**Monika E. Łukasiewicz**

**BISFENOL A (BPA) U CIĘŻARNEJ I PŁODU A FUNKCJA JĄDRA NOWORODKA MĘSKIEGO**

**promotor:**

**prof. dr hab. n. med. sławomir wołczyński**

Kierownik Kliniki Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej SPSK
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

**PROMOTOR POMOCNICZY:**

**DR N. MED. ROBERT MILEWSKI**

Adiunkt w Zakładzie Statystyki i Informatyki Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

###### Streszczenie

Badania epidemiologiczne i obserwacje kliniczne wskazują, że płodność męska
w ostatnich dekadach obniża się. Przyczyn tego zjawiska nie udało  się ustalić. Sugeruje się, że może być to efekt niekorzystnego wpływu środowiskowych substancji zaburzających syntezę, sekrecję i działanie hormonów endocrine-disrupting compounds (EDCs). Substancje te są  wytwarzane przemysłowo i są obecne w produktach codziennego użytku
i w środowisku.  Zdecydowana większość substancji EDC to tzw. ksenoestrogeny (a wśród nich produkowany na największą skalę  bisfenol A),  które naśladują, hamują lub zmieniają działanie estrogenów. Skakkebaek w 2001 roku wysunął hipotezę, że zaburzenia płodności męskiej i choroby męskiego układu rozrodczego (spodziectwo, wnętrostwo, rak jądra) mają swoją pierwotną przyczynę w okresie płodowym, kiedy działanie EDS doprowadza do nieprawidłowego zaprogramowania jądra w okresie jego rozwoju. W okresie rozrodczym manifestuje się to obniżeniem produkcji plemników, zaburzeniami ich funkcji czy zmianami w steroidogenezie. Okres rozwoju prenatalnego jest okresem najbardziej dynamicznych zmian i zaburzenie naturalnego procesu różnicowania jądra będzie miało trwałe konsekwencje. Nieprawidłowo zaprogramowane jądro nie odpowie na leczenie farmakologiczne, bo zmiana jest utrwalona i to tłumaczyłoby brak efektów farmakologicznego leczenia w niepłodności męskiej. Koncepcja o wpływie EDC na zaburzenie funkcji jądra męskiego została potwierdzona na różnych modelach eksperymentalnych, ale przy zastosowaniu dawek ksenoestrogenów przekraczających występujące w środowisku. Trudno potwierdzić te obserwacje u ludzi. Kobieta ciężarna eksponowana jest na różne substancje EDC, które mogą mieć wpływ na rozwój wielu narządów i przebieg ciąży. Otwartym pozostaje zatem pytanie, czy EDCs rzeczywiście odpowiedzialne są za pojawienie się niepłodności męskiej.

Celem przeprowadzonych badań była ocena stężenia bisfenolu A u kobiet ciężarnych
i płodów oraz zbadanie związku między stężeniem BPA a biomarkerami funkcji jądra
i przysadki. Przebadałam grupę 117 kobiet w ciąży i 117 noworodków płci męskiej urodzonych w stanie dobrym (po 37. tygodniu, z prawidłową masą urodzeniową, które otrzymały powyżej 7 punktów w skali APGAR, bez wad na etapie życia płodowego, potwierdzonych w badanich prenatalnych). Badanie zostało przeprowadzone w II Klinice Położnictwa i Ginekologii CMKP w Szpitalu Bielańskim w Warszawie.

Surowica krwi kobiet ciężarnych i surowica krwi pępowinowej noworodków męskich oraz fragmenty tkanki łożyskowej pobrano do próbówek z materiału pozbawionego bisfenolu A. Po odwirowaniu surowica i fragmenty łożyska zostały zamrożone
w temperaturze -80˚C. U noworodków dokonano pomiarów morfometrycznych: masy ciała, długości, obwodu główki, długości anogenitalnej, wielkości jąder oraz długości prącia.

Bisfenol A oznaczono metodą LC-MS, przy użyciu systemu gradientowego mikro-UHPLC z autosamplerem (LC200, Eksigent), sprzężonym z spektroCmetrem masowym TripleTOF 5600+ (AB SCIEX, USA). Oznaczenia hormonów steroidowych wykonano metodą chromatografii cieczowej, sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS), z wykorzystaniem zestawu LC-MS/MS 8040 (Shimadzu, Japonia). AMH, inhibinę B i TGF-β 2 oznaczono metodą ELISA, przy użyciu czytnika mikropłytek TECAN Infinite M200 Pro, z wykorzystaniem odpowiednich zestawów: AMH Gen II ELISA (Beckman Coulter, USA), Inhibin-B EIA Kit (Sigma-Aldrich, USA) oraz Human TGF-β 2 ELISA Kit (Sigma-Aldrich, USA). W każdym przypadku oznaczenia wykonano zgodnie z instrukcjami producentów zestawów.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że kobiety ciężarne oraz noworodki narażone są na ekspozycję na BPA. Łożysko gromadzi BPA i może istotnie ograniczać transport BPA między matką a płodem. Potwierdzenie tego wniosku wymaga przeprowadzenia większej ilości badań. Nie wykazano natomiast korelacji między długością anogenitalną oraz masą noworodka a ekspozycją na BPA. Wykazano pozytywny związek między stężeniem BPA w krwi pępowinowej i obwodem główki noworodka. Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem testosteronu, inhibiny B, AMH, FSH
w krwi pępowinowej a stężeniem BPA w krwi matki, w krwi pępowinowej i w łożysku. Stwierdzono zależność między masą ciała pacjentki na początku ciąży a stężeniem BPA
w surowicy jej krwi.

###### Summary

**Serum bisphenol A (BPA) concentration in pregnant women and and its impact
on testis development and function of their male newborns**

Epidemiological studies and clinical observations have found that male fertility has declined over the past few decades. Endocrine-disrupting compounds (EDCs) which are capable of modulating and disrupting the function of endocrine system have recently raised lots of concern. They can mimic or block natural hormones and there is
a ubiquitous exposure of general population to EDCs, including pregnant women. Bisphenol A (BPA), a well-studied model of EDCs, as a xenoestrogen is widely used in manufacture of polycarbonate plastics, epoxy resins, dental sealants and can lining. It easily leaches out of cans, microwavable containers, dental sealants and polycarbonate bottles. Skakkenbaek in 2001 introduced a hypothesis that male infertility and male reproductive tract abnormalities may have the same cause. BPA can affect fetal testis during early prenatal development (certain critical window) and cause persistent changes in spermatogenesis and steroidogenesis. The fact that these changes are programmed so early during fetus development may explain why drug treatment of male infertility is ineffective. Studies on exposed animals and in vitro gave direct evidence that BPA can affect male reproductive development in dosages exceeding normal environmental exposure. Potential hazardous effect of BPA on pregnant women should be further and more precisely evaluated in the context of testis development, testicular gametogenesis and steroidogenesis of their offsprings. The question whether environmental BPA exposure can influence testis development and can cause male infertility in the future still remains open.

The aim of the study was to investigate whether Polish pregnant women and their male newborns are exposed to BPA and if so, to what extent. I also wanted to find a correlation between BPA in serum of pregnant women, umbilical cord and placental tissue. Moreover, I wanted to find if concentration of BPA in umbilical cord can influence the hypothalamus-pituitary-testicular axis.

Blood from 117 mothers and 117 healthy male newborns was collected into BPA-free tubes and after centrifugation stored in -80C along with placental tissue placed in BPA-free tubes. Antropomorphic parameters were evaluated from newborn (anogenital distance, SPL, head circumferences, birth weight and length).

The BPA level in serum, cord blood and placental tissue were measured using a liquid chromatography (LC200, Eksigent) and mass spectrometry (TripleTOF 5600+ [AB SCIEX, USA]). AMH, TGF –β2 and inhibin B were analyzed in sera from umbilical cord using Infinite M200 Pro microplate reader (Tecan, Switzerland) using commercial kits: (AMH Gen II ELISA [Beckman Coulter, USA], Inhibin-B EIA Kit [Sigma-Aldrich, USA], TGF-β2 [ELISA Kit, Sigma-Aldrich, USA]) according to the manufacturer's protocols. Steroid hormones were measured using a liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS 8040 [Shimadzu, Japan]). LH and FSH were analyzed using immunochemical analyzer Cobas e411 (Roche Diagnostic, USA) with commercial sets of reagents and according to the manufacturer's instructions.

Results of the study suggest that mother and newborn are exposed to BPA. Placenta binds BPA and probably reduces BPA’s transport between mother and fetal compartment. BPA didn’t correlate with maternal or fetal parameter or with steroids levels. My results confirmed mother exposure and utero exposure, but also suggested a protective role of placenta. My findings highlight the importance of further studies of the effects of BPA exposure on testis development.

The research project was approved by ethical committee of CMKP and informed consent was obtained from each mother.