

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Bromoorganiczne uniepalniacze należą do jednych z najefektywniejszych substancji ograniczających spalanie materiałów syntetycznych. Związki te są szeroko wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu, w tym przy produkcji urządzeń elektrycznych, elektronicznych, mebli, tekstyliów oraz innych produktów codziennego użytku. Produkcja bromowanych uniepalniaczy stanowi 25% rynku antypirenow, a ich zawartość w produkcie gotowym wynosi od 5% do 30%. Najpowszechniej stosowanym antypirenem jest tetrabromobisfenol A (TBBPA), który stanowi 60% globalnej produkcji substancji uniepalniających. TBBPA jest produkowany głównie w Stanach Zjednoczonych, Izraelu, Japonii oraz Chinach, jednak znajduje zastosowanie na całym świecie. Do omawianej grupy związków należą również tetrabromobisfenol S (TBBPS), 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP) oraz pentabromofenol (PBP).

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności w 2012 roku stwierdził, iż ze względu na brak wystarczających badań toksykologicznych oraz danych dotyczących obecności ww. substancji w żywności i łańcuchu pokarmowym, nie jest możliwe określenie zagrożenia, jakie stwarzają one dla zdrowia człowieka.

Celem badawczym niniejszej pracy doktorskiej było porównanie wpływu wybranych uniepalniaczy bromofenolowych, tj.: tetrabromobisfenolu A, tetrabromobisfenolu S, 2,4,6-tribromofenolu oraz pentabromofenolu na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Prowadzone analizy miały na celu określenie właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych oraz proapoptotycznych analizowanych związków w badanym modelu komórkowym.

W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano metody analityczne z zakresu spektrofotometrii, spektrofluorymetrii, cytofluorymetrii oraz mikroskopii fluorescencyjnej.

Uzyskane wyniki wykazały, że analizowane związki, a szczególnie TBBPA i PBP spowodowały znaczący spadek żywotności jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka oraz obniżyły poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Odnotowano, że badane substancje spowodowały powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) oraz wzmagaly peroksydację lipidów i uszkodzenia białek w badanych komórkach. Stwierdzono większy potencjał cytotoksyczny i oksydacyjny PBP w porównaniu do 2,4,6-TBP, co wiązało się z większą liczbą atomów bromu w cząsteczce tej substancji. W odniesieniu do bromobisfenoli, można stwierdzić, że obecność grupy sulfonowej w TBBPS zmniejszała

toksyczność tego związku w porównaniu do TBBPA posiadającego w swojej cząsteczce grupy metylowe (obecność mostka propanowego).

Kolejny etap badań obejmował analizę potencjału genotoksycznego badanych uniepalniaczy bromofenolowych. Stwierdzono, że analizowane substancje spowodowały pęknięcia jednoniciowe, a w mniejszym stopniu pęknięcia dwuniciowe DNA oraz indukowały powstawanie oksydacyjnych uszkodzeń zasad pirymidynowych, a szczególnie zasad purynowych w DNA. Największe zmiany w ww. parametrach odnotowano pod wpływem TBBPA oraz PBP, najmniejsze w wyniku oddziaływania TBBPS. Zaobserwowano również, że jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka efektywnie naprawiały powstałe uszkodzenia DNA, jednak nie były w stanie (z wyjątkiem komórek inkubowanych z TBBPS) całkowicie usunąć powstałych zmian. Wykazano także, iż badane substancje nie tworzyły adduktów z DNA. W świetle uzyskanych wyników, można uznać, że badane uniepalniacze spowodowały uszkodzenia DNA pośrednio poprzez generowanie RFT, form rodnikowych i innych reaktywnych produktów, natomiast nie oddziaływały bezpośrednio na materiał genetyczny.

Analizowane związki wykazały również potencjał apoptotyczny w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Stwierdzono, że badane substancje zwiększały liczbę komórek apoptotycznych, podwyższały poziom jonów wapnia w cytozolu komórek, obniżały transbłonowy potencjał mitochondrialny, wzmacniały aktywność kaspazy 8., 9. i 3., indukowały rozszczepienie PARP1 i fragmentację DNA oraz spowodowały zmiany w kondensacji chromatyny. Stwierdzono, większe zmiany w badanych parametrach apoptotycznych pod wpływem TBBPA i PBP w porównaniu do 2,4,6-TBP, a szczególnie TBBPS. Wykazano także, iż analizowane związki (z wyjątkiem TBBPS) w przebiegu procesu apoptotycznego w większym stopniu angażowały szlak mitochondrialny.

Podsumowując, analizowane uniepalniacze bromofenolowe wykazywały zróżnicowany potencjał prooksydacyjny, genotoksyczny i proapoptotyczny w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Wzrost poziomu RFT, uszkodzenia oksydacyjne lipidów, białek i DNA oraz zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie jonów wapnia i transbłonowym potencjale mitochondrialnym odnotowano w badanych komórkach pod wpływem TBBPA, PBP i 2,4,6-TBP w stężeniach, które oznaczane były w organizmie człowieka w warunkach narażenia środowiskowego oraz zawodowego na te substancje. Silniejsze zmiany w badanych parametrach spowodowane przez tetrabromobisfenol A w porównaniu do TBBPS wskazują na zasadność zastępowania TBBPA przez ten analog w przemyśle, jako mniej toksyczny substytut.

STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

SUMMARY

Bromophenolic flame retardants (BRFs) belong to a group of the most effective substances reducing the combustion of synthetic materials. These compounds are widely employed in the industry, including the production of electric and electronic devices, as well as furniture, textiles and other everyday products. The production of BFRs includes 25% of antypirenes market, and their content in finished products is from 5% to 30%. The most commonly produced antypirene is tetrabromobisphenol A (TBBPA) that includes 60% of global production of BFRs. TBBPA is mainly produced in the United States, Israel, Japan and China, but it is used globally. Other compounds that belong to BRFs are tetrabromobisphenol S (TBBPS), 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TBP) and pentabromophenol (PBP).

In 2012 the European Food Safety Authority stated that due to insufficient toxicological studies on bromophenolic flame retardants, as well as in adequate data concerning the presence of BFRs in edibles and food chain, it is impossible to determine the threat that is posed by these substances to the human organism.

The purpose of this doctoral thesis was to compare the effect of selected BFRs, such as tetrabromobisphenol A, tetrabromobisphenol S, 2,4,6-tribromophenol and pentabromophenol on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The analysis aimed to determine prooxidative, genotoxic and proapoptotic properties of these substances in the investigated cellular model.

In this study, analytic methods that included spectrophotometry, spectrofluorimetry, cytofluorimetry and fluorescence microscopy were used.

The obtained results have shown that tested compounds, and particularly TBBPA and PBP caused significant decrease of PBMCs viability and depleted the level of intracellular ATP. It was also observed that studied substances induced reactive oxygen species (ROS) formation and caused damage to lipids and protein in incubated cells. Stronger cytotoxic and prooxidative potential was noted for PBP in comparison to 2,4,6-TBP, which was associated with higher number of bromine atoms in this molecule. It is also highly probable that the presence of sulfonyl group in TBBPS determined its lower cytotoxic and prooxidative potential in comparison to TBBPA having methyl groups in its molecule.

The next step of this study concerned evaluation of genotoxic potential of tested BFRs. It has been revealed that examined substances induced mainly single stranded

DNA breaks, and to a lesser extent, double stranded DNA breaks formation. Those compounds also caused oxidative damage to pyrimidines, and more strongly to purines. The greatest changes were noted in cells treated with TBBPA and PBP, while the smallest in PBMCs incubated with TBBPS. It was also observed that PBMCs efficiently repaired DNA damage caused by tested BFRs, but they were unable (except for the cells preincubated with TBBPS) to completely remove DNA lesions. Moreover, it was found that tested BFRs were unable to create adducts with DNA. In the light of obtained results, it may be concluded that studied compounds caused DNA damage indirectly by generation of ROS, organic radicals or/and other reactive products, but they did not influence directly genetic material of PBMCs.

The tested substances also exhibited significant apoptotic potential in human PBMCs. It has been shown that BFRs increased cytosolic calcium ion level, reduced transmembrane mitochondrial potential, activated caspase-8, -9, and -3, as well as induced PARP1 cleavage, DNA fragmentation and chromatin condensation. Stronger apoptotic changes were observed in PBMCs incubated with TBBPA and PBP when compared with cells treated with 2,4,6-TBP, and particularly TBBPS. It was also noticed that examined compounds (with exception for TBBPS) more strongly activated mitochondrial apoptotic pathway.

Summing up, it has been found that tested bromophenolic flame retardants exhibited different prooxidative, genotoxic and proapoptotic potential in human peripheral blood mononuclear cells. An increase in ROS level, damage to lipids, protein and DNA, as well as alterations in cytosolic calcium ion level and transmembrane mitochondrial potential were noted in PBMCs exposed to TBBPA, PBP and 2,4,6-TBP in the concentrations that were determined in humans environmentally or occupationally exposed to these compounds. Stronger cytotoxic and genotoxic potential of tetrabromobisphenol A in comparison to TBBPS indicates the validity of the substitution of TBBPA by this analog in the industry.

Anna Baranoka