

Ocena wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka

Bisfenol A (BPA) to związek wykorzystywany na olbrzymią skalę w procesie syntezy poliwęglanów, polisulfonów, poliestrów i żywic epoksydowych. Liczne wyniki badań laboratoryjnych oraz epidemiologicznych wykazały szkodliwy wpływ BPA na organizm człowieka w tym działanie endokryne oraz potencjalny wpływ na rozwój raka, cukrzycy, otyłości, chorób serca, astmy czy alergii. Z tego względu, BPA jest stopniowo zastępowany w produkcji artykułów codziennego użytku (szczególnie butelek dla niemowląt, opakowań na żywność, sprzętu medycznego czy zabawek) przez liczne analogii w tym bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF), a także bisfenol AF (BPAF). BPA i jego analogii oznaczono we krwi i moczu osób w populacji ogólnej oraz pracowników narażonych zawodowo na BPA i żywice epoksydowe.

Przewlekłe narażenie populacji ogólnej na bisfenole oraz nieliczne badania dotyczące ich wpływu na leukocyty, skłaniają do określenia mechanizmu oddziaływania tych substancji na komórki układu odpornościowego.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu BPA i jego wybranych analogów, tj.: BPS, BPF i BPAF na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka oraz próba określenia mechanizmu tego działania. W pracy analizowano potencjał cytotoksyczny, prooksydacyjny, proapoptyczny oraz genotoksyczny BPA i jego analogów.

W badaniach wykorzystano różne techniki badawcze, w tym analizy spektrofotometryczne, fluorometryczne, cytofluorometryczne, jak i mikroskopowe.

Wykazano, że bisfenole (poza BPS) silnie obniżały żywotność badanych komórek oraz zmieniały ich cechy morfologiczne (wielkość i granularność). Bisfenole, a w szczególności BPAF obniżały poziom wewnątrzkomórkowego ATP, co skutkowało zmianami nekrotycznymi jednojądrzastych komórek krwi człowieka. Stwierdzono także, że bisfenole wzmagają generowanie reaktywnych form tlenu (RFT), w tym wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego, co przyczyniało się do uszkodzeń oksydacyjnych białek i lipidów. Najsilniejsze zmiany w poziomie RFT oraz peroksydacji lipidów odnotowano pod wpływem BPF i BPAF, natomiast BPA i BPS (szczególnie w wyższych stężeniach) spowodowały bardziej znaczące uszkodzenia oksydacyjne białek.

Przeprowadzone eksperymenty dowiodły zróżnicowanego potencjału apoptotycznego i nekrotycznego badanych związków. Stwierdzono, że BPA wykazywał porównywalny,

znaczący wpływ apoptotyczny i nekrotyczny, podczas gdy BPS inicjował głównie apoptozę, zaś BPAF proces nekrozy. Indukcja apoptozy w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka związana była z takimi zmianami jak podwyższenie poziomu jonów wapnia w cytozolu komórek, obniżenie transbłonowego potencjału mitochondrialnego, wzrost aktywności kaspazy-8, -9 i -3, wzrost poziomu ciętego białka PARP-1 oraz wzrost kondensacji chromatyny. Wykazano, że bisfenole indukowały apoptozę zarówno poprzez szlak zewnętrzny (receptorowy), jak i wewnętrzny (mitochondrialny), przy czym większe zmiany w aktywacji kaspazy-9 wskazywały na bardziej znaczące zaangażowanie szlaku mitochondrialnego w proces programowanej śmierci komórki.

W celu określenia genotoksycznych właściwości BPA i jego analogów przeanalizowano wpływ tych substancji na powstawanie jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA. Stwierdzono, że wszystkie bisfenole generowały głównie uszkodzenia jednoniciowe, a ponadto BPA, BPS i BPAF w niewielkim stopniu indukowały uszkodzenia dwuniciowe. Należy podkreślić, że największe zmiany w ww. parametrach odnotowano w komórkach inkubowanych z BPAF, mniejsze pod wpływem BPA i BPF, zaś najmniejsze w wyniku działania BPS. Stwierdzono także, że komórki efektywnie naprawiały powstałe uszkodzenia, jednak nie były w stanie całkowicie usunąć (poza komórkami preinkubowanymi z BPS) powstałych zmian. Powstawanie uszkodzeń DNA pod wpływem bisfenoli oraz ich niepełna naprawa, mogą tłumaczyć zdolność indukowania przez BPA i jego analogii procesu nekrozy oraz apoptozy.

Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej pracy dostarczyły dowodów na różnicowany cytotoksyczny, proapoptotyczny, prooksydacyjny i genotoksyczny potencjał BPA i jego analogów w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Można domniemywać, że uszkodzenia białek i lipidów powstałe pod wpływem BPA, BPF i BPAF oraz uszkodzenia DNA odnotowane w wyniku działania BPA i BPAF mogą zachodzić w organizmie człowieka na skutek środowiskowego lub zawodowego narażenia na te substancje. Zmiany nekrotyczne oraz obniżenie poziomu ATP pod wpływem BPAF oraz zmiany apoptotyczne zachodzące pod wpływem BPA i jego analogów mogą następować w warunkach narażenia zawodowego lub zatrucia podostrego tymi związkami. Uzyskane wyniki (w zakresie analizowanych parametrów oraz badanego typu komórek) wskazują na zasadność zastępowania BPA przez BPS w syntezie tworzyw sztucznych, natomiast poddają w wątpliwość stosowanie w tym celu BPAF.

Ekspertyza Noka

Streszczenie w języku angielskim

Bisphenol A (BPA) is a chemical substance used in large amounts in the production of polycarbonates, polysulfones, polyesters and epoxy resins. Numerous laboratory studies and epidemiological surveys have shown that BPA exhibits adverse effects on endocrine system and may possibly provoke cancer, diabetes, obesity, asthma or allergy development in humans. That is why; BPA is now being replaced in the production of many every day used products such as bottles for infants, food containers, medical devices or toys by its analogs including bisphenol S (BPS), bisphenol F (BPF) and bisphenol AF (BPAF). BPA and its analogs have been determined in blood and urine of humans of the general population and workers occupationally exposed to bisphenols or epoxy resins.

The permanent exposure of the general population to bisphenols and small numbers of research studies concerning the effect of these substances on leucocytes impels determination of the mechanism of action of these substances on the cells of the immune system.

The aim of this study was to assess the effect of BPA and its selected analogs, i.e. BPS, BPF and BPAF on human peripheral blood mononuclear cells with description of the mechanism of action of these substances.

In this study, various analytical techniques have been used including spectrophotometry, spectrofluorimetry, cytofluorimetry and microscopy.

It has been shown that BPA, BPF and particularly BPAF significantly decreased cell viability and changed cells morphology, i.e. size and granulation. Bisphenols and BPAF in particular decreased intracellular ATP level, which may have influenced necrotic changes in the cells studied. It has also been found that bisphenols enhanced reactive oxygen species (ROS) including hydroxyl radical formation, which led to oxidative damage to lipids and proteins in the incubated cells. BPA and BPAF have been shown to induce stronger changes in ROS level and lipid peroxidation, while BPA and BPS (particularly at higher concentrations) caused more significant oxidative damage to proteins.

The conducted experiments have shown that BPA and its analogs exhibited different apoptotic and necrotic potential. It has been noted that BPA induced significant apoptotic and necrotic changes, while BPAF and BPS caused mainly necrosis and apoptosis, respectively. The compounds studied changed several parameters that are usually involved in apoptosis as they increased cytosolic calcium ion level, decreased transmembrane mitochondrial potential, activated caspase-8, -9 and -3, increased level of cleaved PARP-1 and enhanced chromatin condensation.

It has been noted that bisphenols induced apoptosis both by extrinsic (receptor) and intrinsic (mitochondrial) pathway, while stronger changes in caspase-9 activation showed that mitochondrial pathway was mainly involved in suicidal death of peripheral blood mononuclear cells.

In order to evaluate DNA-damaging potential of BPA and its analogs, the effect of these substances on DNA single (SSBs) and double strand-breaks (DSBs) formation has been assessed. It has been found that all bisphenols studied induced mainly SSBs, while BPA, BPS and BPAF caused small level of DSBs formation in the incubated cells. The strongest changes in DNA damage were noted in cells treated with BPAF, while the smallest in cells incubated with BPS. It was also noticed that the cells effectively repaired DNA strand-breaks, but they were unable (excluding cells preincubated with BPS) to repair totally DNA damage. It may be suggested that strand-breaks formation caused by bisphenols and their incomplete repair may have contributed to necrotic and apoptotic alterations in the cells studied.

The experiments conducted in these research work have shown that BPA and its analogs exhibit different cytotoxic, proapoptotic, prooxidative and genotoxic potential in human peripheral blood mononuclear cells.

It may be supposed that damage to proteins and lipids caused by BPA, BPF and BPAF as well as DNA damage induced by BPA and BPAF in the cells studied may occur in human organism environmentally exposed. Necrotic changes and ATP level depletion in cells incubated with BPAF and apoptotic changes induced by all bisphenols examined may appear in human organism during occupational exposure or subacute poisoning with these substances.

The obtained results (within the parameters studied and cells type tested) have shown that BPS may be used as a substitute of BPA in the polymer synthesis, while BPAF should not be considered as a substitute of BPA in the manufacture.

Kobayashi Mune