05 Gy, a dawki bisfenolu A po 5 mg/kg mc, 10 mg/kg mc i 20 mg/kg mc. W przypadku skojarzonego działania zastosowano dawki 0,05 Gy + 5 mg/kg mc. Grupę kontrolną stanowiły myszy nienapromieniane, którym nie podawano bisfenolu A.

Myszy zabijane były po upływie 24h, 1, 4 i 8 tygodni od ostatniego napromieniania lub/i podawania BPA. W celu przeprowadzenia testu kometowego, zgodnie z metodyką opisaną wcześniej [2, 32], szpik kostny pobrany z kości udowej i wątrobę zawieszano w 1,5 ml RMPi medium. Wątrobę dokładnie rozdrabniano przy użyciu nożyczek i filtrowano. Po dokładnym wymieszaniu, z powstałej zawiesiny komórek każdego narządu pobierano po 10 μ l i mieszano z 75 μ l 0,5% agarozy o niskim punkcie topnienia (LMPA), a następnie наносzono na szkiełko mikroskopowe pokryte uprzednio agarozą o normalnym punkcie topnienia (NMPA). Preparaty przykrywano szkiełkami nakrywkowymi i umieszczano w lodówce na 5 minut w celu zestalenia się agarozy. Po usunięciu szkiełek nakrywkowych na preparaty наносzono jeszcze jedną warstwę 0,5% agarozy i powtórnie zestalano w temperaturze 4°C. Preparaty umieszczano następnie w buforze lizującym na ok. 20h w temperaturze 4°C. Po wyjęciu preparatów z buforu lizującego i osuszeniu, komórki inkubowano w buforze do elektroforezy w środowisku zasadowym (pH>13) przez 20 minut. Następnie przeprowadzano elektroforezę niskonapięciową (24 V, 300 mA) w obecności detergentu. Po zneutralizowaniu komórki barwiono bromkiem etydy. Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Rejestrowano komórki o różnym stopniu uszkodzenia DNA. Za pomocą programu komputerowego CASP oceniano 100 komórek na mysz [19]. Jako parametr charakteryzujący

uszkodzenia DNA wybrano moment ogonowy, który odzwierciedla zarówno zawartość procentową DNA w ogonie komety, jak i długość ogona komety (migrację DNA). Oceny statystycznej dokonano za pomocą testu *t-Studenta*, wykorzystując do tego program komputerowy STATISTICA 9.

WYNIKI

Wyniki przeprowadzonego testu kometowego na komórkach somatycznych limfocytów szpiku kostnego i wątroby badanych myszy przedstawiono w Tabeli 1.

Bisfenol A, w stosunku do kontroli, powodował nieznaczny wzrost lub nieznaczne zmniejszenie wartości momentów ogonowych komet w komórkach wątroby po 24 godzinach, po 1 tygodniu, po 4 tygodniach oraz po 8 tygodniach od zakończenia ekspozycji. Nie wykazano jednak istotnych różnic pomiędzy efektami działania poszczególnych dawek.

Nieznacznie genotoksyczny wpływ bisfenolu A na limfocyty szpiku kostnego zanotowano po upływie 1 tygodnia od ekspozycji na wszystkie dawki badanego związku, a także po 24 godzinach od ostatniego podania BPA w dawce 10 mg/kg mc oraz po 8 tygodniach w dawce 5 mg/kg mc BPA.

Zarówno w przypadku komórek wątroby jak i szpiku kostnego wyniki nie były jednak istotne statystycznie.

Znacznie podwyższone wartości momentów ogonowych komet w komórkach somatycznych wątroby stwierdzono po ekspozycji na promieniowanie w dawce 0,05 Gy po upływie 1, 4 i 8 tygodni od zakończenia narażenia. Statystycznie istotny wynik zanotowano tylko po upływie 4 tygodni od ostatniej ekspozycji ($p = 0,0029$).

Statystycznie istotne podwyższenie wartości momentu ogonowego ($p = 0,044$) zanotowano także po zastosowaniu samego promieniowania X w dawce 0,05 Gy na limfocyty szpiku kostnego po 8 tygodniach od zakończenia narażenia.

Zastosowanie skojarzonego działania bisfenolu A i promieniowania X w dawce 0,05 Gy + 5 mg/kg mc BPA powodowało wzrost wartości momentów ogonowych komet w stosunku do kontroli oraz co najmniej jednego z badanych czynników w obu narządach i w różnych odstępach czasu od zakończenia ekspozycji. Największą migrację DNA odnotowano po 24 godzinach od ostatniej ekspozycji na skojarzone działanie obu czynników w komórkach somatycznych wątroby. Jednak wynik, chociaż prawie czterokrotnie wyższy od kontrolnego, oraz pięciokrotnie wyższy od obserwowanego po zastosowaniu samego promieniowania okazał się nie istotny statystycznie, co mogło być spowodowane dużą rozbieżnością wartości momentów ogonowych komet w grupie badanych myszy. Również w pozostałych przypadkach można było zaobserwować

Tabela 1. Wpływ BPA i promieniowania X na indukcję uszkodzeń DNA w komórkach wątroby i limfocytach szpiku kostnego myszy
Effects of BPA and X-rays exposure on the induction of DNA damage in mouse's cells of liver and lymphocytes of bone marrow

Czas	Dawka	Moment ogonowy \pm SD wątroba	Moment ogonowy \pm SD szpik kostny
24 h po ekspozycji	kontrola	0,555 \pm 0,24	3,201 \pm 2,43
	5 mg/kg bw BPA	0,683 \pm 0,35	4,736 \pm 1,32
	10 mg/kg bw BPA	0,585 \pm 0,47	5,570 \pm 1,58
	20 mg/kg bw BPA	0,665 \pm 0,26	3,416 \pm 2,45
	0,05 Gy	0,406 \pm 0,26	4,658 \pm 3,04
	0,05 Gy + 5 mg/kg BPA	2,098 \pm 3,26	5,020 \pm 1,59
1 tydzień po ekspozycji	kontrola	0,680 \pm 0,56	4,200 \pm 1,53
	5 mg/kg bw BPA	0,691 \pm 0,44	5,918 \pm 4,02
	10 mg/kg bw BPA	0,717 \pm 0,55	5,121 \pm 3,59
	20 mg/kg bw BPA	0,713 \pm 0,35	5,246 \pm 3,27
	0,05 Gy	0,986 \pm 0,77	4,381 \pm 2,70
	0,05 Gy + 5 mg/kg BPA	1,113 \pm 0,89	9,849 \pm 13,91
4 tygodnie po ekspozycji	kontrola	0,450 \pm 0,21	4,233 \pm 2,81
	5 mg/kg bw BPA	0,339 \pm 0,24	4,695 \pm 2,44
	10 mg/kg bw BPA	0,507 \pm 0,50	4,354 \pm 2,05
	20 mg/kg bw BPA	0,577 \pm 0,54	3,965 \pm 2,71
	0,05 Gy	1,335 \pm 0,49*	5,502 \pm 4,16
	0,05 Gy + 5 mg/kg BPA	1,244 \pm 1,05	5,874 \pm 1,91
8 tygodni po ekspozycji	kontrola	0,431 \pm 0,37	4,288 \pm 1,49
	5 mg/kg bw BPA	0,412 \pm 0,39	5,193 \pm 4,83
	10 mg/kg bw BPA	0,288 \pm 0,29	4,466 \pm 4,22
	20 mg/kg bw BPA	0,412 \pm 0,27	4,063 \pm 2,24
	0,05 Gy	1,343 \pm 1,99	7,863 \pm 3,11*
	0,05 Gy + 5 mg/kg BPA	0,704 \pm 0,72	6,535 \pm 3,58

* $p < 0,05$ w porównaniu do odpowiedniej kontroli, test *t-Studenta*

znaczne uszkodzenia nici DNA, zwłaszcza po 1 tygodniu od narażenia w komórkach obu narządów i po 4 tygodniach w komórkach wątroby. Tutaj także wyniki okazały się nieistotne statystycznie, co również można tłumaczyć dużymi różnicami migracji DNA pomiędzy osobnikami we wspomnianych grupach.

DYSKUSJA

W licznych badaniach wykazano, że bisfenol A ma szerokie działanie biologiczne dotyczące wielu organów i układów organizmu ludzkiego. Stwierdzono na przykład, że przyczynia się on do formowania wielojądrystych hepatocytów w wątrobach myszy. Powoduje także degenerację kanalików nerkowych u myszy i szczurów [27]. Istnieją również doniesienia, że bisfenol A może być absorbowany przez skórę, powodując zmiany nowotworowe w wątrobie, nerkach i innych organach ludzkich [30]. BPA indukuje także powstawanie wolnych rodników w najądrzach szczurów [8].

Działanie estrogenne różnych czynników, m. in. bisfenolu A, wykazali *Wada* i wsp. [36]. Szkodliwe działanie tego ksenoestrogenu zależało od jego stężenia. Zostało to później potwierdzone w badaniach *Jakubaszko* [15].

Z kolei niektórzy badacze podważają szkodliwy wpływ związków pochodnych BPA [16]. Wykazano jednak, że metakrylan bisfenolu A (Bis-GMA), który można otrzymać w wyniku reakcji metakrylanu glicydyli (GMA) i bisfenolu A, powodował u myszy, którym podawano go w dawce 100 g/kg masy ciała lub niższej przez 28 dni, zwiększoną resorpcję płodów [20]. W innych badaniach z kolei stwierdzono, że Bis-GMA hamował syntezę DNA, co potwierdza jego zdolności do wywoływania działań genotoksycznych [31]. Indukcję uszkodzeń DNA, mierzonych za pomocą testu kometowego, obserwowano w następstwie działania Bis-GMA w stężeniu 100 μM [18]. Prawdopodobnie metakrylan bisfenolu A może wywoływać uszkodzenia DNA, jednak bez wpływu na cykl komórkowy, co sugeruje, że Bis-GMA nie zaburza mechanizmów naprawy DNA.

Bisfenol A może być biodegradowany lub metabolizowany przez organizm [17], co nie oznacza, że jego metabolity nie mają właściwości ksenoestrogennych lub genotoksycznych. *Atkinson* i wsp. [4, 5] odkryli, że produkt rozpadu BPA, *o*-benzochinon bisfenolu A, może modyfikować DNA, a przez to działać genotoksycznie na komórki wątroby. Ponadto *Yoshihara* i wsp. [37] sugerują, że ksenoestrogenne właściwości BPA wzrastają (od dwóch do pięciu razy) w wyniku jego biodegradacji w wątrobie szczurów. Z kolei *Morrissey* i wsp. [24] zanotowali wzrost relatywnej masy wątroby u wszystkich samic myszy, którym podawano bisfenol

A, co może sugerować, że BPA ma właściwości hepatotoksyczne.

Genotoksyczność BPA w stosunku do komórek chłoniaka myszy przy użyciu testu kometowego zaobserwowali *Lee* i wsp. [21]. Uznali jednak, że efekt był fałszywie pozytywny z powodu śmierci komórek po zaaplikowaniu im BPA w dawce 4×10^{-6} - 4×10^{-4} M. Jednak w badaniach *Iso* i wsp. bisfenol A w dawce 10^{-6} - 10^{-4} M okazał się genotoksyczny w komórkach MCF-7 (linia komórkowa ludzkiego gruczołakoraka piersi), ale nie cytotoksyczny.

Niniejsze badania wykazały, że bisfenol A może indukować uszkodzenia DNA w komórkach szpiku kostnego myszy po 8-tygodniowym podawaniu go w wodzie do picia. Podobnie *Naik* i wsp. [26] zanotowali potencjalnie genotoksyczny wpływ BPA na limfocyty szpiku kostnego. Z kolei, w przeciwieństwie do wyników otrzymanych przez *Izzotti* i wsp. [14], nie stwierdziliśmy znaczących uszkodzeń DNA w komórkach somatycznych wątroby.

Indukcyjny wpływ promieniowania X na uszkodzenia DNA został wykazany za pomocą testu kometowego w licznych publikacjach. Między innymi *Singh* i wsp. [32] zaobserwowali zwiększoną migrację DNA limfocytów ludzkich napromienionych dawką 25 cGy promieniowania X. Z kolei *Plappert* i wsp. [29] wykazali uszkodzenia DNA w limfocytach ludzkich napromienianych dawkami od 0,05 Gy do 1 Gy promieniowania X. Migracja DNA była tym większa, im większa była dawka mutagenu. Zwiększoną częstość pęknięć nici DNA wykazano także w limfocytach myszy po rocznym napromienianiu całkowitą dawką 20 cGy [33]. Stwierdzono również znaczny wpływ promieniowania jonizującego na migrację DNA w komórkach wątroby myszy [7], które były napromieniane jednorazowo dawkami od 0,5 Gy do 1 Gy promieniowania γ . Również otrzymane przez nas wyniki wskazują na wpływ małych dawek promieniowania X na indukcję pęknięć nici DNA w komórkach somatycznych wątroby, a także w szpiku kostnym myszy.

Skojarzone działanie dwóch mutagenów może powodować zwiększenie ich genotoksyczności [3, 9, 11]. W niniejszej pracy po zastosowaniu obu czynników jednocześnie zaobserwowano w większości przypadków większą migrację DNA niż po podaniu samego bisfenolu A. Częstość pęknięć nici DNA była również większa w stosunku do kontroli po działaniu samego promieniowania X. Na tej podstawie można twierdzić, że bisfenol A jest słabszym mutagenem niż promieniowanie X, które dodatkowo potęguje genotoksyczność ksenoestrogenu. Podobne działanie zaobserwowano w pracy dotyczącej częstości występowania mikrojąder w retikulocytach samców myszy narażonych na bisfenol A oraz na skojarzone działanie promieniowania X i BPA [10]. Skojarzone działanie promieniowania X i BPA

w mniejszych dawkach powodowało indukcję mikrojąder z częstością większą niż po zastosowaniu każdego z czynników osobno. Niestety brak publikacji innych autorów na temat skojarzonego działania promieniowania X i bisfenolu A uniemożliwia porównanie wyników własnych z innymi. Badania o podobnym profilu prowadzili *Mutou* i wsp. [25], którzy badali wpływ bisfenolu A i jego chlorowcopochodnych form (CIBPAs), takich jak: 3-chlorobisfenol A, 3,3'-dichlorobisfenol A oraz 3,3',5-trichlorobisfenol A, na komórki linii białaczkowej limfocytów T (linia komórkowa Jurkat). BPA i CIBPAs poddawane były najpierw napromienianiu za pomocą UV o różnej długości fali. Badacze wykazali, że CIBPAs, eksponowane wcześniej na działanie UVB lub UVC, indukowały z wysoką częstością śmierć komórek, które ulegały apoptozie na skutek uszkodzeń DNA. Nie stwierdzono jednak dużego cytotoksycznego wpływu samego bisfenolu A poddanego działaniu UV lub CIBPAs nie poddanych napromienieniu.

WNIOSKI

W badaniach nie wykazano wyraźnego genotoksycznego wpływu samego bisfenolu A na komórki somatyczne wątroby i szpiku kostnego myszy, jednak skojarzone działanie tego ksenoestrogenu i promieniowania jonizującego powoduje znaczny wzrost częstości pęknięć nici DNA w stosunku do kontroli.

PIŚMIENNICTWO

- Anas M.K., Guillemette C., Ayotte P., Pereg D., Giguere F., Bailey J.L.*: In utero and lactational exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture disrupts reproductive development and function in male rats. *Biol. Reprod.* 2005, 73, 414-426.
- Anderson D., Yu T.W., Phillips B.J., Schmezer P.*: The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated damage in human lymphocytes in Comet assay. *Mutat. Res.* 1994, 307, 261-271.
- Astill B., Barber E., Lington A., Moran E., Mulholland A., Robinson E., Scheider B.*: Chemical industry voluntary test program for phthalate esters: health effects studies. *Environ. Health Perspect.* 1986, 65, 329-336.
- Atkinson A., Roy D.*: In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 210, 424-433.
- Atkinson A., Roy D.*: In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ. Mol. Mutagen.* 1995, 26, 60-66.
- Bolger R., Wiese T.E., Ervin K., Nestich S., Checovich W.*: Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ. Health Perspect.* 1998, 106(9), 551-557.
- Carrera P., de Miguel M., Lopez J., de la Torre C., Navarrete M.H.*: In vivo response of mouse liver to γ -radiation assessed by the comet assay. *Mutat. Res.* 1998, 413, 23-31.
- Chitra K.C., Latchoumycandane C., Mathur P.P.*: Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 2003, 185, 119-127.
- Dobrzyńska M.M., Gajewski A.K.*: Induction of micronuclei in bone marrow and sperm head abnormalities after combined exposure of mice to low doses of X-rays and acrylamide. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2000, 20, 133-140.
- Dobrzyńska M.M., Radzikowska J.*: Częstość występowania mikrojąder w retikulocytach samców myszy narażanych na bisfenol A oraz na skojarzone działanie promieniowania X i bisfenolu A. *Roczn. PZH* 2010, 61, Nr 2, 129-133.
- Dobrzyńska M.M.*: Micronucleus formation induced by combination of low doses of X-rays and antineoplastic drugs in bone marrow of male mice. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2000, 20, 321-327.
- Gorczyca R., Wiśniewski K., Pachocki K., Różycki Z.*: Ochrona radiologiczna w pracowni rentgenowskiej. Wyd. „EX-POLON”, Warszawa, 1997.
- Iso T., Watanabe T., Iwamoto T., Shimamoto A., Furuichi Y.*: DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29 (2), 206-210.
- Izzotti A., Kanitz S., D'Agostini F., Camoirano A., De Flora S.*: Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA *in vitro* and in liver and mammary tissue of mice. *Mutat. Res.* 2009, 679, 28-32.
- Jakubaszko E.*: Substancje o działaniu estrogennym uwalniane w środowisku jamy ustnej z materiałów złożonych. *Dent. Med. Probl.* 2002, 39, 285-288.
- Jodkowska E., Małkiewicz K.*: Potencjał cytotoksyczny stomatologicznych materiałów wypełnieniowych i nadtlenu wodoru. Wyd. Czelej, Lublin 2008.
- Kang J.H., Katayama Y., Kondo F.*: Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology* 2006, 217, 81-90.
- Kleinsasser N.H., Schmid K., Sassen A., Harreus U.A., Staudenmaier R., Folwaczny M., Hickel R., Kehe K., Reichl F.X.*: Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J. Dent.* 2004, 32, 229-234.
- Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kruszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wójcik A.*: A cross-platform public domain PC image-analysis program for Comet assay. *Mutat. Res.* 2003, 534, 15-20.
- Kostoryz E.L., Wetmore L.A., Brockmann W.G., Yourtee D.M., Eick J.D.*: Genotoxicity assessment of oxirane-based dental monomers in mammalian cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2004, 68, 660-667.
- Lee M., Kwon J., Chung M.K.*: Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutat. Res.* 2003, 541, 9-19.

22. Markey C.M., Rubin B.S., Soto A.M., Sonnenschein C.: Endocrine disruptors from wingspread to environmental developmental biology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003, 83, 235-244.
23. Mendes A.J.J.: The endocrine disruptors: a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40, 781-788.
24. Morrissey R.E., George J.D., Price C.J., Tyl R.W., Marr M.C., Kimmel C.A.: The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 1987, 8, 571-582.
25. Mutou Y., Ibuki Y., Terao Y., Kojima S., Goto R.: Induction of apoptosis by UV-irradiated chlorinated bisphenol A in Jurkat cells. *Toxicol. In Vitro* 2008, 22, 864-872.
26. Naik P., Vijayalaxmi K.K.: Cytogenetic evaluation for genotoxicity of Bisphenol A in bone marrow cells of Swiss albino mice. *Mutat. Res.* 2009, 676, 106-112.
27. National Toxicology Program.: Carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rats and B6C3F mice. National Toxicology Program Technical Report 1982, 215, 1-116.
28. Pacchierotti F., Ranaldi R., Eichenlaub – Ritter U., Attia S., Adler I.D.: Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. *Mutat Res.* 2008, 651, 64-70.
29. Plappert U., Raddatz K., Roth S., Fliedner T.M.: DNA-damage detection in man after radiation exposure – the comet assay – its possible application for human biomonitoring. *Stem Cells* 1995, 13, Suppl 1, 215-222.
30. Sax N.I.: Toxicology of phenols. *Dangerous Properties of Industrial Chemicals.* Von Nostrand Reinhold, New York, 1985, 458-1008.
31. Schweikl H., Hiller K.A., Eckhardt A., Bolay C., Spagnuolo G., Stempf T., Schmalz G.: Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 2008, 29, 1377-1387.
32. Singh N.P., MacCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, 175, 184-191.
33. Sypin V.D., Osipov A.N., Elakov A.L., Pomarantseva M.D., Zaichkina S.I., Rozanova O.M., Ramaiia L.K., Klokov D.I., Puchkov P.V., Akhmadieva A.K., Apikaeva G.F., Miazin A.E., Sycheva L.P., Kiiatkina M.A.: Estimation of genetic effects of chronic exposure to low-dose rate gamma-radiation by cytogenetic methods and DNA-comet assay. *Radiat. Biol. Radioecol.* 2003, 43, 2, 156-160.
34. Talsness Ch.E., Andrade A.J.M., Kuriyama S.N., Taylor J.A., vom Saal F.S.: Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2009, 364(1526), 2079-2096.
35. Toyamay I., Suzuki-Toyota F., Maekawa M., Ito C., Toshimori K.: Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Arch. Histol. Cytol.* 2004, 67, 373-381.
36. Wada H., Turami H., Imazato S., Narimatsu M., Ebisu S.: *In vitro* estrogenicity of resin composites. *J. Dent. Res.* 2004, 83, 222-226.
37. Yoshihara S., Makishima M., Suzuki N., Ohta S.: Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicol. Sci.* 2001, 62, 221-227.

Otrzymano: 20.06.2011

Zaakceptowano do druku: 29.08.2011