



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

Autoreferát disertační práce

**Účinek Bisfenolu S na štítnou žlázu a vybrané morfologické a
funkční parametry potkanů kmene Wistar**

Autor práce: Ing. Hana Beránková

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

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

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v
Českých Budějovicích.

České Budějovice

2024

Abstrakt

Bisfenol S (BPS) je hlavní náhradou endokrinního disruptoru bisfenolu A (BPA). Díky přítomnosti silných dvojných vazeb je BPS odolnější vůči biologickému rozkladu, a proto se může více akumulovat v prostředí. Četné studie ukazují, že BPS narušuje reprodukční, nervový a kardiovaskulární systém a může mít vliv na hormony štítné žlázy. Cílem studie bylo analyzovat účinky 10týdenní expozice BPS a BPA na morfologické a funkční vlastnosti štítné žlázy potkanů, biochemické a hematologické parametry, stanovení koncentrace jódu ve vybraných tělních tekutinách a orgánech a posouzení histologických změn lymfatických orgánů. Samci potkanů kmene Wistar dostávali BPS ve slunečnicovém oleji denně jícnovou sondou. Kontrolní skupina GI dostávala pouze nosič. Experimentální skupina GII dostávala aktuální povolenou koncentraci (tzv. TDI) stanovenou pro BPA, tedy 4 ug BPS/kg/den. Třetí skupina GIII dostávala první upravený TDI pro BPA, tedy 50 ug BPS/kg/den. Skupina GIV dostávala vysokou koncentraci BPS (100 mg BPS/kg/den) pro porovnání účinku nízkých a vysokých koncentrací BPS. Pro porovnání účinků vysokých koncentrací BPS a BPA (100 mg BPA/kg/den) bylo BPA podáváno v poslední skupině (GV). Výsledky ukazují významný vliv BPS a BPA na změny v morfometrických parametrech štítné žlázy, a to především na periferní folikuly štítné žlázy, přičemž vliv BPS na morfometrické parametry je výraznější než BPA. U všech skupin s BPS bylo zaznamenáno snížení tyreocytů a zmenšení plochy folikulárních buněk, zvětšení folikulu i zvětšení plochy koloidu. Zvýšené množství jódu v moči naznačuje významný účinek BPS a BPA na metabolismus jódu a jeho přísun do štítné žlázy. Výsledky ukazují zvýšení koncentrací TSH ve všech skupinách s bisfenoly nad fyziologické standardy potkanů Wistar (GI $3,14 \pm 1,28$ ng/ml, GII $5,12 \pm 1,16$ ng/ml, GIII $5,55 \pm 2,39$ ng/ml, GIV $5,56 \pm 1,98$ ng/ml, GV $4,47 \pm 1,09$ ng/ml), kdy nejnižší koncentrace BPS (4 ug/kg/den) má výraznější vliv na koncentrace TSH než vysoké koncentrace BPA (100 mg/kg/den). Naše výsledky ukazují, že BPS není vhodnou náhradou za BPA pro použití v plastech určených pro styk s potravinami a také ukazují na nutnost stanovit tolerovatelný denní příjem (TDI) také pro BPS.

Klíčová slova: štítná žláza, jod, folikuly, triacylglyceroly, cholesterol, bílkovina, TSH

Abstract

Bisphenol S (BPS) is the major substitute for the endocrine disruptor bisphenol A (BPA). The presence of strong double bonds makes BPS more resistant to biodegradation and therefore more likely to accumulate in the environment. Numerous studies show that BPS disrupts the reproductive, nervous and cardiovascular systems and could have an impact to thyroid hormones. The aim of this study was to analyze the effects of 10week exposure to BPS and BPA on the morphological and functional characteristics of the rat thyroid gland and the effect of bisphenol S on iodine concentration in urine. Male Wistar rats received bisfenols in sunflower oil daily by gavage. The control group (GI) received vehicle only. Experimental group two (GII) received 4 ug BPS/kg/day, group three (GIII) received 50 ug BPS/kg/day, and group four (GIV) received 100 mg BPS/kg/day. Group five (GV) received 100 mg BPA/kg/day. Groups four and five was made to compare the effect of high concentration of BPS and BPA. The results show a significant effect of BPS and BPA on changes in thyroid morphometric parameters, especially on peripheral thyroid follicles, with the effect of BPS on morphometric parameters being more significant than that of BPA. In all groups with BPS, a decrease in thyrocytes and a decrease in follicular area, an increase in follicle size and an increase in colloid area were measured. Increased urinary iodine levels suggest a significant effect of BPS and BPA on iodine metabolism and supply to the thyroid gland. The results show an increase in TSH concentrations in all bisphenol groups above physiological standards in Wistar rats (GI 3.14 ± 1.28 ng/ml, GII 5.12 ± 1.16 ng/ml, GIII 5.55 ± 2.39 ng/ml, GIV 5.56 ± 1.98 ng/ml, GV 4.47 ± 1.09 ng/ml), with the lowest concentration of BPS (4 ug/kg/day) having a more pronounced effect on TSH concentrations than high concentrations of BPA (100 mg/kg/day). Our results show that BPS is not a suitable substitute for BPA for use in food contact plastics and also indicate the need to establish a tolerable daily intake (TDI) also for BPS.

Keywords: thyroid, iodine, follicles, triacylglycerols, cholesterol, protein, TSH

Obsah

1	Cíl disertační práce.....	5
2	Výsledky a diskuse.....	6
2.1	Účinky Bisfenolu S na růst, biochemické a hematologické parametry potkanů Wistar	6
2.1.1	Účinky Bisfenolu S na hmotnostní parametry	6
2.1.2	Vliv Bisfenolu S na koncentraci triacylglycerolů	7
2.1.3	Vliv Bisfenolu S na koncentraci cholesterolu.....	7
2.1.4	Vliv Bisfenolu S na koncentraci celkové bílkoviny.....	8
2.1.5	Vliv Bisfenolu S na koncentraci močoviny	9
2.1.6	Vliv Bisfenolu S na aktivitu alkalické fosfatázy.....	9
2.1.7	Vliv Bisfenolu S na vybrané makroprvky.....	10
2.1.8	Vliv Bisfenolu S na hematologické parametry	11
2.2	Účinky Bisfenolu S na štítnou žlázu potkanů Wistar	12
2.2.1	Vliv Bisfenolu S na morfologii štítné žlázy.....	12
2.2.2	Vliv Bisfenolu S na funkční parametry štítné žlázy potkanů Wistar	16
2.2.2.1	Vliv Bisfenolu S na hormony štítné žlázy.....	16
2.2.2.2	Vliv Bisfenolu S na koncentraci jódu v moči	17
2.3	Vliv Bisfenolu S na ostatní vybrané orgány potkanů Wistar.....	18
2.3.1	Účinek Bisfenolu S na ledviny.....	18
2.3.2	Účinek Bisfenolu S na játra.....	19
2.3.3	Účinek Bisfenolu S na lymfatické orgány.....	20
3	Závěr	22
4	Souhrn	24
4.1	Summary	25
4.2	Dedikace.....	27

1 Cíl disertační práce

Cílem této disertační práce bylo analyzovat vliv 10týdenní expozice bisfenolu S (BPS) a bisfenolu A (BPA) na zdraví a funkci štítné žlázy potkanů kmene Wistar, přičemž hlavní důraz byl kladen na morfologické a funkční vlastnosti štítné žlázy, biochemické a hematologické parametry a koncentraci jódu ve vybraných tělních tekutinách a orgánech. Dílčí cíle studie byly rozděleny takto:

1. **Zkoumat vliv na biochemické a hematologické parametry:** Pro posouzení celkového fyziologického dopadu BPS a BPA na organismus potkanů byly vyhodnoceny změny v biochemických a hematologických parametrech.
2. **Zhodnotit změny v morfologii štítné žlázy:** Posoudit strukturální změny ve folikulech štítné žlázy, způsobené dlouhodobou expozicí BPS a BPA.
3. **Analyzovat funkční parametry štítné žlázy:** Měřit hladiny klíčových hormonů štítné žlázy (TSH a fT4) v krvi, aby bylo možné určit dopad BPS a BPA na endokrinní aktivitu štítné žlázy.
4. **Stanovit koncentraci jódu ve vybraných tělních tekutinách a orgánech:** Kvantifikovat obsah jódu v krvi, játrech a ledvinách, s cílem identifikovat případné narušení homeostázy jódu způsobené expozicí BPS a BPA.
5. **Posoudit histologické změny v lymfatických orgánech:** Zaměřit se na strukturu a stav lymfatických tkání, jako jsou slezina a brzlík a určit, zda dlouhodobá expozice těmto látkám vede k jejich zánětlivým nebo degenerativním změnám.

Tyto cíle vycházely z hypotézy, že bisfenol S negativně ovlivňuje funkci štítné žlázy, což se projeví změnami v její struktuře a hladinách hormonů štítné žlázy u pokusných hlodavců.

2 Výsledky a diskuse

Všechny dosažené výsledky (obrázky, grafy a tabulky), použitý materiál a metody je možno nalézt v disertační práci a publikacích v ní přiložených.

2.1 Účinky Bisfenolu S na růst, biochemické a hematologické parametry potkanů Wistar

2.1.1 Účinky Bisfenolu S na hmotnostní parametry

Na počátku experimentu nebyl rozdíl v tělesné hmotnosti mezi jednotlivými skupinami statisticky signifikantní ($P > 0,05$). Vzhledem ke tvrzení autorů Shi et al. (2017) o zvyšující se hmotnosti zkoumaných jedinců po vystavení různým koncentracím bisfenolů, jsme očekávali tento trend i u našeho pokusu. Pozorovali jsme však klesající tendence hmotnosti se zvyšující se koncentrací BPS a BPA (tabulka 5). Nejnižší tělesná hmotnost byla ke konci experimentu zjištěna u skupiny GIV (100 mg BPS/kg/den) a to $375,05 \pm 40,18$ g. Oproti kontrolní skupině byla u skupiny GIV tělesná hmotnost nižší o 11,74 %. Přesto rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný. Nižší hmotnost spolu se zhoršenou kvalitou srsti, byla pozorována i subjektivně, a to u skupin GIV a GV. Dále potkani ze skupin GIV a GV vykazovali agresivnější chování, a to jak při podávání látky, tak mezi sebou. Dle Molangiriho et al. (2023) vykazuje BPS větší obezogenní účinek než BPA, zejména při vystavení bisfenolům v době březosti. Dle autorů Varghese et Halla (2023) a Meng et al. (2019) vyvolala expozice BPS hypertrofii adipocytů viscerální tukové tkáně. Toto zjištění podporuje studie Brulport et al. (2020), kteří prokázali, že perinatální expozice BPS významně zvýšila tělesnou hmotnost a hmotnost jater. Boucher et al. (2016) prokázali, že BPS může za akumulaci lipidů. Oproti těmto studiím Ullah et al. (2016) a Mao et al. (2021), neprokázali staticky významné rozdíly v tělesné hmotnosti samců potkanů exponovaných 50 μg BPS /kg živé hmotnosti/den. V tomto výzkumu byla zaznamenána mírná klesající tendence hmotnosti při zvýšené dávce BPS. Thilagavathi et al. (2018) uvádí zvýšení hmotnosti u skupiny 10 μg /BPA/den a výrazně nižší přírůstek hmotnosti skupiny 100 μg /BPA/den. Studie Sharma et al. (2021) naznačuje podobné účinky BPS na tělesnou hmotnost a orgány jako BPA. Úbytek tělesné hmotnosti při podání BPA byl připisován různým změnám vyvolaným BPA, jako je oxidační stres (Kazemi et al., 2016), snížení obsahu testosteronu v séru spolu se sníženým počtem

a aktivitou Leydigových a Sertoliho buněk (Kazemi et al., 2016) a snížení relativní hmotnosti reprodukčních orgánů (Takahashi et Oishi, 2001). U samců dle Isidori et al. (2005) může snížený obsah testosteronu způsobit úbytek svalové a kostní hmoty.

2.1.2 Vliv Bisfenolu S na koncentraci triacylglycerolů

Se zvyšující se koncentrací BPS klesala koncentrace triacylglycerolů, a to signifikantně u skupiny GIV (100 mg BPS) a GV (100 mg BPA) ($P < 0,017$ a $P < 0,022$). Hodnoty u všech skupin s bisfenoly byly pod fyziologickou normou pro triacylglyceroly (GII 0,58 mmol/l, GIII 0,63 mmol/l, GIV 0,36 mmol/l, GV 0,35 mmol/l). Naše zjištění odporuje výsledkům Ejaz ul Haq et al. (2020), kteří naměřili statisticky významně zvýšené ($P < 0,0001$) koncentrace triacylglycerolů u vysokých koncentrací BPA. Zvýšení triacylglycerolů u BPA i BPS zaznamenali také Héliers-Toussaint et al. (2014), Azevedo et al. (2019) a Pal et al. (2017) a to v různých expozičních dávkách od 50 $\mu\text{g/BPS/kg/den}$ po 120 mg BPS/kg/den. Výrazně vyšší je v našem pokusu již koncentrace v kontrolní skupině ($0,78 \pm 0,49$ mmol/l), která pravděpodobně souvisí s použitým nosičem slunečnicovým olejem. Azevedo et al. (2019) použili jako nosič vodu a Pal et al. (2017) 20 % DMSO.

Výsledky korelační analýzy ukázaly, že koncentrace triacylglycerolů středně silně koreluje s hmotnostními parametry ($P < 0,05$) a hmotností jater ($P < 0,01$). Dále byla slabá až středně silná korelace zaznamenána s cholesterolem ($P < 0,05$) a fT4 ($P < 0,05$). Středně silná negativní korelace byla zaznamenána ($P < 0,05$) s jódem, hemoglobinem a hematokritem (tabulka 10).

2.1.3 Vliv Bisfenolu S na koncentraci cholesterolu

Pokles obsahu cholesterolu (graf 2) jsme pozorovali pouze u skupiny GV (100 mg BPA), kde byl pozorován statisticky významný účinek vysoké koncentrace BPA na snížení obsahu cholesterolu ($1,28 \pm 0,15$ mmol/l) oproti skupině GIII (50 $\mu\text{g/kg/den}$ BPS) a GIV (100 mg/kg/den BPS) ($P < 0,005$ a $P < 0,035$). U skupiny GII ($1,88 \pm 0,42$ mmol/l) a GIV ($1,89 \pm 0,33$ mmol/l) změny nepřevyšovaly 2 % dosažené hodnoty kontrolní skupiny ($1,86 \pm 0,35$ mmol/l). U skupiny GIII jsme pozorovali mírné zvýšení obsahu cholesterolu ($2,24 \pm 0,23$ mmol/l) oproti kontrolní skupině ($1,86 \pm 0,35$ mmol/l), nebylo však statisticky

významné. Toto zjištění odpovídá tvrzení Li et al. (2023) a Hong et al. (2016), kteří uvádí, že nižší dávky BPA mohou působit výraznější změny v obsahu cholesterolu. Pal et al. (2017) uvádí, že expozice BPS může vést stejně jako u BPA ke zvýšení koncentrace cholesterolu v krevním séru. BPA a BPS se mohou vázat na estrogenové receptory (ER α a ER β) a receptor spojený s G proteiny (GPR30), což může ovlivnit genovou expresi v různých tkáních, včetně jater, kde je cholesterol syntetizován a metabolizován. Aktivace těchto receptorů může vést k dysregulaci enzymů zapojených do syntézy a odbourávání lipidů (Yuan et al., 2023). BPA může dle Li et al. (2020) snižovat obsah vysokodenzitního lipoproteinu (HDL), který pomáhá odstraňovat nadbytečný cholesterol z těla. Snížení HDL cholesterolu zvyšuje riziko aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění.

Výsledky korelačních analýz ukázaly slabou až středně silnou pozitivní korelaci mezi cholesterolem a hmotností při pitvě, dále přírůstkem, hmotností jater a triacylglyceroly ($P < 0,05$). Slabá korelace byla zaznamenána mezi cholesterolem a koncentrací vápníku ($P < 0,05$). Na vyšší hladině významnosti ($P < 0,01$) docházelo k silné korelaci s obsahem celkové bílkoviny (tabulka 10).

2.1.4 Vliv Bisfenolu S na koncentraci celkové bílkoviny

Negativní vliv různých expozičních dávek BPS a BPA na koncentraci bílkoviny v krevním séru zobrazuje graf 3. Z grafu je patrný větší vliv na obsah celkové bílkoviny u skupiny s vysokou koncentrací BPA, kdy oproti kontrolní skupině ($65,42 \pm 4,56$ mg/l) byla koncentrace výrazně nižší ($59,7 \pm 0,95$ mg/l). Statisticky významně ($P < 0,022$) se skupina s BPA lišila od skupiny GIII (50 ug/kg/den BPS). Naše výsledky odpovídají výzkumu Baralić et al. (2020), kteří po čtyřtýdenní expozici 25 mg BPA/kg/den pozorovali oproti kontrolní skupině statisticky významný pokles koncentrace celkové bílkoviny v krevním séru. Oproti tomu Pal et al. (2017) zaznamenali se zvyšující se koncentrací BPS vzestup koncentrace celkové bílkoviny v séru. Mezi kontrolní skupinou a různými dávkami BPS v našem výzkumu nebyl statisticky významný rozdíl v koncentraci celkové bílkoviny. Celková bílkovina vykazovala statisticky významnou, středně silnou pozitivní korelaci s koncentrací vápníku ($P < 0,01$) a silnou korelaci s cholesterolem ($P < 0,01$) (tabulka 10).

2.1.5 Vliv Bisfenolu S na koncentraci močoviny

Pal et al. (2017) sledovali statisticky významné zvýšení koncentrace močoviny v krevním séru potkanů se vzrůstající koncentrací BPS. Náš výzkum tomuto tvrzení neodpovídá (graf 4), nejvyšší koncentrace močoviny ($10,57 \pm 2,03$ mmol/l) byla analyzována v krevním séru kontrolní skupiny. Močovina představuje konečný produkt metabolismu bílkovin v játrech a její koncentrace v krevním séru může odrážet funkční stav jater a ledvin, stejně jako celkový metabolismus proteinů a kvalitu krmné dávky (Němečková et al., 1991). Zvýšení hladin může nastat v důsledku renální dysfunkce, jako je akutní nebo chronické selhání ledvin, dehydratace, stravy s vysokým obsahem bílkovin, gastrointestinálního krvácení nebo zvýšeného katabolismu proteinů během horečky, infekcí či traumat. Naopak snížení hladin může naznačovat jaterní selhání a poškození funkce hepatocytů, nízkoproteinovou dietu, nadměrnou hydrataci, těhotenství nebo syndrom nepřiměřené antidiurézy (Benson a Paul-Murphy, 1999). Očekávali jsme, že BPS a BPA by mohli mít vliv na funkce jater a ovlivnit koncentraci močoviny. Tato hypotéza však nebyla v naší studii potvrzena, mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl. Obsah močoviny vykazoval statisticky významnou středně silnou pozitivní korelaci ($P < 0,05$) s obsahem leukocytů, hemoglobinu a hematokritu. Slabá korelace byla zaznamenána s obsahem fosforu ($P < 0,05$) (tabulka 10).

2.1.6 Vliv Bisfenolu S na aktivitu alkalické fosfatázy

Enzymatická aktivita alkalické fosfatázy (ALP), společně s aktivitami γ -glutamyltransferázy (GMT), alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) je ukazatelem poškození jater (Hasan et al., 2018). Ve studii Pal et al. (2017) bylo při třicetidenní expozici potkanů dávkami 30, 60 a 120 mg BPS/kg/den pozorováno zvýšení aktivity ALP s rostoucí dávkou expozice. V našem experimentu se však aktivita ALP statisticky výrazně nezměnila (graf 5); nejvyšší aktivita ALP byla zaznamenána u kontrolní skupiny ($1,92 \pm 0,51$ μ kat/l), zatímco nejnižší hodnota byla naměřena u skupiny GII (4 μ g BPS/kg/den) ($1,35 \pm 0,16$ μ kat/l). Koncentrace u všech skupin byla v referenčním rozmezí hodnot ALP (1,17 až 5,00 μ kat/l). Alkalická fosfatáza vykazuje středně silnou negativní korelaci s tělesnou hmotností ($P < 0,01$) (tabulka 10).

2.1.7 Vliv Bisfenolu S na vybrané makroprvky

V našem pokusu nedošlo ke statisticky významné změně koncentrace vápníku, hořčíku a fosforu. Tabulka 6 ukazuje pouze mírné zvýšení obsahu těchto prvků. Suzuki et al. (2003) uvádí po 4 dnech podávání BPA statisticky významně zvýšenou koncentraci vápníku $8,94 \pm 0,25$ mg/100 ml ($P < 0,001$). Po 8 dnech se však plazmatický vápník v tomto výzkumu statisticky významně ($P < 0,05$) snížil pod referenční rozmezí ($5,96 \pm 0,42$ mg/100 ml**). Dlouhodobá expozice bisfenolu je spojována s negativními účinky na kosterní systém. Studie na zvířatech ukazují, že bisfenoly mohou vést ke snížení kostní hustoty a změnám v mikrostruktuře kostí (Chin et al., 2018). Vliv bisfenolů na transport vápníku a fosforu může vést k arytmiím a dalším srdečním dysfunkcím. Bisfenoly mohou také přispívat k hypertenzi a poškození cév (Fonseca et al., 2022). Nerovnováha vápníku způsobená bisfenoly může ovlivnit neurotransmisi, což může mít za následek kognitivní poruchy a změny v chování (Wang et al., 2019). V našem pokusu byla zaznamenána nerovnováha v poměrech Ca:P a P:Mg u všech sledovaných skupin a to včetně skupiny kontrolní (tabulka 6). V poměru mezi Ca:Mg došlo k mírné nerovnováze pouze u skupiny GIII. Dle Kawamota et al. (2020) mohou některé oleje, zvláště ty bohaté na nasycené nebo polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), ovlivnit absorpci fosforu v trávicím traktu. Bisfenoly mohou ovlivnit funkci ledvin a jejich schopnost regulovat obsah fosforu. Studie naznačují, že expozice bisfenolu může vést k poškození ledvinových tubulů a změnám v exkreci fosforu, což může mít za následek hyperfosfatémii nebo hypofosfatémii (Kobroob et al., 2018, Kataria et al., 2015). Priego et al. (2021) upozorňují na zvýšený obsah hořčíku, který je spojen se zvýšením oxidačního stresu, a na vliv bisfenolů na zánětlivé procesy v ledvinách. Obsah fosforu statisticky významně slabě koreluje s močovinou a hematokritem ($P < 0,05$). Obsah vápníku vykazoval středně silné pozitivní korelace s celkovou bílkovinou ($P < 0,01$) a slabou korelaci s cholesterolem ($P < 0,05$). Obsah hořčíku vykazoval středně silnou pozitivní korelaci s celkovým přírůstkem hmotnosti a trombocyty ($P < 0,05$) a slabou korelaci s hmotností jater ($P < 0,05$) (tabulka 10).

2.1.8 Vliv Bisfenolu S na hematologické parametry

Na základě výsledků Kruskal-Wallisova testu nebyly u většiny sledovaných hematologických parametrů, včetně hemoglobinu (Hb), hematokritu (Hk), erytrocytů (Ery), trombocytů (TR) a monocytů (Mo), prokázány statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P > 0,05$). Tyto parametry vykazovaly pouze statisticky významné korelace, které jsou zobrazeny v tabulce 10. Konkrétně Hb středně silně koreloval s močovinou a triacylglyceroly ($P < 0,05$) a dále na hladině významnosti $P < 0,01$ středně silně koreloval s TSH, silný vztah má hemoglobin s Hk a erytrocyty ($P < 0,01$). Hk vykazoval středně silný vztah ($P < 0,05$) s močovinou, triacylglyceroly a slabý až středně silný vztah s fosforem. Na hladině $P < 0,01$ vykazoval Hk středně silný vztah s TSH a monocyty a silný vztah s Hb a erytrocyty ($P < 0,01$). Leukocyty slabě až středně silně korelovaly s koncentrací močoviny ($P < 0,05$), středně silný vztah pak vykazovaly vůči ft4 ($P < 0,01$), a některými hematologickými parametry (TR, Ly, Gr). Trombocyty vykazovaly středně silnou pozitivní korelaci s tělesnou hmotností na konci experimentu a tělesným přírůstkem ($P < 0,01$). Na stejné hladině významnosti pak středně silně koreloval obsah trombocytů s leukocyty. Trombocyty také vykazovaly středně silný vztah s hořčíkem na hladině významnosti $P < 0,05$. Lymfocyty vykazovaly korelaci pouze mezi leukocyty a granulocyty ($P < 0,01$) a to středně silnou až silnou. Monocyty vykazovaly slabý vztah s relativní hmotností jater ($P < 0,05$), středně silný vztah s obsahem TSH ($P < 0,05$) a Hk ($P < 0,01$). Granulocyty vykazovaly středně silný negativní vztah s ft4 ($P < 0,05$), středně silný negativní vztah s leukocyty ($P < 0,01$) a silný korelační vztah s lymfocyty ($P < 0,01$). Statisticky významné rozdíly jsme zaznamenali v množství leukocytů, kdy u skupiny GIV došlo ke snížení jejich počtu ($P < 0,05$) oproti kontrolní skupině. Srovnatelné výsledky při podobné koncentraci (120 mg BPS/kg/den) zaznamenali také Pal et al. (2017), kteří upozorňovali na narušení hematologických parametrů potkanů a výraznější vliv vyšších koncentrací BPS v souvislosti s klesajícím počtem leukocytů. Tito autoři udávají vliv BPS na koncentraci oxidu uhličitého a následnou hypoxii. Stejně tak na změny v počtu leukocytů upozorňují autoři De Porto et al. (2010). Množství leukocytů nekleslo u žádné skupiny pod fyziologické rozmezí (graf 6) pro potkany Wistar 2-10 G/1 (Weiss et Wardrop, 2011).

Statisticky významné rozdíly byly prokázány také v procentickém zastoupení lymfocytů a granulocytů. Oproti kontrolní skupině se významně snížilo procentické zastoupení lymfocytů u skupiny GII a GIV ($P<0,05$). Podobné výsledky zaznamenali Shaibi et al. (2022). Oproti tomu se u skupiny GIV statisticky významně zvýšilo ($P<0,05$) zastoupení granulocytů na 27,48% (kontrolní skupina 15,56%).

2.2 Účinky Bisfenolu S na štítnou žlázu potkanů Wistar

2.2.1 Vliv Bisfenolu S na morfologii štítné žlázy

K největšímu zvětšení šířky a délky folikulů došlo u skupiny GIV ($P<0,001$), které bylo podáváno 100 mg/BPS/kg/den. Vliv BPS v těchto parametrech byl výraznější než vliv BPA, u kterého nedošlo ke statisticky výraznému rozdílu, přesto byla délka ($129,62 \pm 5,63 \mu\text{m}$) i šířka ($100,78 \pm 4,57 \mu\text{m}$) folikulu větší než u kontrolní skupiny (délka $121,74 \pm 11,70 \mu\text{m}$ a šířka $89,34 \pm 7,08 \mu\text{m}$). Statisticky významně se vliv BPS projevil již u skupiny GII, a to v délce folikulu na hladině významnosti $P<0,01$. Změny v délce ($P<0,05$) a šířce ($P<0,01$) se projevíly také u skupiny GIII. Zvětšení délky a šířky folikulu se u skupiny GIV odrazilo i v signifikantní ($P<0,05$) zvětšení plochy folikulu ($11444,41 \pm 1286,7 \mu\text{m}^2$) oproti kontrolní skupině ($9320,09 \pm 1640,18 \mu\text{m}^2$). U periferních folikulů jsme zaznamenali nejvýraznější změny v ploše folikulární buňky a výšce tyreocytů. Z výsledků tabulky 7 je na hladině významnosti $P<0,0001$ vidět rozdíl v poklesu výšky tyreocytů u všech sledovaných skupin. Nejmenší výška tyreocytu byla naměřena u skupiny GII ($8,51 \pm 0,59 \mu\text{g/l}$), stejně tak byla u této skupiny naměřena nejmenší plocha folikulární buňky ($27,63 \pm 0,71 \mu\text{m}^2$). Zmenšení plochy folikulární buňky oproti kontrole se projevilo u všech skupin na hladině významnosti ($P<0,0001$), kromě skupiny GIII, kde byl rozdíl na hladině významnosti ($P<0,01$). Z těchto výsledků lze usuzovat, že již malé koncentrace BPS (4 $\mu\text{g/kg/BPS/den}$) mají významný vliv na morfologii folikulů, především na zmenšení plochy folikulární buňky a snížení výšky tyreocytu. Rozdíl v ploše koloidu nebyl mezi skupinami statisticky potvrzen, přesto je vidět zvětšující se tendence plochy koloidu se zvyšující se koncentrací BPS. U skupiny s nejvyšší koncentrací bisfenolů bylo naměřeno $8550,21 \pm 1306,69 \mu\text{m}^2$, oproti kontrolní skupině, ve které bylo naměřeno $7258,64 \pm 1264,73 \mu\text{m}^2$. Rozdíl v ploše koloidu jsme pozorovali i mezi nejvyšší koncentrací BPS a BPA ($7870,10 \pm 862,01 \mu\text{m}^2$).

Dle Trávníčka et al. (1999) a La Perle et Capen (2007) ukazuje zvětšení plochy koloidu a plochy folikulů spolu se zvýšenou aktivitou TSH na hypofunkci štítné žlázy.

Tabulka 7: Morfometrické parametry periferních folikulů štítné žlázy

Skupina	Délka folikulu (μm)	Šířka folikulu (μm)	Plocha folikulu (μm^2)	Plocha fol. buňky (μm^2)	Výška tyreocytu ($\mu\text{g/l}$)	Plocha koloidu (μm^2)
GI (n = 6)	121,74 $\pm$ 11,70	89,34 $\pm$ 7,08	9320,09 $\pm$ 1640,18	32,42 $\pm$ 2,72	10.39 $\pm$ 1.24	7258.64 $\pm$
GII (n = 6)	138,20 $\pm$ 4,90**	98,87 $\pm$ 3,33	11292,34 $\pm$ 552,14	27,63 $\pm$ 0,71****	8.51 $\pm$ 0.59****	8377.65 $\pm$ 262.51
GIII (n = 6)	138,25 $\pm$ 4,90 *	98,87 $\pm$ 3,33**	11388,73 $\pm$ 2455,38	30,03 $\pm$ 3,16**	8,79 $\pm$ 1,28****	8295,61 $\pm$
GIV (n = 6)	139,11 $\pm$ 9,23***	102,12 $\pm$ 4,76***	11444,41 $\pm$ 1286,7 *	30,43 $\pm$ 2,39****	8.82 $\pm$ 1.15****	8550.21 $\pm$
GV (n = 6)	129,62 $\pm$ 5,63	100,78 $\pm$ 4,57	10656,56 $\pm$ 922,44	28,98 $\pm$ 1,41****	8,85 $\pm$ 0,30****	7870,10 $\pm$

Statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou s bisfenoly *P<0,05 **

P<0,01 *** P<0,001 **** P<0,0001

Na morfologii středových folikulů měl BPS i BPA menší vliv než na folikuly okrajové (tabulka 8). Délku a šířku středových folikulů ovlivnila statisticky významně pouze koncentrace 50 μg BPS/kg/den (skupina GIII) a to na hladině významnosti P<0,01. Délka folikulů se oproti kontrolní skupině (60,46 $\pm$ 8,32 μm) zvětšila o 16,7 %, šířka se oproti kontrolní skupině (47,70 $\pm$ 6,68 μm) zvětšila o 14,2 %. Šířku folikulů ovlivnil statisticky významně také BPA (53,80 $\pm$ 3,07 μm). Na rozdíl od periferních folikulů nedošlo ke zmenšení plochy folikulárních buněk a snížení výšky tyreocytu. Plocha koloidu se statisticky významně zvětšila (P<0,05) pouze u skupiny s BPA (1398,95 $\pm$ 259,19 μm^2).

Naše výsledky jsou shodné se zjištěním Lee et al. (2017), kteří uvádí menší vliv BPA na morfologii štítné žlázy oproti jeho analogu BPS, u kterého jsme zaznamenali působení morfologické parametry folikulů štítné žlázy již od menších koncentrací. Chen et al. (2016) pozorovali při expozici BPS zvýšenou aktivitu folikulů štítné žlázy. Byla pozorována hypertrofie a hyperplazie folikulárního epitelu. Na rozdíl od našeho experimentu však pozoroval koloidní depleci. Dle těchto autorů působí BPS na expresi TRH v hypotalamu. Ten stimuluje TSH v hypofýze, který následně působí na folikuly štítné žlázy (De Groef a kol., 2006).

V tabulce 9 je zobrazena korelační analýza mezi hormony štítné žlázy a jednotlivými morfologickými parametry folikulů štítné žlázy. Ukázalo se, že hladina fT4 nekoreluje s žádným morfometrickým parametrem folikulů. Oproti tomu jsme zaznamenali středně silný pozitivní vztah mezi koncentrací TSH a šířkou periferního folikulu ($P < 0,05$) a středně silný negativní vztah mezi TSH a plochou folikulární buňky ($P < 0,01$). Při větším počtu pozorování by pravděpodobně došlo i ke vztahu mezi zvýšením obsahu TSH a zvětšením plochy folikulu a koloidu ($P < 0,08$). U středových folikulů došlo ke středně silnému negativnímu vztahu mezi TSH a délkou folikulů, šířkou folikulů, plochou folikulu a plochou koloidu ($P < 0,05$). Mohamed et Rateb (2018) zaznamenali vztah mezi zvýšeným obsahem TSH a zvětšením plochy folikulu a koloidu při expozici BPA, což by odpovídalo našemu pozorování. Oproti našemu sledování tito autoři uvádějí zvýšení výšky folikulárního epitelu. Naše výsledky jsou více v souladu s pozorováním Sahu et Verma (2023), kteří uvádějí významné snížení výšky folikulárních epiteliálních buněk ($P < 0,001$) ve skupině se 150 mg BPS/kg/den což odpovídá našim výsledkům u skupiny GIV (tabulka 7). Tito autoři udávají jako důvod snížení biologické dostupnosti aktivní formy hormonů štítné žlázy vlivem snížení exprese receptoru hormonů štítné žlázy (TR- α) a DIO2.

Tabulka 9: Korelace mezi hormony štítné žlázy a vybranými morfometrickými parametry folikulů štítné žlázy

		Okrajové folikuly					
		Délka folikulu (μm)	Šířka folikulu (μm)	Plocha folikulu (μm ²)	Plocha fol. buňky (μm ²)	Výška tyreocytu (μg/l)	Plocha koloidu (μm ²)
TSH	Korelační koeficient	0,244	,548*	0,391	-,551**	-0,352	0,382
	p hodnota	0,286	0,010	0,080	0,010	0,118	0,088
	N	30	30	30	30	30	30
ft4	Korelační koeficient	-0,304	-0,308	-0,251	0,174	0,264	-0,329
	p hodnota	0,192	0,187	0,285	0,462	0,261	0,157
	N	30	30	30	30	30	30
		Středové folikuly					
		Délka folikulu (μm)	Šířka folikulu (μm)	Plocha folikulu (μm ²)	Plocha fol. buňky (μm ²)	Výška tyreocytu (μg/l)	Plocha koloidu (μm ²)
TSH	Korelační koeficient	-,501*	-,496*	-,522*	-0,036	-0,179	-,518*
	p hodnota	0,021	0,022	0,015	0,876	0,437	0,016
	N	30	30	30	30	30	30
ft4	Korelační koeficient	-0,126	-0,102	-0,161	0,083	0,025	-0,097
	p hodnota	0,597	0,669	0,499	0,728	0,917	0,685
	N	30	30	30	30	30	30

Statisticky významný rozdíl *P<0,05 ** P<0,01

2.2.2 Vliv Bisfenolu S na funkční parametry štítné žlázy potkanů Wistar

2.2.2.1 Vliv Bisfenolu S na hormony štítné žlázy

Tyreoidální stimulační hormon (TSH) je glykoproteinový hormon, který se produkuje v hypofýze (prostřednictvím TSH receptoru (TSH-R)) a reguluje všechny kroky spojené se syntézou a sekrecí hormonů štítné žlázy, vychytávání jódu a také hypertrofii a hyperplazii tyreocytů (Spaulding, 2000, Zoeller a kol., 2007). Mezi TSH a TH existuje známý systém negativní zpětné vazby (Fitzgerald a Bean, 2018, Eghtedari and Correa, 2022). Malé změny hladin volných hormonů štítné žlázy vedou dle Alveš et al. (2017) k větším změnám hladin TSH. Sérový TSH je považován za nejspolehlivější diagnostický test pro všechny běžné formy hypotyreózy a hypertyreózy (Alves et al. 2017).

Sledovali jsme vzestupnou tendenci TSH (tabulka 12) při zvyšující se dávce BPS ($P < 0,05$). Hodnoty TSH byly zvýšené oproti kontrolní skupině nad fyziologickou normu pro potkany Wistar (0,85 - 3,23 ng/ml) u všech skupin s bisfenoly. Zvýšené TSH pozoroval také Hu et al. (2023), který uvádí zvýšený obsah TSH při podávání BPA (2 mg BPA/kg/den) a BPS (20 mg BPS/kg /den) a to až na 1,21násobek hodnot kontrolní skupiny. Zároveň Hu et al. (2023) a Holloway et al. (2021) upozorňují na narušení syntézy tyreoidálních hormonů a funkci štítné žlázy, které jsou spojeny s regulací TSHR, tyreoidální peroxidázy, tyreoglobulinu a exprese NIS. Naše výsledky ukazují na riziko dysfunkce štítné žlázy již od koncentrace 4 ug BPS/kg/den. Dle Peeters (2017) je zvýšené TSH spolu se snížením fT4 typickým příznakem hypotyreózy. Statisticky významný rozdíl v koncentraci fT4 byl prokázán mezi skupinou GII a GIV ($P < 0,002$) a také mezi GII a GV, a to na hladině významnosti $P < 0,001$. U skupiny GIV a GV byla hodnota fT4 mírně pod referenčním rozmezí fT4 pro potkany Wistar (0,92 ng/dl). Korelační analýza (tabulka 10) prokázala středně silný vztah mezi obsahem TSH a obsahem hemoglobinu a hematokritu ($P < 0,01$). Dle Solimana et al. (2017) a Wopereis et al. (2018) může souvislost mezi zvýšením TSH a vyššími hodnotami hemoglobinu a hematokritu znamenat kompenzační mechanismus na podporu zvýšené erytropoézy v reakci na nedostatečné množství hormonů štítné žlázy. V našem výzkumu byl dále zaznamenán středně silný vztah mezi TSH a procentickým zastoupením monocytů ($P < 0,05$). Koncentrace fT4 vykazovala středně silný vztah s tělesnou hmotností na konci experimentu ($P < 0,05$).

a slabý až středně silný vztah s přírůstkem, hmotností jater a triacylglyceroly ($P < 0,05$). Na hladině významnosti $P < 0,01$ byl zaznamenán středně silný korelační vztah mezi fT4 a leukocyty. Mezi fT4 a granulocyty byla zaznamenána středně silná negativní korelace ($P < 0,05$).

Tabulka 11: Koncentrace TSH, ft4 a obsah jódu v moči

Skupina	TSH (ng/ml) *	fT4 (ng/dl)	Jód v moči (μg/L) *
GI (n = 6)	3,14 ± 1,28	0,94	89,44 ± 86,02
GII (n = 6)	5,12** ± 1,16	0,95	197,04 ± 64,93
GIII (n = 6)	5,55** ± 2,39	0,93 ± 0,01	171,20 ± 59,43
GIV (n = 6)	5,56** ± 1,98	0,92***	336,76 ± 103,07
GV (n = 6)	4,48** ± 1,09	0,92***	225,94 ± 134,70

* $P < 0,05$ **Hodnota je vyšší než referenční rozmezí pro TSH potkanů Wistar (0,85 - 3,23 ng/ml) ***Hodnota je nižší než referenční rozmezí pro fT4 potkanů Wistar (0,93 až 2,33 ng/dl)

2.2.2.2 Vliv Bisfenolu S na koncentraci jódu v moči

Jód je esenciální stopový prvek, který se podílí na mnoha hormonálních i nehoronálních procesech v organismu (Shahid et al., 2024). Množství jódu v těle je určováno především jeho příjmem v krmné dávce (Soldin, 2002; Rohner et al., 2014). Moleti et al. (2021) uvádí, že koncentraci jódu v moči ovlivňuje také zásoba ve štítné žláze a přítomnost látek narušujících jeho metabolismus. Pearce et Caldwell (2016) a Wainwright et Cook (2019) uvádějí měření jódu v moči jako nejběžnější ukazatel pro hodnocení jódového statusu.

V tabulce 12 je uvedena koncentrace jódu v moči u kontrolní skupiny a experimentálních skupin vystavených působení bisfenolů. Naše výsledky ukazují, že expozice BPS a BPA vedla ke zvýšenému vylučování jódu do moči. Nejnižší

koncentrace jódu v moči byla zaznamenána u kontrolní skupiny ($89,44 \pm 86,02 \mu\text{g/l}$). Ve skupině GII a GIII byl zaznamenán 1,84 resp. 1,6násobek oproti kontrolní skupině. Nejvyšší vylučování jódu bylo zaznamenáno ve skupině GIV ($336,76 \pm 103,07$), u které se rozdíl oproti skupině kontrolní ukázal jako statisticky významný ($P < 0,014$). Naše zjištění odpovídá tvrzení Zhang et al. (2018) a Deal and Volkoff (2021), kteří uvádí schopnost působení analogů BPA na tyreoidální peroxidázu a natrium jodový symportér. Dle Nicola et al. (2009) je za akumulaci jódu ve štítné žláze odpovědný právě NIS.

Byla provedena korelace mezi obsahem TSH, fT4 a obsahem jódu v moči, výsledek se ovšem ukázal jako statisticky nevýznamný. Tabulka 10 ukazuje korelační závislosti mezi obsahem jódu a ostatními zkoumanými parametry. Bylo zjištěno, že jód v moči středně silně negativně koreloval s koncentrací triacylglycerolů ($P < 0,05$). Nebyla zjištěna souvislost mezi obsahem jódu a morfologickými parametry folikulů štítné žlázy (tabulka 13).

2.3 Vliv Bisfenolu S na ostatní vybrané orgány potkanů Wistar

2.3.1 Účinek Bisfenolu S na ledviny

Štítná žláza je hlavním zásobníkem jódu, přestože se jód hromadí i v dalších netyroidálních tkáních, jako jsou slinné žlázy, střeva, žaludek, mléčné žlázy, slzné váčky, nososlizniční kanálky a ledviny (Tazebay et al., 2000; Spitzweg et al., 2001; Dohan et al., 2003; Portulano et al., 2014; Ravera et al., 2017). Vylučování jódu probíhá především prostřednictvím ledvin močí (Rohner et al., 2014), což znamená, že ledviny hrají významnou roli v metabolismu jódu a hormonů štítné žlázy (Spitzweg et al., 2001; Zimmermann et Anderson, 2012; Rohner et al., 2014). Autoři Katz et al. (1975) a Spitzweg et al. (2001) uvádějí, že ledviny obsahují mnohem více hormonů štítné žlázy a anorganických jodidů na jednotku hmotnosti, než ostatní mimo jódové tkáně, a hrají důležitou roli v periferním metabolismu jódu a hormonů štítné žlázy.

Po zjištění vyššího obsahu jódu v moči u skupin vystavených BPS jsme analyzovali obsah jódu v ledvinách, kde jsme zaznamenali opačný trend ve srovnání s koncentrací jódu v moči. Tedy nejvyšší koncentraci jódu jsme zaznamenali v kontrolní skupině, a naopak nejnižší koncentrace ve skupině GIV s nejvyšším množstvím BPS (graf 7). Ve srovnání s kontrolní skupinou se jednalo o 1,02násobný

pokles u skupiny GII, 1,06násobný u GIII a 1,11násobný u GIV. Zjištěné rozdíly však nebyly statisticky významné.

2.3.2 Účinek Bisfenolu S na játra

Játra plní nezastupitelnou úlohu v regulaci mnoha základních procesů v organismu, včetně udržování homeostázy a fyziologických funkcí. Vzhledem k jejich roli jsou játra vystavena neustálému působení různých cizorodých látek, jako jsou například bisfenoly, které vstupují do těla především přes trávicí systém (Thoolen et al., 2010). V našem experimentu jsme pozorovali klesající tendence hmotnosti jater se zvyšující se koncentrací BPS a BPA (tabulka 15). Po Bonferroniho korekci vícenásobných porovnávání, nebyl ovšem rozdíl mezi skupinami statisticky signifikantní. Relativní hmotnost jater se mezi skupinami nelišila, čemuž odpovídá i silný korelační vztah hmotnosti jater s přírůstkem a hmotností potkanů při pitvě, na hladině významnosti ($P < 0,01$). Středně silný korelační vztah byl zaznamenán mezi hmotností jater a obsahem cholesterolu ($P < 0,05$) a obsahem triacylglycerolů ($P < 0,05$). Slabý až středně silný vztah hmotnosti jater byl zaznamenán s hořčíkem a $\text{ft}4$ ($P < 0,05$) (tabulka 10). Naše výsledky odporují zjištění Brulporta et al. (2020) a Boucher et al. (2016), kteří udávají významné zvýšení tělesné hmotnosti a hmotnosti jater při podání BPS. Tito autoři také prokázali vliv BPS na akumulaci lipidů v játrech. Při 8týdenní expozici koncentrací 5 mg/kg/BPS/den pozoroval steatózu jater také Zhang et al. (2018), který jako hlavní příčinu uvádí působení BPS na aktivitu antioxidantních enzymů a zvýšení peroxidace lipidů. Zhang et al. (2018) také zkoumali vliv BPS na játra v nižších koncentracích (5 a 50 ug BPS/kg/den), u kterých neprokázali statisticky významný vliv.

Tabulka 11: Hmotnostní parametry jater

Parametr	Skupina				
	GI	GII	GIII	GIV	GV
Absolutní hmotnost jater (g)	11,42 ± 1,55	10,58 ± 1,07	11,02 ± 1,07	9,45 ± 1,51	9,40 ± 0,79
Relativní hmotnost jater	2,69 ± 0,28	2,51 ± 0,23	2,64 ± 0,12	2,51 ± 0,18	2,48 ± 0,26

BPS může interferovat s transportními mechanismy jódu v těle, zejména jeho vlivem na transportní proteiny, jako je NIS, který hraje důležitou roli v absorpci jódiu z krve do různých tkání, včetně jater. Změny v expresi NIS mohou vést k omezenému ukládání jódu v játrech. Dalšími souvislostmi jsou vlivy BPS na antioxidační systémy a produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou vést k oxidačnímu stresu a poškození hepatocytů (Bindhumol et al., 2003). Nejnížší zaznamenaný obsah jódu byl zaznamenan ve skupině GIII (64,62 g/kg ± 18,87) (graf 8), změny však nebyly ani v jedné skupině statisticky signifikantní.

2.3.3 Účinek Bisfenolu S na lymfatické orgány

Mezi jednotlivými skupinami jsme nezaznamenali rozdíly v histologické struktuře brzlíku. U všech skupin byl brzlík obklopen vazivovým pouzdrém s jasně rozlišenou hranicí mezi kůrou a dřením. Poměry kůry a dřene se v kontrolních i experimentálních skupinách lišily dle oblasti. V kůře jsme u všech skupin pozorovali apoptotické buňky fagocytované makrofágy (obrázek 10a). Pouze u jednoho jedince ze skupiny GII (4 ug/BPS/kg/den) byly zjištěny cystické dilatace s buňkami v lumen (obrázek 10b). Yaglov et al. (2022) uvádějí možný úbytek lymfocytů v kůře brzlíku, při působení toxických látek. Tento trend jsme ale v našem pozorování nezaznamenali. V současné době nejsou dostupné studie zabývající se vlivem BPS na histologii brzlíku. Naše výsledky odpovídají výzkumům Aydemira et al. (2018) a Yanga et al. (2008), kteří zjistili, že prenatální expozice různým koncentracím BPA nezpůsobila patologické změny v brzlíku potkanů.

Podobně jako u brzlíku, je i výzkum zaměřený na vliv BPS na slezinu v současné literatuře velmi omezený. Shaibi et al. (2022) provedli experiment na tří týdenních myších, kterým podávali TDI pro BPA upravený EFSOU v roce 2006 (50 µg BPA/kg/den) intraperitoneálně ve slunečnicovém oleji po dobu 6 týdnů. Zjistili, že expozice BPA způsobila zvýšení počtu germinativních center v lymfatických nodulech bílé pulpy sleziny, přičemž byl pozorován minimální počet apoptotických buněk a výrazná histiocytární infiltrace v červené pulpě. Basit et al. (2020) popisují po 12týdenní expozici potkanů kmene Wistar dávkou 10 mg BPA/kg/den dilataci splenických sinů, vakuolizaci v červené pulpě, depopulaci bílé pulpy a aktivaci lymfatických nodulů. Ahmed et al. (2015) našli podobné histopatologické změny při vyšší expoziční dávce BPA, zatímco Dawoud et al. (2009) popisují fokální nekrózu ve slezině myší po šestitýdenní expozici BPA v dávce 25 000 mg/kg/den. Dong et al. (2013) zjistili, že BPA narušuje aktivitu antioxidantních enzymů a zvyšuje obsah malondialdehydu, což naznačuje, že příčinou histopatologických změn ve slezině může být zvýšený lokální oxidační stres.

Pokud jde o dopad expozice BPS na slezinu, dostupná je pouze jedna studie, kterou provedli Zhao et al. (2020) na myším modelu. Tato studie zahrnovala 56denní expozici BPS, přičemž BPS byl podáván per os gaváží, v koncentraci 10 µg BPS/kg/den a 100 µg BPS/kg/den. Výsledky této studie naznačují, že BPS má podobný účinek jako BPA. Expozice BPS vedla zejména ke změnám v bílé pulpě sleziny, včetně nezřetelného oddělení bílé a červené pulpy, lymfocytodeplece v periarteriálních lymfatických pláštích a snížení počtu lymfatických nodulů. Tyto změny byly nejvýraznější ve skupině zvířat vystavených vyšší dávce BPS.

Naše výsledky se však s touto studií neshodují. U sleziny kontrolních zvířat i skupin vystavených BPS jsme nezaznamenali žádné zřetelné histologické změny. Slezina byla u všech skupin pokryta vazivovým pouzdem stejné tloušťky, s dobře oddělenou bílou a červenou pulpou a výraznou marginální zónou (obrázek 10 d, e, f). Slunečnicový olej použitý v našem pokusu jako nosič, může působit jako ochranný prostředek proti oxidačnímu stresu díky vysokému obsahu antioxidantů, zejména vitamínu E (tokoferolu) a nenasycených mastných kyselin. Výzkumy na zvířatech ukazují, že příjem slunečnicového oleje může snižovat markery oxidačního stresu ve slezině a dalších orgánech. Kromě toho může vitamín E regulovat expresi antioxidantních enzymů, jako je superoxid dismutáza a kataláza, které jsou klíčové pro obranu proti oxidačnímu poškození (Ashok et al., 2022).

3 Závěr

V předkládané práci byl zkoumán vliv BPS a BPA na morfologické a funkční parametry štítné žlázy potkanů Wistar, dále na změny biochemických a hematologických parametrů, obsah jódu v moči a obsah jódu a histologické změny vybraných orgánů. K tomuto účelu byl proveden 10týdenní laboratorní pokus na potkanech kmene Wistar. Potkani byli rozděleni na kontrolní skupinu (n=6) a čtyři pokusné skupiny (n=24).

Následující část shrnuje hlavní zjištění:

- Zvyšující se množství jódu v moči se zvýšením koncentrace BPS naznačuje jeho významný účinek na metabolismus jódu a jeho přísun do štítné žlázy, a to již od nejnižších koncentrací, které mají podobný vliv jako vysoká koncentrace BPA.
- Nejnižší koncentrace BPS (4 ug/kg/den) měla výraznější vliv na obsah TSH než vysoká koncentrace BPA (100 mg/kg/den), což ukazuje na výraznější vliv BPS na TH.
- Hodnoty TSH byly oproti kontrolní skupině zvýšené nad fyziologickou normu pro potkany Wistar (0,85 - 3,23 ng/ml) u všech skupin s bisfenoly.
- Na snížení koncentrace fT4 působila nejvyšší koncentrace BPS ($P < 0,002$) a BPA ($P < 0,001$) a to statisticky významně oproti skupině GII s nejnižším obsahem bisfenolů.
- Zvýšené TSH spolu se snížením fT4 ukazuje na vliv bisfenolů na snížení obsahu TH a hypofunkci štítné žlázy.
- Byl prokázán statisticky významný účinek BPS i BPA na změny v morfometrických parametrech štítné žlázy. Statisticky významně se vliv BPS projevil již u skupiny GII s nejnižší koncentrací BPS (v délce folikulu, ploše folikulární buňky a výšce tyreocytu). Větší vliv bisfenolů byl pozorován na periferní folikuly.
- Se zvyšující se koncentrací bisfenolů klesala koncentrace triacylglycerolů, a to statisticky významně ($P < 0,017$ a $P < 0,022$) u skupiny GIV (100 mg BPS/kg/den) a GV (100 mg BPA/kg/den), hodnoty u všech pokusných skupin byly pod fyziologickou normou pro triacylglyceroly.

- Podání vysoké koncentrace BPA oproti vysoké koncentraci BPS statisticky významně ($P < 0,035$) ovlivnilo pokles obsahu cholesterolu ($1,28 \pm 0,15$ mmol/l).
- Byl patrný větší vliv na koncentrace celkové bílkoviny u skupiny s BPA, kdy oproti kontrolní skupině ($65,42 \pm 4,56$ mg/l) byla koncentrace výrazně nižší ($59,7 \pm 0,95$ mg/l).
- Došlo k mírnému nesignifikantnímu zvýšení koncentrace vápníku, hořčíku a fosforu.
- Získané výsledky ukazují na větší vliv vysoké koncentrace BPS na hematologické parametry než vysoké koncentrace BPA. U skupiny GIV došlo ke statisticky významnému rozdílu v množství leukocytů ($P < 0,05$), ke snížení procentického zastoupení lymfocytů ($P < 0,05$) a zvýšení procentického zastoupení granulocytů.
- Expozice BPS nevyvolala histopatologické změny brzlíku a sleziny.

Předkládaná disertační práce ukazuje, že BPS není vhodnou náhradou za BPA pro použití v plastech určených pro styk s potravinami a jeho použití může mít důsledky pro zdraví zvířat i lidí. Výsledky upozorňují na nutnost stanovit tolerovatelný denní příjem (TDI) také pro bisfenol S. Vzhledem k nedostatku studií, které přímo zkoumají vliv analogů BPA na funkci štítné žlázy, je zapotřebí dalšího výzkumu, aby byly lépe pochopeny účinky těchto endokrinních disruptorů a došlo k případné úpravě TDI i u ostatních analogů BPA.

4 Souhrn

Cílem disertační práce bylo zhodnocení dopadu bisfenolu S na morfologické a funkční vlastnosti štítné žlázy potkanů a účinku bisfenolu S na koncentraci jódu ve vybraných tělních tekutinách.

K tomuto účelu byl proveden 10týdenní pokus na potkanech kmene Wistar. Zvířata byla rozdělena do 5 pokusných skupin na skupinu kontrolní (GI), která dostávala pouze nosič slunečnicový olej a skupiny experimentální. Experimentální skupina GII dostávala aktuální povolenou koncentraci (tzv. TDI) stanovenou pro BPA, tedy 4 ug BPS/kg/den. Třetí skupina GIII dostávala první upravený TDI pro BPA, tedy 50 ug BPS/kg/den. Skupina GIV dostávala vysokou koncentraci BPS (100 mg BPS/kg/den) pro porovnání účinku nízkých a vysokých koncentrací BPS. Pro porovnání účinků vysokých koncentrací BPS a BPA (100 mg BPA/kg/den) bylo BPA podáváno v poslední skupině (GV).

U pokusných skupin došlo ke vlivu BPS a BPA na hmotnostní parametry. Se zvyšující se koncentrací bisfenolů docházelo ke snížení celkového přírůstku a hmotnosti při pitvě. Hmotnostní parametry vykazovaly silnou pozitivní korelaci s hmotností jater ($P<0,01$). Úbytek hmotnosti se odrazil také v koncentraci triacylglycerolů, která byla u všech experimentálních skupin pod fyziologickým rozmezím. Byl prokázán vliv BPA na sníženou koncentraci cholesterolu, oproti tomu u BPS nedošlo k výrazným změnám. Ukázalo se, že na hematologické parametry měl větší vliv BPS. Došlo ke statisticky významnému rozdílu v množství leukocytů u skupiny GIV ($P<0,05$) a dále ke změně procentického zastoupení lymfocytů, které se oproti kontrolní skupině u skupiny GIV snížilo ($P<0,05$) a oproti tomu se statisticky zvýšilo procentické zastoupení granulocytů.

Oproti BPA byl prokázán větší vliv BPS na morfologické parametry štítné žlázy. U skupiny GIV došlo u periferních folikulů k nejvýraznějšímu zvětšení délky a šířky folikulů ($P<0,001$) a také ke zvětšení plochy folikulů ($P<0,05$). Vliv BPS na morfologii folikulů byl prokázán již od nejnižší koncentrace u skupiny GII, kde došlo k vlivu především na zmenšení plochy folikulární buňky a výšky tyreocytu periferních folikulů. Byl zaznamenán vztah mezi koncentrací TSH, plochou folikulární buňky a šířkou periferních folikulů. U všech experimentálních skupin byla zaznamenána zvýšená koncentrace TSH nad fyziologickou normu potkanů Wistar. Vyšší vliv byl pozorován u BPS, kdy i skupina s nejnižším množstvím bisfenolu S GII vykazovala

vyšší koncentraci TSH ($5,12 \pm 1,16$ ng/ml), než skupina s vysokou koncentrací BPA GV ($4,48 \pm 1,09$ ng/ml). Se zvyšující se koncentrací bisfenolů klesala koncentrace fT4 a to u skupiny GIV a GV pod fyziologické rozmezí. Zvýšené TSH spolu se snížením fT4 poukazuje na hypotyreózu štítné žlázy.

Expozice BPS a BPA vedla ke zvýšenému vylučování jódu močí. Nejvyšší obsah jódu byl naměřen u skupiny GIV ($336,76 \pm 103,07$ µg/L), rozdíl oproti kontrolní skupině ($89,44 \pm 86,02$ µg/L) byl statisticky významný ($P < 0,014$). Jód byl také analyzován v ledvinách, kde došlo k 1,11násobnému poklesu koncentrace jódu u skupiny GIV oproti kontrolní skupině. Tento rozdíl však nebyl statisticky signifikantní, stejně jako rozdíl v obsahu jódu v játrech.

Práce potvrdila negativní působení BPS na aktivitu štítné žlázy projevující se změnami v morfológické struktuře a funkčními změnami štítné žlázy pokusných hlodavců. Ukázalo se, že vliv BPS je v mnoha parametrech výraznější, než vliv BPA a jeho použití jakožto náhražky BPA není vhodné, a to především při použití v plastech, které přicházejí do styku s potravinami. Z této práce vyplývá nutnost stanovit tolerovatelný denní příjem (TDI) také pro BPS a pravděpodobně i pro další analogy využívané jako náhražky BPA. Vzhledem k nízkému počtu studií přímo studujících vliv analogů BPA na morfologii štítné žlázy, by bylo zapotřebí více prací zabývajících se tímto tématem.

4.1 Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of bisphenol S on the morphological and functional changes in the thyroid gland of rats and the effect of bisphenol S on iodine concentration in selected tissues.

For this study, a 10-week experiment was made on the Wistar rats. The animals were separated into 5 experimental groups into a control group (GI), which received only sunflower oil vehicle, and an experimental groups. The experimental group GII received the tollerable daily intake (TDI) for BPA, i.e. 4 ug BPS/kg/day. The third group GIII received the first adjusted TDI for BPA, i.e. 50 ug BPS/kg/day. The GIV group received a high concentration of BPS (100 mg BPS/kg/day) to compare the effect of low and high concentrations of BPS. The last group (GV) received BPA to compare the effects of high concentrations of BPS and BPA (100 mg BPA/kg/day).

The effect of BPS and BPA on weight parameters was observed in the experimental groups. There was a decrease in total gain and weight at necropsy with increasing concentration of bisphenols. Weight parameters showed a strong positive correlation with liver weight ($P<0.01$). Weight loss was also reflected in triacylglycerol concentration, which was lower than the physiological range in all experimental groups. There was an effect of BPA on decreased cholesterol concentration, in comparison, there were no significant changes in BPS. BPS had a stronger effect on haematological parameters. There was a statistically significant difference in the level of leucocytes in the GIV group ($P<0.05$) and a statistically significant change in the percentage of lymphocytes, which decreased in the GIV group ($P<0.05$) compared to the control group, and a statistically significant increase in the percentage of granulocytes.

Compared to BPA, there was a stronger effect of BPS on thyroid morphological parameters. In the GIV group, peripheral follicles showed the most significant increase in follicle length and width ($P<0.001$), as well as an increase in follicle area ($P<0.05$). The effect of BPS on follicle morphology was demonstrated from the lowest concentration in the GII group, where the effect was especially on the decrease in follicular cell area and thyrocyte height of peripheral follicles. There was a relationship between TSH concentration, follicular cell area and peripheral follicle width. Increased TSH concentration above the physiological norm of Wistar rats was observed in all experimental groups. A stronger effect was observed with BPS, where even the lowest bisphenol S GII group showed higher TSH concentration (5.12 ± 1.16 ng/ml) than the BPA GV group (4.48 ± 1.09 ng/ml). As the concentration of bisphenols increased, the fT4 concentration decreased and that of the GIV and GV group was below the physiological range. Increased TSH with decrease in fT4 indicates hypothyroidism of the thyroid gland.

Exposure to BPS and BPA led to increased urinary iodine excretion. The highest iodine content was measured in the GIV group (336.76 ± 103.07 $\mu\text{g/L}$), the difference with the control group (89.44 ± 86.02 $\mu\text{g/L}$) was statistically significant ($P<0.014$). Iodine was also analyzed in the kidneys, where there was a 1.11- fold decrease in iodine concentration in the GIV group compared to the control group. However, this difference was not statistically significant, as well as the difference in liver iodine content.

The study confirmed the negative effect of BPS on thyroid activity manifested by changes in the morphological structure and functional changes in the thyroid gland of experimental rats. The effect of BPS was shown to be stronger than that of BPA in many parameters and its use as a BPA substitute is not appropriate, especially when used in food contact plastics. This work shows the need to establish a tolerable daily intake (TDI) also for BPS and probably for other analogues used as BPA substitutes. Due to the low number of studies directly studying the effect of BPA analogues on thyroid morphology, more researches on this issue are needed.

4.2 Dedikace

Práce vznikla za podpory grantů GAJU 094/2021/Z a 005/2022/Z. Dále za podpory Ministerstva zemědělství České republiky, grantu NAZV QK21010326.