

WPLYW BISFENOLU A I JEGO WYBRANYCH ANALOGÓW NA ERYTROCYTY CZŁOWIEKA

STRESZCZENIE

Bisfenol A (BPA) jest związkami chemicznymi powszechnie stosowanym w produkcji poliwęglanów, żywic epoksydowych i papieru termicznego. Badania toksykologiczne wykazały niekorzystny wpływ BPA na organizm człowieka. Dowiedziono, że związek ten charakteryzuje się działaniem toksycznym, estrogenym oraz potencjalnie kancerogennym. Uważa się także, że wpływ BPA na organizm ludzki może prowadzić do rozwoju otyłości, cukrzycy, chorób serca, alergii czy astmy. Dane wskazujące na toksyczność BPA oraz jego obecność w organizmie człowieka, skutkują sukcesywnym zastępowaniem tego związku w produkcji przemysłowej przez liczne substytuty (analogi), w tym bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) oraz bisfenol AF (BPAF).

W wielu badaniach epidemiologicznych wykazano obecność BPA i jego analogów w organizmie człowieka (tkanki stałe, krew, mocz). Mając na uwadze przewlekłe narażenie populacji ogólnej na bisfenole, kontakt tych związków z erytrocytami w układzie krwionośnym oraz brak prac opisujących wpływ BPA i jego analogów na ten typ komórek, istnieje konieczność poznania mechanizmów oddziaływania tych substancji chemicznych na krwinki czerwone.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu BPA i jego wybranych analogów, tj.: BPS, BPF i BPAF na erytrocyty człowieka. Analizowano wpływ bisfenoli na parametry hemolityczne, morfologiczne i apoptotyczne. Określono także uszkodzenia oksydacyjne, zmiany w aktywności systemu antyoksydacyjnego oraz zmiany w błonie komórkowej krwinek czerwonych poddanych działaniu tych związków.

W badaniach wykorzystano różne techniki analityczne, w tym spektrofotometrię, spektrofluorymetrię, cytofluorymetrię, mikroskopię kontrastu fazowego i spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

Wykazano, że badane związki spowodowały hemolizę oraz utleniały hemoglobinę w erytrocytach człowieka. BPAF indukował najsilniejsze zmiany hemolityczne, podczas gdy BPA charakteryzował się najsilniejszym potencjałem oksydacyjnym. Analiza przeprowadzona metodą cytometrii przepływowej wykazała, że wszystkie badane związki spowodowały istotne zmiany w morfologii (wielkości) erytrocytów człowieka. Przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego zaobserwowano, że bisfenole zmieniały kształt

erytrocytów, powodując powstanie echinocytów (BPA i BPAF) oraz stomatocytów (BPF). Stwierdzono także, iż BPS nie spowodował znaczących zmian w wielkości i kształcie komórek.

Wyniki badań wykazały także, że analizowane substancje chemiczne charakteryzuje różnicowany potencjał apoptotyczny względem ludzkich erytrocytów. BPA i jego analogi (szczególnie BPAF) podwyższały poziom jonów wapnia w cytozolu, spowodowały translokację fosfatydyloseryny oraz wzmagają aktywność kaspazy-3 i kalpain w krwinkach czerwonych. Największe zmiany eryptotyczne odnotowano pod wpływem BPAF, natomiast BPA i BPS wykazywały porównywalny potencjał apoptotyczny.

Stwierdzono ponadto, że badane związki wzmagają tworzenie reaktywnych form tlenu (RFT) (w tym rodnika hydroksylowego), obniżają poziom zredukowanego glutationu (GSH), zwiększają peroksydację lipidów oraz zmieniały (głównie obniżały) aktywność enzymów antyoksydacyjnych tj.: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px). Stwierdzono, że najsilniejsze zmiany zachodziły pod wpływem BPAF i BPA, natomiast BPS nie zmieniał większości badanych parametrów.

W oparciu o wyniki eksperymentów dotyczących wpływu BPA, BPS, BPF i BPAF na błonę komórkową erytrocytów stwierdzono, że analizowane związki zmieniały płynność błony (w części hydrofobowej dwuwarstwy lipidowej), zwiększały mikrolepkość wnętrza erytrocytu oraz wzmagają oporność osmotyczną krwinek czerwonych. Ponadto, BPA i jego analogi zmieniały konformację białek błonowych, podwyższały poziom grup tiolowych, indukowały oksydacyjne uszkodzenia białek błonowych, obniżały poziom wewnątrzkomórkowego ATP, zmniejszały aktywność ATPazy Na^+/K^+ , a także zmieniały aktywność acetylocholinoesterazy (AChE). Najsilniejsze zmiany w analizowanych parametrach obserwowano pod wpływem BPAF, najslabsze zaś w wyniku działania BPS.

Wyniki badań wskazują, że bisfenole spowodowały zmiany w erytrocytach człowieka w stężeniach, które mogą oddziaływać na organizm ludzki w warunkach narażenia zawodowego lub na skutek zatrucia podostrego tymi substancjami. Przeprowadzone badania wskazują także (w odniesieniu do badanego typu komórek i przeprowadzonych analiz) na zasadność wykorzystywania BPS jako substytutu BPA w produkcji tworzyw sztucznych i innych materiałów użytkowych, natomiast podważają zasadność stosowania w tym celu BPAF.

Ameta Wolska

THE EFFECT OF BISPHENOL A AND ITS SELECTED ANALOGS ON HUMAN ERYTHROCYTES

SUMMARY

Bisphenol A (BPA) is a chemical substance widely used in the manufacturing of polycarbonates, epoxy resins and thermal paper. Toxicological studies have shown that BPA can cause adverse health effects in human organism. It has been proven that BPA exhibits toxic, estrogenic and potentially carcinogenic potential. Furthermore, BPA is suspected to increase risk of obesity, diabetes, heart diseases, allergy and asthma in humans. Due to significant toxicity of BPA and its presence in the human body, this chemical is successively substituted in the industry by its numerous analogs, including bisphenol S (BPS), bisphenol F (BPF) and bisphenol AF (BPAF). Many epidemiological surveys have also determined BPA analogs in tissues and fluids of human body including blood and urine, which shows common exposure of the general population to their action.

Taking into consideration chronic exposure of humans to BPA and its analogs, significant contact of erythrocytes with bisphenols in the circulation and lack of studies evaluating the effect of BPA and its analogs on human erythrocytes, it is necessary to explain the mechanisms of action of these substances on human red blood cells, which are crucial for proper function of human organism.

The purpose of this study was to evaluate the effect of BPA and its selected analogs, i.e. BPS, BPF and BPAF on human erythrocytes. The impact of these substances on hemolytic, morphological and eryptotic parameters has been assessed. Moreover, the effect of BPA and its analogs on oxidative stress parameters, function of antioxidant system and erythrocyte membrane has been evaluated.

Various analytical techniques including spectrophotometry, spectrofluorimetry, cytometry, phase-contrast microscopy and electron paramagnetic resonance have been employed in this study.

The compounds examined caused hemolysis and hemoglobin oxidation in human erythrocytes. BPAF induced the strongest hemolytic effect, while BPA exhibited the highest oxidative potential. Flow cytometry analysis has shown that all bisphenols studied (excluding BPS) significantly altered erythrocytes morphology (cell size). The use of phase-contrast microscopy has revealed that BPA and BPAF induced echinocytes formation, BPF caused stomatocytes creation, while BPS did not exert significant changes in the shape of red blood cells.

The results achieved using flow cytometry have also shown that the substances examined exhibited different apoptotic potential. BPA and its analogs (particularly BPAF) increased cytosolic calcium ions level and phosphatidylserine translocation in human erythrocytes. Furthermore, it has been found that bisphenols studied caused significant increase in caspase-3 and calpain activities. The strongest apoptotic effects were noted for BPAF, while BPS exhibited comparable apoptotic potential to BPA.

It has also been shown that bisphenols examined enhanced reactive oxygen species (ROS) (including hydroxyl radical) formation, depleted the level of reduced glutathione (GSH), increased lipid peroxidation and changed (mainly decreased) the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px). It has been noted that the strongest alterations were induced by BPAF and BPA, while BPS did not alter most parameters studied.

Moreover, the study has demonstrated that the compounds studied changed membrane fluidity at its hydrophobic region, increased internal viscosity and osmotic fragility of the erythrocytes and changed conformational state of membrane proteins. BPA and its analogs have also increased thiol groups level, induced oxidative damage to membrane proteins, decreased intracellular ATP level, depleted Na^+/K^+ ATPase activity and changed acetylcholinesterase (AChE) activity in red blood cells.

Observed changes in human erythrocytes were provoked by BPA and its analogs at the concentrations, which may influence the human organism during occupational exposure or subacute poisoning with these compounds. The obtained results (within the cell type studied and the parameters examined) have shown that BPS may be applied as a substitute of BPA in the production of polymers and other materials, while BPAF should not be used for these purposes.

Ameta Wolska