



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Bakalářská práce

Účinek bisfenolu S na vybrané krevní parametry potkanů

Autorka práce: Tereza Hlatká

Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Konečný, Ph.D.

Konzultant práce: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

České Budějovice

2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Podpis

Abstrakt

Bisfenol S (BPS) je organická látka, která nahradila významně průmyslově užívaný bisfenol A (BPA). Přestože BPS vykazuje vyšší odolnost proti různým fyzikálním vlivům i tak dochází z finálních produktů k jeho uvolňování a následné kontaminaci vody, potravy a prostředí. Doposud je BPS podobně jako BPA spojován zejména s narušením funkce pohlavní soustavy lidí a zvířat. Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zdali desetitýdenní orální expozice BPS (50 μ g, 100 mg/kg živé hmotnosti /den) vede k narušení vybraných hematologických parametrů (počet erytrocytů (RBC), koncentrace hemoglobinu (HGB), hematokritová hodnota (HCT), střední objem erytrocytů (MCV), koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), střední množství hemoglobinu (MCH), celkové množství leukocytů, procentuální zastoupení granulocytů, lymfocytů a monocytů). Do pokusu bylo zařazeno 18 potkanů kmene Wistar Han, kteří byli rozděleni do 3 skupin (kontrolní, 50 μ g BPS, 100 mg BPS). Experimentálním skupinám byl denně gavaži podáván BPS rozpuštěný ve slunečnicovém oleji.

Krev byla odebrána srdeční punkcí a analyzována pomocí automatického hematologického analyzátoru. V rámci provedené studie jsme u exponovaných zvířat BPS zjistili nesignifikantní pokles HGB a nesignifikantní vzestup MCV a MCH. BPS vedl také k nesignifikantním změnám počtu leukocytů (vzestup celkového počtu) a zastoupení jednotlivých skupin těchto buněk (vzestup procentuálního zastoupení granulocytů, pokles lymfocytů). Dopad expozice BPS byl markantněji sledován u skupiny 50 μ g BPS. Námi získané výsledky jednoznačně neprokázaly negativní účinek BPS na vybrané krevní parametry potkanů.

Klíčová slova: potkan, bisfenol S, krevní parametry

Abstract

Bisphenol S (BPS) is an organic substance which has replaced significantly industrially used bisphenol A (BPA). Eventhough BPS shows higher tolerance against physical influence, there have been registered leaks from the final products and there is a possibility of wather, food and environtment contamination. Until now the BPS has been, just like BPA, mostly connected with disruption of the reproductive system of human and animals. The aim of the bachelor thesis was to determinate whether a ten weeks oral exposure to BPS (50 µg, 100 mg/kg live weight/day) leads to disturbance in selected haematological parameters (erythrocyte count (RBC), haemoglobin concentration (HGB), haematocrit value (HCT), mean corpuscular volume (MCV), erythrocyte haemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular haemoglobin (MCH), total leucocytes, percentage of granulocytes, lymphocytes and monocytes). Eighteen Wistar Han rats were enrolled in the experiment and they were divided into three groups (control group, 50 µg BPS, 100 mg BPS). Dissolved BPS in sunflower oil was given to the experimental groupts by a gavage.

Blood was collected through cardiac puncture and analyzed using an automated hematology analyser. In the particular study, we found out a nonsignificant decrease of HGB and nonsignificant increase of MCV and MCH in experimental animals. BPS also led to a nonsignificant changes in the number of leukocytes (increase in the total number of leukocytes) and it led to a changes in the number of individual types of the white blood cells representation (increase in the percentage of granulocytes, decrease in lymphocytes). More significant effect was observed in 50 µg BPS group. Our results did not conclusively proved the negative effect of BPS on the selected blood parameters of rats.

Keywords: rat, bisphenol S, blood parameters

Poděkování

Touto cestou bych velice ráda poděkovala panu doc. Ing. Romanovi Konečnému, Ph.D. za vstřícnost, cenné rady, věcné připomínky a především odbornou pomoc, kterou mi poskytoval během celé tvorby bakalářské práce.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární přehled.....	9
1.1 Endokrinní disruptory.....	9
1.2 Bisfenoly	9
1.2.1 Bisfenol A	9
1.2.2 Bisfenol B	10
1.2.3 Bisfenol F	11
1.2.4 Bisfenol AF	11
1.2.5 Bisfenol AP	12
1.2.6 Bisfenol S	12
1.3 Význam a charakteristika krve	14
1.4 Fyzikální vlastnosti krve	14
1.4.1 Viskozita krve	14
1.4.2 Osmolalita	14
1.4.3 Osmotický tlak	14
1.4.4 Tonicita	14
1.4.5 Onkotický (koloidně osmotický) tlak.....	14
1.4.6 Objem krve.....	15
1.4.7 Hustota krve	15
1.4.8 Barva krve	15
1.4.9 pH krve.....	15
1.5 Složení krve.....	15
1.5.1 Krevní plazma	15
1.6 Krevní elementy	16
1.6.1 Červené krvinky (erytrocyty).....	16
1.6.2 Bílé krvinky (leukocyty)	18

Granulocyty	19
Agranulocyty	21
1.6.3 Krevní destičky	23
1.7 Hematologické parametry	23
1.7.1 Hematokritová hodnota	23
1.7.2 Množství hemoglobinu	24
1.7.3 Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytech.....	24
1.7.4 Střední množství hemoglobinu v erytrocytu	24
1.7.5 Střední objem erytrocytů.....	24
2 Materiál a metody	25
2.1 Experimentální zvířata	25
2.2 Průběh experimentu.....	25
2.3 Odběr a zpracování vzorků krve	25
3 Výsledky a diskuse.....	26
3.1 Dopad expozice BPS na erytrocyty	26
3.2 Dopad expozice BPS na leukocyty	29
Závěr	32
Seznam použité literatury.....	33
Seznam obrázků	42
Seznam tabulek	43
Seznam použitých zkratk.....	44

Úvod

Plast se stal každodenním průvodcem člověka i zvířat. Obklopuje nás celý život, takřka kdekoliv. Vedle hlavních komponent plastických hmot jsou do plastů přidávány látky, které mění jejich pevnost, pružnost a odolnost. Načež se tyto látky dostávají do potravin, vody a následně kontaminují životní prostředí. Významnou složkou plastů je bisfenol A (BPA), u kterého se následně prokázaly endokrinně disruptní účinky, a proto se jako jeho náhrada začala používat domněle neškodná analogická sloučenina bisfenol S (BPS). Nyní je BPS velice diskutovanou látkou, a to i díky studiím, které potvrdily, že tato látka má vliv na metabolismus živočichů podobným způsobem jako BPA.

Cílem bakalářské práce bylo vyhodnotit působení desetitýdenní orální expozice BPS na koncentraci hemoglobinu, hodnotu hematokritu, střední objem erytrocytu, průměrnou koncentraci hemoglobinu v erytrocytu, střední množství hemoglobinu v erytrocytu, počet erytrocytů, střední objem erytrocytů, celkový počet leukocytů, procentuální zastoupení granulocytů, lymfocytů a monocytů.

1 Literární přehled

1.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (EDC) jsou definovány jako exogenní látky či směsi látek, které mění funkci endokrinního systému a dále pak způsobují nepříznivé dopady na zdraví jedince, jeho potomstva či celé populace (Bendlová, 2013).

Účinek EDC má svá specifika. Tyto látky působí již v malém množství (obdobně jako hormony) a také s velikou latencí (tzn. jejich účinky se mohou projevit až po několika letech). Chemicky jsou EDC velmi heterogenní skupinou látek, od složitějších aromatických látek až po těžké kovy (Bendlová, 2013). Mezi EDC náleží různá průmyslová rozpouštědla (dioxiny), plastifikátory (BPA, ftaláty), některé pesticidy a insekticidy (furany, endosulfan), fungicidy (vinclozolin), detergenty (alkylfenolické polyetoxylát), farmaceutické a kosmetické výrobky (dietylsilbestrol, cyklické metylované siloxany), (Bendlová, 2013; La Merrill et al., 2019). Za EDC lze do jisté míry považovat také fytoestrogeny, což jsou rostlinné fenoly, které vykazují působení velmi slabých estrogenů, respektive antiestrogenů. Jejich zastoupení je především v rostlinách z čeledi bobovitých, zejména v sóji (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Bendlová, 2013).

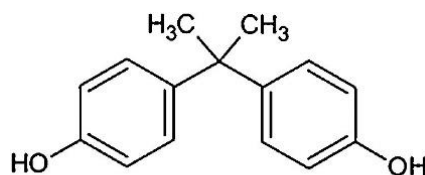
1.2 Bisfenoly

Bisfenoly (BP) jsou chemické látky se dvěma hydroxyfenylovými funkčními skupinami. Většina z BP je založena na difenylmetanu (výjimkami jsou bisfenol S, P a M). V těchto sloučeninách jsou benzenová jádra oddělena centrálním uhlíkovým atomem (obrázek 1.2), přičemž v některých BP je uhlíkový atom nahrazen sulfidovou či sulfo-novou skupinou (obrázek 1.5), (Fic et al., 2013). Na základě struktury a fyzikálních vlastností se BP dělí na A, B, F, S, Z, AF, AP (Andújar et al., 2019), které jsou popsány v dalších kapitolách.

1.2.1 Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) [2,2-bis(4-hydroxyfenyl) propan; $C_{15}H_{16}O_2$] je chemická látka s pevnou strukturou, vyskytující se ve formě vloček od bílé až po světle hnědou barvu anebo ve formě prachu. Pach BPA připomíná dezinfekční prostředky. Bod tání BPA je 154-155 °C a bod varu 220 °C. Molární hmotnost je 228,29 g/mol a hustotu má definovanou na 1,195 g/cm³ (Pokoj, 2010). BPA je dobře rozpustný v etanolu a acetonu a naopak málo rozpustný v tetrachloru. Ve vodě je tato látka prakticky nerozpustná (Arnika.org, 2003).

BPA se poměrně značně uplatňoval v průmyslové výrobě, a to díky jeho dobrým fyzikálním vlastnostem, které se využívaly při výrobě polykarbonátových plastů, epoxidových pryskyřic, barviv, pesticidů i zubních výplní (Fleisch et al., 2010). Základním problémem BPA je, že v uvedených produktech není stabilní. Při vystavení těchto produktů vysokým teplotám a dalším fyzikálním faktorům se z nich BPA uvolňuje a tím kontaminuje prostředí, případně potraviny anebo přímo lidský organizmus (Calafat et al., 2010). V souvislosti s vysokou kontaminací prostředí, se začal BPA pojít se zdravotními poruchami jak zvířat, tak i lidí (Canesi a Fabbri, 2015). Bylo prokázáno, že BPA účinkuje jako xenoestrogen a antiandrogen (Shibata et al., 2002; Watson et al., 2005) má neurotoxické a imunotoxické účinky (Yin et al., 2015), vede ke zvýšení tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) v játrech (Bindhumol et al. 2003), a také narušuje embryonální a fetální vývoj (Heimeier a Shi, 2010).



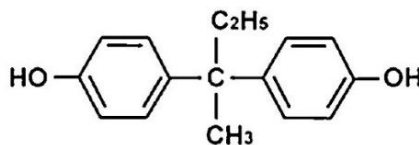
Obrázek 1.1: Schéma bisfenolu A (Sigmaaldrich.com, 2021)

BPA vstupuje do lidského anebo zvířecího organismu především alimentární cestou (Ribeiro et al., 2017). Při této expozici je hlavním místem vstřebání BPA střevo. Načež volný BPA je nejlépe vstřebáván v tlustém střevě (Inoue et al., 2003). Metabolismus vstřebaného BPA probíhá převážně v játrech (Kapustka et al., 2020).

1.2.2 Bisfenol B

Bisfenol B (BPB) [2,2-bis(4-hydroxyfenyl)butan; $C_{16}H_{18}O_2$] byl syntetizován jako alternativní látka k BPA. Struktura BPB je zobrazena na obrázku 1.2. U této látky se předpokládala nižší toxicita, avšak nedávné studie dokládají, že BPB podobně jako BPA narušuje stavbu a funkci pohlavních orgánů potkanů a ryb (Minier et al., 2019). Nebezpečí této látky je nezbytné spatřovat především proto, že se BPB vyskytuje v produktech označovaných „BPA free“, jedná se o obaly potravin, zubních tmelů, šampónů a sprchových gelů, mejkapu, zubních past (Liao a Kannan, 2014). Liao et al. (2012) popisuje přítomnost BPB také v bankovkách, vstupenkách a účtenkách

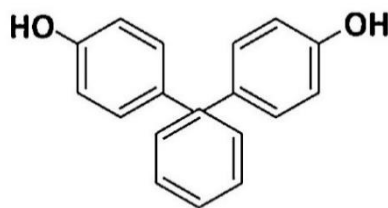
(v „*BPA free*“ účtenkách). Dále může být přítomen v mléčných a masných výrobcích, zelenině, konzervovaných potravinách a v cereáliích (Liao a Kannan, 2014).



Obrázek 1.2: Schéma bisfenolu B
(Sigmaaldrich.com, 2021)

1.2.3 Bisfenol F

Bisfenol F (BPF) [bis(4-hydroxyphenyl)metan; $\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$] je častěji využívanou látkou (obrázek 1.3), která byla například analyzována v konzervách, účtenkách z termopapíru a nealkoholických nápojích. BPF vykazuje estrogení, androgení a antiestrogení účinek. U BPF bylo prokázáno také narušení signální dráhy zapojené do metabolismu lipidů a adipogeneze (Ullah et al., 2019).

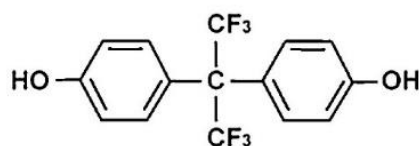


Obrázek 1.3: Schéma bisfenolu F
(Sigmaaldrich.com, 2021)

1.2.4 Bisfenol AF

Bisfenol AF (BPAF) [4,4'-(Hexafluoroisopropyliden)diphenol; $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_6\text{O}_2$] je fluorovaný organický difenol a strukturní analog BPA, ve kterém jsou dvě metylové skupiny nahrazeny trifluormetylovými skupinami (obrázek 1.4). BPAF má široké využití například jako síťovací prostředek, dále jako činidlo při výrobě fluoropolymerů a fluoroelastomerů či jako monomer při výrobě mnoha jiných polymerů. Díky svému širokému použití v průmyslu je BPAF považován za nový kontaminant životního prostředí. V současné době chybí toxikologické informace o BPAF (Edlists.org, 2020),

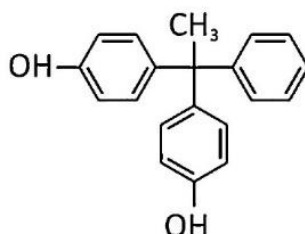
pouze Rongzhen et al. (2020) publikovali negativní účinek BPAF na imunitní systém (inhibice životaschopnosti makrofágů a funkce T-buněk).



Obrázek 1.4: Schéma bisfenolu AF
(Sigmaaldrich.com, 2021)

1.2.5 Bisfenol AP

Bisfenol AP (BPAP) [4,4'-(1-fenylethyliden)bisfenol; $C_{20}H_{18}O_2$] je látka, která se ze všech analogů BPA nejčastěji uplatňuje při výrobě kontaktních materiálů (obrázek 1.5). Uvádí se, že BPAP vykazuje vyšší genotoxický potenciál, než je tomu u BPA (Sigmaaldrich.com, 2021).



Obrázek 1.5: Schéma bisfenolu AP
(Sigmaaldrich.com, 2021)

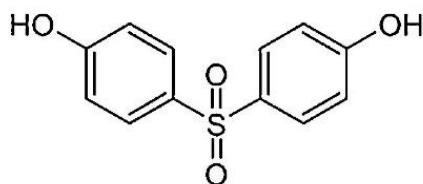
1.2.6 Bisfenol S

Bisfenol S (BPS) [4,4'-sulfonyldifenol; $C_{12}H_{10}O_4S$] (obrázek 1.6) je pevná látka bezbarvého charakteru, která ve vodě vytváří jehlicovité krystaly. Bod tání BPS je při teplotě 245-250 °C. Jeho molární hmotnost činí 250,27 g/mol. Rozpustný je ve vodě při 1100 mg/l a také v etanolu. Hustota se rovná 1,3663 g/cm³ (Pivnenko et al., 2015).

BPS je lidský organismus exponován každodenně, a to jednak díky jeho přítomnosti v různých spotřebních výrobcích, plastech, termografických papírech, rychleschnoucích lepidlech ale také kvůli kontaminaci prostředí (Glausiusz, 2014). Zvýšená kontaminace prostředí BPS, je dána vzestupem průmyslového užití BPS, ke kterému vedla regulace BPA. BPS se jevil jako vhodná substituce BPA, především díky vyšší termální a světelné stabilitě a nižší vyluhovatelnosti (Naderi a Kwong, 2020).

Expozice lidí a zvířat probíhá obdobnou cestou jako u BPA a to perorálně, dermálně anebo inhalací (Rezg et al., 2018). Řada studií prokázala odlišnou biologickou dostupnost BPS v souvislosti s různým způsobem expozice (Beausoleil et al., 2022). Biologická dostupnost se pro perorální expozici kvantifikuje jako podíl BPS, který z podané látky vstupuje do systémové cirkulace organismu. Zahrnuje tedy absorpci i primární metabolismus této látky (Beausoleil et al., 2022). Při perorálním příjmu je BPS metabolizován v tenkém střevě (enzym UGT1A10), avšak značné množství BPS podléhá metabolismu v jaterních buňkách (hepatocytech) enzymem UGT1A9 na BPS-glukuronid (Skledar et al., 2015), který vykazuje vysokou voděrozpustnost a tedy snadnou eliminaci z organismu prostřednictvím moči. Tento fakt dokládají studie na různých experimentálních modelech zvířat (Song et al., 2017; Oh et al., 2018; Waidyanatha et al., 2018; Gayrard et al., 2019; Khmiri et al., 2020).

Oproti orální expozici BPS je dermální expozice do jisté míry nebezpečnější, a to především z důvodu rychlého vstupu BPS do systémové cirkulace. V tomto případě je obejit první průchod v játrech, což vede k významně vyšší koncentraci biologicky dostupného BPS (Gayeard et al., 2019).



Obrázek 1.6:Schéma bisfenolu S
(Sigmaaldrich.com, 2021)

BPS zasahuje do mnoha biologických procesů v organismu. První spojitosti negativních dopadů BPS na organismus byly publikovány v roce 2012 (Mathew et al., 2014), poté byla provedena řada studií, která tento fakt potvrdila. Jednalo se o narušení funkce hypofýzy potkanů (Viñas a Watson, 2013), změny morfologických a funkčních parametrů spermií (Ullah et al., 2019), narušení reprodukce ryb (Ji et al., 2013) a srdeční činnosti myši (Zhang et al., 2020). BPS je také spojován s obezitou (Thoene et al., 2020) a poruchou vývoje kostí (Chin et al., 2018).

1.3 Význam a charakteristika krve

Krev (*sanguis*) představuje životně důležitou a nenahraditelnou tělesnou tekutinu, která koluje v uzavřeném systému. Vytváří vnitřní prostředí organismu. Mezi hlavní funkce krve se řadí transport (O_2 , CO_2 , vody), regulace a obrana (zabezpečována leukocyty, imunoglobuliny, cytokiny, proteiny akutní fáze). Další neméně významnou funkcí krve je udržení acidobazické rovnováhy, nepřetržitého obsahu vody v organismu a vzájemného poměru iontů. Krev je považována z hlediska morfologicko-funkčního za životně významný orgán (Sova, 1990; Doubek et al., 2003).

1.4 Fyzikální vlastnosti krve

Krev je charakterizována řadou fyzikálních vlastností, mezi které patří viskozita, osmolalita, osmotický tlak, tonicita, onkotický (koloidně osmotický) tlak, objem krve, hustota krve, barva a pH krve (Doubek et al., 2003).

1.4.1 Viskozita krve

Viskozita (vazkost) krve představuje vnitřní tření tekutiny. Tato veličina je odvislá od počtu buněčných elementů a koncentrace plazmatických proteinů (poměr albuminů a globulinů, koncentrace fibrinogenu). Dále také na teplotě. Viskozita krve se udává čtyřikrát až pětkrát vyšší, než je tomu u viskozity vody (Doubek et al., 2003; Windberger et al., 2003).

1.4.2 Osmolalita

Osmolalita je celkové množství osmoticky aktivních látek v rozpouštědle. Osmoticky aktivní látky v krvi jsou glukóza, soli a dusíkaté metabolity (Doubek et al., 2003).

1.4.3 Osmotický tlak

Osmotický tlak představuje rozdíl mezi vodou a plazmou při ideálně semipermeabilní membráně. Závisí na osmolalitě. Jeho hodnota činí zhruba 750 kPa (Doubek et al., 2003).

1.4.4 Tonicita

Tonicita odpovídá osmotickému tlaku proti plazmě (Doubek et al., 2003).

1.4.5 Onkotický (koloidně osmotický) tlak

Onkotický tlak označuje tlak plazmatických proteinů proti *intersticiu* (kapilární stěny jsou pro proteiny nepropustné). Jeho hodnota se pohybuje kolem 3,5 kPa (Doubek et al., 2003).

1.4.6 Objem krve

Objem krve je stálý, u potkanů se pohybuje v rozmezí 5,0 – 7,1 ml/100 g tělesné hmotnosti (Moore, 2000a). Mezi faktory, které ovlivňují objem krve, patří pohlaví, věk (u mladších potkanů byl zaznamenán větší objem krve), výživný stav (menší objem krve má zpravidla zvíře obézní) a zdravotní stav (Nemzek et al., 2001). Pouze 50 % krve cirkuluje v krevním řečišti, zbytek krve se nachází především v játrech, slezině a kůži. Při poklesu 50–60 % krevního objemu dochází k selhání krevního řečiště (Jelínek a Koudela, 2003).

1.4.7 Hustota krve

Hustota krve je dána poměrem specifické hmotnosti proti vodě. Závisí zejména na koncentraci plazmatických proteinů a hodnotě hematokritu. Tato hodnota se pohybuje v rozmezí 1,042 – 1,053 kg/m³ (Doubek et al., 2003).

1.4.8 Barva krve

Barva krve závisí na nasycení kyslíkem a pohybuje se v odstínech od jasně červené (tepenná) až po tmavě červenou (žilní), (Jelínek a Koudela, 2003).

1.4.9 pH krve

Hodnota pH krve kolísá v rozmezí hodnot 7,35 – 7,45 (Jelínek a Koudela, 2003).

1.5 Složení krve

Krev se skládá z krevní plazmy a krevních elementů, mezi které náleží červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky (Doubek et al., 2003).

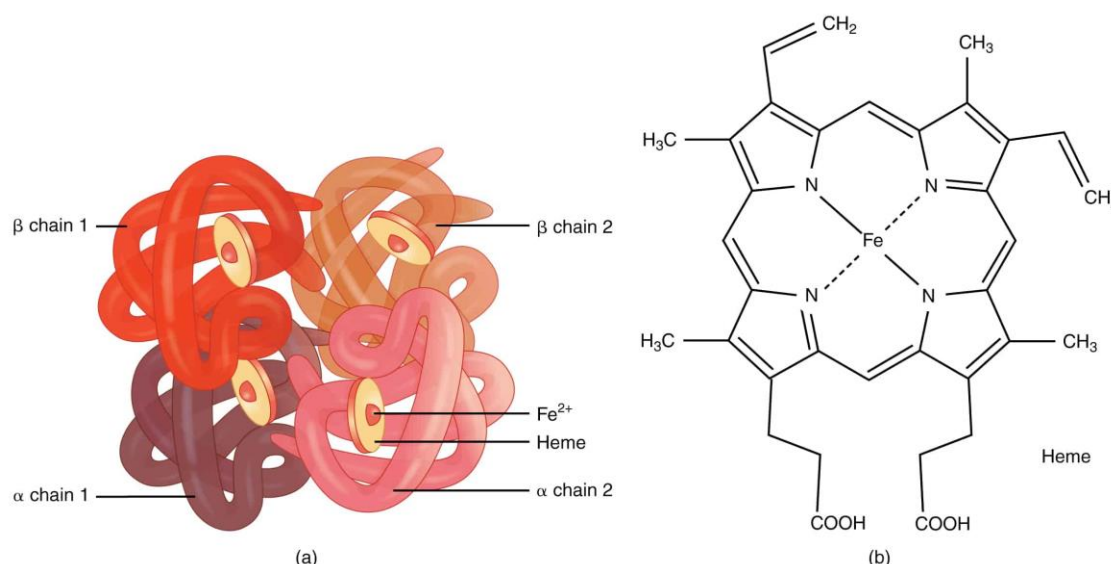
1.5.1 Krevní plazma

Krevní plazma je průhledná, lehce nažloutlá a mírně alkalická tekutina tvořící 55 % objemu krve. Hlavní složky krevní plazmy jsou voda (91 až 93 %) a plazmatické bílkoviny (7 %). Z plazmatických bílkovin je nejvíce zastoupen albumin, skupina globulinů (α , β , γ) a fibrinogen. Langmeier (2009) uvádí, že v krevní plazmě jsou také přítomny lipidy ve formě triacylglycerolů, fosfolipidů, cholesterolu a volných mastných kyselin. Zhruba 1 % plazmy je tvořeno elektrolyty (Na^+ , Cl^- , HCO_3^-), plyny (O_2 , CO_2 , N_2), dusíkatými látkami (močovina, kreatinin, aminokyseliny), hormony, vitamíny a enzymy (Carneiro et al., 1999; Doubek et al., 2003; Samuelson, 2007).

1.6 Krevní elementy

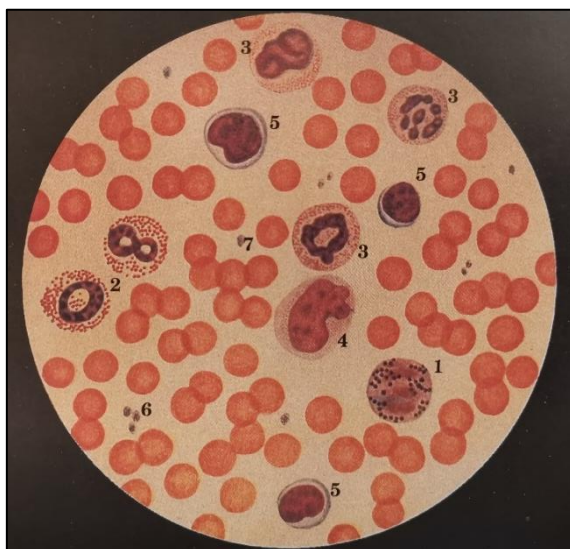
1.6.1 Červené krvinky (erythrocyty)

Červené krvinky (RBC) jsou podobně jako u dalších savců i u potkanů bezjaderné buňky, bikonkávního tvaru o průměrné velikosti $6,2\ \mu\text{m}$ ($5,7 - 7\ \mu\text{m}$). U potkanů se dožívají 56–69 dnů (Derelanko et al., 1985). Červené krvinky jsou nepostradatelné pro transport kyslíku, oxidu uhličitého a aminokyselin (Freedrickson a Harris, 2000; Moore, 2000a). Přenos uvedených plynů je zajištěn vazbou na hemoglobin, který vyplňuje až z 90 % intracelulární prostor červené krvinky. Hemoglobin (obrázek 1.7) určuje také zbarvení těchto buněk (obrázek 1.8) a je tvořen dvěma páry globinových řetězců, čtyřmi tetrapyrolovými prstenci a čtyřmi atomy dvoumocného železa (Fe^{2+}), (Rošková, 2019). Počet červených krvinek je v rámci druhu značně variabilní. Bylo prokázáno nižší zastoupení těchto buněk u samců a mladších jedinců (Leck, 1999).



Obrázek 1.7: Struktura hemoglobinu (chemistryscore.com, 2021)

U mladších jedinců jsou červené krvinky morfologicky variabilnější a častěji se v krvi vyskytují nevyzrálé formy (retikulocyty). Relativní počet retikulocytů u starších potkanů se udává v rozmezí 2–5 %, zatímco u mladých potkanů je tato hodnota 10–20 % (Moore, 2000a; Doubek et al., 2003). Fyziologické hodnoty počtu erytrocytů jsou uvedeny v tabulce 1.1.



Obrázek 1.8: Hemogram u laboratorního potkana (Doubek et al., 2003)

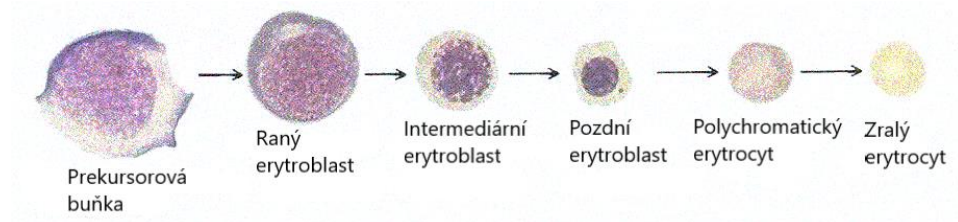
Vysvětlivky: (1) bazofilní granulocyt, (2) eozinofilní granulocyty, (3) neutrofilní granulocyty, (4) monocyt, (5) lymfocyty, (6) trombocyty, (7) erytrocyty

Erythropoéza a zánik erytrocytů

Tvorba červených krvinek (erythropoéza) v průběhu embryonálního vývoje počíná ve žloutkovém vaku (mezodermu), následně se přesouvá do jater, sleziny a v první polovině gravidity přechází v kostní dřeň. Po narození se erytrocyty (obrázek 1.9) vytváří v kostní dřeni, u potkanů však mohou vznikat také ve slezině a játrech (Reece, 1998; Whalan, 2015).

Základem tvorby všech krevních buněk je pluripotentní hematopoetická kmenová buňka. Tato kmenová buňka je následně diferenciována na dvě linie multipotentních buněk, které se dělí na lymfoidní a myeloidní. Myeloidní multipotentní buňka tvoří základ pro 8 buněčných linií, přičemž jedna je základem pro vznik erytrocytu. Diferenciací myeloidní multipotentní buňky vzniká proerytroblast. Ten se poté dělí na bazofilní erytroblast, polychromatofilní erytroblast, ortochromatický erytroblast a retikulocyt. Retikulocyt představuje nezralou formu erytrocytu, jejíž schopností je plnit funkci erytrocytu. Po třech dnech retikulocyt dozrává na erytrocyt. U stárnoucího erytrocytu klesá obsah vody i iontů a stoupá jeho vnitřní viskozita. Díky tomu se zmenší i jeho velikost.

Zestárlé erythrocyty jsou pohlceny fagocytujícími buňkami ve slezině, játrech a kostní dřeni (Reece, 1998; Trojan, 2003).



Obrázek 1.9: Vývojové fáze erythrocytu (Bain et al., 2010)

Proces krvetvorby ovlivňují různé faktory. Nejčastějším faktorem je nárok organismu na kyslík. Při nízké zásobě kyslíku, respektive zvýšené potřebě je stimulována syntéza a uvolnění hormonu erythropoetinu. Další hormony zasahující do erythropoézy jsou tyroxin, testosteron, somatotropin a estrogen. Dále má vliv na průběh erythropoézy přísun železa, vitaminu B₁₂ a kyseliny listové (Jelínek a Koudela, 2003).

Tabulka 1.1: Zastoupení jednotlivých krevních buněk u potkana (Weiss et al., 2010)

Parametr	Hodnota
Počet erythrocytů ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7,62-9,99
Počet leukocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	2,00-10,00
Lymfocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1,56-2,50
Neutrofilní granulocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,46-0,68
Eozinofilní granulocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,01-0,15
Bazofilní granulocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0-0,03
Monocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,02-0,16
Trombocyty ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	430,00-1450,00

1.6.2 Bílé krvinky (leukocyty)

Bílé krvinky (WBC) jsou buňky se zásadní úlohou zajistit imunitu daného organismu. Počet WBC v krvi potkana je výrazně nižší než erythrocytů a udává se v hodnotách $2-10 \times 10^3/\mu\text{l}$ (tabulka 1.1), (Knotek et al., 1999; Washington et al., 2012). WBC se od erythrocytů odlišují zpravidla přítomností jádra, a naopak absencí hemoglobinu. Morfologicky a funkčně se WBC dělí na granulocyty a agranulocyty (Knotek et al., 1999; Washington et al., 2012).

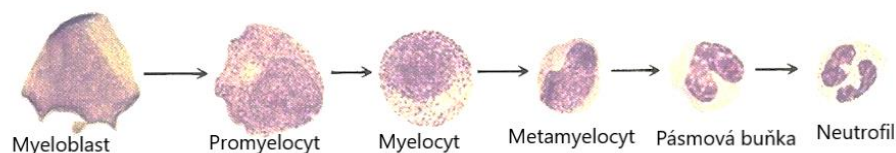
Granulocyty

Granulocyty (GR) též polymorfonukleární leukocyty představují buňky, které obsahují ve své cytoplazmě granula o rozdílné afinitě k barvivu (kyselé, zásadité). Na základě barvitelnosti se rozdělují do tří skupin – neutrofilní, bazofilní a eozinofilní (Doubek et al., 2003; Čížek et al., 2014).

1. Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty (neutrofilny) jsou fagocytující buňky, které hrají zásadní roli v přirozené imunitě, a to obranou proti vnikajícím patogenům, zejména bakteriím a houbám (Kolaczowska a Kubes, 2013). Životnost těchto buněk je pouze 6 hodin, přičemž v krevním řečišti cirkulují krátkou dobu. Následně vstupují do vmezeřeného vaziva, kde zanikají (Arndt a Boone, 2019). U potkanů neutrofilní granulocyty tvoří 12–38 % z celkového počtu WBC a jejich počet je vyšší u samců než u samic. Průměrná velikost neutrofilních granulocytů je 11 μm . Ve světlé cytoplazmě neutrofilní granulocyty nesou vysoce segmentované, stočené či stužkovité (s četným vroubkováním) jádro (obrázek 1.10), (Bolliger, 2004). Segmentace jádra je závislá na stáří buňky. U mladých jedinců jsou jádra bez segmentace (tyčky), (Toman et al., 2000; Eurell a Frappier, 2006).

V každém neutrofilním granulocyту se vyskytují dva typy cytoplazmatických granul – specifická a azurofilní. Specifická granula dosahují velikosti 0,15 μm a díky své velikosti rovněž i barvitelnosti často splývají s cytoplazmou. Obsahem těchto granul je alkalická fosfatáza, kolagenázy, lysozym a protein laktoferin. Velikost azurofilních granul zpravidla bývá 0,5 μm . Jedná se o primární lyzozomy, které obsahují enzymy ze skupiny hydroláz, a to například elastázu, kolagenázu či kyselou fosfatázu (Čížek et al., 2014). Vývojové fáze neutrofilních granulocytů jsou zobrazeny na obrázku 1.10.

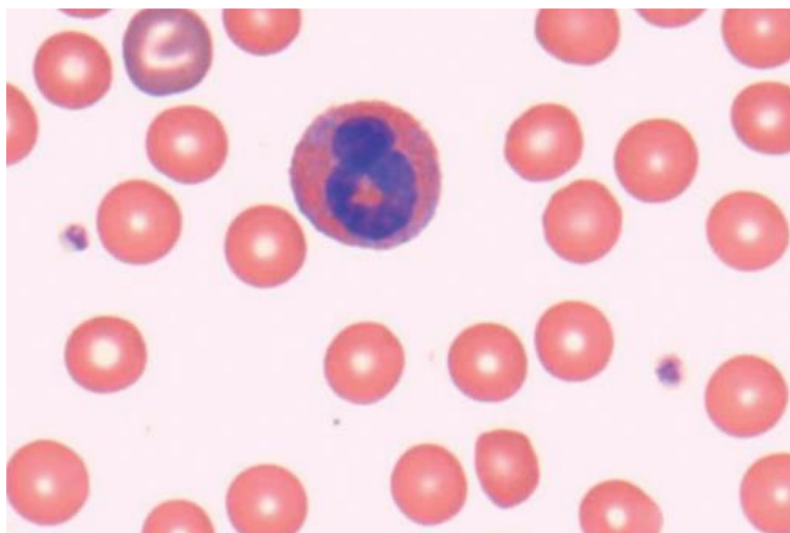


Obrázek 1.10: Vývojové fáze neutrofilního granulocyту (Bain et al., 2010)

2. Eozinofilní granulocyty

Eozinofilní granulocyty (eozinofily) představují u potkanů 1–4 % z celkového počtu WBC. Podobně jako neutrofilní granulocyty žijí i eozinofilů relativně krátce (18-23 hodin), (Arndt a Boone, 2019). Eozinofilní granulocyty potkanů mají méně segmen-

tovaná jádra, než je tomu u neutrofilních granulocytů a obsahují malá, kulatá až načervenalá granula (obrázek 1.11). Rovněž i granula eozinofilů se dělí na specifická a primární. Specifická granula jsou větší a obsahují širokou paletu mediátorů zánětu anebo poškození tkáně, včetně bazických proteinů, cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a enzymů. Převažujícími látkami jsou hlavní bazický protein, eozinofilní kationický protein, eozinofilní peroxidáza a eozinofilní neurotoxin (Giembycz a Lindsay, 1999). Eozinofilní granulocyty jsou buňky, které se podílí na imunitní odpovědi typu dva. Tedy na obraně proti parazitům, účastní se alergických reakcí a zánětlivých odpovědí (Reece, 1998; Toman et al., 2000; Jelínek a Koudela, 2003; Willebrand a Voehringer, 2017). Eozinofilní granulocyty se po výstupu z krevního řečiště soustřeďují do vaziva pod epitel kůže, pochvy, dělohy a trávicího traktu. Bylo prokázáno, že eozinofilní granulocyty v periferních tkáních mají odlišné vlastnosti nežli v krvi (Arai et al, 2020).

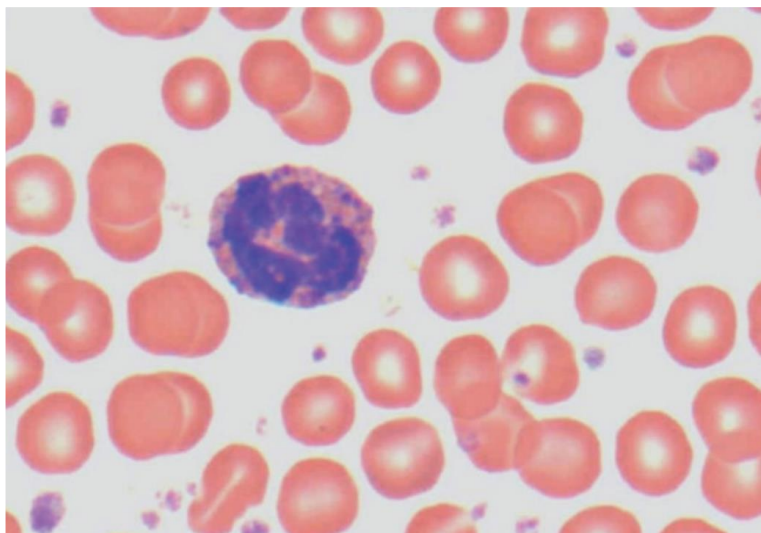


Obrázek 1.11: Eozinofilní granulocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010)

3. Bazofilní granulocyty

Přestože jsou bazofilní granulocyty (bazofily) potkanů poměrně výrazné, v nátěrech periferní krve jsou pozorovány pouze zřídka (tabulka 1.1). Četnost bazofilních granulocytů je méně nežli 2 % (Ward et al., 2018). Jádra bazofilních granulocytů jsou kulovitá případně laločnatá a cytoplazma obsahuje velká, kulatá, fialová granula (obrázek 1.12). Četnost granul v cytoplasmě může být různá, mohou se vyskytovat málo, anebo jsou tak početná, že zakrývají celé jádro (Lord et al., 1991). Velikost bazofilních granul je v průměru 0,5 μm . Tato granula obsahují různé látky jako je heparin, histamin, pe-

rooxidáza či serotonin (Toman, 2000; Eurell a Frappier, 2006; Čížek et al., 2014). Afinita granul k bazickým barvivům dává granulám tmavě purpurově modrou barvu eventuálně tmavě fialovo-červenou barvu (Ward et al., 2018). Bazofilní granulocyty jsou nefagocytyující buňky, které hrají roli při hypersenzitivních reakcích a rovněž pomáhají v boji proti parazitům (Čížek et al., 2014).



Obrázek 1.12: Bazofilní granulocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010)

Agranulocyty

Agranulocyty neboli mononukleární leukocyty jsou buňky, které neobsahují specifická granula (Marvan, 1998; Doubek et al., 2003; Čížek et al., 2014). Zároveň však obsahují granula azurofilní. Původem těchto granul jsou primární lysozomy. Jádra těchto buněk jsou okrouhlého tvaru, nesegmentovaná a často napodobující písmeno D. Agranulocyty se dělí na lymfocyty a monocyty (Čížek et al., 2014).

1. Lymfocyty

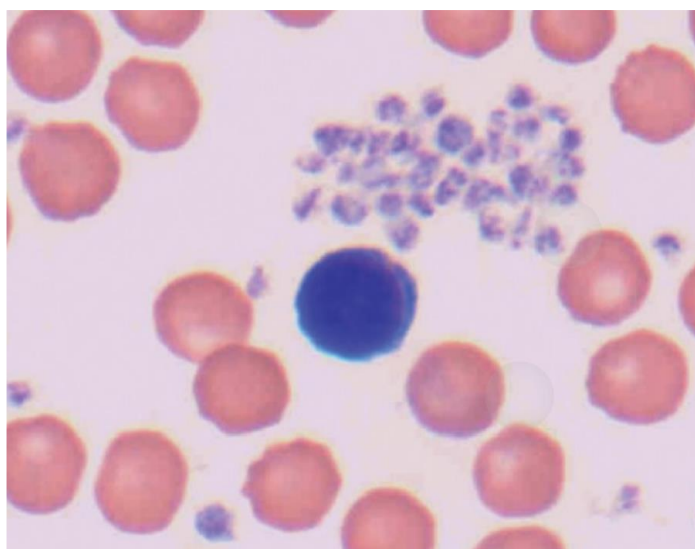
Lymfocyty (obrázek 1.13) tvoří u potkanů 60–75 % z celkového počtu WBC (tabulka 1.1) čímž představují hlavní podíl leukocytů v periferní krvi. Tento podíl je však závislý na stáří jedince. S přibývajícím věkem potkanů počet lymfocytů klesá, a naopak podíl neutrofilních granulocytů stoupá (Bolliger, 2004). Životnost lymfocytů v periferní krvi je 60-100 dnů (Arndt a Boone, 2019).

V krevních nátěrech je možno pozorovat lymfocyty o různé velikosti a obsahu cytoplazmy. Malé lymfocyty měří přibližně 6 μm a obsahují nepatrné množství cytoplazmy. Naproti tomu velké lymfocyty dosahují až 15 μm a obsahují hojnou světle až tmavě modrou cytoplazmu, ve které mohou být přítomna velká, tmavě zbarvená azurofilní granula (Bickhardt et al., 1983; Schwab et al., 2005).

Na základě přítomnosti povrchových antigenně specifických receptorů a funkce se lymfocyty rozdělují na dvě skupiny (B-lymfocyty a T-lymfocyty), (Toman et al., 2000).

B-lymfocyty jsou pojmenovány podle lymfoidní tkáně spojené s kloakou ptactva, zvanou *bursa Fabricii* (zde první průkaz diferenciaci). B-lymfocyty mají odpovědnost za humorální imunitu tím, že jsou schopny po konečné diferenciaci produkovat specifické protilátky (Čížek et al., 2014).

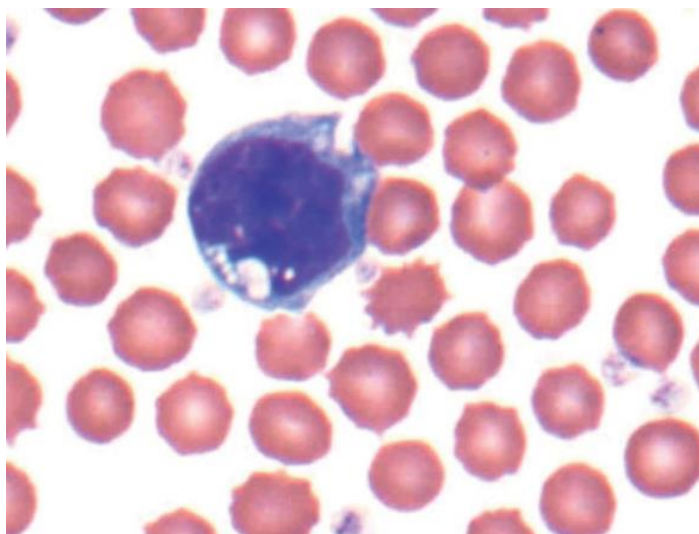
T-lymfocyty vznikají v kostní dřeni a jejich následná maturace probíhá v brzlíku (*thymus*). Jejich funkční odpovědnost spočívá v buněčné imunitní odpovědi (Čížek et al., 2014).



Obrázek 1.13: Lymfocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010)

2. Monocyty

Monocyty (obrázek 1.14) jsou v krvi potkanů zastoupeny z 1-6 %. Celkový počet monocytů je zobrazen v tabulce 1.1. V krevním nátěru jsou tyto buňky relativně snadno rozpoznatelné, a to především díky jejich velikosti (jedná se o největší buňky) a uložení jádra (Campbell et al., 2012). Jádra monocytů mohou být pleomorfní, kulatá, vroubkovaná či laločnatá. Jejich cytoplazma je objemná a zbarvuje se v odstínu bledě-šedo modré s častým obsahem vakuol. Příležitostně se v cytoplazmě vyskytují acidofilní granula (Fredrickson a Harris, 2000). Obdobně jako neutrofilní granulocyty jsou tyto buňky schopné améboidního pohybu a fagocytózy. Tvoří tedy první linii obrany proti patogenním mikroorganismům (Ward et al., 2018). Monocyty vznikají v kostní dřeni a jsou průběžně uvolňovány do krve, kde cirkulují 12-100 hodin. Z krevního řečiště mohou přecházet do vaziva, kde se diferencují na makrofágy (Čížek et al., 2014).



Obrázek 1.14: Monocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010)

1.6.3 Krevní destičky

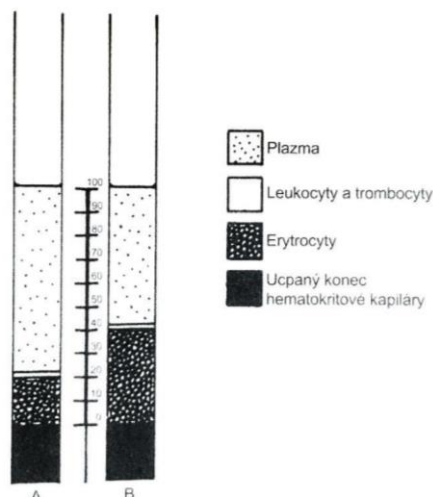
Krevní destičky (trombocyty) potkanů mají podobnou morfologii jako u myši. Jedná se o bezjaderné fragmenty megakaryocytů. Kulaté trombocyty jsou stejně velké jako červené krvinky a poměrně často jsou pozorovány i jejich shluky. Ve srovnání s velkými hospodářskými zvířaty mají potkani vyšší počet krevních destiček (Moore, 2000a). Průměrný počet krevních destiček je uveden v tabulce 1.1. Hlavní funkcí trombocytů je krevní srážení (Reece, 1998; Jelínek a Koudela, 2003).

1.7 Hematologické parametry

Hematologické parametry jsou důležitým kritériem pro posouzení zdravotního stavu zvířat a lidí, ale také pro posouzení toxicity různých chemických látek (Khan a Zafar, 2005; Togun et al., 2007; Olafedehan et al., 2010).

1.7.1 Hematokritová hodnota

Hematokritová hodnota (HCT) představuje procentuální podíl červených krvinek z celkového objemu krve (obrázek 1.15), (Frandsen et al., 2009). Pokles HCT je spojován s anémií nebo urémií. Naopak pokud se HCT zvýší, značí tak polyglobulii (Kraft a Dürr, 2001; Doubek et al., 2003). HCT potkanů se pohybuje v rozmezí 37,6 – 51,0 % (0,376 – 0,510 l/l krve), (Leck, 1999).



Obrázek 1.15: Schéma hematokritové hodnoty (Reece, 1998)

Vysvětlivky: A – anemická krev, B – krev zdravého jedince

1.7.2 Množství hemoglobinu

Množství hemoglobinu v erytrocytech (HGB) je parametr, který vyjadřuje schopnost přenosu kyslíku v těle (Whalan, 2015). U potkanů se referenční rozmezí hodnot HGB pohybuje v rozmezí 11,6 – 16,1 g/dl (Leck, 1999).

1.7.3 Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytech

Průměrná koncentrace hemoglobinu (MCHC) je ovlivněna HGB a velikostí erytrocytu. Fyziologické hodnoty MCHC jsou v rozmezí 30 – 34 g/dl (Moore, 2000a; Moore, 2000b).

1.7.4 Střední množství hemoglobinu v erytrocytu

Střední množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH) značí parametr, který není zcela považován za užitečný, jelikož se úměrně mění ke střednímu objemu erytrocytů (Moore, 2000a; Moore, 2000b).

1.7.5 Střední objem erytrocytů

Střední objem erytrocytů (MCV) je základní parametr červených krvinek. Udává průměrný objem erytrocytu. Tento parametr lze stanovit na hematologickém analyzátoru anebo jako podíl HTC a celkového počtu červených krvinek. Fyziologické rozmezí MCV je u potkanů 55,1 – 61,5 fentolitřů (fl), (Moore, 2000b). Whalan (2015) uvádí, že hodnoty MCV a MCH klesají a stoupají společně.

2 Materiál a metody

2.1 Experimentální zvířata

Do studie bylo zařazeno 18 outbredních potkanů kmene Wistar Han. Na základě tělesné hmotnosti byli potkani rozděleni do tří šestičlenných skupin (kontrolní, 50 µg BPS, 100 mg BPS). V průběhu experimentu byli potkani chováni v chovných nádobách s ad libitním přístupem k pitné vodě a krmivu (ST – 1. Velas s.r.o.). Zvířata byla chována ve standardním světelném režimu 12 hodin světla 12 hodin tma.

2.2 Průběh experimentu

Studie probíhala deset týdnů. Po týdenní aklimatizaci byla experimentálními skupinám zvířat denně podávána prostřednictvím žaludeční sondy různá koncentrace BPS (4,4'-Sulfonyldiphenol), $O_2S(C_6H_4OH)_2$, Sigma Aldrich (103039-100G) rozpuštěného ve slunečnicovém oleji (nosič), skupina 50 µg BPS přijímala 50 µg BPS/kg živé hmotnosti za den (ž. hm./d.) a skupina 100 mg BPS 100 mg BPS/kg ž. hm./d. Kontrolní skupině byl podáván pouze nosič. Pro dodržení uvedené expozice BPS byla zvířata v týdenních intervalech vážena a na základě aktuální tělesné hmotnosti upravena koncentrace BPS.

2.3 Odběr a zpracování vzorků krve

Pro analýzu hematologických parametrů byla krev získána srdeční punkcí. Odebraná krev byla nejpozději do jedné hodiny analyzována pomocí automatického analyzátoru ALVET 2000 (DIALAB spol. s.r.o.). Z hematologických parametrů byly stanoveny koncentrace hemoglobinu (HGB), hodnota hematokritu (HCT), střední objem erytrocytu (MCV), koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), střední množství hemoglobinu (MCH), počet erytrocytů (RBC), střední objem erytrocytů (WBC), procentuální zastoupení granulocytů (GR), lymfocytů (LY) a monocytů (MONO).

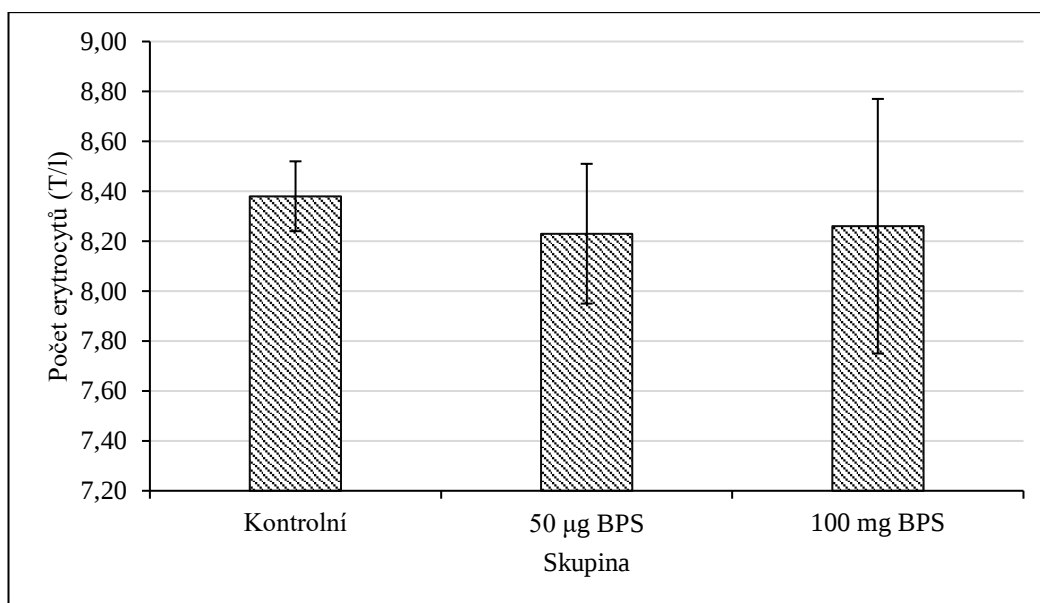
Statistická vyhodnocení

Získaná data byla zpracována analýzou rozptylu (ANOVA) s následným mnohorozměrným porovnáním pomocí Tukeyova HSD testu v programu Statistika 10 (StatSoft. Inc.). Základní statistická průkaznost byla akceptována na hladině významnosti $P < 0,05$.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Dopad expozice BPS na erytrocyty

Erytrocyty jsou buňky zodpovědné za transport kyslíku do orgánů a tkání (Trojan, 2003). Nízký počet erytrocytů anebo jejich snížená funkce mají negativní dopad na organismus (Fry a McGavin, 2012). V prostředí se vyskytuje řada chemických látek, u kterých byl prokázán hematotoxický účinek. Mezi tyto látky náleží i BPA, u kterého byl sledován při orální expozici dávkami 125 a 150 mg/kg pokles celkového počtu erytrocytů (RBC), hematokritové hodnoty (HCT) a průměrné koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), (Ulutaş et al., 2011; Yamasaki a Okuda, 2012; Ahmed et al., 2015). Ulutaş et al. (2011) uvádí, že k tomuto stavu mohlo dojít díky narušení erytropoézy, anebo zvýšeným poškozením erytrocytů. Vzhledem k strukturální podobnosti BPA a BPS vyvstala otázka, zda i BPS vykazuje podobný účinek. Tímto tématem se experimentálně zabývali autoři Pal et al. (2017), kteří podobně jako u BPA prokázali signifikantní pokles počtu RBC a obsahu hemoglobinu (HGB) u potkanů při orální expozici dávkou 60 a 120 mg BPS/kg ž. hm./d. Rovněž i tito autoři se domnívají, že BPS vede k narušení erytropoézy (inhibice syntézy erytropoetinu a jeho inaktivace v játrech) a také ke zvýšení hemolýzy erytrocytů.

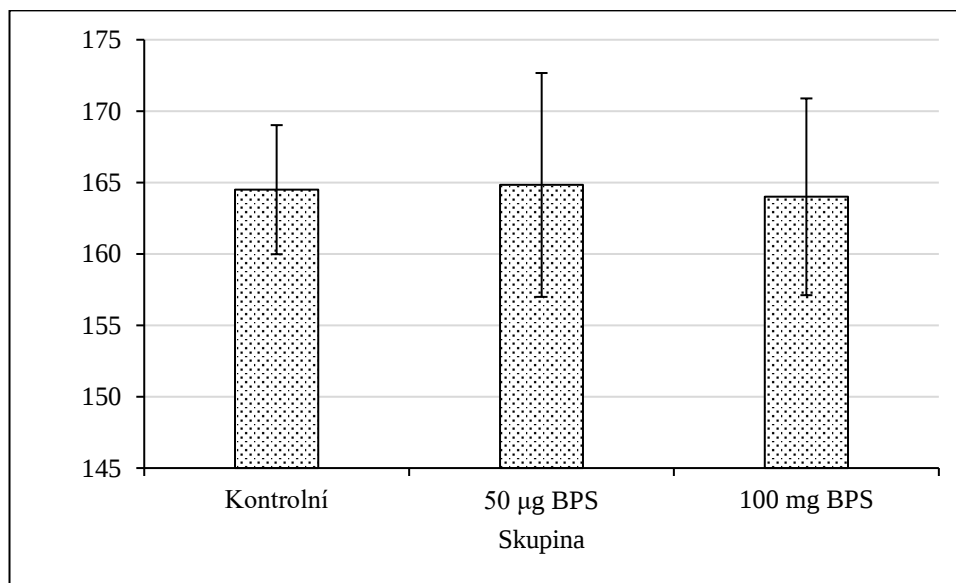


Obrázek 3.1: Počet erytrocytů (RBC)

V grafech 3.1 – 3.6 je zobrazen průměrný počet erytrocytů (RBC), koncentrace hemoglobinu (HGB), hematokritová hodnota (HCT), střední objem erytrocytů (MCV), koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC) a střední množství hemoglobinu (MCH).

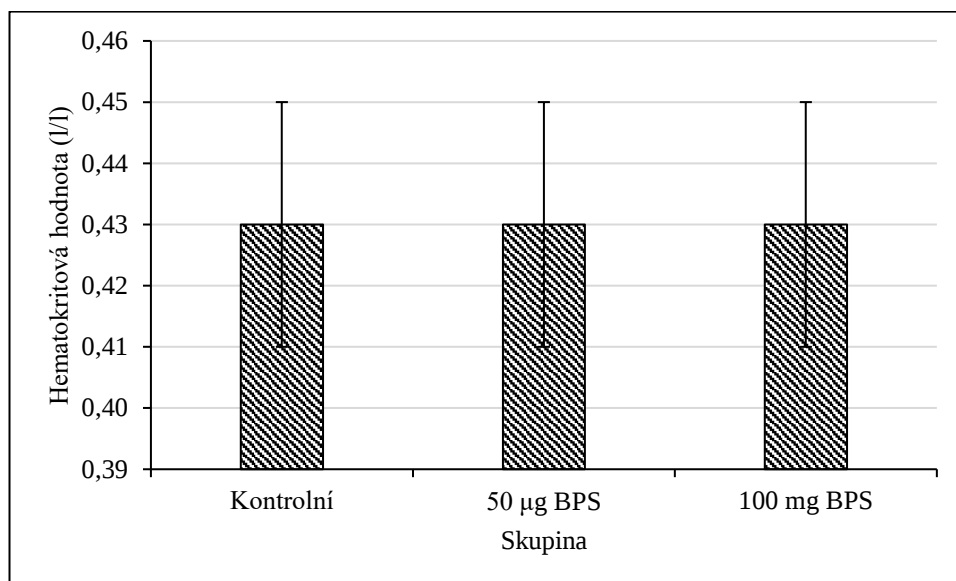
V našem experimentu se všechny uvedené parametry jak u kontrolních, tak experimentálních skupin (50 µg BPS, 100 mg) pohybovaly v referenčním rozmezí hodnot uváděné Giknis a Clifford (2008) pro vybraný kmen potkanů. V rámci námi sledovaných parametrů jsme mezi skupinami neshledali statisticky významný rozdíl. Oproti autorům Pal et al. (2017) jsme u experimentálních skupin nezaznamenali pokles koncentrace HGB ani HCT. Z grafu 3.2 a 3.3 je patrné, že tyto parametry byly u všech skupin téměř bez rozdílu. V případě celkového počtu RBC (graf 3.1), MCV (graf 3.4), MCHC (graf 3.5) a MCH (graf 3.6) byl oproti kontrolní skupině sledován pokles anebo vzestup hodnot těchto parametrů.

U kontrolní skupiny potkanů byl průměrný počet RBC $8,38 \pm 0,14$ T/l, u skupiny 50 µg BPS $8,23 \pm 0,28$ T/l a u skupiny 100 mg $8,26 \pm 0,56$ T/l. Pozorovaný pokles počtu erytrocytů u experimentálních skupin byl pouze 1,8 % (50 µg BPS) respektive 1,4 % (100 mg BPS). Podobný trend poklesu hodnot byl sledován i v případě MCHC (graf 3.5). U skupiny 50 µg BPS se jednalo o 0,8 % ($381,90 \pm 4,00$ g/l) a u skupiny 100 mg BPS o 0,6 % ($382,63 \pm 4,26$ g/l).

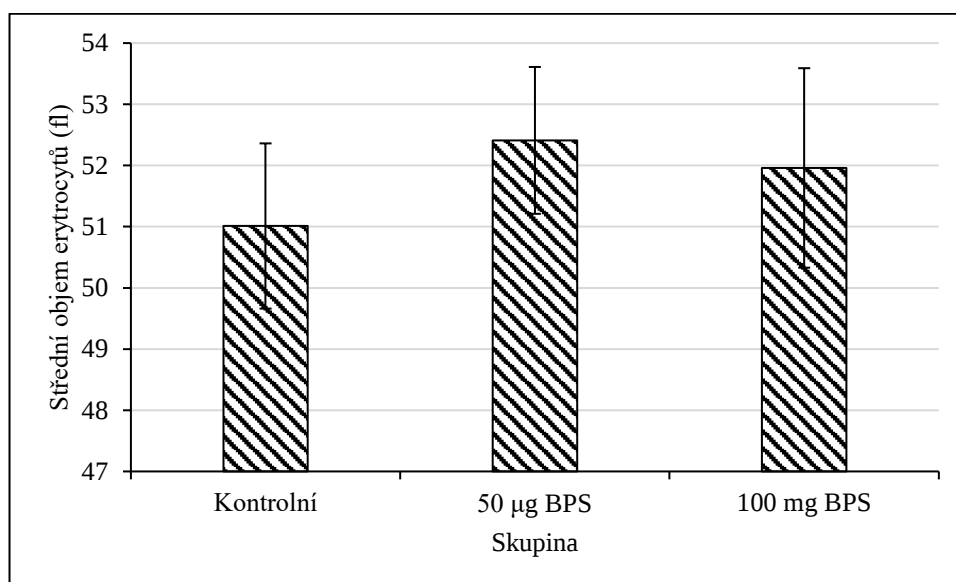


Obrázek 3.2: Koncentrace hemoglobinu (HGB)

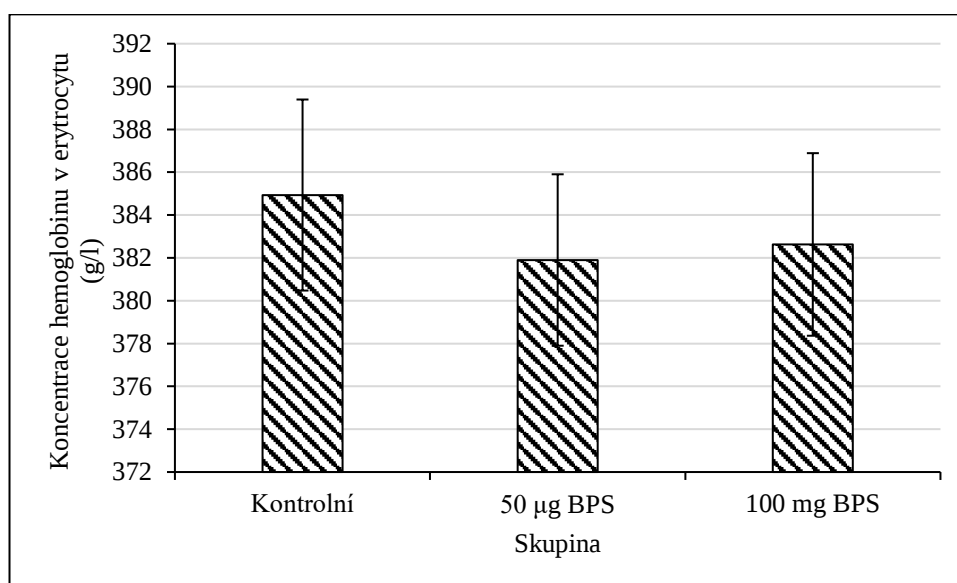
Hodnoty MCV a MCH vykazovaly oproti výše uvedeným parametrům opačný trend. Nejnížší hodnoty obou parametrů byly pozorovány u kontrolní skupiny (MCV $51,01 \pm 1,35$ fl, MCH $19,63 \pm 0,34$ pg) a naopak nejvyšší u experimentální skupiny 50 µg BPS (MCV $52,41 \pm 1,2$ fl, MCH $20,01 \pm 0,41$ pg). Shodný trend obou parametrů odpovídá literárním údajům (Whalan, 2015).



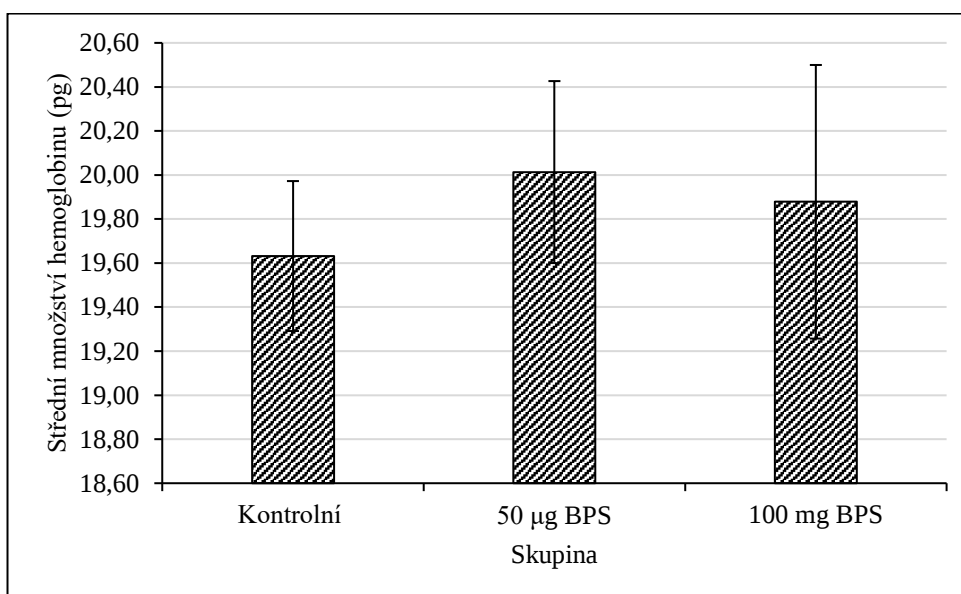
Obrázek 3.3: Hematokritová hodnota (HCT)



Obrázek 3.4: Střední objem erytrocytů (MCV)



Obrázek 3.5: Koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC)

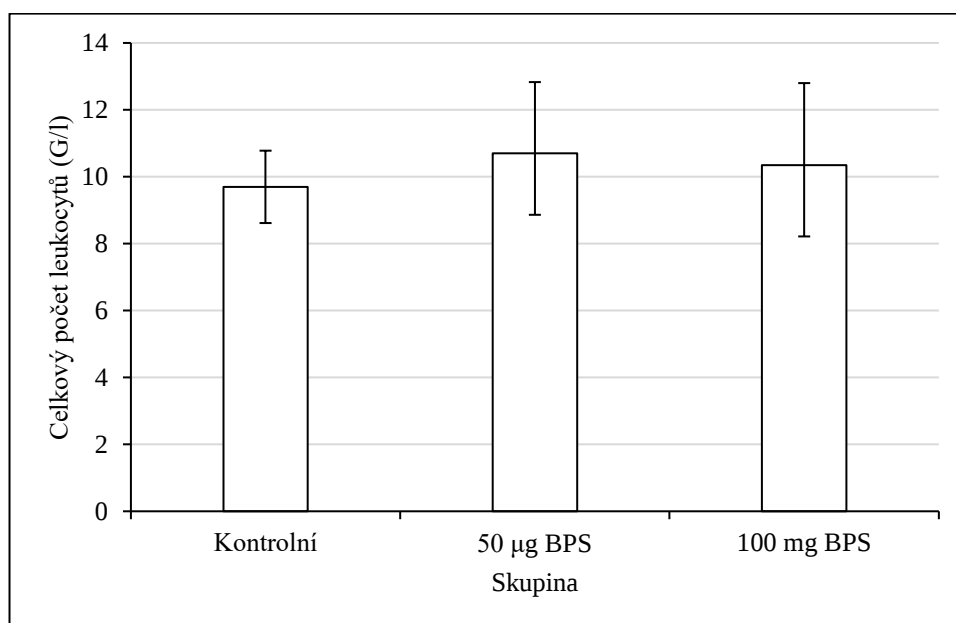


Obrázek 3.6: Střední množství hemoglobinu (MCH)

3.2 Dopad expozice BPS na leukocyty

Leukocyty hrají klíčovou roli v imunitním systému organismu (Whalan, 2015). Podobně jako v případě červených krvinek i tyto buňky mohou být ovlivněny různými chemickými látkami, ať se jedná o přímé působení na leukocyty anebo nepřímo narušením endokrinního či nervového systému, který zasahuje do regulace imunitního systému (Zerdan et al., 2021). Jedny z takových chemických látek mohou být i bisfenoly, které ve své struktuře nesou benzenová jádra, jenž dle Benjamin (2001) působí jako

hapteny. Hapteny po vazbě na proteiny leukocytů iniciují tvorbu protilátek, v jejichž důsledku dochází k lýze anebo aglutinaci leukocytů. Další studie dokládá, že bisfenoly (BPA, BPB, BPF) vedou ke zvýšené produkci ROS, peroxidaci lipidů a depleci glutathion peroxidázy (Ikhlas et al., 2019). Tyto procesy vedou rovněž k poškození leukocytů. Ikhlas et al. (2019) však poznamenávají, že uvedené procesy byly pozorovány zejména při vyšších koncentracích bisfenolů. Působení bisfenolů (BPA) o různých koncentracích uvádí i některé další studie. Například Karnam et al. (2016) prokázali signifikantní pokles celkového počtu leukocytů, procentuálního zastoupení lymfocytů a vzestup neutrofilních granulocytů u skupin potkanů s expoziční dávkou 200 a 600 mg BPA/kg ž. hm./d., nikoliv u dávky 50 mg BPA. Také autoři Ulutaş et al. (2011) a Ahmed et al. (2015) nepozorovali signifikantní rozdíly v celkovém počtu leukocytů a změny v leukogramu při expozičních dávkách 125, 150 a 250 mg BPA/kg ž. hm./d. V předložené práci jsme se zabývali dopadem 10 týdenní expozice potkanů BPS (50 µg a 100 mg BPS/kg ž. hm./d.) na celkový počet leukocytů (graf 3.6), procentuální zastoupením granulocytů, lymfocytů a monocytů (tabulka 3.1).



Obrázek 3.7: Celkový počet leukocytů

Z grafu 3.7 je zřejmé, že u námi sledované skupiny zvířat vedla expozice BPS k mírnému (nesignifikatnímu) vzestupu celkového počtu leukocytů, přičemž nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u skupiny 50 µg BPS ($10,70 \pm 2,13$ G/l). Toto zjištění není v souladu s autory Pal et al. (2017), kteří při expozici BPS zaznamenali naopak pokles celkového počtu leukocytů, a to se zvyšující se expoziční dávkou BPS.

Tabulka 3.1: Procentuální zastoupení leukocytů

Parametr	Skupina		
	Kontrolní	50 µg BPS	100 mg BPS
Lymfocyty	80,03±1,29	75,50±6,18	78,69±3,25
Granulocyty	16,4±2,03	20,77±5,62	17,78±2,99
Monocyty	3,58±1,14	3,73±1,25	3,54±0,87

V tabulce 3.1 je zobrazeno procentuální zastoupení lymfocytů, granulocytů a monocytů v krvi potkanů. U všech skupin se analyzované hodnoty pohybovaly v referenčním rozmezí uváděném Giknis a Clifford (2008). V našem experimentu expozice různými dávkami BPS nevedla k signifikantním změnám v zastoupení vybraných typů leukocytů. Oproti kontrolní skupině byly patrné změny hodnot zejména u skupiny 50 µg BPS. V případě zastoupení lymfocytů byly hodnoty nižší o 5,7 % a u granulocytů a monocytů naopak vyšší o 26,6 % respektive o 4,2 %. V literárních zdrojích nejsou dostupné údaje o působení BPS na vybrané populace leukocytů. Vědecké publikace se zabývaly primárně působením donedávna nejvíce rozšířeného BPA. Z těchto publikací je zřejmé, že BPA zasahuje do zastoupení jednotlivých populací leukocytů opět však v závislosti na expoziční dávce. Autoři Karnam et al. (2016) prokázali signifikantní pokles lymfocytů a vzestup neutrofilních granulocytů u potkanů s expoziční dávkou 200 a 600 mg BPA/kg ž. hm./d. Podobné výsledky publikovali i autoři Afzal et al. (2021) u králíků, avšak při nižších expozičních dávkách (10, 50, 100 mg BPA/kg ž. hm./d.). Jak je výše uvedeno naše výsledky se do jisté míry shodují s Karnam et al. (2016) a Afzal et al. (2021).

Závěr

Cílem předložené bakalářské práce bylo posoudit dopad desetitýdenní orální expozice potkanů BPS (50 μ g a 100 mg/kg živé hmotnosti/den) na průměrný počet erytrocytů (RBC), koncentraci hemoglobinu (HGB), hematokritovou hodnotu (HCT), střední objem erytrocytů (MCV), koncentraci hemoglobinu v erytrocytu (MCHC), střední množství hemoglobinu (MCH), celkové množství leukocytů, procentuální zastoupení granulocytů, lymfocytů a monocytů. Získané výsledky u průměrného počtu erytrocytů se jak u kontrolních, tak experimentálních skupin pohybovaly v referenčním rozmezí hodnot pro vybraný kmen potkanů. V rámci provedené studie jsme u exponovaných zvířat BPS zjistili nesignifikantní pokles koncentrace hemoglobinu v erytrocytech a nesignifikantní vzestup středního množství a objemu hemoglobinu v erytrocytech. BPS vedl také k nesignifikantním změnám počtu leukocytů (vzestup celkového počtu) a zastoupení jednotlivých skupin těchto buněk (vzestup procentuálního zastoupení granulocytů, pokles lymfocytů). Dopad expozice BPS byl markantněji sledován u skupiny 50 μ g BPS. Námi získané výsledky jednoznačně neprokázaly dopad expozice BPS na vybrané krevní parametry potkanů.

Seznam použité literatury

Citace knihy

Benjamin, M. M. (2001). *Outline of Veterinary Clinical Pathology*. 3rd ed. Colorado State University, USA. ISBN 978-0813812304.

Campbell, T. W. et al. (2012). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2nd ed. Iowa State University Press, USA. ISBN 9780813810270.

Carneiro, J. et al. (1999). *Základy histologie*. 7th ed. H&H, Jinočany. 502 s. ISBN 80-85787-377.

Čížek, P. et al. (2014). *Histologie*. První vydání. Středisko Teiresiás, Masarykova univerzita Brno. ISBN 978-80-210-7821-5.

Doubek, J. et al. (2003). *Veterinární hematologie*. První vydání. Noviko, Brno. ISBN 80-86542-02-5.

Eurell, J. A. a Frappier, B. L. (2006). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6th ed. Blackwell Publishing, USA. 416 pp. ISBN 978-1-118-68582-2.

Fredrickson, T. N. a Harris, A. W. (2000). *Atlas of Mouse Hematopathology*. 1st ed. Harwood Academic, Amsterdam. ISBN 9058230023.

Jelínek, P. a Koudela, K. (2003). *Fyziologie hospodářských zvířat*. První vydání. Mendelova univerzita, Brno. ISBN 80-715-7644-1.

Knotek, Z. et al. (1999): *Chov a využití pokusných zvířat*. II. díl. První vydání, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. 140 s. ISBN 80-85114-69-0.

Kraft, W. a Dürr, U. M. (2001). *Klinická laboratorna diagnostika vo veterinárnej medicíne*. První vydání. Hajko & Hajková, Bratislava. ISBN 80-88700-51-5.

Langmeier, M. (2009). *Základy lékařské fyziologie*. 1. vydání. Grada, Praha. 320 s. ISBN 978-80-247-2526-0.

Marvan, V. (1998): *Morfologie hospodářských zvířat*. Druhé vydání. Brázda, Praha. 303 s. ISBN 80-209-0273-2.

Reece, W. O. (1998). *Fyziologie domácích zvířat*. Druhé vydání. Grada, Praha, 449 s. ISBN 80-7169-547-5.

Samuelson, D. A. (2007): *Textbook of veterinary histology*. 1st ed. Elsevier, St. Louis, 546 pp. ISBN 0721681743.

Sova, Z. (1990): *Fyziologie hospodářských zvířat*. Druhé přepracované vydání. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. 469 s. ISBN 80-209-0092-6.

Tichý, F. et al. (2004). *Histologie – Mikroskopická anatomie*. První vydání. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. 275 s. ISBN 80-7305-495-7.

Toman, M. et al. (2000): *Veterinární imunologie*. První vydání. Grada, Havlíčkův Brod. 416 s. ISBN 8071697273.

Trojan, S. (2003). *Lékařská fyziologie*. Čtvrté přepracované vydání. Grada, Praha. 771s. ISBN 80-247-0512-5.

Ward., J. M. et al. (2018). *Hematopoietic and lymphoid tissues in Comparative histology*. 2nd ed. Academic Press, USA. Pages 365-401. ISBN 9780128029008.

Weiss, D. J. et al. (2010). *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. Wiley – Blackwell, USA. ISBN 9780813817989 0813817986.

Whalan, J. E. (2015). *A Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals: Hematology, Clinical Chemistry, Urinalysis*. 1st ed. Springer, USA. ISBN 978-3-319-15852-5.

Citace vědeckých publikací

Afzal, G. et al. (2021). Bisphenol A mediated histopathological, hemato-biochemical and oxidative stress in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Toxin Reviews*, doi: 10.1080/15569543.2021.1972318.

Ahmed, W. M. S. et al. (2015). Bisphenol A toxicity in adult male rats: hematological, biochemical and histopathological approach. *Global Veterinaria*, Vol. 14. No. 2. pp. 228-238 ref.51.

Andújar, N. et al. (2019). Bisphenol A Analogues in Food and Their Hormonal and Obesogenic Effects: A Review. *Nutrients*, 11(9):2136.

Arai, M. et al. (2020). Morphological and phenotypical diversity of eosinophils in the rat ileum. *Cell Tissue Res*, 381: 439–450.

Arndt., T. P. a Bonne., L. I. (2020). Clinical Pathology of the Rat. *Academic press*, Chapter 5: 133-155.

Beausoleil, C. et al. (2022). Regulatory and academic studies to derive reference values for human health: The case of bisphenol S. *Environmental Research*, Volume 204.

Bendlová, B. (2013). Endokrinní disruptory – neviditelná hrozba – editorial. *Vnitřní Lékařství*, 59(5):334-336.

Bickhardt, K. et al. (1983). Influence of bleeding procedure and some environmental conditions on stress - dependent blood constituents of laboratory rats. *Lab Animal*, 17:161–165.

Bindhumol, V. et al. (2003). Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*, 188(2-3):117-124.

Bolliger, A. P. (2004). Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(2):58–67.

Calafat, A. M. et al. (2010). Exposure of the U. S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary - Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1):9–44.

Canesi, L. a Fabbri, E. (2015). Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species. *SAGE Publishing*, 13(3):1-14.

Derelanko, M. J. et al. (1985). Toxicity of cyclohexanone oxime. *Fundamental and Applied Toxicology*, 5:117-127.

Diamanti-Kandarakis, E. et al. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: and Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30:293–342.

Chin, K. Y. et al. (2018). A Review on the Effects of Bisphenol A and Its Derivatives on Skeletal Health. *International journal of medical sciences*, 15(10):1043-1050.

Fic, A. et al. (2013). Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64:189–200.

Fleisch, A. F. et al. (2010). Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*, 126(4):76.

Frandsen, W. et al. (2009). Anatomy and physiology of farm animals. *Wiley-Blackwell*, 7th ed. : 512s.

Fry, M. M. a McGavin, M. D. (2012). Bone marrow, blood cells, and the lymphatic system. Pathologic basis of veterinary disease. *Elsevier*, 5th ed. : 698-770.

Gayraud, V. et al. (2019). Oral systemic bioavailability of bisphenol A and bisphenol S in pigs. *Environmental Health Perspectives*, 127: 77005.

Giembycz, M. a Lindsay, M. (1999). Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacological Reviews*, 51(2):213–340.

Glausiusz, J. (2014). Toxicology: The plastics puzzle. *Nature*, 508(7496):306– 308.

Heimeier, R. A. a Shi, Y. B. (2010). Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: Effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *General and Comparative Endocrinology*, 168(2):181-189.

Ikhlas, S. et al. (2019). In vitro study to evaluate the cytotoxicity of BPA analogues based on their oxidative and genotoxic potential using human peripheral blood cells. *Toxicology in Vitro*, 60: 229-236.

Inoue, H. et al. (2003). Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine. *Drug metabolism and disposition*, 31(1):140-144.

Ji, K. et al. (2013). Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish. *Environmental Science & Technology*, 47(15):8793-8800.

Kapustka, K. et al. (2020). Identification of health risks from harmful chemical agents – review concerning bisphenol A in workplace. *Production Engineering Archives*, 26(2):45-49.

Karnam, S. S. et al. (2016). Evaluation of subacute bisphenol - A toxicity on male reproductive system. *Veterinary World*, 8(6): 738-744.

Khan, T. A. a Zafar, F. (2005). Haematological Study in Response to Varying Doses of Estrogen in Broiler Chicken. *International Journal of Poultry Science*, 4(10): 748-751.

Khmiri. I. et al. (2020). Toxicokinetics of bisphenol-S and its glucuronide in plasma and urine following oral and dermal exposure in volunteers for the interpretation of biomonitoring data. *Environment International*, 138: 105644.

Kolaczowska, E. a Kubes, P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* ,13: 159–175.

La Merrill, M. A. et al. (2019). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(1):45-57.

Leck, S. (1999) Rats: what veterinarians need to know. *Exotic DVM*, 15:42–44.

Liao, C. a Kannan, K. (2014). A Survey of Alkylphenols, Bisphenols, and Triclosan in Personal Care Products from China and the United States. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(1), pp. 50–59.

Liao, Ch. et al. (2012). Bisphenol Analogues in Sediments from Industrialized Areas in the United States, Japan, and Korea: Spatial and Temporal Distributions. *Environmental Science & Technology*, 46(21):11558–11565.

Lord, B. I. et al. (1991). Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin - 3, granulocyte colony - stimulating factor (CSF), or granulocyte - macrophage CSF in vivo. *Blood*, 77:2154-2159.

Mathew, M. S. et al. (2014). Exploring the Interaction of Bisphenol-S with Serum Albumins: A Better or Worse Alternative for Bisphenol A. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(14):3832–3843.

Minier, Ch. et al. (2019). Evidence for Bisphenol B Endocrine Properties: Scientific and Regulatory Perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 127(10):106001.

Moore, D. (2000a). Hematology of the rat (*Rattus norvegicus*). *Lippincott Williams & Wilkins*, 1210–1218.

Moore, D. (2000b). Hematology of the mouse (*Mus musculus*). *Lippincott Williams & Wilkins*, 1219–1224.

Naderi, M. a Kwong, R. W. M. (2020). A comprehensive review of the neurobehavioral effects of bisphenol S and the mechanisms of action: New insights from in vitro and in vivo models. *Environment International*, Volume 145.

Nemzek, J. A. et al (2001). Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. *Inflammation Research*, 50:523 – 527.

Oh, J. et al. (2018). Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration. *Environment International*, 112:127-133.

Olafedehan, C. O. et al. (2010). Effects of residual cyanide in processed cassava peel meals on haematological and biochemical indices of growing rabbits. *Nigerian Society for Animal production*, p. 212.

Pivnenko, K. et al. (2015). Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Management*, 44:39-47.

Rezg, R. et al. (2018). Effects of Bisphenol S on hypothalamic neuropeptides regulating feeding behavior and apelin/APJ system in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161:459-466.

Ribeiro, E. et al. (2017). Occupational Exposure to Bisphenol A (BPA): A Reality That Still Needs to Be Unveiled. *Toxics*, 5(3):22.

Rongzhen, L. et al. (2020). Transcriptomic analysis of bisphenol AF on early growth and development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environmental Science and Ecotechnology*, 4:2666-4984.

Schwab, C. L. et al. (2005). Modeling and predicting stress - induced immunosuppression in mice using blood parameters. *Toxicology Science*, 83:101-113.

Shibata, N. et al. (2002). Male-specific suppression of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase activities toward sex hormones in the adult male rat administered bisphenol A. *Biochemical Journal*, 368(3):783–788.

Skledar, D. G. et al. (2015). Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica*, Issue 6. Volume 45. p. 511-519.

Song, Y. et al. (2017). Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(6):495-502.

Thoene, M. et al. (2020). Bisphenol S in Food Causes Hormonal and Obesogenic Effects Comparable to or Worse than Bisphenol A: A Literature Review. *Nutrients*, 12(2):532.

Togun, V. A. et al. (2007). Effects of chronic lead administration on the haematological parameters of rabbits – a preliminary study. *Agricultural Society of Nigeria*, p. 341.

Ullah, A. et al. (2019). Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere*, 158:383-391.

Ullah, A., et al. (2019). Effect of bisphenol F, an analog of bisphenol A, on the reproductive functions of male rats. *Environmental health and preventive medicine*, 24(1):41.

Ulutaş, O. K., et al. (2011). An in vivo assessment of the genotoxic potential of bisphenol -A and 4-tert-octylphenol in rats. *Archives of Toxicology*, 85(8):995-1001.

Viñas, R. a Watson, Ch. S. (2013). Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives*, 121(3):82.

Waidyanatha, S. et al. (2018). Disposition and metabolism of the bisphenol analogue, bisphenol S, in Harlan Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice and in vitro in hepatocytes from rats, mice, and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 351:32- 45.

Washington, I. M. et al. (2012): Clinical Biochemistry and Hematology. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. *Accademic Press*, 57–116 pp.

Watson, Ch. S. et al. (2005). Steroids Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor- α : Estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids*, 70(5- 7):364-371.

Willebrand, R. a Voehringer, D. (2017). Regulation of eosinophil development and survival. *Current Opinion in Hematology*, 24:9–15.

Windberger, U. et al. (2003). Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Experimental Physiology*, 88(3):431-40.

Yamasaki, K. a Okuda, H. (2012). Comparison of endocrine-mediated effects of two bisphenol A related compounds, 2,2-bis (4-cyanatophenyl) propane and 4,4'-cyclohexylidenebisphenol, based on subacute oral toxicity studies using rats. *Toxicology Letters*, 208:162- 167.

Yin, N. et al. (2015). Assessment of Bisphenol A (BPA) neurotoxicity in vitro with mouse embryonic stem cells. *Journal of Environmental Sciences*, 36:181-187.

Zerdan, B. M. et al. (2021). Mechanisms of Immunotoxicity: Stressors and Evaluators. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):8242.

Zhang, Y. F. et al. (2020). Cardiovascular toxicity and mechanism of bisphenol A and emerging risk of bisphenol S. *Science of The Total Environment*, 723(137952):1-17.

Citace webových zdrojů

Arnika.org, (2003). *Chráníme naše životní prostředí*. [online] [cit. 23. 10. 2021]. Dostupné z: <https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/bisfenol-a>.

Edlists.org, (2020) *Endocrine Disruptor List*. [online] [cit. 02. 11. 2021]. Dostupné z: <https://edlists.org/sites/edlists.org/files/media/document/BisAF.pdf>.

Sigmaaldrich.com, (2021). *Bisphenol AP analytical standard*. [online] [cit. 02. 11. 2021]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/38753>.

Citace závěrečných prací

Pokoj, P. (2010). *Bisfenol A-jeho vliv na zdraví člověka a životní prostředí*. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

Rošková, V. (2019). *Morfologické změny periferní krve u nedonošených novorozenců*. Bakalářská práce, České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Schéma bisfenolu A (Sigmaaldrich.com, 2021).....	10
Obrázek 1.2: Schéma bisfenolu B (Sigmaaldrich.com, 2021).....	11
Obrázek 1.3: Schéma bisfenolu F (Sigmaaldrich.com, 2021)	11
Obrázek 1.4: Schéma bisfenolu AF (Sigmaaldrich.com, 2021)	12
Obrázek 1.5: Schéma bisfenolu AP (Sigmaaldrich.com, 2021)	12
Obrázek 1.6: Schéma bisfenolu S (Sigmaaldrich.com, 2021)	13
Obrázek 1.7: Struktura hemoglobinu (chemistryscore.com, 2021)	16
Obrázek 1.8: Hemogram u laboratorního potkana (Doubek et al., 2003).....	17
Obrázek 1.9: Vývojové fáze erytrocytu (Bain et al., 2010)	18
Obrázek 1.10: Vývojové fáze neutrofilního granulocytu (Bain et al., 2010).....	19
Obrázek 1.11: Eozinofilní granulocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010).....	20
Obrázek 1.12: Bazofilní granulocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010).....	21
Obrázek 1.13: Lymfocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010).....	22
Obrázek 1.14: Monocyt v krvi potkana (Weiss et al., 2010)	23
Obrázek 1.15: Schéma hematokritové hodnoty (Reece, 1998).....	24
Obrázek 3.1: Počet erytrocytů (RBC)	26
Obrázek 3.2: Koncentrace hemoglobinu (HGB).....	27
Obrázek 3.3: Hematokritová hodnota (HCT).....	28
Obrázek 3.4: Střední objem erytrocytů (MCV)	28
Obrázek 3.5: Koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC).....	29
Obrázek 3.6: Střední množství hemoglobinu (MCH).....	29
Obrázek 3.7: Celkový počet leukocytů	30

Seznam tabulek

Tabulka 1.1: Zastoupení jednotlivých krevních buněk u potkana (Weiss et al., 2010)	
.....	18
Tabulka 3.1: Procentuální zastoupení leukocytů	31

Seznam použitých zkratek

ANOVA	Analýza rozptylu
BP	Bisfenoly
BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BPAP	Bisfenol AP
BPB	Bisfenol B
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
cm ³	Centimetr krychlový
d.	Den
dl	Decilitr
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDC	Endokrinní disruptory
fl	Femtolitry
GR	Granulocyty
G	Giga
g	Gram
HCT	Hematokritová hodnota
HGB	Množství hemoglobinu v erytrocytu
kg	Kilogram
l	Litr
LY	Lymfocyty
m ³	Metr krychlový
MCH	Střední množství hemoglobinu v erytrocytu
MCHC	Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytech
MCV	Střední objem erytrocytů
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitr
μm	Mikrometr
mg	Miligram
ml	Mililitr
MONO	Monocyty

pg	Pikogram
RBC	Erytrocyty
ROS	Reaktivní formy kyslíku
T	Tera
tzn.	To znamená
WBC	Bílé krvinky
ž. hm.	Živá hmotnost
