

Elżbieta Bruchajzer, Barbara Frydrych, Jadwiga A. Szymańska

OCENA WYBRANYCH PARAMETRÓW HEPATOTOKSYCZNEGO DZIAŁANIA ETERU OKTABROMODIFENYLOWEGO PO JEDNORAZOWYM I WIELOKROTNYM PODANIU SZCZUROM*)

Zakład Toksykologii, Katedry Toksykologii i Bromatologii,
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. *A. Sapota*

W pracy podjęto próbę oceny toksycznego działania eteru oktabromodifenyloвого po jednorazowym i wielokrotnym podawaniu samicom szczurów. Analizę wykonano wykorzystując wybrane parametry biologiczne (zmiana masy ciała, względna masa wątroby) i biochemiczne (aktywność ALAT, AspAT w surowicy, suma cytochromów P-450 w wątrobie) wykorzystywane do oceny działania hepatotoksycznego.

Hasła kluczowe: eter oktabromodifenyłowy, toksyczność ostra, podawanie wielokrotne, hepatotoksyczność, szczury.

Key words: octabromodiphenyl ether, acute toxicity, repeated administration, hepatotoxicity, rats.

Eter oktabromodifenyłowy (OktaBDE) to substancja zmniejszająca palność, stosowana do produkcji syntetycznych polimerów i tworzyw sztucznych (ABS, HIPS, PBT), wykorzystywanych w przemyśle samochodowym, elektrycznym i elektronicznym. Handlowe preparaty OktaBDE (Bromkal 79-8DE, DE-79, Saytex 111, Tardex 80) były mieszaninami eterów difenyłowych zawierających od 5 do 10 atomów bromu, w których brom stanowił 79% masy. OktaBDE, podobnie jak inne polibromowane difenyloetery (PBDE): eter pentabromodifenyłowy (PentaBDE) i dekabromodifenyłowy (DekaBDE), zaliczono do trwałych zanieczyszczeń organicznych (ang.: POPs, persistent organic pollutants), które ze względu na swe właściwości fizykochemiczne (m.in. słabą rozpuszczalność w wodzie, stabilność termiczną i chemiczną) może powodować kontaminację środowiska naturalnego. Do organizmu człowieka te lipofilne związki, mogą dostawać się głównie z dietą bogatą w tłuszcze. Narażenie na PBDE występuje także w czasie recyklingu i utylizacji sprzętu elektrycznego i elektronicznego (1, 2).

Polibromowane difenyloetery wykazują wiele wspólnych cech i efektów działania toksycznego. Stwierdzono, że związki te powodują zaburzenia w funkcjonowaniu tarczycy, wątroby, zdolności rozrodczych oraz rozwoju płodu i młodych

* Praca finansowana z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Nr 503/3-045-01/503-01).

osobników (1–3). Dotychczas najlepiej poznana jest toksyczność PentaBDE, a najmniej – OktaBDE (1, 2, 4–7). Z doświadczeń wykonanych wcześniej w Zakładzie Toksykologii wynika, że OktaBDE podawany wielokrotnie może powodować zaburzenia w syntezie porfiryn (8). Po jednorazowym i wielokrotnym podawaniu OktaBDE obserwowano także efekty świadczące o stresie oksydacyjnym (dane nieopublikowane).

Celem pracy była ocena toksycznego działania OktaBDE na wątrobę po jednorazowym i wielokrotnym podawaniu związku samicom szczurów szczepu Wistar.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na samicach szczurów Wistar, o masie ciała 190–230 g. Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Szczury karmione były paszą standardową „Muligran” i otrzymywały wodę *ad libitum*. Zwierzęta podzielone były na grupy liczące po 4 (grupy kontrolne) lub 5 szczurów (grupy badane) w każdej. Eksperymenty prowadzono zgodnie z procedurami i obowiązującym w Polsce prawem (9), po uzyskaniu wcześniej zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (pozwolenie Nr 17/ŁB457/2009).

Podawany szczurom OktaBDE był mieszaniną zawierającą: 65,7% eteru okta-bromodifenylowego, 14,8% hepta-, 1,7% hekso- oraz 17,8% eteru nona- i dekabromodifenylowego. Zsyntetyzowano go w Zakładzie Chemii Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. OktaBDE podawano szczurom dożołądkowo (sondą) po rozpuszczeniu lub zawieszeniu (w przypadku wysokich dawek) w oleju słonecznikowym, w objętości 0,5 cm³/200 g masy szczura.

W eksperymencie oceniającym toksyczność ostrą stosowano: grupę kontrolną (kontrolę czyste, czyli zwierzęta nie otrzymujące żadnego związku) oraz 3 grupy badawcze, którym podawano OktaBDE w dawkach 25, 200 lub 2000 mg/kg masy ciała. Przy założeniu, że medialna dawka śmiertelna (DL₅₀) dla OktaBDE jest wyższa niż 5000 mg/kg m.c. (wg danych producentów preparatów handlowych), podawane dawki stanowiły odpowiednio: 0,5%, 4% lub 40% DL₅₀.

W doświadczeniu oceniającym toksyczność podostrą, stosowano dwie grupy kontrolne (kontrolę czyste i olejowe) oraz pięć grup zwierząt narażanych na OktaBDE w dawkach: 0,4, 2, 8, 40 lub 200 mg/kg/dzień. Czas ekspozycji szczurów wynosił 7, 14, 21 lub 28 dni.

Po 4, 12, 24, 48 i 120 godz. po podaniu jednorazowym oraz po 24 godz. po ostatniej dawce w narażeniu wielokrotnym, szczury będące w lekkiej narkozie eterowej były skrwawiane przez punkcję dosercową. Uzyskana z krwi surowica posłużyła do oznaczeń enzymów wskaźnikowych uszkodzenia wątroby: aminotransferazy alaninowej (AlAT, EC 2.6.1.2) i asparaginianowej (AspAT; EC 2.6.1.1). Aktywność tych enzymów oznaczano za pomocą metody kolorymetrycznej z użyciem 2,4-dinitrofenylohydrazyny (10). Za jednostkę aktywności przyjęto liczbę μ moli powstałego w ciągu 1 godz. w temp. 37°C pirogronianu sodu w przeliczeniu na 1 cm³ surowicy.

Z homogenatu wątroby otrzymano frakcję mikrosomów poprzez ich strącenie metodą agregacji i sedymentacji z CaCl_2 . We frakcji tej oznaczono stężenie białka (11) i poziom sumy cytochromów P-450 (12, 13).

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono za pomocą programu SYSTAT for Windows. Istotność różnic dla wybranych parametrów wyliczono stosując test Tukey'a, po sprawdzeniu jednorodności wariancji testem Bartletta.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W doświadczeniu oceniającym toksyczność ostrą OktaBDE w każdym punkcie pomiarowym stosowano kontrole czyste, które połączono we wspólną grupę kontrolną, wobec której wykonano analizę statystyczną wyników. Podobnie postąpiono w doświadczeniu, w którym szczury narażane były przez 7–28 dni. W eksperymencie tym stosowano także grupy zwierząt, otrzymujących olej. Z powodu różnej liczby stosowanych dawek (7, 14, 21 lub 28) wyników uzyskanych z kontroli olejowych nie połączono ze sobą.

Ocena hepatotoksyczności po jednorazowym podaniu OktaBDE

Po jednorazowym podaniu szczurom OktaBDE zanotowano zmiany w masie ciała zwierząt (tab. I). Po 24 godz. od podania dwóch najwyższych dawek stwierdzono istotne statystycznie obniżenie przyrostu masy ciała. Po najwyższej dawce (2000 mg/kg m.c.) obniżona masa ciała w porównaniu z kontrolą utrzymywała się (na poziomie niższym o ok. 7%) do końca okresu obserwacji.

Tabela I. Poziom wybranych parametrów (średnie \pm SD) biologicznych (zmiana masy ciała) i biochemicznych (aktywność AIAT i AspAT w surowicy) po jednorazowym podaniu szczurom OktaBDE

Table I. The level of selected biological (change in body mass) and biochemical (ALT and AST activity in serum) parameters (mean \pm SD) after single administration of OctaBDE to rats

Dawki OktaBDE mg/kg m.c.	Czas po podaniu (godz.)				
	4	12	24	48	120
Zmiana masy ciała (%)					
0 (kontrola czysta)		96,9 \pm 1,59	101,3 \pm 1,30	102,3 \pm 1,41	102,4 \pm 0,71
25		95,4 \pm 1,94	98,7 \pm 2,00	101,1 \pm 1,08	103,5 \pm 0,65
200		97,2 \pm 1,59	98,7 \pm 1,12 a	99,3 \pm 2,88	102,8 \pm 1,48
2000		97,3 \pm 1,56	97,6 \pm 1,00 a	94,8 \pm 1,50 a	95,4 \pm 1,86 a
Aktywność AIAT w surowicy (μmol pirogronianu/ cm^3 surowicy)					
kontrola czysta z połączonych grup kontrolnych: 1,965 \pm 0,445					
25	2,286 \pm 0,123	2,088 \pm 0,378	1,796 \pm 0,451	2,273 \pm 0,159	2,450 \pm 0,267
200	2,460 \pm 0,209	2,135 \pm 0,544	1,667 \pm 0,544	2,128 \pm 0,345	2,743 \pm 0,141 a
2000	2,446 \pm 0,343	2,217 \pm 0,235	1,906 \pm 0,418	2,428 \pm 0,502	2,429 \pm 0,443

Tabela I. (cd.)

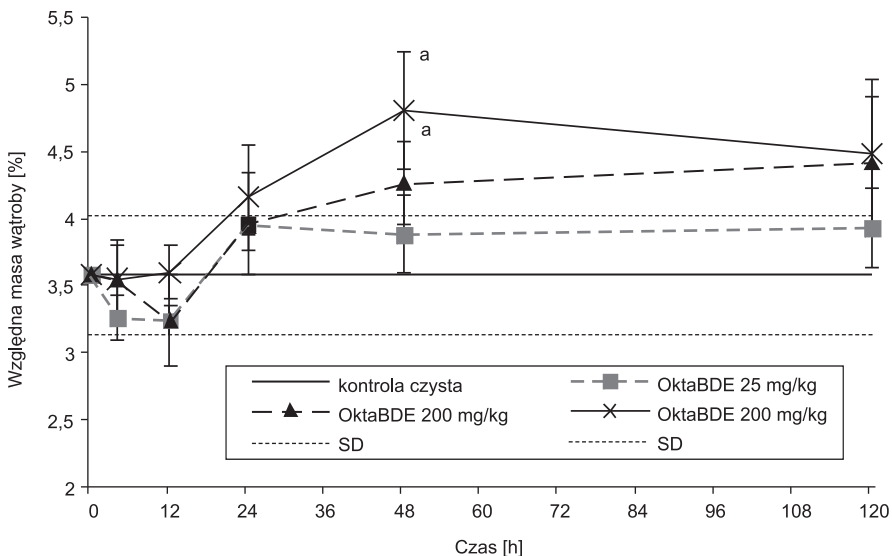
Table I. (cont.)

Dawki OktaBDE mg/kg m.c.	Czas po podaniu (godz.)				
	4	12	24	48	120
Aktywność AspAT w surowicy (μmol pirogronianu/ cm^3 surowicy)					
kontrola czysta z połączonych grup kontrolnych: $2,241 \pm 0,472$					
25	$2,171 \pm 0,121$	$2,347 \pm 0,324$	$1,609 \pm 0,238$	$2,213 \pm 0,640$	$2,362 \pm 0,527$
200	$2,090 \pm 0,477$	$2,279 \pm 0,188$	$1,366 \pm 0,232$ a	$2,224 \pm 0,543$	$2,703 \pm 0,481$
2000	$2,193 \pm 0,300$	$2,199 \pm 0,263$	$1,623 \pm 0,184$	$2,184 \pm 0,187$	$2,581 \pm 0,416$

a – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli czystej, $\alpha = 0,05$;

a – significantly different from pure control animals, $\alpha = 0.05$.

Istotnie statystycznie zmiany wystąpiły także w stosunku masy wątroby do całkowitej masy ciała (ryc. 1). Po 48 godz. od podania OktaBDE w dawkach 200 i 2000 mg/kg stwierdzono wzrost względnej masy wątroby o ok. 25–35%. Efekt taki utrzymywał się do końca okresu obserwacji. Dane pochodzące z piśmiennictwa również wskazywały na wzrost tego parametru. Efekt taki obserwowano jednak po nieco dłuższej, 4-dniowej ekspozycji szczurów na DE-79 w dawkach 10–100 mg/kg/dzień (6) oraz po 14 dniach w dawce ok. 80 mg/kg/dzień (14).



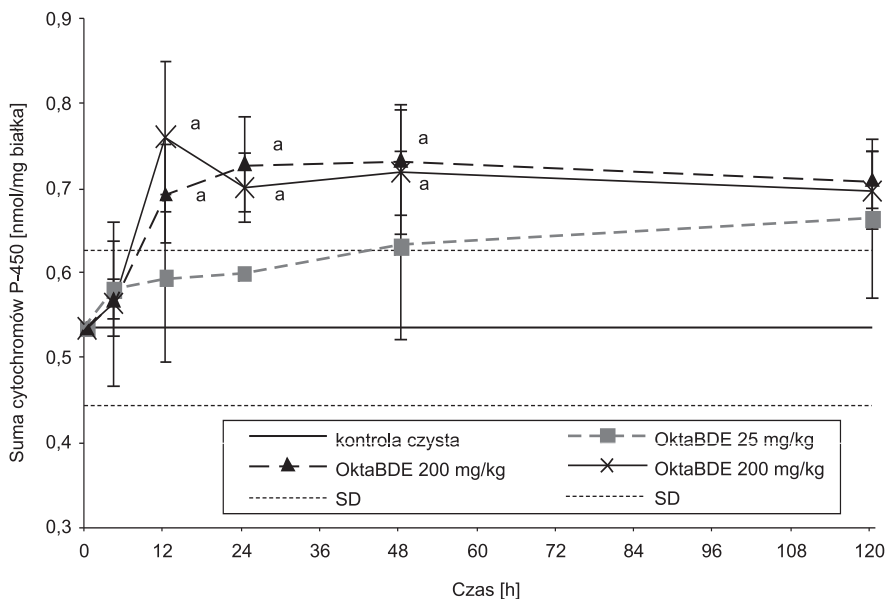
Ryc. 1. Zmiana względnej masy wątroby (%) po jednorazowym podaniu OktaBDE szczurom. Na rycinie przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe (SD).

a – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli czystej, $\alpha = 0,05$.

Fig. 1. Change in relative mass of liver (%) after a single administration of OktaBDE to rats. The results represent mean followed by standard deviation (SD).

a – significantly different from non-exposed control animals, $\alpha = 0,05$.

Wzrostowi względnej masy wątroby często towarzyszy indukcja enzymów mikrosomalnych wątroby. Po jednorazowym podaniu OktaBDE w dawkach 200 i 2000 mg/kg stwierdzono znamienne statystycznie podniesienie (o ok. 30–45%) stężenia sumy cytochromów P-450 w wątrobie (ryc. 2).



Ryc. 2. Poziom sumy cytochromów P-450 w mikrosomach wątroby (nmol/mg białka) po jednorazowym podaniu OktaBDE szczurom. Na rycinie przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe (SD). a – wynik znamiennej statystycznie w stosunku do kontroli czystej, $\alpha = 0,05$.

Fig. 2. Total levels of microsomal cytochrome P-450 in the liver (nmol/mg of protein) after a single administration of OctaBDE to rats. The results represent mean followed by standard deviation (SD). a – significantly different from non-exposed control animals, $\alpha = 0,05$.

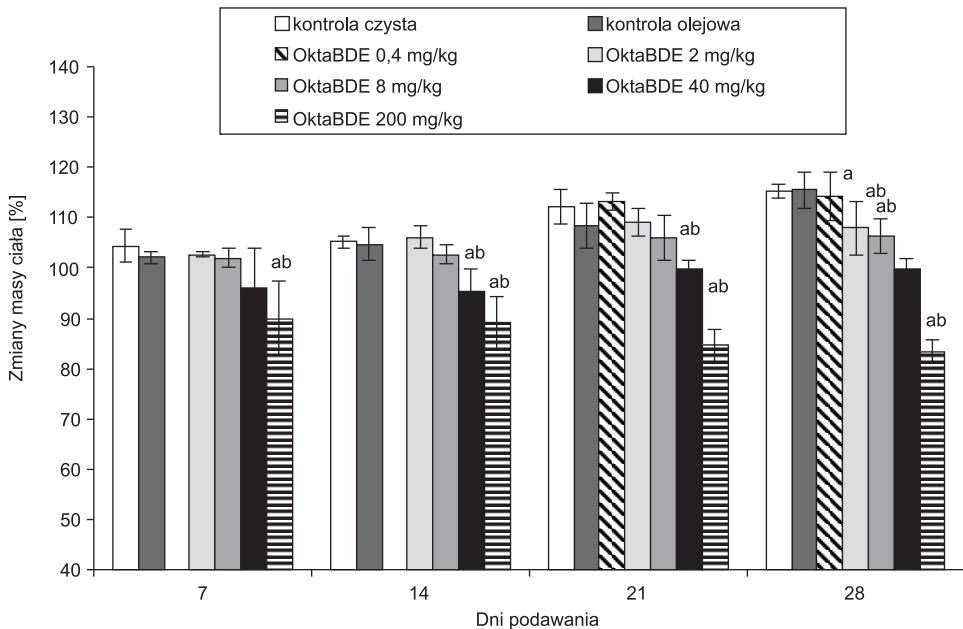
Analiza aktywności AlAT i AspAT w surowicy nie wykazała wyraźnych zmian, które świadczyłyby o hepatotoksyczności OktaBDE po jednorazowym podaniu związku szczurom (tab. I).

Ocena hepatotoksyczności po wielokrotnym podawaniu OktaBDE

Po wielokrotnym podawaniu szczurom OktaBDE zanotowano obniżenie przyrostu masy ciała zwierząt (ryc. 3). Efekty takie (istotne statystycznie) po 7 dniach narażenia obserwowano tylko po najwyższej dawce (200 mg/kg/dzień), po 14 i 21 dniach – po dawkach 40 i 200 mg/kg/dzień. Ekspozycja 28-dniowa spowodowała obniżenie przyrostu masy ciała już po dawce 2 mg/kg/dzień. Po tym czasie po wyższych dawkach (8–200 mg/kg/dzień) efekty te nasiliły się. Po najwyższej dawce podawanej przez 28 dni badany parametr był obniżony o prawie 30% w porównaniu z grupą kontrolną.

Po wielokrotnym podawaniu OktaBDE zanotowano także, zależny od dawki, wzrost względnej masy wątroby (ryc. 4). Po podawaniu dwóch najwyższych da-

wiek (40 i 200 mg/kg/dzień) był on wyższy od kontrolnego o ok. 40–55%. Tylko po najniższej z podawanych dawek (0,4 mg/kg/dzień) nie zaobserwowano wzrostu poziomu tego parametru. Dostępne w piśmiennictwie dane wskazują, że po miesięcznej ekspozycji na OktaBDE zwiększenie względnej masy wątroby notowano, gdy komercyjny związek podawano w dawkach 100, 1000 i 10000 ppm w diecie, co odpowiadało ok. 8–10, 82–106 i 1000 mg/kg m.c./dzień (2).



Ryc. 3. Zmiana masy ciała (%) po wielokrotnym podawaniu OktaBDE szczurom. Na rycinie przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe (SD).

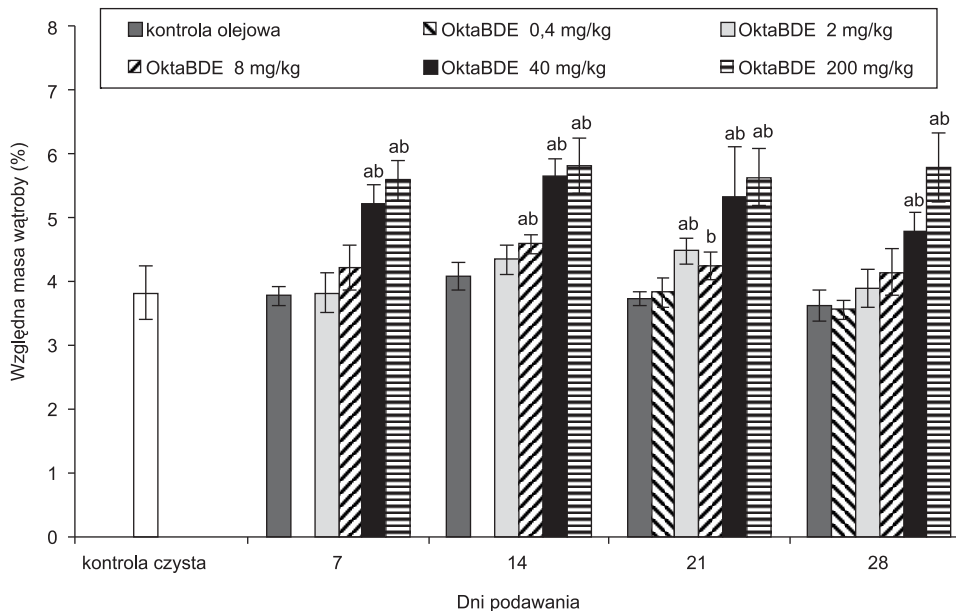
a – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli czystej, $\alpha = 0,05$; b – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli olejowej, $\alpha = 0,05$.

Fig. 3. Change in body mass (%) after repeated administration of OctaBDE to rats. The results represent mean followed by standard deviation (SD).

a – significantly different from non-exposed control animals, $\alpha = 0,05$; b – significantly different from oil control animals, $\alpha = 0,05$.

Wielokrotna ekspozycja szczurom na OktaBDE spowodowała także zmiany poziomu sumy cytochromów P450 w wątrobie (tab. II). Istotnie statystycznie zwiększenie stężenia tego wskaźnika (dochodzące do ok. 140% wartości kontrolnych) obserwowano po 14 i 28 dniach podawania. Efekty te nie były jednak zależne od wielkości podawanej dawki. Indukcję enzymów mikrosomalnych wątroby obserwowano także po podawaniu komercyjnego OktaBDE przez 14 dni (w dawce 80 mg/kg/dzień) oraz po znacznie dłuższej, 90-dniowej ekspozycji na dawki 5–20 mg/kg/dzień (14, 15).

OktaBDE podawany szczurom wielokrotnie, nie spowodował wzrostu aktywności AlAT w surowicy, co wskazywałoby na martwicę wątroby (tab. II).



Ryc. 4. Zmiana względnej masy wątroby (%) po wielokrotnym podawaniu OktaBDE szczurom. Na rycinie przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe (SD).

a – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli czystej, $\alpha = 0,05$; b – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli olejowej, $\alpha = 0,05$.

Fig. 4. Change in relative mass of liver (%) after the repeated administration of OctaBDE to rats. The results represent mean followed by standard deviation (SD).

a – significantly different from non-exposed control animals, $\alpha = 0,05$; b – significantly different from oil control animals, $\alpha = 0,05$.

Tabela II. Wybrane parametry biochemiczne (średnie \pm SD) (poziom sumy cytochromów P-450 w mikrosomach wątroby i aktywność AlAT w surowicy) po wielokrotnym podaniu szczurom OktaBDE

Table II. The selected biochemical parameters (mean \pm SD) (total levels of microsomal cytochrome P-450 in the liver and activity of ALT in the serum) after repeated administration of OctaBDE to rats

Rodzaj ekspozycji	Dni podawania			
	7	14	21	28
Suma cytochromów P-450 w wątrobie (nmol/mg białka mikrosomalnego)				
kontrola czysta z połączonych grup kontrolnych: 0,943 \pm 0,199				
kontrola olejowa	0,714 \pm 0,082	1,248 \pm 0,103	0,872 \pm 0,090	0,889 \pm 0,136
OktaBDE 0,4 mg/kg/dzień			1,027 \pm 0,112	1,033 \pm 0,036
OktaBDE 2 mg/kg/dzień	0,860 \pm 0,110	1,224 \pm 0,067	1,207 \pm 0,112 b	1,316 \pm 0,051 ab
OktaBDE 8 mg/kg/dzień	0,861 \pm 0,083	1,157 \pm 0,078	1,132 \pm 0,187	1,360 \pm 0,129 ab
OktaBDE 40 mg/kg/dzień	1,035 \pm 0,190	1,323 \pm 0,070 a	1,078 \pm 0,036 b	0,990 \pm 0,131
OktaBDE 200 mg/kg/dzień	0,977 \pm 0,409	1,008 \pm 0,181	0,884 \pm 0,271	0,787 \pm 0,121

Tabela II. (cd.)

Table II. (cont.)

Rodzaj ekspozycji	Dni podawania			
	7	14	21	28
Aktywność AIAT w surowicy (μmol pirogronianu/ cm^3 surowicy)				
kontrola czysta z połączonych grup kontrolnych: $2,124 \pm 0,379$				
kontrola olejowa	$1,609 \pm 0,293$	$1,930 \pm 0,206$	$2,386 \pm 0,121$	$2,388 \pm 0,322$
OktaBDE 0,4 mg/kg/dzień			$2,473 \pm 0,469$	$2,421 \pm 0,279$
OktaBDE 2 mg/kg/dzień	$1,837 \pm 0,372$	$2,047 \pm 0,251$	$3,264 \pm 0,551$ ab	$2,553 \pm 0,348$
OktaBDE 8 mg/kg/dzień	$1,901 \pm 0,225$	$2,394 \pm 0,431$	$2,101 \pm 0,251$	$2,577 \pm 0,356$
OktaBDE 40 mg/kg/dzień	$2,001 \pm 0,730$	$1,780 \pm 0,456$	$3,053 \pm 0,616$	$2,212 \pm 0,389$
OktaBDE 200 mg/kg/dzień	$2,220 \pm 0,144$ b	$1,769 \pm 0,301$	$1,749 \pm 0,412$ b	$0,226 \pm 0,388$

a – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli czystej, $\alpha = 0,05$; b – wynik znamieny statystycznie w stosunku do kontroli olejowej, $\alpha = 0,05$;

a – significantly different from pure control animals, $\alpha = 0,05$; b – significantly different from oil control animals, $\alpha = 0,05$.

WNIOSKI

1. Zarówno po jednorazowym, jak i wielokrotnym podawaniu szczurom OktaBDE nie stwierdzono martwicy wątroby.

2. Po jednorazowym podaniu OktaBDE efekty toksycznego działania związku (zmniejszenie przyrostu masy ciała, wzrost względnej masy wątroby, zwiększenie poziomu sumy cytochromów P-450 w wątrobie) obserwowano po dwóch najwyższych dawkach: 200 i 2000 mg/kg m.c. Po najniższej dawce – 25 mg/kg – nie zano-towano efektów działania toksycznego (NOAEL).

3. Po wielokrotnym podawaniu OktaBDE najniższą dawką powodującą toksyczne działanie związku była dawka 2 mg/kg/dzień (LOAEL). Obserwowano wtedy wzrost względnej masy wątroby i indukcję sumy cytochromów P-450 w wątrobie.

4. Za najwyższy poziom niewywołujący działania toksycznego (NOAEL) po wielokrotnym podawaniu OktaBDE można przyjąć dawkę 0,4 mg/kg/dzień.

E. Bruchajzer, B. Frydrych, J.A. Szymańska

THE EVALUATION OF SELECTED PARAMETERS OF HEPATOTOXICITY
OF OCTABROMODIPHENYL ETHER AFTER SINGLE
AND REPEATED ADMINISTRATION TO RATS

S u m m a r y

The aim of this study was to evaluate the toxicity of octabromodiphenyl ether (OctaBDE) – a flame retardant – on the rat liver. Female rats were used in the experiment. The animals were exposed intragastrically, either to single doses of 25 – 2000 mg/kg b.w., or received the chemical intragastrically at doses 0.4

to 200 mg/kg/day for 7 to 28 days. Both after single and repeated administration, there was no increase in the activity of the indicators of liver necrosis (ALT, AST). After the single administration of OctaBDE at the lowest of dose (25 mg/kg b.w.), the changes in the analyzed parameters were not observed – therefore the dose may be assumed to represent the NOAEL. Exposure to the higher doses (200 and 2000 mg/kg b.w.) resulted in reduced body weight gain, increased relative liver mass and increased total cytochromes P-450 in the liver. Changes in these parameters were also observed after repeated administration of OctaBDE at 2 – 200 mg/kg/day. After repeated exposure to this compound at the dose of 0.4 mg/kg/day, there were no toxic effects (NOAEL).

PIŚMIENNICTWO

1. EU RAR. European Union Risk Assessment Report. Diphenyl ether, pentabromo derivative (pentabromodiphenyl ether). CAS No.: 32534-81-9, EINCES No.: 251-084-2. Risk Assessment, United Kingdom, 2000. – 2. EU RAR. European Union, Risk Assessment Report. Diphenyl ether, octabromo derivative (octabromodiphenyl ether). CAS No.: 32536-52-0, EINCES No.: 251-087-9. Risk Assessment, Institute for Health and Consumer Protection. European Chemical Bureau, European Communities, 2003. – 3. *Zhou T., Taylor M.M., DeVito M.J., Crofton K.M.*: Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicol. Sci.*, 2002; 66: 105-116. – 4. *Bruchajzer E., Frydrych B., Sporny S., Szymańska J.A.*: Toxicity of Penta- and Decabromodiphenyl ethers after repeated administration to rats: a comparative study. *Arch. Toxicol.*, 2010; 84: 287-299. – 5. *Bruchajzer E., Frydrych B., Sporny S., Szymańska J.A.*: The effect of short-term intoxication of rats with pentabromodiphenyl ether (in mimic commercial products). *Hum. Exp. Toxicol.*, 2011; 30(5): 363-378. – 6. *Zhou T., Ross D.G., DeVito M.J., Crofton K.M.*: Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicol. Sci.*, 2001; 61: 76-82. – 7. *van der Ven L.T.M., van de Kuil T., Verhoef A., Leonards P.E.G., Slob W., Canton R.F., Germer S., Hamers T., Visser T.J., Litens S., Hakansson H., Fery Y., Schenk D., van den Berg M., Piersma A.H., Vos J.G.*: A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. *Toxicology*, 2008; 245: 109-122. – 8. *Bruchajzer E., Frydrych B., Szymańska J.A.*: Octabromodiphenyl ether – porphyrogenicity after repeated administration to rats. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2012; 25(4): 392-403. – 9. *Dziennik Ustaw*, Nr 33, poz. 289. Ustawa z dnia 21 stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach, 2005. – 10. *Poznańska E., Osiński T.*: Modyfikacja kolorymetrycznej metody oznaczania aminotransferaz w surowicy krwi. *Diagnost. Laborat.*, 1968; 4: 349-353.
11. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.*: Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-274. – 12. *Cinti D.L., Moldens P., Shenkman I.B.*: Kinetic parameters of drug metabolizing in Ca²⁺ sedimented microsomes from rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 1972; 21: 3249-3256. – 13. *Guengrich F.P.*: Analysis and characterisation of enzymes. Principles and methods of Toxicology. Walence Hayes (red.), III wyd. Raven Press LTD. New York, 1994. – 14. *Carlson G.P.*: Introduction of xenobiotic metabolism in rats by short-term administration of brominated diphenyl ethers. *Toxicol. Lett.*, 1980; 5: 19-25. – 15. *Carlson G.P.*: Introduction of xenobiotic metabolism in rats by brominated diphenyl ethers administered for 90 days. *Toxicol. Lett.*, 1980; 6: 207-215.