

USZKODZENIA DNA W KOMÓRKACH SOMATYCZNYCH MYSZY NARAŻANYCH NA NONYLOFENOL ORAZ NA SKOJARZONE DZIAŁANIE PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO I NONYLOFENOLU

DNA DAMAGE TO SOMATIC CELLS OF MICE EXPOSED TO NONYLPHENOL AND TO A COMBINATION OF IONIZING RADIATION AND NONYLPHENOL

Małgorzata M. Dobrzyńska

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

Słowa kluczowe: *nonylofenol, promieniowanie jonizujące, skojarzone działanie, uszkodzenia DNA, komórki somatyczne, działanie subchroniczne*

Key words: *nonylphenol, ionizing radiation, combined exposure, DNA damage, somatic cells, subchronic exposure*

STRESZCZENIE

Wprowadzenie. Nonylofenol (NF) występuje w produktach codziennego użytku zawierających polichlorek winylu (PCV). Narażenie ludzi na nonylofenol związane jest z jego obecnością w wodzie wodociągowej i żywności. Promieniowanie jonizujące pochodzi ze źródeł naturalnych oraz sztucznych, stosowanych szczególnie w medycynie oraz w nauce i przemyśle. Oba czynniki występują powszechnie w środowisku człowieka, dlatego ekspozycja na ich skojarzone działanie wydaje się wielce prawdopodobne.

Cel badań. Celem badań było określenie wpływu subchronicznego podawania samcom myszy nonylofenolu oraz poddawania ich skojarzonemu działaniu promieniowania jonizującego i nonylofenolu na indukcję pęknięć nici DNA w komórkach somatycznych różnych narządów.

Materiał i metoda. Materiał stanowiły myszy Pzh:SFIS, którym przez 8 tygodni, 5 razy w tygodniu podawano dootrzewnowo zawiesinę nonylofenolu w oleju słonecznikowym (25 mg/kg mc lub 50 mg/kg mc NF) lub poddawano je skojarzonemu działaniu promieniowania X i nonylofenolu (0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF). Grupy zwierząt zabijano po 24 h oraz po 1, 4 i 8 tygodniach od zakończenia narażania. Z myszy izolowano szpik kostny, wątroby, nerki, płuca i śledziony. Oceny uszkodzeń DNA dokonano za pomocą testu kometowego.

Wyniki. Na działanie nonylofenolu najbardziej wrażliwe okazały się limfocyty szpiku kostnego, mniej komórki śledziony i płuc. Nonylofenol nie indukował występowania pęknięć nici DNA w komórkach wątroby i nerek.

Ośmiotygodniowe skojarzone działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu w komórkach większości badanych narządów powodowało zwiększenie częstości występowania pęknięć nici DNA w porównaniu do skutków działania samego nonylofenolu. Spośród badanych komórek najbardziej wrażliwe na skojarzone działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu (0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF dziennie) okazały się limfocyty szpiku kostnego i komórki śledziony, a najmniej komórki nerek i płuc.

Wnioski. Nonylofenol indukuje uszkodzenia materiału genetycznego limfocytów szpiku kostnego oraz komórek śledziony i płuc. Skojarzone działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu powoduje występowanie pęknięć nici DNA limfocytów szpiku kostnego, komórek wątroby, płuc, śledziony i nerek, ze znacznie większą częstością niż sam nonylofenol. Uszkodzenia te mogą być więc stymulowane przez promieniowanie.

ABSTRACT

Background. Nonylphenol (NP) has been found in daily used products reach in polyvinyl chloride (PVC). The main routes of human exposure are consumption of contaminated food and water. Radiation comes from natural and man-made sources, and is used in medicine, science and industry. Both agents are widely present in environment, therefore human exposure to their combined effect seems to be highly probable.

Objective. The aim of the study was the estimation of the effects of subchronic exposure of male mice to nonylphenol alone and in a combination with ionizing radiation on the induction of DNA strand breaks of multiple somatic cells.

Adres do korespondencji: Małgorzata M. Dobrzyńska, Zakład Higieny Radiacyjnej i Radiobiologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, 00-794 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. +48 22 54 21 253, fax +48 22 54 21 309, e-mail: mdobrzynska@pzh.gov.pl

Material and method. Pzh:SFIS male mice were exposed for 8 weeks, 5 days/week to nonylphenol alone (25 mg/kg bw or 50 mg/kg bw) or in a combination with X-rays (0.05 Gy + 25 mg/kg bw NP). Animals were killed at 24 h, 1, 4 and 8 weeks after the end of exposure. The bone marrow, spleens, livers, kidneys and lungs were isolated from mice. The estimation of DNA damage was carried out by using Comet assay.

Results. The most sensitive to nonylphenol occurred bone marrow lymphocytes, less sensitive were cells of spleen and lungs. NP did not induce the strand breaks in cells coming from liver and kidneys.

Eight-weeks combined exposure to ionizing radiation and nonylphenol (0.05 Gy + 25 mg/kg bw NP) caused significantly enhanced level of DNA strand breaks in all tested cells. The most sensitive occurred bone marrow lymphocytes and spleen cells, whereas cells from kidneys and lungs were the least sensitive.

Conclusion. Subchronic application of nonylphenol to mice induced damage to genetic material of bone marrow lymphocytes and cells of spleen and lungs. Combined exposure to ionizing radiation and nonylphenol caused, significantly higher than NP alone, level of DNA strand breaks of bone marrow lymphocytes, cells of liver, spleen, lungs and kidneys. Such damages might be stimulated by ionizing radiation.

WSTĘP

Nonylofenol (NF, nr CAS 104-40-05), należący do grupy związków estrogenopodobnych, jest oleistą bezbarwną cieczą o charakterystycznym zapachu. Jest mieszaniną izomerów zawierającą głównie p-nonylofenol. Jego produkcja ciągle wzrasta. Roczna produkcja NF wynosi w Europie 73 500 ton, a w Stanach Zjednoczonych 154 200 ton [2, 22]. Nonylofenol stosowany jest głównie do produkcji niejonowych środków powierzchniowo-czynnych, a także żywic epoksydowych i fenolowych, jak również jako dodatek do smarów oraz w produkcji chemikaliów rolniczych i w przemyśle oponiarskim. Występuje w wielu produktach codziennego użytku, szczególnie w wyrobach zawierających polichlorek winylu (PCV), takich jak opakowania do żywności, zabawki, folie oraz detergenty, środki dezynfekujące i owadobójcze, farby, pestycydy [21, 36, 42]. Narażenie ludzi na nonylofenol związane jest z jego obecnością w wodzie wodociągowej i żywności. Do wody może migrować z rur plastikowych, a do żywności przedostaje się z pojemników używanych podczas jej produkcji oraz pakowania [24, 37]. Badania wykazały, że zawartość NF w żywności wynosi od 0,1 do 1,4 µg/kg świeżej masy, podczas gdy woda przechowywana w pojemnikach z PCV może zawierać 300 ng/L NF [17, 28]. Ostatnio pojawiły się też informacje, że obecność nonylofenolu i jego etoksylantu wykrywano w odzieży produkowanej w Azji. Ze względu na swoje powinowactwo do tłuszczów, nonylofenol może ulegać kumulacji w tkankach zwierzęcych [17]. Z powodu podobnego działania do estradiolu, może oddziaływać na różne narządy np. na wątrobę, gdzie znajdują się receptory estrogenowe [23]. Nonylofenol, podobnie jak inne związki o aktywności estrogennej, działa toksycznie na gonady męskie oraz redukuje produkcję gamet męskich, powoduje pogorszenie ich jakości (zmniejszenie ruchliwości, zwiększenie odsetka plemników o nieprawidłowej budowie morfologicznej) wpływając na obniżenie zdolności reprodukcyjnych [6, 9, 13, 14,

20]. Nonylofenol indukuje też powstawanie uszkodzeń DNA wykrywanych za pomocą testu kometowego i aberracji chromosomowych w hodowlach komórek chomika chińskiego CHO-K1 [39]. Znacznie mniej wiadomo na temat wpływu nonylofenolu na komórki somatyczne.

Promieniowanie jonizujące pochodzi ze źródeł naturalnych (promieniowanie kosmiczne oraz promieniowanie emitowane przez naturalne radionuklidy znajdujące się w środowisku) oraz z wytwarzanych przez człowieka źródeł sztucznych, szczególnie medycznych stosowanych w diagnostyce i terapii, jak również ze źródeł używanych w nauce i przemyśle. Promieniowanie jonizujące może powodować m.in. zaburzenia czynności życiowych organizmu, obumieranie komórek, uszkodzenia ich membran występowanie zmian w DNA i w RNA. Za najbardziej wrażliwą na promieniowanie część komórki uważane jest DNA [31, 38]. Skutki działania promieniowania jonizującego zależą od wielu czynników, m.in. od mocy dawki, czasu ekspozycji oraz od wrażliwości komórek poszczególnych tkanek i narządów, podczas gdy odpowiedź biologiczna zależy od wieku, rodzaju tkanki, fazy cyklu komórkowego i predyspozycji genetycznych. Do najbardziej wrażliwych należą komórki rozrodcze oraz komórki układu krwiotwórczego, a do stosunkowo najmniej czułych komórki wątroby, nerek, płuc [41]. Promieniowanie jonizujące posiada właściwości mutagenne i kancerogenne, które ujawniają się szczególnie po jego zastosowaniu w dużych dawkach. Znane są dwa mechanizmy oddziaływania promieniowania jonizującego z żywą materią; bezpośredni i pośredni. Bezpośrednie uszkodzenia wywołane są przez zderzenie cząstek promieniowania z nicią DNA. Efekt pośredni to oddziaływanie produktów radiolizy wody prowadzące do powstawania reaktywnych form tlenu. Szacuje się, że ok. 60 % uszkodzeń powodowanych przez promieniowanie X i γ ma charakter pośredni. [3].

Jednymi z ważniejszych efektów działania zarówno promieniowania jonizującego, jak i niektórych zwią-

ków chemicznych są upośledzenie syntezy DNA oraz indukcja uszkodzeń DNA komórek. Komórki wyposażone są w enzymatyczne mechanizmy kontrolujące prawidłowość procesu replikacji DNA, przebieg cyklu komórkowego oraz w enzymy rozpoznające i naprawiające uszkodzenia DNA. Jednakże naprawa taka może być nieprawidłowa, w konsekwencji powodując powstawanie aberracji chromosomowych i mutacji. Takie modyfikacje mogą być przekazywane do następnych pokoleń komórek prowadząc niekiedy do transformacji nowotworowej. Natomiast nie naprawienie uszkodzeń może prowadzić do śmierci komórek. Liczni autorzy stwierdzili indukcję uszkodzeń DNA w komórkach różnych narządów zwierząt doświadczalnych podanych działaniu promieniowania lub związków chemicznych [7, 10, 11, 18, 19, 30]. Zarówno promieniowanie jonizujące, jak i nonylofenol występują powszechnie w środowisku człowieka, dlatego skojarzona ekspozycja na oba czynniki wydaje się wielce prawdopodobna.

Celem badań było określenie wpływu subchronicznego, 8-tygodniowego podawania samcom myszy nonylofenolu oraz poddawania ich skojarzonemu działaniu promieniowania jonizującego i nonylofenolu na indukcję pęknięć nici DNA w komórkach somatycznych różnych narządów.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z przyjętymi standardami etyki po uzyskaniu zgody IV Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie.

Materiał doświadczalny stanowiły myszy pochodzące ze stada niekrewniaczego Pzh:SFIS w wieku 8 tygodni w momencie rozpoczęcia doświadczenia, które przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności z automatycznie sterowanym dobowym cyklem świetlnym (12 godzin światła: 12 godzin ciemności). Zwierzęta karmione były standardową paszą dla gryzoni oraz pojone wodą wodociągową *ad libitum*. Przez 8 tygodni, 5 razy w tygodniu, samcom myszy podawano dootrzewnowo nonylofenol (Sigma-Aldrich, Niemcy) zawieszony w oleju słonecznikowym lub poddawano je skojarzonemu działaniu promieniowania X i nonylofenolu. Wybór drogi podania uwarunkowany był większą spodziewaną skutecznością działania związku, który po podaniu dootrzewnowym znajdował się w bezpośrednim sąsiedztwie większości badanych narządów. Myszy nienapromienione, otrzymujące olej słonecznikowy stanowiły grupę kontrolną. NF podawano zwierzętom w dawkach 25 mg/kg mc lub 50 mg/kg mc. Samce poddawane skojarzonemu działaniu promieniowania X i nonylofenolu otrzymywały badane czynniki w dawkach 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF, tj. skojarzono NF w najmniejszej z dawek z promieniowa-

niem X w małej dawce. Dawki nonylofenolu wybrano na podstawie danych zawartych w piśmiennictwie, a dawkę promieniowania X na podstawie wcześniejszych badań własnych. W przypadku skojarzonego działania, nonylofenol podawano myszom bezpośrednio po napromienieniu.

Źródłem promieniowania X był terapeutyczny aparat rentgenowski (Medicor, Węgry) Zastosowano następujące parametry ekspozycji: 170 kV, 20 mV, filtracja dodatkowa 0,5 mm Cu, warstwa połówkowa 0,8 mm Cu. Moc dawki wynosiła 0,20 Gy/min. Zwierzęta napromieniano na całe ciało.

Grupy zwierząt zabijane były 24 h po zakończeniu narażania na badane czynniki oraz po upływie 1, 4 i 8 tygodni. Liczebność zwierząt w poszczególnych grupach doświadczalnych i kontrolnych wynosiła od 5 do 7 sztuk.

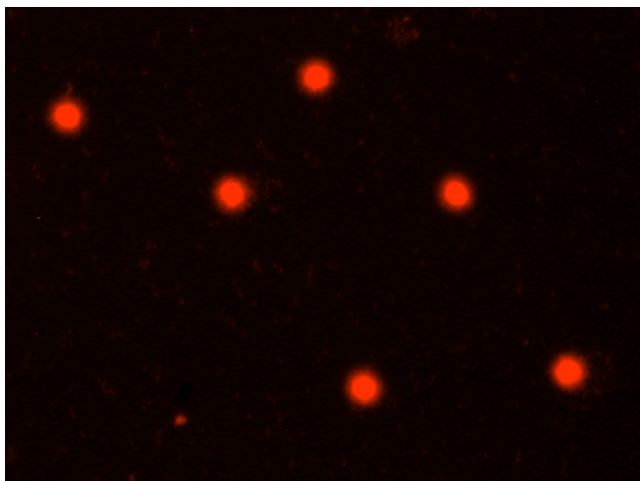
Test kometowy przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną metodyką [1, 35]. Z każdej myszy pobierano kość udową, wątrobę, nerkę, płuca i śledzionę. Z kości udowej izolowano szpik kostny i zawieszano go w RMPI medium (MP Biomedicals LLC, Kanada). Pozostałe narządy również umieszczano w próbkach z RMPI medium, a następnie rozdrabniano. Wątroby, nerki i płuca po rozdrobnieniu filtrowano przez gazę (siatkę) metalową. 5-10 μ l zawiesiny komórkowej pobierano do próbki eppendorf, mieszano z 75 μ l agarozy o niskiej temperaturze topnienia (LMPA, Sigma-Aldrich, Niemcy) i наносono na podstawowe szkiełka mikroskopowe pokryte uprzednio warstwą agarozy o normalnej temperaturze topnienia (NMPA, Sigma-Aldrich, Niemcy). Po zestaleniu się pierwszej warstwy agarowy LMPA w temperaturze 4°C przez 5 minut, наносono drugą jej warstwę. Preparaty mikroskopowe umieszczano w buforze do lizy w temperaturze 4°C na około 20 h. Następnie układano je w aparacie do elektroforezy w pozycji poziomej. Komórki w żelu agarozowym inkubowano przez 20 minut, a następnie przeprowadzano elektroforezę niskonapięciową (24 V, 300 mA) w temperaturze 4°C przez 20 minut. Komórki neutralizowano buforem neutralizującym, a następnie barwiono bromkiem etydydy (Sigma-Aldrich, Niemcy). Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym, zliczając losowo po 200 komórek o różnym stopniu uszkodzeń DNA z każdego narządu i z każdej myszy. Zgodnie z metodą opisaną przez *Kumaravel i Jha* [26] komórki były wizualnie dzielone na 5 kategorii w zależności od zawartości procentowej DNA w ogonie komety; 0 – (0-5 %), 1 - (5-20 %), 2 - (20-40 %), 3 - (40-95 %), 4 – (>95 %). Średnie uszkodzenie DNA obliczano sumując iloczyny odsetków komórek z poszczególnych kategorii i wskaźników kategorii.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu *t-Studenta*, porównując wyniki z grup doświadczalnych z grupą kontrolną. Ponadto, porównywano

także wyniki dotyczące skojarzonego działania z wynikami uzyskanymi po działaniu samego nonylofenolu.

WYNIKI

Na rycinie 1, na przykładzie limfocytów szpiku kostnego, zaprezentowano fotografię obrazu mikroskopowego typowego dla grupy kontrolnej, gdzie materiał genetyczny komórek jest nieuszkodzony lub uszkodzony w nieznacznym stopniu. Na rycinie 2 przedstawiono fotografię mikroskopową charakterystyczną dla grupy badanej. W tym przypadku zaprezentowano limfocyty szpiku kostnego myszy z grupy 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF. Na rycinie przedstawiono jądra komórkowe charakteryzujące się różnym stopniem uszkodzeń DNA, widocznym jako tzw. ogony komet.



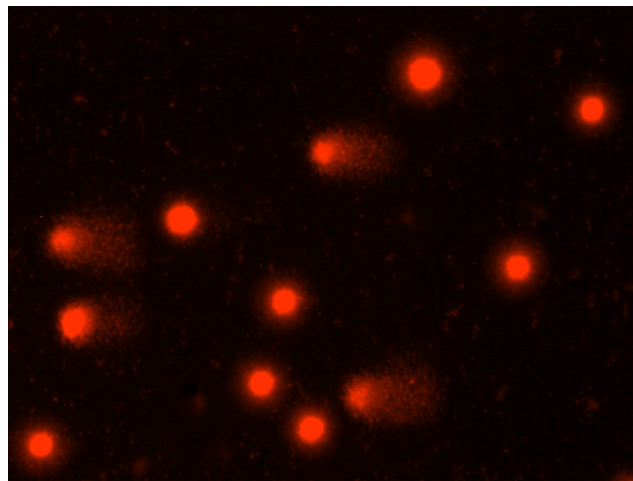
Ryc. 1. Limfocyty szpiku kostnego myszy barwione bromkiem etydyny (grupa kontrolna). Widoczne nieuszkodzone lub minimalnie uszkodzone jądra komórkowe
Bone marrow lymphocytes of mice stained with ethidium bromide (control group). Undamaged and slightly damaged cells nuclei are visible.

Wyniki dotyczące uszkodzeń DNA w komórkach somatycznych różnych narządów samców myszy, którym podawano nonylofenol lub były poddawane skojarzonemu działaniu promieniowania X i nonylofenolu przez 8 tygodni przedstawiono w tabeli 1.

Limfocyty szpiku kostnego okazały się najbardziej wrażliwe na działanie nonylofenolu. Podwyższoną częstość występowania uszkodzeń DNA obserwowano bezpośrednio po zakończeniu oraz po 1 tygodniu od zakończenia podawania nonylofenolu, zarówno w dawce 25 mg/kg mc, jak i 50 mg/kg mc dziennie. W komórkach śledziony i płuc zwiększony poziom uszkodzeń DNA stwierdzono po 24 godzinach oraz po tygodniu od zakończenia podawania NF tylko w dawce 50 mg/kg mc dziennie. W następstwie 8-tygodniowego podawania

myszom, nonylofenol nie indukował występowanie pęknięć nici DNA w komórkach wątroby i nerek.

Ośmiotygodniowe skojarzone działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu w komórkach większości badanych narządów powodowało zwiększenie częstości występowania pęknięć nici DNA w porównaniu do kontroli oraz do skutków działania samego nonylofenolu. Wyjątki stanowią wyniki uzyskane po 1 tygodniu od zaprzestania skojarzonej ekspozycji w komórkach nerek i płuc, gdzie poziom uszkodzeń DNA był znacznie niższy niż po podawaniu samego NF w dawce 25 mg/kg mc. Spośród badanych komórek najbardziej wrażliwe na skojarzone działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu (0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF dziennie) okazały się limfocyty szpiku kostnego i komórki śledziony, w których znamienne statystycznie podwyższoną częstość uszkodzeń DNA



Ryc. 2. Limfocyty szpiku kostnego myszy barwione bromkiem etydyny (grupa 0,05 Gy + 25 mg/kg mc NF). Widoczne jądra komórkowe charakteryzujące się różnym stopniem uszkodzeń DNA, widocznym jako tzw. ogony komety.
Bone marrow lymphocytes of mice stained with ethidium bromide (group 0.05 Gy + 25 mg/kg mc NF). Cells nuclei with different level of DNA damage are visible as comet tail.

w stosunku do wartości kontrolnych obserwowano nie tylko bezpośrednio po zakończeniu narażenia, ale też po upływie 1, 4 i 8 tygodni. Skojarzona ekspozycja na oba czynniki indukowała w limfocytach szpiku kostnego i w komórkach śledziony istotnie zwiększoną częstość występowania uszkodzeń DNA także w porównaniu do efektów 8-tygodniowego podawania 25 mg/kg mc NF po 24 h i po 8 tygodniach od zaprzestania ekspozycji. W komórkach płuc podwyższoną częstość występowania pęknięć nici DNA w stosunku do kontroli notowano po 24 h, oraz po 4 i 8 tygodniach od zakończenia narażenia, a w porównaniu do działania samego NF tylko po 8 tygodniach od odstawienia związku. Z kolei w komórkach pochodzących z nerek i wątroby istotnie

Tabela 1. Uszkodzenia DNA komórek somatycznych różnych narządów samców myszy narażanych subchronicznie na nonylofenol lub na skojarzone działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu
DNA damage of somatic cells different organs of male mice subchronic exposed to nonylphenol or to a combination of ionizing radiation and nonylphenol

Czas	Dawka	Limfocyty szpiku kostnego	Wątroba	Śledziona	Nerki	Pluca
8 tygodni	Kontrola	59,42±14,83	68,67±41,40	72,80±9,67	83,42±28,71	52,00±12,23
	25 mg/kg mc NF	80,20±14,19*	73,83±34,59	87,75±29,98	91,08±33,22	70,50±19,67
	50 mg/kg mc NF	97,40±31,00*	74,13±70,54	92,50±13,07*	93,60±19,12	98,60±37,49*
	0,05 Gy+25 mg/kg mc NF	144,7±28,18*. ⁿ	104,60±22,87	132,80±28,25*. ⁿ	112,80±24,98	74,50±9,51*
8 tygodni + 1 tydzień	Kontrola	72,00±28,08	58,6±22,71	79,70±29,35	70,00±34,61	53,00±22,00
	25 mg/kg mc NF	114,00±33,34*	76,17±24,91	90,20±24,29	106,30±29,21	64,10±10,25
	50 mg/kg mc NF	122,10±34,19*	88,60±27,30	127,90±24,67*	110,90±52,58	104,70±40,77*
	0,05 Gy+25 mg/kg mc NF	133,90±29,51*	95,00±35,79	110,00±11,90*	54,70±6,67 ⁿ	40,88±15,64
8 tygodni + 4 tygodnie	Kontrola	94,8±5,86	89,50±38,66	76,40±29,07	91,00±12,07	81,38±30,09
	25 mg/kg mc NF	95,63±8,53	84,90±45,56	94,80±54,07	101,30±50,45	113,70±46,23
	50 mg/kg mc NF	91,70±17,68	81,60±27,57	88,80±22,46	88,80±22,46	102,50±54,57
	0,05 Gy+25 mg/kg mc NF	124,40±35,48*	150,04±49,48*	133,40±42,29*	153,00±29,00*	146,20±50,31*
8 tygodni + 8 tygodni	Kontrola	74,13±13,93	58,30±10,81	75,50±28,80	79,75±9,68	41,63±10,05
	25 mg/kg mc NF	86,80±18,56	48,40±19,94	74,40±35,17	75,70±10,50	43,50±14,19
	50 mg/kg mc NF	105,63±53,16	54,10±20,33	103,70±27,91	89,60±39,80	44,40±25,50
	0,05 Gy+25 mg/kg mc NF	141,08±49,09*. ⁿ	107,60±32,71*. ⁿ	121,60±24,22*. ⁿ	148,78±29,13*. ⁿ	157,10±18,98*. ⁿ

* $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli, ⁿ $p < 0,05$ w porównaniu do 25 mg/kg mc NF w teście *t-Studenta*

statystycznie podwyższoną częstość pęknięcia nici DNA w stosunku do kontroli zanotowano tylko po 4 i 8 tygodniach od zakończenia narażenia na oba czynniki. Ponadto, wyniki uzyskane po 8 tygodniach od zaprzestania ekspozycji na skojarzone działanie promieniowania X i NF różniły się istotnie także od notowanych po narażeniu na sam nonylofenol.

DYSKUSJA

W środowisku człowieka znajduje się wiele związków chemicznych, które potencjalnie mogą oddziaływać na jego zdrowie. Na szczególną uwagę zasługują związki o aktywności estrogennej, które mogą zakłócać prawidłowe funkcjonowanie gruczołów dokrewnych. Substancje te u mężczyzn mogą powodować demaskulinizację, prowadzącą m.in. do obniżenia płodności, u kobiet natomiast mogą zaburzać gospodarkę hormonalną cyklu miesięcznego, m.in. działając antykoncepcyjnie. Nonylofenol, należący do tej grupy związków znany jest z niekorzystnego wpływu na układ rozrodczy oraz na gamety męskie zwierząt laboratoryjnych [7, 20, 27]. Niewiele jest danych na temat wpływu nonylofenolu na inne narządy ssaków, a szczególnie na materiał genetyczny komórek somatycznych. Indukcja pęknięć nici DNA jest niezwykle istotnym problemem biologicznym. Nie naprawienie uszkodzeń może nawet prowadzić do śmierci komórki, natomiast ich błędne naprawienie do wystąpienia mutacji.

Przedstawione badania wykazały zdolność nonylofenolu do indukcji uszkodzeń DNA w limfocytach szpiku kostnego oraz w komórkach śledziony i płuc samców myszy. Zjawisko to obserwowano jednak tyl-

ko bezpośrednio po zaprzestaniu podawania badanego związku oraz po upływie 1 tygodnia. Brak istotnego zwiększenia częstości występowania uszkodzeń DNA po 4 i 8 tygodniach od zakończenia podawania NF jest prawdopodobnie uwarunkowany występowaniem procesów naprawczych oraz usuwaniem NF z organizmu. Materiał genetyczny komórek wątroby i nerek nie był podatny na indukcję uszkodzeń w następstwie podawania zwierzętom nonylofenolu.

Wrażliwość materiału genetycznego krwinek na działanie nonylofenolu obserwowali także inni autorzy. Badania *in vivo* na erytrocytach krwi obwodowej ryby tilapia nilowa, wykazały zdolność nonylofenolu do indukcji mikrojąder [34]. Nonylofenol powodował także występowanie mikrojąder oraz apoptozę krwinek czerwonych suma afrykańskiego [29]. Z kolei inni autorzy wykazali indukcję przez nonylofenol mikrojąder w erytrocytach krwi obwodowej ryb morskich [4]. Obserwowano też występowanie mikrojąder w retikulocytach szpiku kostnego i krwi obwodowej oraz w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego myszy laboratoryjnych w następstwie 2 lub 8-tygodniowej ekspozycji na nonylofenol [8, 12]. Ponadto, *Peridis* i wsp. [32] stosując test kometowy obserwowali indukcję uszkodzeń DNA w hemocytach mięczaka *Scrobicularia plana* w następstwie narażenia na nonylofenol *in vivo* oraz *in vitro*. Należy jednak odnotować, że uzyskano także wyniki świadczące o braku zdolności nonylofenolu do indukcji mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego myszy [16] oraz o braku zdolności NF do indukcji pęknięć nici DNA w erytrocytach krwi obwodowej ryb [34].

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych na temat wpływu nonylofenolu na śledzionę

i płuca. Zatem, uzyskane w niniejszej pracy wyniki świadczące o zdolności nonylofenolu do indukowania uszkodzeń DNA w komórkach obu narządów są prawdopodobnie pierwszymi informacjami na ten temat. Autorzy wcześniejszych publikacji sugerowali natomiast wrażliwość wątroby i nerek na działanie nonylofenolu. Woo i wsp. [43] obserwowali toksyczne działanie NF w stosunku do obu narządów samic i samców szczurów. Zarówno w nerkach, jak i w wątrobie autorzy ci stwierdzili zmiany histopatologiczne. Podwyższony był też relatywny ciężar obu narządów. W następstwie działania NF Barsiene i wsp. [4] wykazali indukcję mikrojąder oraz apoptozy w nerkach ryb morskich flądry i dorsza atlantyckiego. Natomiast Korkmaz i wsp. [25] sugerowali możliwość indukcji uszkodzeń oksydacyjnych w nerkach szczurów w wyniku działania nonylofenolu. Geens i wsp. [15] stwierdzili obecność nonylofenolu w wątrobach ludzkich. Indukcję apoptozy w wątrobach szczurów, którym podawano nonylofenol przez 45 dni obserwowali Jubendradass i wsp. [23]. Powyższe wyniki nie znalazły jednak potwierdzenia w niniejszej pracy.

Dotychczas nie publikowano danych na temat wpływu skojarzonego działania promieniowania jonizującego i nonylofenolu na indukcję pęknięć nici DNA w komórkach somatycznych. Natomiast w komórkach płciowych w następstwie 2-tygodniowego działania obu czynników (0,05 Gy + 25 mg/kg bw NF) obserwowano istotnie zmniejszoną indukcję uszkodzeń DNA w porównaniu do efektów działania samego nonylofenolu [13]. Jednak w przypadku 8-tygodniowego skojarzonego narażenia na promieniowanie X i nonylofenol w takich samych dawkach w męskich komórkach rozrodczych notowano znaczną stymulację występowania pęknięć nici DNA, podobną do uzyskanej w efekcie podawania samego NF [14]. W niniejszej pracy zmniejszenie częstości występowania uszkodzeń DNA obserwowano tylko w komórkach nerek i płuc po tygodniu od zaprzestania ekspozycji na skojarzone działanie obu czynników. Natomiast pozostałe wyniki świadczące o zwiększonej częstości pęknięcia nici DNA w komórkach somatycznych myszy w efekcie skojarzonego działania potwierdzają wyniki uzyskane dla gamet męskich myszy poddanych subchronicznej ekspozycji na promieniowanie jonizujące i nonylofenol [14]. Skojarzone działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu powodowało także istotne zwiększenie częstości występowania mikrojąder w krwinkach czerwonych szpiku kostnego i krwi obwodowej myszy [8, 12]. Ze względu na to, że szereg wcześniejszych prac dotyczyło wpływu samego promieniowania jonizującego na indukcję uszkodzeń materiału genetycznego, takie badanie nie było przedmiotem niniejszej pracy. Już jedna z pierwszych prac odnośnie wykorzystania testu kometowego do wykrywania uszkodzeń materiału genetycznego

dotyczyła indukcji takich uszkodzeń w DNA limfocytów ludzkich napromienianych promieniowaniem X [35]. Inni autorzy wykazali także, że promieniowanie jonizujące indukowało występowanie pęknięcia nici DNA w komórkach różnych narządów myszy laboratoryjnych *in vivo*. Uszkodzenia materiału genetycznego obserwowano w takich narządach napromienionych zwierząt jak wątroba, nerki, śledziona, jelita, płuca, pęcherz moczowy, tarczycza, mózg, żołądek i szpik kostny [11, 40]. Wydaje się więc prawdopodobne, że zwiększona częstość uszkodzeń DNA po skojarzonym działaniu może być stymulowane przez promieniowanie jonizujące. To tłumaczyłoby fakt, że stopień uszkodzeń DNA w komórkach zwierząt poddanych skojarzonemu działaniu był zazwyczaj znacznie wyższy niż w przypadku narażenia na sam nonylofenol. Na uwagę zasługuje również fakt, że uszkodzenia DNA, które nastąpiły po skojarzonym działaniu obu czynników utrzymywały się znacznie dłużej niż po działaniu NF. Może to świadczyć o ograniczonej możliwości usuwania powstałych uszkodzeń przez enzymy naprawcze. Trudne do wytłumaczenia jest jednak zmniejszenie częstości uszkodzeń DNA komórek nerek i płuc po tygodniu od zakończenia skojarzonej ekspozycji na promieniowanie jonizujące i nonylofenol w stosunku do efektów działania samego NF. Jakkolwiek, znane są doniesienia świadczące o stymulowaniu przez małe dawki promieniowanie fizjologicznych mechanizmów naprawczych [33], jak również podobne zjawisko opisano we wcześniejszej pracy dotyczącej indukcji uszkodzeń DNA w gametach męskich myszy narażanych przez dwa tygodnie na skojarzone działanie promieniowania i nonylofenolu [13]; jednakże w kontekście pozostałych wyników stymulacja procesów reparacyjnych wydaje się w tym przypadku mało prawdopodobna.

Podsumowując, można stwierdzić, że uzyskane wyniki, szczególnie dotyczące skojarzonego działania promieniowania jonizującego i nonylofenolu, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia możliwości zagrożeń zdrowotnych ze strony czynników środowiskowych. Jak bowiem wiadomo, narażenie populacji generalnej na biologiczne, chemiczne i fizyczne czynniki środowiskowe jest powszechne. Ponadto, coraz większego znaczenia nabiera zagrożenie zdrowotne związane z przewlekłym narażeniem na czynniki środowiskowe występujące w małych dawkach, szczególnie w przypadku gdy czynników tych jest kilka i gdy mogą nastąpić interakcje pomiędzy nimi.

WNIOSKI

1. Subchroniczne podawanie myszom laboratoryjnym nonylofenolu indukuje uszkodzenia materiału genetycznego limfocytów szpiku kostnego oraz komórek

- śledzony i płuc. Najbardziej wrażliwym na działanie nonylofenolu narządem ssaków okazał się szpik kostny.
- Skojarzone subchroniczne działanie promieniowania jonizującego i nonylofenolu indukuje występowanie pęknięć nici DNA limfocytów szpiku kostnego, komórek wątroby, płuc, śledziony i nerek.
 - Skojarzenie nonylofenolu z promieniowaniem X powoduje znaczne zwiększenie częstości występowania uszkodzeń DNA w komórkach somatycznych w porównaniu do działania samego nonylofenolu. Może to świadczyć o stymulującym wpływie promieniowania jonizującego.

PIŚMIENNICTWO

- Anderson D., Yu T.W., Phillips B.J., Schmezer P.*: The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated damage in human lymphocytes in Comet assay. *Mutat Res* 1994, 307, 261-71.
- Anonymous*: Nonylphenol. *Chem Mark Rep* 2001, 260-31.
- Barcellos-Hoff M.H., Park C., Wright E.G.*: Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer* 2005, 5, 867-875.
- Barsiene J., Dedonyte V., Rybakovas A., Andreikenaite L., Andersen O.K.*: Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat Toxicol* 2006, 78 Suppl 1, S99-104.
- Carrera P., Migueal de M., Lopez J., Torre de la C., Navarrete M.H.*: In vivo response of mouse liver to γ -irradiation assessed by the comet assay. *Mutat Res* 1998, 413, 23-31.
- Chapin R.E., Delaney J., Wang Y., Lanning L., Davis B., Collins B., Minz N., Wolfe G.*: The effects of 4-nonylphenol in rats. A multigeneration reproductive study. *Toxicol. Sci* 1999, 80, 80-91.
- Chitra K.C., Latchoumycandane C., Mathur P.P.*: Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Arch Toxicol* 2002, 76, 545-551.
- Czajka U., Dobrzyńska M.M.*: Indukcja mikrojąder w komórkach somatycznych myszy eksponowanych na działanie promieniowania X lub nonylofenolu oraz na skojarzone działanie obu czynników. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2006, 57, 155-64.
- De Jager C., Bornman M.S., van der Horst G.*: The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia* 1999, 31, 99-106.
- Dobrzyńska M.M.*: The effects in mice of combined treatments to X-rays and antineoplastic drugs in the Comet assay. *Toxicology* 2005, 207, 331-338.
- Dobrzyńska M.M.*: Assessment of DNA damage in multiple organs from mice exposed to X-rays or acrylamide or a combination of both using the comet assay. *In Vivo* 2007, 21, 657-62.
- Dobrzyńska M.M.*: Ocena częstości występowania mikrojąder w erytrocytach myszy eksponowanych subchronicznie na promieniowanie jonizujące i nonylofenol. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2008, 59, 309-18.
- Dobrzyńska M.M.*: Combined action of X-rays and nonylphenol on mouse sperm. *Cent Eur J Biol* 2011, 6(3), 320-29.
- Dobrzyńska M.M.*: Male-mediated F1 effects in mice exposed to nonylphenol or to a combination of X-rays and nonylphenol. *Drug Chem. Toxicol* 2012, 35, 36-42.
- Geens T., Neels H., Covaci A.*: Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere* 2012, 87, 796-802.
- Grisolia C.K., Bilich M.R., Formigli L.M.*: A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol etoxylate. *Ecotoxicol Environ Safety* 2004, 59, 123-26.
- Guenther K., Heinke V., Thiele B., Kleist E., Prast H., Raecker T.*: Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol* 2002, 36, 1676-80.
- Haines G.A., Hendry J.H., Daniel C.P., Morris I.D.*: Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-rays-irradiation of spermatogonia. *Mutat Res* 2001, 495, 21-32.
- Haines G.A., Hendry J.H., Daniel C.P., Morris I.D.*: Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol Reprod* 2002, 67, 854-61.
- Han X.D., Tu Z.G., Gong Y., Shen S.N., Wang X.Y., Kang L.N., Hou Y.Y., Chen J.X.*: The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod Toxicol* 2004, 19, 215-21.
- Hawerlak M., Bennett E., Metcalfe C.*: The environmental fate of the primary degeneration products of alkylphenol etoxylate surfactants in recycled paper sludge. *Chemosphere* 1999, 39, 745-52.
- HELCOM (Helsinki Commission) Guidance document on nonylphenol /nonylphenoletoxylates (NP/NPEs), Baltic Marine Environment Protection Commission. Finland: Helsinki, 2002.*
- Jubendradass R., D'Cruz S.C., Rani S.J.A., Matur P.P.*: Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-L-mediated pathways in the liver of adult male rat. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012, 62, 405-11.
- Junk G.A., Svec H.J., Vick R.D., Avery M.J.*: (1974). Contamination of water by synthetic polymer tubes. *Environ Sci Technol* 1974, 8, 1100-1106.
- Korkmaz A., Aydogan M., Kolankaya D., Barlas N.*: Vitamin C coadministration augments bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol induced oxidative damage on kidney of rats. *Environ Toxicol* 2011, 26, 325-37.
- Kumaravel T.S. and Jha A.N.*: Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. *Mutat Res* 2006, 605, 7-16.
- Lee P.C.*: Distribution of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol to male newborn rats. *Endocrine* 1998, 9, 105-111.

28. Loyo-Rosales J.E., Rosales-Rivera G.C., Lynch A.M., Clifford P., Rice C.P., Torrents A.: Migration of nonylphenol from plastic containers to water and milk surrogate. *J Agric Food Chem* 2004, 52, 2016-20.
29. Mekkawy I.A., Mahmoud U.M., Sayed Ael-D.: Effects of 4-nonylphenol on blood cells of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Tissue Cell* 2011, 43, 223-29.
30. Mendiola-Cruz M.T. and Morales-Ramirez P.: Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by single gel electrophoresis assay in murine leukocyte in vivo. *Mutat Res* 1999, 433, 45-52.
31. Morgan W.F., Day J.P., Kaplan M.I., McGhee E.M., Limoli C.L.: Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res* 1996, 146, 247-258.
32. Peridis P., Jha A.N., Langston W.J.: Measurements of the genotoxic potential of (xeno-) oestrogens in the bivalve mollusk *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic Toxicol* 2009, 94, 8-15.
33. Pollycove M. and Feinendegen L.E.: Radiation reduced versus endogenous DNA damage possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage, *Human Exp Toxicol* 2003, 22, 290-306.
34. Rivero C.L., Barbosa A.C., Ferreira M.F.N., Dorea J.G., Grisolia C.K.: Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction on nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicology* 2008, 17, 732-37.
35. Singh N.P., Mc Coy M., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantization of low level of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175, 184-91.
36. Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N.: Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Internat* 2008, 14, 1033-49.
37. Soto A.M., Justica H., Wray J.W., Sinnenschein C.: p-Nonylphenol as estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. *Environ Health Perspect* 1991, 92, 167-73.
38. Sowa M., Arthurs J., Estes B.J., Morgan W.F.: Effects of ionizing radiation on cellular structure, induced instability and carcinogenesis. *EXS* 2006, 96, 293-301.
39. Tayama S., Nakagawa Y., Tayama K.: Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutat Res* 2008, 649, 114-25.
40. Ueno S., Kashimoto T., Susa N., Natsume H., Toya M., Ito N., Takeda-Homma S., Nishimura Y., Sasaki Y.F., Sugiyama M.: Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mutat Res* 2007, 634, 135-45.
41. UNSCEAR (2008) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and effects of ionizing radiation. United Nations Publication. New York 2010.
42. White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G.: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994, 135, 175-82.
43. Woo G.-H., Shibutani M., Ichiki T., Hamamura M., Lee K.-Y., Inoue K., Hirose M.: A repeated 28-day oral dose toxicity study on nonylphenol in rats, based on the 'Enhanced OECD test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol* 2007, 81, 77-88.

Otrzymano: 26.03.2012

Zaakceptowano do druku: 12.09.2012