

Uticaj hroničnog tretmana niskim dozama bisfenola a (BPA) na endotelne ćelije krvnih sudova na modelu humane ćelijske linije EA.hy926

Bisfenol A (BPA) i drugi plastifikatori široko su zastupljeni u proizvodima za svakodnevnu upotrebu. Iako epidemiološke studije ukazuju na moguću uzročnu vezu između izlaganja plastifikatorima i kardiovaskularnih bolesti, do danas je sprovedeno veoma malo studija koje se bave mehanizmima preko kojih BPA utiče na vaskularne ćelije. Cilj ovog rada bio je da se ispituju biomolekularne pojave povezane sa endotelijalnom disfunkcijom nakon hronične izloženosti BPA. Kao model je korišćena humana ćelijska linija vaskularnih endotelnih ćelija EA.hy926. Ćelije su tretirane trima koncentracijama BPA (10^{-9} , 10^{-8} i 10^{-7} M), tokom 14 nedelja. Vijabilnost ćelija nakon dodatnih 24 h izloženosti BPA nije značajno smanjena, a postepeno smanjenje sposobnosti preživljavanja pri povećanju koncentracije BPA primećeno je nakon 48 h. Takođe, sa povećanjem koncentracije BPA rasla i koncentracija produkovanih nitrita. Sposobnost ćelija da se vezuju za ekstracelularni matriks nakon hronične izloženosti BPA prvenstveno je praćena posmatranjem ćelijske adhezije na želatin, nakon čega je SRB testom procenjena količina zalepljenih ćelija. Sa povećanjem koncentracija BPA povećavana je i količina vezanih ćelija. Dobijeni rezultati ukazuju da dugotrajna izloženost EA.hy926 ćelija niskim dozama BPA uzrokuje direktne biološke efekte, što zahteva dodatna istraživanja u cilju otkrivanja tačnih mehanizama efekata BPA na vaskularne ćelije.

Uvod

Plastifikatori od nedavno privlače pažnju naučne zajednice i šire javnosti zbog velikog obima proizvodnje i široko rasprostranjene upotrebe plastike, ali i zbog potencijalnog štetnog uticaja na zdravlje. Jedan od najzastupljenijih plastifikatora i endokrinih ometača je bisfenol A (BPA). BPA je bezbojna čvrsta supstanca koja se dobro rastvara u organskim rastvaračima, a slabo u vodi. Koristi se u proizvodnji pojedinih plastika i epoksi smola. BPA plastika je čvrsta i providna, i od nje se pravi čitav niz proizvoda koji se koriste u svakodnevnoj upotrebi, kao što su flašice za vodu, sportska oprema, CD i DVD diskovi, medicinska i dentalna pomagala, stakla za naočare, a epoksi smole koje sadrže BPA se koriste kao premazi u cevima za vodu, u ambalaži za hranu i piće, kao i u proizvodnji termalnog papira koji se koristi za štampanje fiskalnih računa (Welshons *et al.* 2006; Rochester 2013). BPA pripada grupi endokrinih ometača zbog sposobnosti da remeti normalno funkcionisanje endokrino sistema.

Studije su pokazale da laboratorijske životinje izlagane niskim dozama BPA imaju povišenu stopu dijabetesa, raka dojke i prostate, smanjen broj spermatozoida, reproduktivne probleme, gojaznost i neurološke probleme (Dyer 2007). Pored ovih poremećaja i karcinoma izazvanih hormonskim disbalansom koje izaziva BPA, poslednjih godina su objavljene studije koje su povezale plastifikatore sa faktorima rizika i pojavom kardiovaskularnih bolesti. Epidemiološke studije su pokazale da je prisustvo veće koncentracije BPA u serumu i urinu u pozitivnoj korelaciji sa različitim vrstama kardiovaskularnih bolesti (Posnack 2014; Ranciere *et al.* 2015).

Vuk Gordić (1999), Užice, Jovana Sterije Popovića 28, učenik 4. razreda Užičke gimnazije

*Mentor: dr Bojana Stanić,
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu*

Azot oksid (NO[•]) je snažan oksidans koji je normalni proizvod metabolizma endotelnih ćelija i makrofaga. U zavisnosti od mesta nastanka, NO[•] može imati pro-aterogeni ili protektivni efekat (Matthys i Bult 1997). Ravnoteža NO[•] u endotelnim ćelijama je čvrsto regulisana u normalnim fiziološkim uslovima, ali se može poremetiti endotelnom disfunkcijom koja ujedno predstavlja i prve znake aterogeneze (Pong i Huang 2015). Pored toga, stanja koja su faktori rizika za nastanak ateroskleroze su povezana i sa smanjenim oslobađanjem NO[•] u arterijski zid, zbog oštećenja enzima azot oksid sintaze ili zbog prekomerne oksidativne degradacije (Tousoulis *et al.* 2012). Smanjena proizvodnja NO[•] u ovim patološkim stanjima izaziva ozbiljne probleme u endotelnoj ravnoteži, i to je razlog zbog koga se ispituju brojni potencijalni terapeutici koji bi mogli da ublaže ili spreče disfunkciju endotela povećanjem oslobađanja NO[•] iz endotelnih ćelija.

Ćelijska sposobnost vezivanja za ekstracelularni matriks, druge ćelije ili specifične površine je od suštinskog značaja za rast i opstanak ćelija, kao i za njenu komunikaciju sa drugim ćelijama (Chen 2012). Proces adhezije ćelija uključuje niz bioloških događaja kao što je trodimenzionalna reorganizacija citoskeleta, biohemijske reakcije u ćeliji i promene molekula na samoj površini ćelija. Jedna od ranih faza ateroskleroze podrazumeva regrutaciju inflamatornih ćelija iz cirkulacije i njihovu transendotelijalnu migraciju. U ovom procesu uglavnom posreduju molekuli koji imaju ulogu u ćelijskoj adheziji, a koji se eksprimiraju na vaskularnom endotelu kao odgovor na neke upalne stimulse (Blankenbergh *et al.* 2003).

Nedavne studije su pokazale da izlaganje BPA rezultira razvojem ateroskleroze kod glodara (Kim *et al.* 2014; Sui *et al.* 2014) i zečeva (Fang *et al.* 2014) i uzrokuje niz drugih kardiovaskularnih bolesti kod različitih životinjskih modela. Ove *in vivo* studije su važne jer dokazuju uzročnu vezu između plstifikatora i kardiovaskularnih bolesti. Međutim sami specifični mehanizmi preko kojih plastifikatori uzrokuju razvoj i napredovanje kardiovaskularnih bolesti su nejasni i zahtevaju *in vitro* studije u cilju otkrivanja mehanizama na ćelijskom nivou.

Uzimajući u obzir teret koji kardiovaskularne bolesti predstavljaju u savremenom društvu, neophodne su sveobuhvatne studije koje bi do-

vele do popunjavanja praznina u našem trenutnom poznavanju veza između zagađujućih supstanci i ovih bolesti. Osim toga, razumevanje mehanizama bolesti je od ključnog značaja za formulisanje efikasnih strategija prevencije i pronalaženja novih terapijskih strategija.

Cilj ovog istraživanja je razumevanje mehanizama uključenih u aktivaciju vaskularnih endotelnih ćelija nakon izlaganja bisfenolu A. Osnovna ideja rada je da se ispita uticaj BPA na endotelne ćelije krvnih sudova nakon hroničnih tretmana niskim dozama BPA, pri tome imitirajući realne uslove svakodnevnne izloženosti ovoj supstanci

Materijal i metode

Na osnovu literaturnih podataka odabrane su koncentracije testirane supstance koje su korišćene tokom istraživanja. MTT esejom ispitano je citotoksično dejstvo odabranih koncentracija u dve vremenske tačke, nakon dodatnih 24 i 48 h od vremena početka hroničnog izlaganja koji je trajao 14 nedelja. Griess-ovom metodom određena je koncentracija produkovananih nitrita nakon tri dana pošto su ćelije gajene u kulturi, za sve odabrane koncentracije ispitivane supstance. Količina ćelija koje su se vezale za ekstracelularni matriks merena je pomoću SRB esejaja.

EA.hy926 ćelijska linija. EA.hy926 je humana ćelijska linija vaskularnih endotelnih ćelija koja predstavlja somatski hibrid nastao fuzijom primarnih endotelnih ćelija umbilikalne vene i A549 ćelijske linije rezistentne na tioguanin nakon izlaganja polietilen glikolu. To su adherentne ćelije i rastu u vidu monosloja zalepljene za podlogu. Ćelije su gajene u Dulbecco's Modified Eagle medijumu – DMEM (Biowest, Nemačka) sa dodatkom 1% penicilin-streptomycin smeše, 2% HAT suplementa i 10% fetalnog goveđeg seruma na temperaturi od 37°C pri vlažnosti vazduha od 95% i koncentraciji CO₂ od 5%. Ćelijska linija dobijena je sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu gde su ćelije bile pod hroničnim tretmanom počevši od 08.05.2018. godine. Flaskovi sa ćelijama su u IS Petnica stigli 06.08.2018. gde je nastavljen identičan hronični tretman. Ćelije su pasažirane dva puta nedeljno, a tretmani (kontrola i BPA različitih koncentracija) su dodavani 4 puta nedeljno.

Ispitivana supstanca. Na osnovu dostupne literature koja prikazuje vrednosti bisfenola A koje su prisutne u krvnoj plazmi čoveka (Huang *et al.* 2017) odabrane su sledeće koncentracije: 10^{-9} M, 10^{-8} M i 10^{-7} M BPA. Kao rastvarač korišćen je apsolutni etanol (EtOH) finalne koncentracije 0.1%.

MTT esej. MTT esej je test vijabilnosti ćelija, gde se ispituje sposobnost ćelija da redukuju tetrazolijumske soli (MTT) u plavi formazan aktivnošću mitohondrijalne reduktaze. Dodatno izlaganje hronično tretiranih ćelija rađeno je u dve vremenske tačke, 24 i 48 h, za sve ispitivane koncentracije BPA. Za obe vremenske tačke ćelije su zasejane u gustini 2.5×10^4 ćelija po bunariću u mikrotitar ploče sa 96 bunarića, za svaku koncentraciju BPA, kao i za kontrolu. Po isteku eksperimentalnog tretmana odliven je medijum, a zatim je u svaki bunarić dodato po 100 μ L rastvora MTT koncentracije 0.5 mg/mL. Nakon inkubacije od 3 h na 37°C, medijum je odliven i ćelije su lizirane dodatkom 100 μ L 0.04 M HCl u izopropanolu u svaki bunarić. Ploča je zatim inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi uz neprestano mešanje kako bi se kristali formazana u potpunosti rastvorili. Očitane su vrednosti apsorbanci na talasnoj dužini od 540 nm.

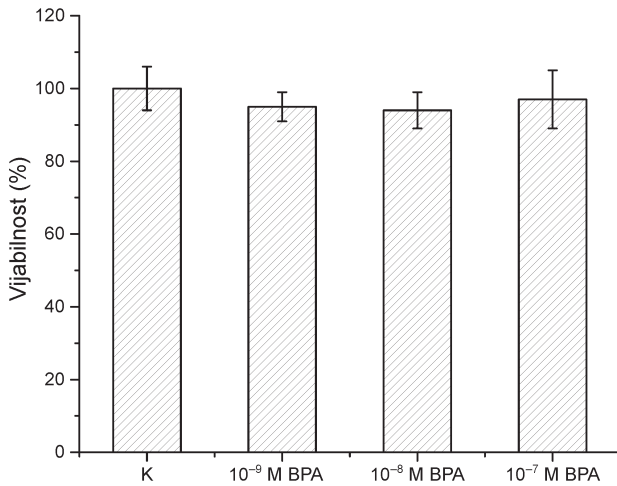
Produkcija nitrita. Za detekciju azot oksida korišćena je Griess-ova metoda koja se bazira na reakciji Griess-ovog reagensa sa NO_2 u uzorku gde nastaje produkt crvenkasto-roze boje. Nakon pasaziranja, ćelije su inkubirane 3 dana, a potom je direktno iz flaskova uzeto po 800 μ L medijuma kako bi se odredila količina produkovanog NO_2 (stabilni proizvod oksidacije NO^*). Medijum je sve vreme po uzimanju držan na ledu. Uzorkovani medijum je centrifugiran 5 minuta na 1000xg na 4°C, kako bi se istaložile mrtve ćelije. Uzorci su zatim pipetirani u mikrotitarsku ploču sa 96 bunarića zajedno sa standardnim rastvorima (0.475, 0.95, 1.953, 3.906, 7.8125, 15.625 i 31.25 μ M NaNO_2), koji su korišćeni za konstrukciju standardne krive. U svaki bunarić u ploči gde su bili standardni rastvori i uzorci, dodat je Griess-ov reagens. Zbog fotoosetljivosti reagensa, ploča je uvijena u foliju i inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi, uz neprestano mešanje. Vrednosti apsorbance su očitane na 540 nm.

Adhezija ćelija. Sposobnost ćelija da se vežu za ekstracelularni matriks (adhezija) odre-

đena je pomoću želatina fiksiranog albuminom, koji je predstavljao okoloćelijsku sredinu, a kvantifikacija adheriranih ćelija određivana je SRB esejom. SRB esej se zasniva na usvajanju ljubičastog sulforodamina B (SRB) od strane određenih aminokiselinskih ostataka ćelijskih proteina, što dovodi do razvoja intenzivnije boje tamo gde ima više ćelija. Za ovaj eksperiment korišćena je ploča sa 12 bunarića. Najpre, 4 bunarića u ploči su presvučena slojem sterilnog 1% želatina (10 mg/mL). Ploča sa želatinom je ostavljena oko 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim je uklonjen želatin i ostavljen 45 minuta da se osuši, nakon čega je svaki bunarić ispran sa po 1 mL PBS. Pre zasejavanja ćelijske kulture, ploča je blokirana 1% BSA u PBS-u i ostavljena 1 h na sobnoj temperaturi. Po isteku 1 h, rastvor BSA je odliven, i ploča je isprana sa po 1 mL PBS. Nakon pripreme ćelijske suspenzije odgovarajuće gustine (45×10^4 ćelija/bunariću), tubice su centrifugirane 5 minuta na $600 \times g$. Odliven je supernatant i ćelije su isprane sa po 1 mL PBS sa katjonima (Ca^{2+} i Mg^{2+}). Ponovljeno je centrifugiranje sa PBS, a talog je resuspendovan u 1 mL pufera za adheziju (DMEM medijum, 0.5% BSA, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM MnCl_2 , pH 7.4) koji je zatim dodat u bunariće sa želatinom. Ploča je stavljena u inkubator tokom 30 minuta, kako bi se ćelije zalepile za želatin. Nakon isteka 30 min bunarići u ploči su isprani tri puta sa po 1 mL PBS sa katjonima, s tim što nakon poslednjeg ispiranja PBS nije odliven. Zatim su ćelije fotografisane pod mikroskopom pri različitim uveličanjima (5, 10 \times i 20 \times). Eksperiment je nastavljen SRB testom koji obuhvata fiksiranje ćelija 50% (w/v) trihlorsirćetnom kiselinom tokom 1 h na 4°C, ispiranje ćelija sa dH_2O (5 puta po 1 mL po bunariću), dodavanje SRB boje i inkubacija na sobnoj temperaturi od 30 minuta. Nakon inkubacije, bunarići u ploči su isprani 5 puta 1% sirćetnom kiselinom, a na kraju je inkorporirana boja rastvorena u Tris puferu (pH 10.5). Apsorbanca je merena na 540 nm.

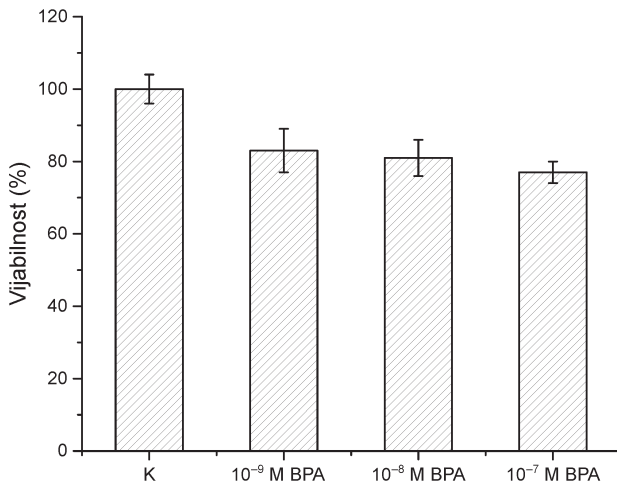
Rezultati i diskusija

Efekat hroničnih tretmana BPA na vijabilnost EA.hy926 ćelija. Na osnovu rezultata MTT testa nakon 24 i 48 h uočava se sličan uticaj BPA na vijabilnost EA.hy926 ćelija nakon nastavljenog hroničnog tretmana, s tim što je preživljavanje ćelija koje su izlagane koncentra-



Slika 1. Vijabilnost hronično tretiranih EA.hy926 ćelija tokom 14 nedelja nakon dodatnih 24 h tretmana sa BPA

Figure 1. Viability of EA.hy926 cells chronically treated with BPA for 14 weeks after an additional 24 h treatment with BPA



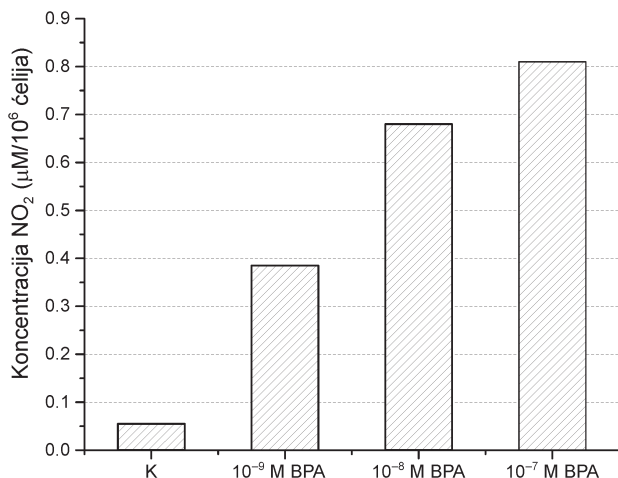
Slika 2. Vijabilnost hronično tretiranih EA.hy926 ćelija tokom 14 nedelja ćelija nakon dodatnih 48 h tretmana sa BPA

Figure 2. Viability of EA.hy926 cells chronically treated with BPA for 14 weeks after an additional 48 h treatment with BPA

ciji od 10⁻⁷ M BPA najmanje posle 48 h. Ovakvi rezultati su bili i očekivani s obzirom na to da su korišćene niske koncentracije kojima smo svakodnevno izloženi, a sličan efekat je pokazan i u nekim prethodnim istraživanjima na drugim ćelijskim linijama (Fujiwara *et al.* 2018). Rezultati su grafički predstavljeni na slikama 1 i 2.

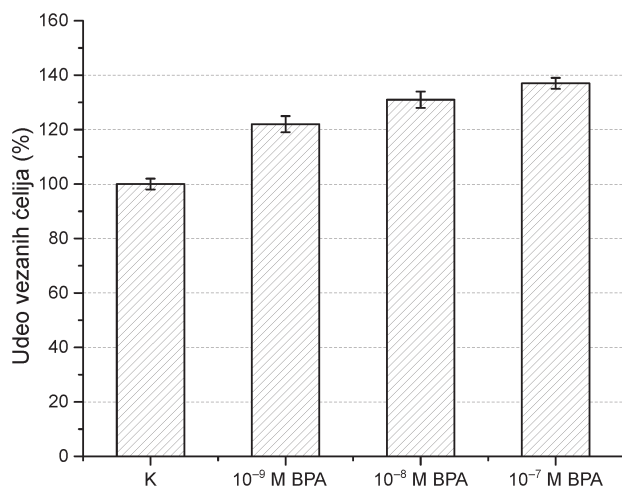
Efekat hroničnih tretmana BPA na produkciju nitrita u EA.hy926 ćelijama. Rezultati testa kojim je merena produkcija nitrita, prikazani na slici 3, pokazuju da sa povećanjem koncentracija BPA raste i koncentracija produkovanog NO₂, što se može protumačiti kao odbrambeni mehanizam ćelija nakon hroničnog izlaganja većim koncentracijama BPA. Kako BPA ima i odlike endokrinog ometača, može se

pretpostaviti da se vezuje za specifične receptore na membrani, čime se povećava unutarćelijska koncentracija kalcijuma koji se vezuje za kalmodulin, čime se aktivira kalmodulin-vezujuće mesto na endotelijalnoj azot oksid sintazi (eNOS), što dovodi do povećane produkcije NO₂ (Zhao *et al.* Efekat hroničnih tretmana BPA na adheziju EA.hy926 ćelija. Rezultati ispitivanja adhezije ćelija na želatin pokazuju da su ćelije koje su bile hronično izložene najvišoj koncentraciji BPA imale najveću sposobnost vezivanja za ovaj ekstracelularni matriks, dok se ta sposobnost smanjivala sa smanjenjem koncentracije BPA, završno sa najmanjim brojem adheriranih ćelija u kontroli (slika 4). Povećana sposobnost za adheziju pri većim koncentracijama se može protu-



Slika 3. Produkcija NO₂ kod hronično tretiranih EA.hy926 ćelija tokom 14 nedelja nakon dodatnih 72 h tretmana BPA

Figure 3. Production of NO₂ in EA.hy926 cells chronically treated with BPA for 14 weeks after an additional 72 h treatment with BPA



Slika 4. Adhezija na želatin EA.hy926 ćelija hronično tretiranih sa BPA tokom 14 nedelja

Figure 4. Adhesion to gelatin of EA.hy926 cells chronically treated with BPA for 14 weeks

mačiti kao odgovor endotelnih ćelija na stimulus u vidu BPA, pri kojem se ekspimiraju molekuli na membrani ćelije koji imaju ulogu u ćelijskoj adheziji. Upravo ti molekuli imaju ulogu u početnoj fazi ateroskleroze, kada se na endotelu nakupljaju inflamatorne ćelije, pre transendotelijalne migracije.

Zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju da je hronično izlaganje EA.hy926 ćelija niskim dozama BPA tokom tri meseca dovelo do uočljivih promena u endotelnim ćelijama. Iako tretman niskim koncentracijama BPA nije izazvao citotoksičan efe-

kat, kao odgovor na takav stimulus, povećala se sposobnost ćelija za adheziju, i produkovana je veća količina NO₂, što se može povezati sa ranim fazama ateroskleroze.

Značajno bi bilo nastaviti i upotpuniti istraživanje dajim upoznavanjem promena koje BPA izaziva na endotelnim ćelijama. U tom svetlu, poželjno je pod sličnim tretmanom ispratiti nastanak reaktivnih vrsta kiseonika koji su normalni produkti metabolizma ćelija, ali čija promena u količini može dovesti do oštećenja ćelijskih struktura. Zatim, može se odrediti ekspresija gena koji kodiraju NOX i uticaj BPA na permeabilnost membrane endotelnih ćelija. Ovakva saznanja bi mogla da posluže za defini-

sanje terapijskih strategija kojima bi se blokirali patofiziološki metabolički putevi i time sprečile promene na ćelijama koje nastaju usled izloženosti ovim supstancama.

Literatura

Blankenberg S., Barbaux S., Tiret L. 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **170** (2): 191.

Chen Y. 2012. Cell Adhesion Assay. Bio-101: e98. DOI: 10.21769/BioProtoc.98.

Dyer C. A. 2007. Heavy metals as endocrine-disrupting chemicals. U *Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice* (ur. A. C. Gore). Totowa (NJ): Humana Press, str. 111–133.

Huang D., Wu J., Su X., Yan H., Sun, Z., 2017. Effects of low dose of bisphenol A on the proliferation and mechanism of primary cultured prostatic epithelial cells in rodents. *Oncology Letters*, **14** (3): 2635.

Fujiwara Y., Miyazaki W., Koibuchi N., Katoh T. 2018. The Effects of Low-Dose Bisphenol A and Bisphenol F on Neural Differentiation of a Fetal Brain-Derived Neural Progenitor Cell Line. *Frontiers in Endocrinology*, **9** (24): 1.

Fang C., Ning B., Waqar A. B., Niimi M., et al. 2014. Bisphenol A Exposure Enhances Atherosclerosis in WHHL Rabbits. *PLoS One*, **9** (10): e110977.

Kim M. J., Moon M. K., Kang G. H., Lee K. J., Choi S. H., et al. 2014. Chronic exposure to bisphenol A can accelerate atherosclerosis in high-fat-fed apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovascular Toxicology*, **14**: 120.

Matthys K. E., Bult H. 1997. Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, **6** (1): 3.

Pong T., Huang P. L. 2015. Effects of Nitric Oxide on Atherosclerosis. U *Atherosclerosis: Risks, Mechanisms and Therapies*. Wiley, str. 355-364.

Posnack N. G. 2014. The adverse cardiac effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate and Bisphenol A. *Cardiovascular Toxicology*, **14** (4): 339.

Ranciere F., Lyons J. G., Loh V. H., Botton J., Galloway T., Wang T., Shaw J.E., Magliano D.J. 2015. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of

the epidemiological evidence. *Environmental Health*, **14** (1): 46.

Rochester J. R. 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, **42**: 132.

Sui Y., Park S. H., Helsley R. N., Sunkara M., Gonzalez F. J., et al. 2014. Bisphenol A increases atherosclerosis in pregnane X receptor-humanized ApoE deficient mice. *Journal of the American Heart Association*, **3**: e000492.

Tousoulis D., Kampoli A. M., Tentolouris C., Papageorgiou N., Stefanadis C. 2012. The role of nitric oxide on endothelial function. *Current Vascular Pharmacology*, **10** (1): 4.

Welshons W. V., Nagel S. C., vom Saal F. S. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, **147** (6 Suppl): S56.

Zhao Y., Vanhoutte P. M., Leung S. W. S. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, **129** (2): 83.

Vuk Gordić

Chronic Low-dose Exposure to Bisphenol A Effects on the Endothelial Function in Human Vascular Endothelial Cell Line EA.hy926

Bisphenol A (BPA) and other plastic-associated chemicals (PACs) have a wide range of uses in products such as food containers, water pipes, medical tubing and children's toys. Although it has been estimated that over 95% of the European population is exposed to PACs and epidemiological studies suggest a possible correlation between PACs exposure and cardiovascular diseases, very few mechanistic and functional studies regarding the effect of BPA on vascular cells have been conducted to date. Hence, our goal was to examine biomolecular events associated with endothelial dysfunction in human vascular endothelial cell line EA.hy926 after chronic exposure to BPA. The cells were exposed to either control conditions or three different concentra-

tions of BPA (10^{-9} , 10^{-8} and 10^{-7} M) over a period of 14 weeks. Concentrations of BPA were selected based on a range of detected BPA plasma levels in human population. After 14 weeks, MTT assay was conducted to establish whether exposure to BPA had an impact on EA.hy926 viability.

Cell viability was not significantly affected after 24 h, whereas a gradual decrease in viability was observed with increasing BPA concentrations after 48 h. Nitrite levels (stable oxidation product of NO^*) were estimated in cell culture media using the Griess' method. Increased nitrate levels were observed with increasing con-

centrations of BPA, reaching the highest values with 10^{-7} M BPA. The ability of cells to bind to the extracellular matrix after chronic exposure to BPA was assessed by first observing cellular adhesion to gelatin, followed by the SRB assay to quantify the amount of adhered cells. Increased adhesion was detected with increasing concentrations of BPA. Overall, the obtained results indicate that long-term exposure of EA.hy926 cells to low doses of BPA causes direct biological effects, warranting further comprehensive investigation aimed at uncovering the exact mechanisms and the effects of BPA on vascular cells.

