

The preemptive role of C and E vitamin against deleterious role of bisphenol A in Albino rats on tissue changes in liver and kidney

Albino rats على تاثير البيسفينول A في الجرذان الفاعل المضاد لفيتامين E و C على التغيرات النسجية للكبد والكلية

مواهب بشير جاسم أ.د عبد الامير عودة اسماعيل¹ أ.د كريم حميد رشيد²
1- كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء
2- كلية العلوم – جامعة بابل

المخلص :

اجريت الدراسة الحالية في البيت الحيواني لكلية الطب البيطري- جامعة كربلاء لمعرفة مدى التأثير السمي نتيجة التعرض لمادة البيسفينول A اثناء مدة الحمل والرضاعة على التغيرات النسجية لكل من الكبد و الكلية في الجيل الاول من الذكور المعاملة

استخدمت في هذه الدراسة 30 انثى جرد حامل قسمت بالتساوي الى ستة مجاميع, المجموعة الاولى جرعت فمويا بزيت الذره النقي واعتبرت كمجموعة سيطرة سالبة ومجموعتين جرعت المجموعة الاولى فيتامين C فقط بتركيز 500 ملغرام وجرعت المجموعة الثانية فيتامين E فقط بتركيز 200 ملغرام واعتبرت مجموعة سيطرة موجبة وجرعت المجموعة الرابعة مادة البيسفينول و محلول زيت الذره وجرعة مقدارها 200 ملغرام لكل كيلوغرام من وزن الجسم والمجموعة الخامسة جرعت البيسفينول وبنفس الطريقة السابقة بالاضافة الى فيتامين C بتركيز 500 ملغرام وجرعت المجموعة السادسة بالبيسفينول وفيتامين E بتركيز 200 ملغرام ابتداء من اليوم السادس من الحمل وصولا الى عمر الفطام ثم تم فصل الجيل الاول من صغار الجرذان الى ذكور واثان حيث تم قتل الذكور بعد وصولها الى سن البلوغ لغرض دراسة الاعضاء الداخلية المذكورة اعلاه . وقد اظهرت نتائج الدراسة حصول تغيرات نسجية مرضية في كل المجاميع المعاملة بالبيسفينول حتى بوجود مضادات الاكسدة فيتاميني E و C

Abstract

This study was carried out at the college of Veterinary Medicine, Kerbala University to determine the effect of pre- and postnatal exposure to Bisphenol A (BPA) on histopathology of Liver and Kidney Thirty pregnant female rats (F0) were divided to six groups the first group gave corn oil as control group and 2 positive control groups the first group treated with vitamin C concentration 500 mg and another group treated with vitamin E concentration 200 mg the fourth group treated one dose of BPA suspended in corn oil 200 mg/kg/BW ,the fifth one treated with BPA and vit. E concentration 500 mg . and the sixth group treated with BPA and vit. C 500 mg concentration from gestational day (GD) 6 through postnatal day (PND) 21. The weanlings (F1) from all treated groups(6 of each group) then were subjected to necropsy 3 months of age. The results of Histopathologic effects of Bisphenol A on liver and kidney of male rats showed that the treatment with BPA or BPA with antioxidant (C+E) resulted in deleterious effects in liver and kidney. From the present study it has been revealed that the antioxidant vitamins C and E don't have preemptive role against deleterious role of bisphenol A.

المقدمة

ازدادت في السنوات الأخيرة الاصابة بامراض كثيرة بفعل مواد لها القدرة على تغيير او احداث خلل في وظيفة جهاز الغدد الصم والجسم بصورة عامة ومن هذه المواد هو البيسفينول , الذي انتشر في كل مكان من البيئة خلال الثمانين عام الماضية بسبب دخوله في صناعة العديد من المنتجات الاستهلاكية يومية الاستخدام مثل القناني البلاستيكية , قناني رضاعات الاطفال , المنظفات , لعب الاطفال , مستحضرات التجميل , مبيدات الحشرات , مواد البناء , حافظات الأغذية , المواد الالكترونية , وغيرها [1] . وقد ازدادت الحاجة إلى البيسفينول أ خلال السنوات الأخيرة حيث بلغ الانتاج العالمي منه في سنة 2003 (2.3) مليون طن متري في حين تزايد الانتاج في العام 2011 إلى أكثر من (5.5) مليون طن متري [2] [3] . ذكرت هذه الدراسات ان مستويات البيسفينول الأقل والمساوية 50 ملغم/كغم من وزن الجسم تعتبر سامة ومؤثرة في تكاثر وتطور ذكور واثان الجرذان والفئران و تعمل المستويات الأعلى من 500 ملغم/كغم بالتأثير على خصوبة الفئران (ذكور, اناث) وقد تؤثر على اختزال وزن الجسم والأعضاء الداخلية وزيادة سمية الكبد [4]. يعمل فيتامين C (حامض الاسكوربيك) وهو مضاد اكسدة باطني المنشأ على حماية الخلايا من

الفعل المعادي لجذور الاوكسجين الحرة باعطائه ذرة هيدروجين , كما ثبت بأن فيتامين E وهو مانع اكسدة في الانسجة التكاثرية، كما يعمل هذان الفيتامينان كموانع تأكسد حيث يعملان على حماية خلايا الدماغ [5] . لذا فقد هدفت الدراسة الحالية الى دراسة تأثير مادة البيسفينول A عند التعرض لها خلال فترتي الحمل والرضاعة على التغيرات النسيجية للكبد والكلية ودراسة الدور الوقائي لفيتاميني E و C في التقليل من هذه التأثيرات او الحد منها .

المواد وطرائق العمل :

المركب قيد التجربة البيسفينول A الاسم التجاري هو البيسفينول A (99%, CAS80-05-7, BPA) تم استيراده من شركة Sigma الأميركية وزيت ذرة الذي استخدم في إذابة مركب البيسفينول A وفي تجريع مجموعة السيطرة تم تحضير المحلول الذي جرعت به الجرذان بإذابة البيسفينول A في زيت الذرة اسبوعياً و حسب المجموعة المراد إعطاءها لكل مجموعة من الجرذان الاناث الحوامل التي جرعت البيسفينول A

تضمنت الدراسة الحالية 30 انثى جرذ بالغة و 10 جرذان ذكور بالغة من نوع *Albino rats* حصلنا عليها من وحدة المختبر , في كلية الصيدلة , جامعة كربلاء , العراق . بعمر تراوح ما بين 14- 16 اسبوع و تراوح معدل اوزانها ما بين (200 – 250 غم) للأنثى و (250 – 300) غم للذكور والحيوانات بصحة جيدة ووضعت في اقفاص معدنية , لتجنب التعرض للبيسفينول A الذي قد تتعرض له الجرذان في حالة الاقفاص البلاستيكية وزودت الاقفاص بقناني زجاجية لتزويد الحيوانات بالماء , وضعت الحيوانات في البيت الحيواني لمدة 30 يوم قبل بدأ التجربة وذلك لغرض التطبع والتكيف مع أجواء البيت الحيواني وخضعت لنظام الضوء 12/12 ساعة من الضوء والظلام طول مدة التجربة.

تزاوجت الاناث البالغة مع الذكور البالغة في اقفاص منعزلة , بعد التزاوج أخذت منها مسحات مهبلية , للتأكد من وجود الحيامن حيث أن وجودها دليل على اليوم الصفر من الحمل (6) .

تم عزل الاناث الحوامل من هذه الجرذان وتقسيمها إلى ستة مجاميع رئيسية .

1- مجموعة السيطرة (control group) :- 5 أنثى حوامل جرعت زيت ذرة corn oil فقط بتركيز (0.5 مل/كغم من وزن الجسم) كل يوم .

2- المجموعة الثانية : 5 أنثى حوامل جرعت البيسفينول A بتركيز 200 ملغم/ كغم من وزن الجسم كل يوم بعد إذابته بزيت الذرة. (7) .

3- المجموعة الثالثة : 5 أنثى من الجرذان الحوامل جرعت فيتامين E بجرعة مقدارها 200 ملغم .

4- المجموعة الرابعة: 5 أنثى من الجرذان الحوامل جرعت فيتامين C بجرعة مقدارها 500 ملغم .

5- المجموعة الخامسة : 5 أنثى جرذان حوامل جرعت البيسفينول A بتركيز 200 ملغم/كغم من وزن الجسم مع جرعة من فيتامين E بتركيز 200 ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً .

6- المجموعة السادسة : 5 أنثى جرذان حوامل جرعت البيسفينول A بتركيز 200 ملغم/كغم من وزن الجسم مع جرعة من فيتامين C 500 بتركيز 200 ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً

الاناث الحوامل (منفصلة) جرعت البيسفينول A يومياً تبعاً للمجموعة التابعة لها من اليوم السادس للحمل إلى إنتهاء فترة الرضاعة .

كل الصغار في المجاميع المعاملة جمعت مع بعضها كل مجموعة لوحدها وعزلت على أساس الجنس حيث وضعت كل 4 صغار في قفص منعزل من ذكور و أنثى إلى حين البلوغ (90 يوم من العمر) . تم التضحية بستة افراد من كل مجموعة (ذكور) واخذت عينات الاعضاء لغرض دراسة التغيرات المرضية في الانسجة 0

تم استئصال الكبد, الكلية من جوف الحيوان وبعد ازالة المواد الدهنية والانسجة الملتصقة بها وزنت بميزان الكتروني , تم تثبيت العينات بالفورمالين بتركيز 10% بعد غسلها بمحلول Normal saline لغرض اجراء المقاطع النسيجية بعدما اجريت عليها سلسلة من العمليات اعتمادا على الطريقة الموصوفة (8) ثم فحصت السلايدات تحت المجهر الضوئي. لتحديد التغيرات النسيجية في الاعضاء قيد الدراسة وتصوير هذه التغيرات إن وجدت .

التحليل الاحصائي

تم اجراء جميع الاختبارات الاحصائية باستخدام نظام SPSS حيث تم التعبير عن النتائج بواسطة (المعدل $\pm$ الانحراف المعياري) (Mean $\pm$ SD) [9]

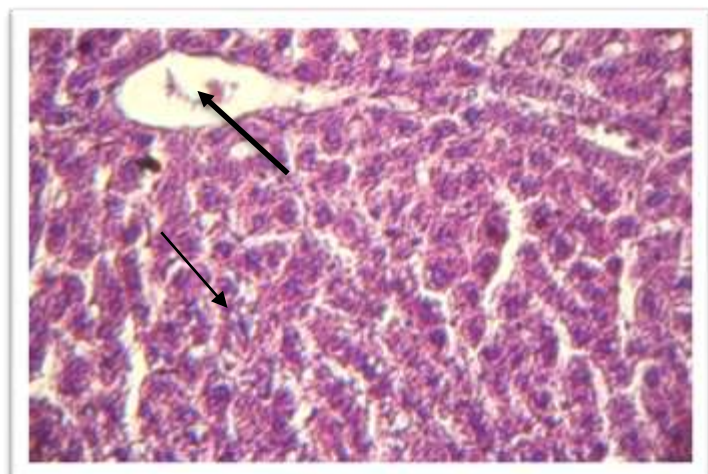
النتائج (Results)

1- الكبد (Liver)

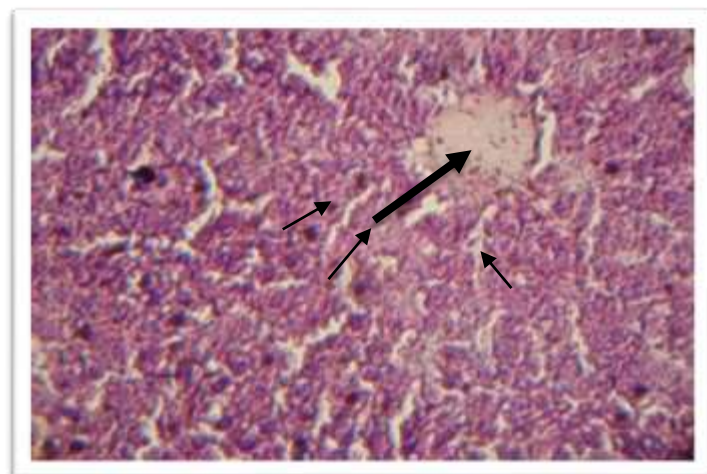
تبين الصور (1) (2) (3) مقاطع في نسيج الكبد لجرذ بالغ من مجموعة السيطرة والسيطرة الموجبة المعاملة بفيتاميني E , C على التوالي النسيج في الحالة الطبيعية حيث نلاحظ الوريد المركزي محاط بالخلايا الكبدية المرتبة بصورة شعاعية والجيبانيات sinusoid بين الخلايا الكبدية 0

في حين تبين الصورة (4) مقطع في نسيج الكبد لجرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم وجود تنخر تجلطي co agulative necrosis في النسيج الكبدي مع احتقان congestion بالوريد المركزي central vein كما اظهرت نتائج الفحص المجهرى ارتشاح الخلايا الالتهابية دلالة على وجود التهاب

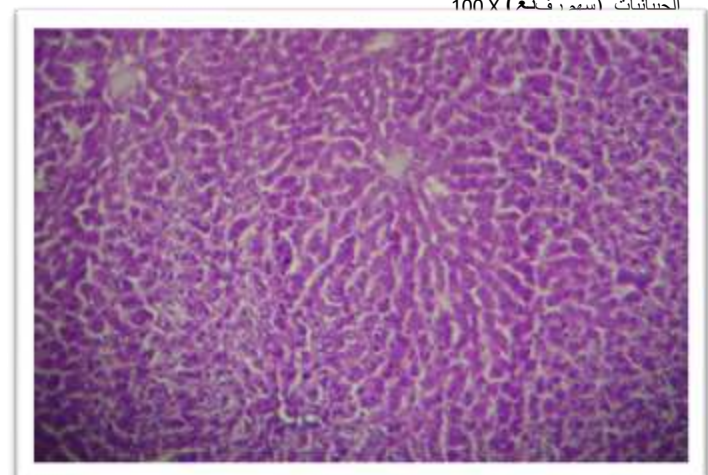
في حين تبين الصورة (5) مقطع في نسيج الكبد لجرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين C بتركيز 500 ملغ / كغم وجود احتقان شديد بالاوردة المركزية ووجود تغيرات تنكسية degenerative changes متمثلة بتفجي ساييتو بلازم الخلايا الكبدية hepatocytes وحصول التخر في بعض الخلايا تبين الصورة (6) مقطع في نسيج لجرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين E بتركيز 200 ملغ / كغم وجود احتقان شديد بالاوردة المركزية ووجود تغيرات تنكسية متمثلة بتفجي الخلايا الكبدية



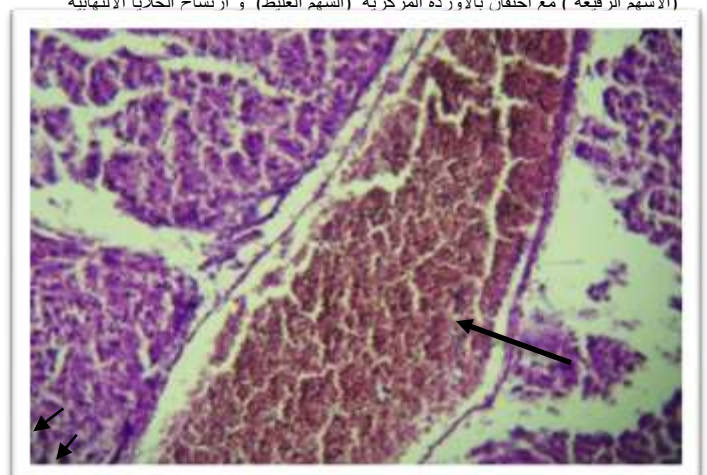
صورة (1) توضح مقطع لكبد جرذ ذكر من مجموعة السيطرة حيث نلاحظ وجود الوريد المركزي (سهم ممتلئ) داخل احد الفصيصات الكبدية مع وجود الخلايا الكبدية وتتموضع فيها الحبيبات (سهم رفيع) 100 X



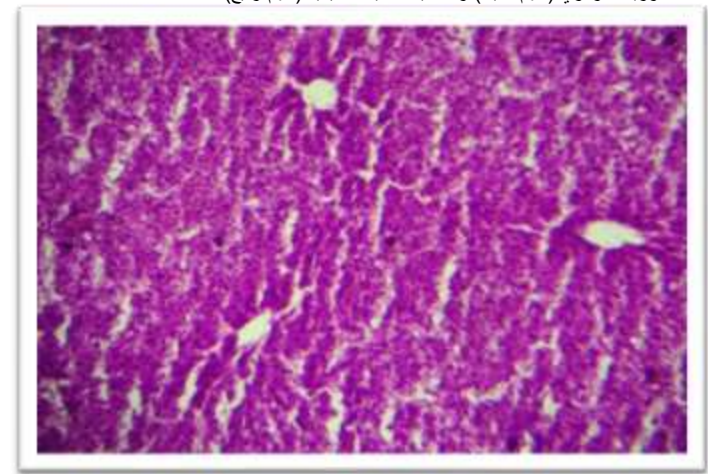
صورة (4) تبين التغيرات النسيجية في كبد جرذ معاملة بالبيسفينول بجرعة مقدارها 200 ملغ / كغم / وزن الجسم حيث نلاحظ وجود تخر تجلطي في المنطقة المحيطة بالوريد المركزي (السهم الرفيع) مع احتقان بالاوردة المركزية (السهم الغليظ) و ارتشاح الخلايا الالتهابية



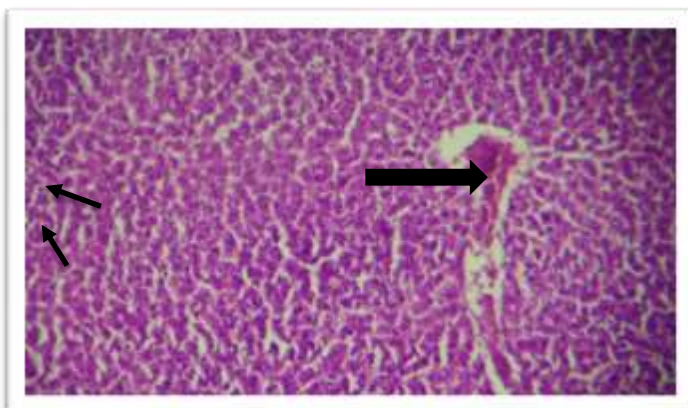
صورة (2) لمقطع نسيجي في كبد جرذ بالغ معاملة بفيتامين C بتركيز 500 ملغ تبين الوريد المركزي (سهم غليظ) والخلايا الكبدية الطبيعية (سهم رفيع) 100X



صورة (5) مقطع نسيجي لكبد جرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين C بتركيز 500 ملغ / كغم توضح احتقان شديد للوعاء الدموي (السهم) وجود تغيرات تنكسية متمثلة بوجود الفجوات في الخلايا الكبدية و nekrotic of nuclei اى حصول التخر (السهم الصغيرة) 400X



صورة (3) لمقطع نسيجي في كبد جرذ بالغ معاملة بفيتامين E بتركيز 200 ملغ تبين الوريد المركزي (سهم غليظ) والخلايا الكبدية الطبيعية (سهم رفيع) 100X



صورة (6) مقطع نسيجي في الكبد لجرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين E تبين وجود احتقان شديد للاوعية الدموية (السهم الغليظ) ووجود تغيرات تنكسية للخلايا الكبدية متمثلة بالتفجي (السهم الرفيع) 100 X

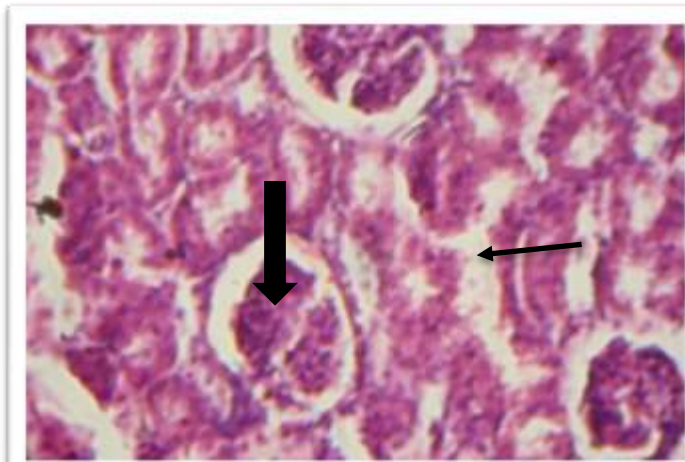
2- الك

3- الكلية (Kidney)

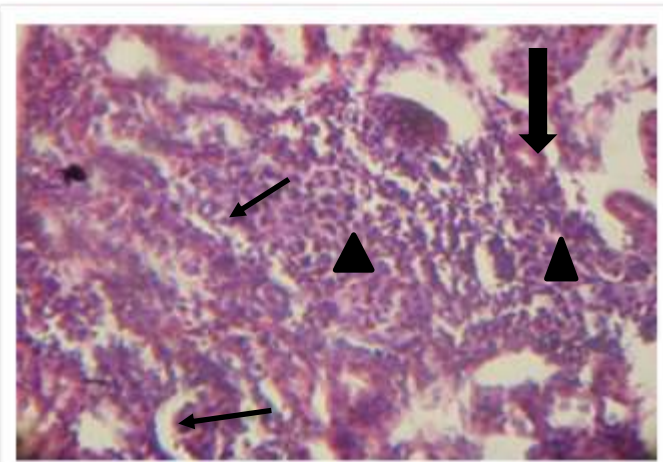
تبيين الصور (7) (8) (9) مقاطع في نسيج الكلية لجرذ بالغ من مجموعة السيطرة والسيطرة الموجبة المعاملة بفيتاميني C , E على التوالي النسيج في الحالة الطبيعية حيث نلاحظ الكبيبات glomeruli والنبيبات الكلوية renal tubules بالحالة الطبيعية ومساحات طبيعية لمحفظة بومان

في حين تبيين الصورة (10) مقطع في نسيج الكلية لجرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم التغيرات النسيجية المرضية المتمثلة بحدوث نزف في النسيج الخلالي الكلوي وارتشاح الخلايا الالتهابية وحصول تنخر تجلطي في النسيج الخلالي الكلوي والنبيبات والكبيبات الكلوية

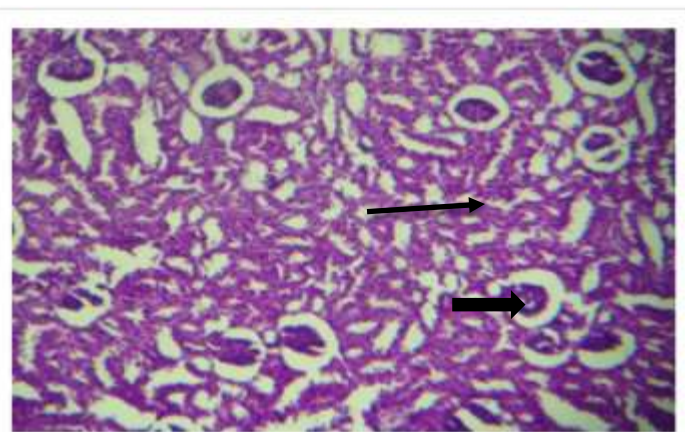
في حين تبيين الصورة (11) مقطع في نسيج الكبد لجرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين C بتركيز 500 ملغ / كغم وجود احتقان الاوعية الدموية مع وجود تنخر في النسيج الخلالي الكلوي وارتشاح الخلايا الالتهابية في حين تبيين الصورة (12) مقطع في نسيج الكبد لجرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين E بتركيز 200 ملغ / كغم وجود احتقان الاوعية الدموية ووجود تنخر في بعض الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية مع وجود تنخر في بعض الكبيبات الكلوية



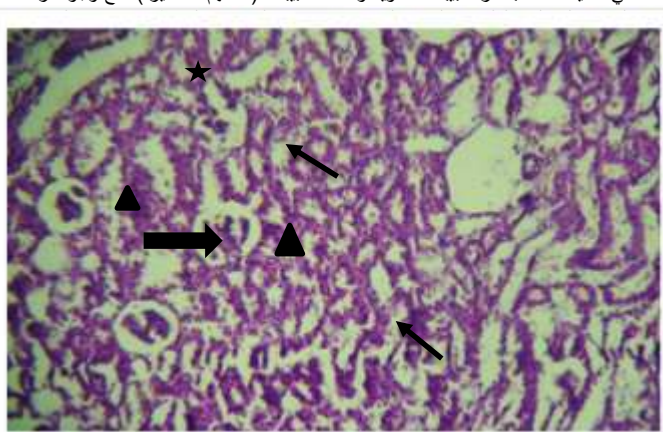
صورة (7) توضح مقطع لكلية جرذ ذكر من مجموعة السيطرة حيث نلاحظ وجود القشرة واللب والنبيبات الكلوية (سهم رفيع) والكبيبات (سهم غليظ) 400X



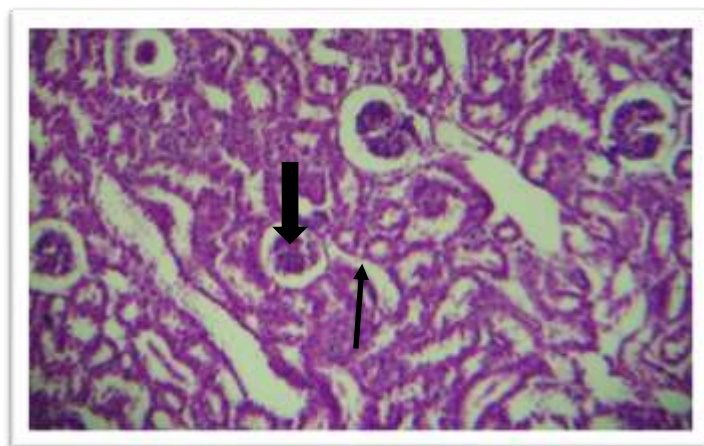
صورة (10) تبيين التغيرات النسيجية في كلية جرذ معاملة بالبيسفينول بجرعة مقدارها 200 ملغ / كغم / وزن الجسم حيث نلاحظ وجود تنخر تجلطي CO agulative necrosis في النسيج الخلالي للكلية متمثل بتنخر النبيبات الكلوية وكذلك الكبيبات (الاسهم الصغيرة) مع وجود نزف



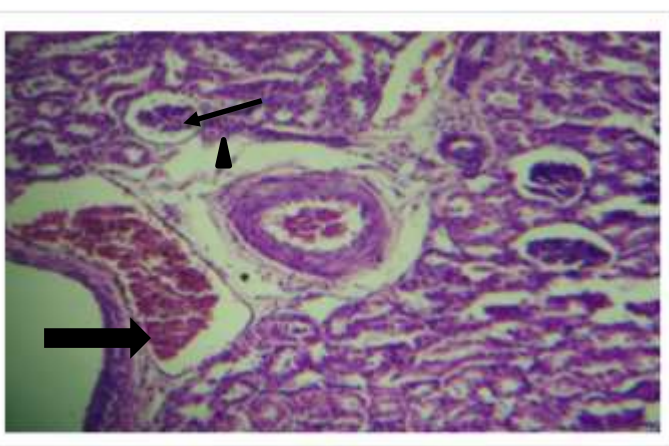
صورة (8) لمقطع نسيجي في كلية جرذ بالغ تم تجريعه فيتامين C بتركيز 500 ملغ تبيين الكبيبات (سهم غليظ) والنبيبات الكلوية (سهم رفيع) في الحالة الطبيعية 100X



صورة (11) لمقطع نسيجي في كلية جرذ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين C بتركيز 500 ملغ توضح احتقان الاوعية الدموية (النجمة) ووجود تنخر في النسيج الخلالي الكلوي الذي يشمل الكبيبة (سهم غليظ) والنبيبات (الاسهم الرفيعة) مع ارتشاح لبعض الخلايا الالتهابية (المثلث) 100X



صورة (9) لمقطع نسيجي في الكلية لجرذ بالغ من مجموعة السيطرة الموجبة معاملة بفيتامين E بتركيز 200 ملغ تبين الكبيبات (سهم عريض) والنيبيات الكلوية (الاسهم الرفيعة) و الحالة الطبيعية للنسيج 100X



صورة (12) لمقطع نسيجي في كلية جرذ بالغ معاملة بالبيسفينول بتركيز 200 ملغ / كغم من وزن الجسم بالإضافة الى فيتامين E بتركيز 200 ملغ تبين احتقان في الاوعية الدموية (سهم غليظ) ووجود تنخر في بعض الخلايا المبطنة لبعض النبيبات الكلوية(المثلث) والكبيبات(سهم رفيع) 100X

المناقشة :

يعتبر الكبد اهم عضو لتايض وازالة السمية لكثير من المواد التي تدخل الجسم مثل البيسفينول (10) حيث يعتبر الكبد العضو الأكثر حساسية للجرع الواطئة من البيسفينول ، اظهرت نتائج الدراسة النسيجية تآثر نسيج الكبد في كل المجاميع المعاملة حيث اكدت نتائج البحث حصول تنخر وتفجي للخلايا الكبدية واحتقان في الاوردة المركزية وهذا يتفق مع الدراسات السابقة حيث اكد (11) و (12) ان المعاملة بالبيسفينول سبب تغيرات تنكسية في الكبد متمثلة بتنخر وتفجي للخلايا الكبدية وزيادة الخلايا الالتهابية كما اكدت الدراسات حصول تلف للكبد (13) ، يعمل البيسفينول على زيادة الجهد التأكسدي oxidative stress في الخلايا الكبدية حيث يعمل البيسفينول على زيادة توليد جذور الاوكسجين الحرة (ROS) ويحث على موت الخلايا Apoptosis في الخلايا الكبدية والكلوية (14) يسبب البيسفينول زيادة الجهد التأكسدي بكل الطريقتين اما lipid peroxidation او بتوليد جذور الهيدروكسيل حيث تعمل هذه الجذور بعمر نصف نانو ثانية ممكن ان تحث عملية lipid peroxidation في الدهون المفسفرة الموجودة في الغشاء الخلوي مما يؤثر على وظيفة وتركيب الغشاء الخلوي وتساهم في تحرير انواع اخرى من الجذور الحرة تلتصق وتلتف كل المحتويات الخلوية وشريط DNA وهذا يؤدي في النهاية الى تلف الكبد والكلية (15 و16) ، تمتلك الخلايا طرق دفاعية عديدة ضد الجهد التأكسدي منها النظام الانزيمي مثل انزيم Catalase الذي اكدت الدراسات ان فعاليته تقل عند التعرض للبيسفينول (17) كما يقلل البيسفينول فعالية الكثير من مضادات الاكسدة مثل الكلوتاتيون حيث تعمل الجرعة الواطئة من البيسفينول على اختزال التعبير الجيني (gene expression) لمضادات الاكسدة بعد اربعة اسابيع من المعاملة بالبيسفينول (18) وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث لم يثبت تاثير لفيتاميني C و E في تقليل الضرر في نسيجة الكبد والكلية ، ان تلف الاعضاء ناتج من تاثير البيسفينول الذي يعمل على اضطراب في توازن تحرر الجذور الحرة ونظام مضادات الاكسدة (19، 120) كما ان تجمع المركبات الوسطية لايض البيسفينول وعدم قدرة الكلية على التخلص منها ربما يؤدي الى تلف النسيج الكلوي بعد المعاملة بالبيسفينول مما يؤدي الى تنخر الخلايا وتغيرات تنكسية في النبيبات الكلوية كما موضح في الصور (10، 11، 12)

المصادر

- 1- Chapin, R. E.; Adams, J.; Boekelheide, K.; Gray, L. E., Jr.; Hayward, S. W.; Lees, P. S., McIntyre, B. S.; Portier, K. M.; Schnorr, T. M.; Selevan, S. G.; Vandenbergh, J. G. and Woskie, S. R. (2008). NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 83, 157-395.
- 2- Greiner, E.; Kaelin, T.; Nakamura, K.; (2007). Bisphenol A. CEH Report by SRI Consulting.
- 3- Tsai, W.T., (2006). Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a review. J. Environ. Sci. Health C 24, 225- 255.
- 4- Richter, C.; Birnbaum, L.S.; Farabollini, F.; Newbold, R.R.; Rubin B.S.; Talsness CE, Vandenbergh, J. G.; Walser-Kuntz, D. R. and vom Saal, F. S.(2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. Reprod Toxicol., 24(2): 199-224.

- 5- Chattopadhyay, D.; Arunchalam, G.; Mandal, A.B.; Sur, T.K.; Mandal, S.C.; Bhattacharya, S.K., (2002). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: Mallotus peltatus leaf extract. *J Ethnopharm.*, 82, 229-237.
- 6- Barcelona, R. S.; Fanelli, O. and Campana, A. (1977). Teratological study in rat and rabbit. *Toxicol.*, 2: 87-94.
- 7- vom Saal, F.S. and Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low – dose effects of bisphenol-A shows the need for anew risk assessment. *Environ Health Perspect.*, 113: 926-933.
- 8- Mescher, A. L. (2010). Junqueira, s basic histology text and atlas. 12th Ed. 1 -5.
- 9- SPSS Statistical Packages for the Social Sciences. (2001). Statistical software for windows version 13.0 Micrisoft. SPSS, Chicago, IL, USA
- 10 -Knaak, J.B., and Sullivan, L.J., (1966). Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 8, 175-184.
- 11 - Boshra, V., Moustafa, A.M., 2011. Effect of preischemic treatment with fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Molecular Histology* 42, 113122.
- 12 - Roy, S., Kalita, C.J.; Mazumdar, M., (2011). Histopathological effects of Bisphenol A on liver of Heteropneustes Fossilis (Bloch). *An international Quarterly Journal of Environmental Sciences the Ecoscan.*, 1, 187-190.
- 13 - Hassan, Z.K.; Elobeid, M.A.; Virk, P.; Omer, S.A.; ElAmin, M.; Daghestani, M.H.; AlOlayan, E.M., (2012). Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*
- 14 -Asahi, J.; Kamo, H.; Baba, R., Doi, Y.; Yamashita, A.; Murakami, D.; Hanada, A.; Hirano, T., (2010). Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associatedapoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes. *Life Sciences* 87, 431-438.
- 15 -.Kovacic P.(2010). How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: metabolism, electron transfer and oxidative stress. *Med Hypotheses*,; 75, 1-4.
- 16 -Anjum S; Rahman S; Kaur M,. (2011) . Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitoch- ondria of mouse. *Food Chem Toxicol.*, 49, 2849-54.
- 17 -Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P., 2003. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185, 119-127.
- 18 -.Lazalde-Ramos BP; Lares-Asseff I; Villanueva-Fierro I, (2010). HPLC method for quantification of oxidative stress by salicilate hydroxylation in human plasma. *J Chromatogr Sci*,; 48, 675-9.
- 19 -.Korkmaz A.; Ahbab MA; Kolankaya D; (2010) . Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food Chem Toxicol.*; 48, 2865-71. 27.
- 20 - Korkmaz A; Aydoğan M; Kolankaya D; (2011). Vitamin C coadministration augments bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol induced oxidative damage on kidney of rats. *Environ Toxicol.*; 26, 325-37.