

# INDUKCJA MIKROJĄDER W KRWI OBWODOWEJ I SZPIKU KOSTNYM SAMCÓW MYSZY NARAŻANYCH SUBCHRONICZNIE NA DZIAŁANIE PROMIENIOWANIA X I BISFENOLU A

## INDUCTION OF MICRONUCLEI IN PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW RETICULOCYTES OF MALE MICE AFTER SUBCHRONIC EXPOSURE TO X-RAYS AND BISPHENOL A

Joanna Radzikowska, Aneta Gajowik, Małgorzata Dobrzyńska

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

**Słowa kluczowe:** *bisfenol A, promieniowanie X, skojarzone działanie, mikrojądra*  
**Key words:** *bisphenol A, X-ray, combined exposure, micronuclei*

### STRESZCZENIE

**Wprowadzenie.** Promieniowanie jonizujące i ksenoestrogeny występują powszechnie w środowisku człowieka. Bisfenol A (BPA) używany jest podczas produkcji poliwęglanów oraz żywic epoksydowych, stanowiących składnik m.in. soczewek do okularów, wypełnień dentystrycznych, płyt CD, szyb okiennych, pokryw instrumentów, opakowań oraz pojemników na napoje, ale także wyrobów dla dzieci, butelek, talerzyków, kubeczków oraz elementów smoczków. Żywice epoksydowe wchodzi też w skład powłok wewnętrznych pojemników do przechowywania żywności. Promieniowanie jonizujące wykorzystywane jest m.in. w diagnostyce rentgenowskiej, terapii chorób nowotworowych, w przemyśle, nauce.

**Cel badań.** Celem badań było określenie wpływu bisfenolu A, promieniowania X oraz skojarzonego działania obu czynników na indukcję mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego myszy laboratoryjnych.

**Material i metoda.** Doświadczenie prowadzono na samcach myszy Pzh: Sfis przez 8 tygodni. Zwierzętom podawano bisfenol A w wodzie do picia (5 mg/kg mc, 10 mg/kg mc, 20 mg/kg mc), napromieniano dawką 0,05 Gy promieniowania X albo poddawano skojarzonemu działaniu obu tych czynników (0,05 Gy + 5 mg/kg mc BPA). Krew z żyły ogonowej pobierano po upływie 1, 4 i 8 tygodni od rozpoczęcia ekspozycji, a szpik kostny tylko po zakończeniu narażania. Oceniano częstość występowania mikrojąder w retikulocytach.

**Wyniki.** Zarówno bisfenol A jak i promieniowanie jonizujące stymulowały indukcję mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego. W następstwie napromieniania zwierząt promieniowaniem X indukcja mikrojąder wzrastała, podczas gdy w rezultacie podawania bisfenolu A malała proporcjonalnie do czasu trwania ekspozycji. Skojarzone działanie promieniowania jonizującego i BPA indukowało występowanie mikrojąder ze znacznie wyższą częstością w porównaniu do efektów działania samego BPA. Częstość występowania mikrojąder w krwi obwodowej zwiększała się w miarę upływu czasu od rozpoczęcia doświadczenia. W szpiku kostnym we wszystkich grupach obserwowano znacznie niższą liczebność retikulocytów z mikrojądrami niż w krwi obwodowej.

**Wnioski.** Subchroniczne narażenie na bisfenol A prowadzi do zmniejszenia wrażliwości materiału genetycznego retikulocytów na indukcję uszkodzeń. Promieniowanie X jest prawdopodobnie czynnikiem decydującym o uszkodzeniu DNA w następstwie skojarzonego działania.

### ABSTRACT

**Background.** Ionizing radiation and xenoestrogens are widely present in the human environment. Bisphenol A (BPA) is used to manufacture polycarbonate plastics, epoxy and polyester resins. BPA is present in a great variety of products including: baby bottles, compact disks, thermal paper, safety helmets, bullet resistant laminate, plastic windows, car parts, adhesives, protective coatings, powder paints, polycarbonate bottles and containers, the sheathing of electrical and electronic parts, dental fillings. Food and beverage cans are protected from rusting and corrosion by the application of epoxy resins as inner

**Adres do korespondencji:** Joanna Radzikowska, Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii,  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24,  
tel. +48 22 542 12 53, fax: +48 22 54 21 309, e-mail: jradzikowska@pzh.gov.pl

coatings. Human activities involving the use of radiation and radioactive materials in industry, agriculture and research cause radiation exposure in addition to natural exposure coming from cosmic rays and naturally occurring radioactive substances.

**Objective.** The aim of the study was to estimate the effects of bisphenol A, X-rays and combined exposure to X-rays and bisphenol A on the induction of micronuclei in the peripheral blood and in bone marrow reticulocytes of laboratory mice.

**Material and method.** Pzh-Sfis male mice were exposed for 8 weeks. Animals were treated with bisphenol A diluted in drinking water (5 mg/kg bw, 10 mg/kg bw, 20 mg/kg bw), irradiated 0.05 Gy of X-rays or exposed to a combination of both (0.05 Gy + 5 mg/kg bw BPA). The samples of peripheral blood were taken at 1, 4 and 8 week following the start of exposure, whereas the bone marrow after the end of experiment, only. The induction of micronuclei in reticulocytes were evaluated by using fluorescence microscope.

**Results.** Bisphenol A as well as ionizing radiation stimulated induction of micronuclei in peripheral blood and bone marrow reticulocytes. After the irradiation the level of micronuclei increased, whereas after exposure to BPA decreased related to time expired from beginning of experiment. Combined exposure of ionizing radiation and bisphenol A induced significantly higher frequency of micronuclei compared to the effect produced by BPA alone. The frequency of micronuclei in peripheral blood reticulocytes increased during the experiment. In all groups, the significantly lower induction of micronuclei in reticulocytes of bone marrow than of peripheral blood were observed. The levels of micronuclei in mice exposed to a combination of X-rays and BPA or to irradiation alone were slightly higher compared to those administered to BPA alone.

**Conclusions.** Bisphenol A induced micronuclei in peripheral blood and bone marrow reticulocytes. Subchronic BPA exposure leads to diminished sensitivity of genetic material of reticulocytes on the induction of damage. X-rays is probably the agent which decided about DNA damage following combined exposure.

## WSTĘP

We współczesnym świecie związki chemiczne oraz czynniki fizyczne występujące w środowisku mogą stanowić zagrożenie dla świata roślin, zwierząt i człowieka. Jedną z grup związków powodujących niekorzystny wpływ na komórki ssaków są substancje wykazujące podobieństwo do estrogenów. Już w latach trzydziestych XX wieku znano substancje środowiskowe, które w swoim działaniu przypominały naturalny estrogen - 17 $\beta$ -estradiol. Związki te określa się jako ksenoestrogeny (*xeno* – obcy), czyli estrogeny pochodzenia zewnętrznego. Substancje o działaniu słabych estrogenów znaleziono zarówno wśród związków wytworzonych przez człowieka, jak i wśród związków naturalnie występujących w przyrodzie [5]. Związki estrogenopodobne mogą wchodzić w skład produktów przemysłowych, komercyjnych oraz medycznych i farmaceutycznych [3, 23]. Substancją tego typu jest bisfenol A (BPA), który po raz pierwszy został otrzymany przez rosyjskiego chemika *Dianina* w 1891 roku jako produkt kondensacji acetonu i dwóch cząsteczek fenolu. Jest związkiem organicznym 10 000 razy mniej aktywnym niż 17 $\beta$ -estradiol i 20 000 razy mniej aktywnym niż syntetyczny hormon dietylostilbestrol (DES), którego przypomina budową [36]. BPA stanowi formę syntetycznego estrogenu, co oznacza, że w organizmie człowieka może łączyć się z receptorami odpowiedzialnymi za wiązanie naturalnego estrogenu. Ksenoestrogen ten znalazł zastosowanie w produkcji poliwęglanów oraz żywic epoksydowych o bardzo szerokim spektrum zastosowania, m.in. w produkcji soczewek do okularów, wypełnień dentystycznych, płyt CD, szyb okiennych, pokryw instrumentów, opakowań oraz pojemników na napoje, ale także wyrobów dla dzieci, butelek, talerzyków, kubeczków oraz elementów smoczków. Żywiec

epoksydowe wchodzą w skład powłok wewnętrznych pojemników do przechowywania żywności. Związek ten używany jest również w przemyśle samochodowym oraz przy wytwarzaniu sprzętu medycznego i wyrobów dla sportowców [21].

Promieniowanie jonizujące wywołuje w organizmie skutki na poziomie molekularnym i komórkowym. Wrażliwość komórek na promieniowanie zależy od wielu czynników, m.in. od fazy cyklu komórkowego, w której się znajdują w momencie ekspozycji. Działanie promieniowania jonizującego na tkanki opiera się na dwóch mechanizmach: bezpośrednim i pośrednim. Oba mechanizmy skutkują zmianami chemicznymi (przerywanie wiązań, depolimeryzacja, polimeryzacja) oraz biochemicznymi (zaburzenia syntezy DNA i RNA, zahamowanie syntezy ATP, inne zmiany enzymatyczne). Powyższe zmiany fizykochemiczne powodują określone efekty biologiczne, zależne od dawki promieniowania. Może to prowadzić do upośledzenia czynności reprodukcyjnych (podziałów) komórki lub wpływać na procesy metaboliczne. Nieprawidłowości w procesie podziałów komórki mogą być spowodowane uszkodzeniem chromosomów, opóźnieniem mitotycznym, przesunięciem w cyklu komórkowym lub mutacjami [16].

Celem badań było określenie 8-tygodniowego wpływu bisfenolu A, promieniowania X oraz skojarzonego działania obu tych czynników na częstość występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego samców myszy.

## MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na 8-tygodniowych samcach myszy laboratoryjnych niekrewniaczego stada

Pzh: Sfis. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu z automatycznie regulowanym cyklem świetlnym, o stałej temperaturze i wilgotności. Samce poddawano działaniu promieniowania X i/lub bisfenolu A rozpuszczonego w niewielkiej ilości 70% etanolu, a następnie rozcieńczonego do odpowiedniej dawki w wodzie do picia. Myszy eksponowano na oba czynniki przez 8 tygodni. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie.

Dawka promieniowania X wynosiła 0,05 Gy. Dawki bisfenolu A wynosiły 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 BPA. Źródłem promieniowania był terapeutyczny aparat rentgenowski THX-250 firmy Medicor. Podczas pracy stosowano natężenie prądu 170 kV, napięcie 20 mA, filtracja dodatkowa 0,5 mm Cu, warstwa połówkowa 0,8 mm Cu. Moc dawki wynosiła 0,20 Gy/min na całe ciało. Po upływie 1, 4 i 8 tygodni od rozpoczęcia ekspozycji myszom pobierano krew z żyły ogonowej. Szpik kostny pobierano tylko po zakończeniu 8-tygodniowego narażania. Od każdego samca pobierano po 10 µl krwi obwodowej z żyły ogonowej, nanoszono na szkiełka mikroskopowe pokryte wodnym roztworem oranżu akrydyny i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. W celu pozyskania szpiku kostnego izolowano kość udową, a kanał szpikowy przepłukiwano surowicą płodową cielęcą. Zawiesinę odwirowywano, po usunięciu nadmiaru supernatantu zawartość próbki dokładnie mieszano. Następnie na szkiełko mikroskopowe pokryte wodnym roztworem oranżu akrydynowego nanoszono po 25 µl otrzymanej zawiesiny komórek i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Oceny indukcji mikrojąder w krwi obwodowej i szpiku kostnym dokonano według metody opisanej przez Hayashi i wsp. [15]. Częstość występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym zliczając po 1000 retikulocytów z każdej myszy i rejestrując równocześnie liczbę komórek z mikrojądrami (MN).

Analizy statystycznej dokonano za pomocą testu *t-Studenta* w programie Statistica 9.

## WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono wyniki dotyczące indukcji mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego samców myszy.

Po 1 tygodniu ekspozycji na bisfenol A częstość występowania mikrojąder wzrastała liniowo w zakresie dawek od 5 do 20 mg/kg mc, a po zastosowaniu najwyższej dawki osiągnęła wartość ponad 2,5-krotnie wyższą niż u samców kontrolnych. Wszystkie wyniki, oprócz uzyskanych po podawaniu 5 mg/kg mc BPA, różniły się statystycznie od kontrolnych. Po 4 tygodniach podawania bisfenolu A największą liczebność retikulocytów z mikrojądrami uzyskano dla dawki 10 mg/kg mc, nieco mniejszą dla dawki 20 mg/kg mc BPA, a najmniejszą ponownie dla dawki 5 mg/kg mc BPA. Wszystkie wyniki były istotne statystycznie oprócz uzyskanych po ekspozycji na BPA w dawce 20 mg/kg mc. Po 8-tygodniowym narażeniu na BPA najwyższą liczebność retikulocytów uzyskano dla dawki 5 mg/kg mc i tylko nieco niższą dla dawki 20 mg/kg mc BPA. Wszystkie wyniki różniły się nieznacznie od siebie i żadna wartość nie różniła się statystycznie od kontrolnej. Dla dawki 5 mg/kg mc BPA obserwowano wzrost indukcji mikrojąder wraz z czasem narażania, natomiast dla dawek 10 mg/kg mc i 20 mg/kg mc obserwowano spadek indukcji mikrojąder w kolejnych tygodniach trwania doświadczenia.

W następstwie napromieniania zwierząt promieniowaniem X indukcja mikrojąder wzrastała wyraźnie i proporcjonalnie do czasu trwania ekspozycji, a po 8 tygodniach osiągnęła największą wartość. Wyniki były istotne statystycznie w stosunku do kontroli. Po 1 tygodniu napromieniania dawką 0,05 Gy odnotowano ponad 2-krotny wzrost częstości występowania MN,

Tabela 1. Częstość występowania mikrojąder w retikulocytach samców myszy w następstwie 1, 4 i 8-tygodniowej ekspozycji na bisfenol A lub/i na promieniowanie jonizujące

Frequency of micronuclei in male mice reticulocytes following 1, 4 and 8-weeks exposure to X-rays or/and bisphenol A

Dawka	MN/1000 retikulocytów w krwi obwodowej ± SD			MN/1000 retikulocytów w szpiku kostnym ± SD
	Po 1 tygodniu	Po 4 tygodniach	Po 8 tygodniach	
Kontrola	5.67±3.33	8.50±1.76	6.50±1.38	2.67±1.03
5 mg BPA	7.80±1.92	9.20±1.30*	9.80±7.26	5.83±2.14*
10 mg BPA	12.80±5.07*	11.00±1.58*	8.20±4.82	4.83±3.13
20 mg BPA	14.50±3.78*	10.00±3.32	9.67±4.32	6.00±4.43
0.05 Gy	13.60±4.04*	18.60±2.07*	22.40±6.02*	7.75±4.35*
0.05 Gy + 5 mg BPA	12.60±12.6*.b	16.00±2.35*.b	17.40±1.95*	7.67±3.79*

\* p<0,05 różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli w teście *t-Studenta*

\*,b p<0,05 różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli i do bisfenolu A w teście *t-Studenta*



a po 8 tygodniach ekspozycji obserwowano w tej grupie ponad 3-krotnie więcej mikrojąder w stosunku do wartości kontrolnej.

Skojarzone działanie promieniowania X i bisfenolu A w krwi obwodowej, również powodowało wzrost częstości występowania mikrojąder wraz z czasem trwania ekspozycji. Częstość ta była większa niż po podawaniu samego BPA, ale mniejsza w porównaniu z efektami działania samego promieniowania X przez cały okres trwania doświadczenia.

W retikulocytach szpiku kostnego indukcja mikrojąder po ekspozycji na BPA była największa dla dawki 20 mg/kg mc, ale tylko nieznacznie mniejsza dla dawki 5 mg/kg mc BPA. W obu przypadkach wartości były ponad 2-krotnie wyższe w porównaniu do kontrolnych. Po podawaniu myszom bisfenolu A w dawce 10 mg/kg mc obserwowano najmniejszą indukcję mikrojąder. Tylko wynik uzyskany po ekspozycji na 5 mg/kg mc BPA różnił się statystycznie w stosunku do kontroli. Po narażeniu na promieniowanie jonizujące obserwowano większą ilość mikrojąder niż po ekspozycji na sam bisfenol A. Podobne, w następstwie 8-tygodniowej ekspozycji na oba czynniki, liczebność mikrojąder była wyższa niż po zastosowaniu samego BPA. Po samym napromienianiu zwierząt oraz po ekspozycji na skojarzone działanie promieniowania X i BPA uzyskano wyniki nieznacznie różniące się od siebie, ale różniące się statystycznie od kontroli.

## DYSKUSJA

Ze względu na szerokie spektrum umiejscowienia receptorów estrogenowych, ksenoestrogeny są w stanie wywoływać działania niepożądane niemal we wszystkich tkankach i narządach [5]. Związki o aktywności estrogennej mogą zaburzać prawidłowy rozdział chromosomów podczas mejozy [27]. O częstości powstawania mikrojąder w komórkach somatycznych ssaków decyduje w dużym stopniu czas działania związku [30]. Nasze badania wykazały, że najczęściej mikrojąder powstało po 1 tygodniu ekspozycji na bisfenol A dla dawki 20 mg/kg mc. Dla tego punktu czasowego obserwowano także wzrost indukcji MN wraz z zastosowaną dawką.

Zdania dotyczące wpływu bisfenolu A na komórki somatyczne organizmów żywych są podzielone. Niektórzy autorzy wykazali, że BPA nie indukuje mikrojąder w szpiku kostnym [22, 12], inni natomiast wskazują na wyraźną indukcję MN przez ten ksenoestrogen [18, 29, 34]. *Naik* i wsp. [26] donoszą, że bisphenol A nie wywołuje aberracji chromosomowych i powstawania mikrojąder w komórkach szpiku kostnego myszy Swiss-albino, ale potencjalną genotoksyczność tego związku zaobserwowano w efekcie c-mitozy i powstawania achromatycznych luk. Ponadto autorzy ci podają, że

w badaniach cytogenetycznych *in vitro* bisfenol A nie wpłynął znacząco na aberracje chromosomowe, ponieważ nie jest on klastogenny w komórkach szpiku kostnego *in vivo*. BPA indukował powstawanie mikrojąder w kulturach komórek V79 chomika chińskiego [33]. Można przypuszczać, że BPA może indukować powstawanie aneuploidów w wyniku nondysjunkcji podczas mitozy [11]. Może prowadzić to do mutacji chromosomowych, a te z kolei do kancerogenezy. *Izotti* i wsp. [17] potwierdzają zdolność BPA do tworzenia adduktów DNA *in vitro* oraz *in vivo* w wątrobie myszy. Podobnie *Yoo* i wsp. [37] podają, że doustne podawanie myszom bisfenolu A prowadzi do tworzenia adduktów w DNA komórek nabłonkowych. BPA indukował także liczne zmiany chromosomowe, transformacje morfologiczne, aneuploidy i również addukty w DNA [35].

Także pochodne bisfenolu A występujące w stomatologicznych materiałach złożonych, m. in. metakrylan bisfenolu A (Bis-GMA), mogą promować mutacje i niestabilność genomową [28]. Powodują one znaczne zwiększenie częstości pojedynczo - niciowych pęknięć w DNA limfocytów krwi obwodowej oraz w komórkach gruczołów ślinowych [19, 20]. *Schweikl* i wsp. [32] donoszą, że m.in. Bis-GMA ma wpływ na powstawanie zwiększonej liczby mikrojąder oraz mostków nukleoplazmatycznych, co może wskazywać, że związki te indukują przerwy w chromosomach oraz ich rearanzacje. Inni autorzy wykazali, że metakrylan bisfenolu A powoduje delecję w genomie komórek ssaków, która mogła nastąpić w wyniku podwójno - niciowych pęknięć w DNA, które z kolei prowadzą do aberracji chromosomowych [14]. *Schweikl* i wsp. [32] podają także, że bardzo niska aktywność Bis-GMA i wykryta liczba mikrojąder po ekspozycji na wysokie stężenie Bis-GMA i BPA były związane z cytotoksycznością. *Drozd* i wsp. [9] prowadzili badania na limfocytach człowieka i wykazali, że Bis-GMA jest w stanie indukować szerokie spektrum uszkodzeń DNA wliczając pęknięcia podwójnej helisy. Uszkodzenia te mogą być odpowiedzialne za opóźnienie cyklu komórkowego w fazie S. Jednak *Arossi* i wsp. [1] podają, że metakrylan bisfenolu A nie wykazuje efektu genotoksycznego. W niniejszych badaniach wykazano, że 8-tygodniowe narażenie na bisfenol A indukuje powstawanie mikrojąder zarówno w retikulocytach krwi obwodowej, jak i szpiku kostnego. Mikrojądra te mogą być zarówno efektem pęknięcia chromosomów, jak i nie włączania całych chromosomów do jąder komórek potomnych. Wraz z upływem czasu od rozpoczęcia ekspozycji na BPA w dawkach 10 mg/kg i 20 mg/kg m.c. obserwowano znaczne zmniejszenie częstości występowania mikrojąder. Może to świadczyć o adaptacji organizmu do zwiększonej ekspozycji na bisfenol A w warunkach subchronicznych.

W piśmiennictwie jest wiele doniesień o genotoksycznym działaniu promieniowania jonizującego na

komórki somatyczne ssaków. Nasze badania wyraźnie wskazują na wzrost indukcji mikrojąder wraz z czasem subchronicznej ekspozycji samców myszy na promieniowanie X. *Sabati* i wsp. [31] podają, że u osób narażonych zawodowo na promieniowanie X (pracownicy szpitali w sekcji radiologii oraz obsługujący urządzenia w elektrowniach jądrowych) obserwowano aberracje chromosomowe, mikrojądra i wymianę chromatyd siostrzanych w limfocytach krwi obwodowej. W ubiegłych latach w naszej pracowni wykazano, że u myszy napromienianych małymi dawkami promieniowania jonizującego (0,05 Gy), występuje zwiększona liczba mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych i retikulocytach szpiku kostnego. Natomiast 2-tygodniowa ekspozycja myszy na te same dawki promieniowania jonizującego indukuje powstawanie mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego z większą częstotliwością niż subchroniczne 8-tygodniowe narażenie zwierząt [8]. *Hamasaki* i wsp. [13] wskazują, że nawet po roku ekspozycji na promieniowanie X w dawce 2,5 Gy, obserwowano zwiększenie częstotliwości występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej. Może to świadczyć o przedłużonym efekcie działania promieniowania na układ krwiotwórczy. *Carrera* i wsp. [2] stwierdzili istotny poziom uszkodzenia DNA w komórkach wątroby myszy spowodowanego jednorazową ekspozycją na małe dawki promieniowania X (0,05 Gy i 1,00 Gy). Promieniowanie X w dawce 3 Gy powoduje w komórkach diploidalnych ok. 1,000 jedno-niciowych i 60 podwójno-niciowych pęknięć DNA [10].

Obecnie w piśmiennictwie jest niewiele danych na temat skojarzonego działania promieniowania X i bisfenolu A na komórki somatyczne. W niniejszej pracy wykazano, że skojarzone działanie promieniowania X i bisfenolu A wpływało na zmniejszenie indukcji mikrojąder w porównaniu do ekspozycji na samo promieniowanie X, natomiast przewyższało wartości otrzymane tylko po działaniu bisfenolu A. 8-tygodniowe subchroniczne narażenie spowodowało większą indukcję mikrojąder niż 1-tygodniowe narażenie. Nieco inne rezultaty otrzymano wcześniej w naszej pracowni w czasie 2-tygodniowej ekspozycji na promieniowanie X i BPA dla małych dawek. Wykazano wówczas indukcję mikrojąder z częstością większą niż po działaniu każdego z czynników oddzielnie. Natomiast w tych samych badaniach, ale dla większych dawek, częstość występowania mikrojąder po skojarzonym działaniu obu związków była już znacznie wyższa niż po ekspozycji na sam BPA [6]. Wpływ skojarzenia bisfenolu A i jego pochodnych form oraz promieniowania ultrafioletowego badali *Mutou* i wsp. [25] Donoszą oni, że 3-chlorobisfenol A, 3,3'-dichlorobisfenol A oraz 3,3',5-trichlorobisfenol A (CIBPAs) wystawione na działanie UVB i UVC wpływały na zwiększenie śmiertelności komórek ludzkich limfocytów, prawdopodobnie w następstwie kondensacji chromaty-

ny i fragmentacji DNA. Natomiast narażenie na UVA i BPA nie powodowało znaczącego wpływu na proces apoptozy. Inne badania sugerują, że ekspozycja na UVB może obniżać aktywność estrogenną BPA i CIBPAs [24]. W ubiegłych latach w Zakładzie Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny prowadzono badania nad wpływem promieniowania jonizującego i nonylfenolu (NF), który także należy do związków o aktywności estrogennej. Dowiedziono w nich, że 8-tygodniowa ekspozycja na skojarzone działanie promieniowania X i nonylfenolu w mniejszych dawkach (0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF) powoduje większą liczebność mikrojąder w retikulocytach szpiku kostnego samców myszy, niż zastosowanie obu czynników w większych dawkach (0,10 Gy + 50 mg/kg mc NF) [7]. Wyniki innej pracy wykazały stymulujące działanie równoczesnego zastosowania promieniowania X i nonylfenolu po 2-tygodniowej ekspozycji w mniejszych dawkach na tworzenie się mikrojąder. Jednak równoczesne narażenie zwierząt na wyższe dawki obu czynników także powodowało zmniejszenie częstości występowania mikrojąder, co może wskazywać na ochronne właściwości nonylfenolu w stosunku do mutagennego działania promieniowania jonizującego [4]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują podobne właściwości bisfenolu A, szczególnie w następstwie długotrwałej ekspozycji.

## WNIOSKI

1. Bisfenol A powoduje uszkodzenie materiału genetycznego retikulocytów krwi obwodowej i szpiku kostnego samców myszy laboratoryjnych.
2. Subchroniczne narażenie na BPA prowadzi do zmniejszenia wrażliwości materiału genetycznego retikulocytów na indukcję uszkodzeń.
3. Skojarzone działanie promieniowania X i bisfenolu A niwelowało uszkodzenie materiału genetycznego w retikulocytach w stosunku do narażenia na samo promieniowanie jonizujące.
4. Promieniowanie X jest prawdopodobnie czynnikiem decydującym o uszkodzeniu DNA w następstwie skojarzonego działania.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Arossi G.A., Lehmann M., Dihl R.R., Reguly M.M., de Andrade H.H.*: Induced DNA damage by dental resin monomers in somatic cells. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010, 106, 124 – 129.
2. *Carrera P., de Miguel M., Lopez J., de la Torre C., Navarrete M.H.*: *In vivo* response of mouse liver to  $\gamma$ -radiation assessed by the comet assay. *Mutat. Res.* 1998, 413, 23-31.

3. *Choi S.M., Yoo S.D., Lee B.M.*: Toxicology Characteristic of the Endocrine-Disrupting Chemicals: Development Toxicity, Carcinogenicity and Mutagenicity. *J. Toxicol. Environ. Health* 2004, Part B, 7, 1–24.
4. *Czajka U., Dobrzyńska M.M.*: Indukcja mikrojąder w komórkach somatycznych myszy eksponowanych na działanie promieniowania X lub nonylfenolu oraz na skojarzone działanie obu czynników. *Roczn. PZH* 2006, 57, 155–164.
5. *Czupryńska K., Marchlewicz M., Wiszniewska B.*: Wpływ ksenoestrogenów na męski układ płciowy. *Postępy biologii komórki*. Tom 34, 2007, 2, 317–333.
6. *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.
7. *Dobrzyńska M.M.*: Ocena częstości występowania mikrojąder w erytrocytach myszy eksponowanych subchronicznie na promieniowanie jonizujące i nonylfenol. *Roczn. PZH* 2008, 59, 3, 309–318.
8. *Dobrzyńska M.M.*: Uszkodzenia materiału genetycznego komórek somatycznych myszy narażanych na małe dawki promieniowania X. *Roczn. PZH* 2005, 56 Nr 1, 25–33.
9. *Drozd K., Wysokinski D., Krupa R., Woźniak K.*: Bisphenol A-glycidyl metacrylate induced a broad spectrum of DNA in human lymphocytes. *Arch. Toxicol.* 2011, 85, 11, 1453–1461.
10. *Durner J., Dębiak M., Bürkle, Hickel R., Reichl F.K.*: Induction of DNA strand breaks by dental composite components compared to X-ray exposure in human gingival fibroblasts. *Arch. Toxicol.* 2010., 85(2), 143–148.
11. *Evans H.J.*: Neoplasia and cytogenetic abnormalities, in: *Etiology and Mechanisms*. Basic Life Sciences, Plenum Press, New York 1985, 36, 165–177.
12. *Haighton L.A., Hlywka J.J., Doull J., Kroes R., Lynch B.S., Munro I.C.*: An evaluation of the possible carcinogenicity of bisphenol-A to humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2002, 35, 238–254.
13. *Hamasaki K., Imai K., Hayashi T., Nakachi K., Kusunoki Y.*: Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body irradiated BALB/c and C57BL/6 mice. *Cancer Sci.* 2007, 98, 1840–1844.
14. *Harvey A.N., Costa N.D., Savage J.R., Thacker J.*: Chromosomal aberrations induced by defined DNA double-strand breaks: the origin of achromatic lesion. *Somat. Cells Mol. Genet.* 1997, 23, 211–219.
15. *Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M. Jr.*: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 1990, 245, 245–249.
16. *Huttermann J., Rohing M., Kohnlein W.*: Free radicals from irradiated lyophilized DNA: influence of water on hydration. *Int. J. Radiat. Biol.* 1992, 61, 299–313.
17. *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.
18. *Johnson G.E., Parry E.M.*: Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. *Mutat. Res.* 2008, 651, 56–63.
19. *Kleinsasser N.H., Schmid K., Sassen A., Harreus U.A., Staudenmaier R., Folwaczny M., Glas J., Reichl F.X.*: Cytotoxic and genotoxic effect of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Biomaterials* 2006, 27, 1762–1770.
20. *Kleinsasser N.H., Wallner B.C., Harreus U.A., Kleinjung T., 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.
21. *Markey C.M., Rubin B.S., Soto A. M., Sonnenschein C.*: Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental development biology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003, 83, 235–244.
22. *Masuda S., Terashima Y., Sano A., Kurto R., Sugiyama Y., Shimoi K., Tanji K., Yoshioka H., Terao Y., Kinai N.*: Changes in the mutagenic and estrogenic activities of bisphenol A upon treatment with nitrite. *Mutat. Res.* 2005, 585, 137–146.
23. *Mendes A.J.J.*: The endocrine disruptors a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40, 781–88.
24. *Mutou Y., Ibuki Y., Terao Y., Kojima S., Goto R.*: Change of estrogenic activity and release of chloride ion in chlorinated bisphenol A after exposure to ultraviolet B. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29, 2116–2119.
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. *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.
28. *Pawłowska E., Loba K., Błasiak J., Szczepańska J.*: Właściwości i ryzyko stosowania metakrylanu bisfenolu A i dimetakrylanu uretanu – podstawowych monomerów kompozytów stomatologicznych. *Dent. Med. Probl.* 2009, 46, 4, 477–485.
29. *Pfeiffer E., Rosenberg B., Deuschel S., Metzler M.*: Interference with microtubules and induction of micronuclei *in vitro* by various bisphenols. *Mutat. Res.*, 1997, 390, 21–31.
30. *Przybojewska B.*: Mechanizm i kinetyka powstawania mikrojąder w szpiku kostnym myszy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1992, 46, 3, 327–332.
31. *Sabati K.A., Lloyd D.C., Edwards A.A., Stegner P.*: A survey of lymphocytes chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogen. *Mutat. Res.* 1992, 280, 215–253.
32. *Schweickl H., Hiller K.A., Eckhardt A., Bolay C., Kreissl M., Kreismann W., Nusser A., Steinhäuser S., Wiczorek J., Vasold R., Schmalz G.*: Cytotoxic and mutagenic effect of dental composite materials. *Biomaterials* 2005, 26, 1713–1719.

33. Schweikl H., Schmalz G., Rackebrandt K.: The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat. Res.* 1998, 415, 119 – 130.
34. Tsutsui T., Tamura Y., Suzuki A., Hirose Y., Kobayashi M., Nishimura H., Metzler M., Barrett J.C.: Mammalian cell transformation and aneuploidy induced by five bisphenols. *Int. J. Cancer* 2000, 86 (2), 151 – 154.
35. Tsutsui T., Tamura Y., Yagi E., Hasegawa K., Takahashi M., Maizumi N., Yamaguchi F., Barrett J.C.: Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer* 1998, 75, 290 – 294.
36. Tyl R.W., Myers C.B., Thomas B.F., Keimowitz A.R., Brine D.R., Veselica M.M., Fail P.A., Chang T.Y., Seely J.C., Joiner R.L., Butala J.H., Dimond S.S., Cagen S.Z.: Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Sci.* 2002, 68, 121 - 146.
37. Yoo S.D., Shin B.S., Lee B.M., Lee K.C., Han S.Y., Kim H.S.: Bioavailability and mammary excretion of bisphenol A in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 2001, A 64, 417 - 426.

Otrzymano: 22.07.2011

Zaakceptowano do druku: 02.12.2011