

mgr AGNIESZKA WNUK

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej

**Tytuł rozprawy doktorskiej:**

*The effects of the chemical UV filter - benzophenone-3 in the mouse neuronal cells.*

*(Efekty działania chemicznego filtra UV, benzofenonu-3, w komórkach nerwowych myszy.)*

**Promotor:**

dr hab. MAŁGORZATA KAJTA

**Recenzenci:**

prof. dr hab. STANISŁAW OKRASA

dr hab. n. med. ELŻBIETA SALIŃSKA, prof. IMDiK

## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Benzofenon-3 (BP-3, 2-hydroksy-4-metoksybenzofenon, oksybenzon lub 2OH-4 MeO-BP) należy do grupy substancji promieniochłonnych zwanych potocznie filtrami przeciwsłonecznymi, chroniących przed negatywnym działaniem promieniowania ultrafioletowego (UV) poprzez absorbowanie promieniowania z zakresu UVB i UVA. Benzofenon-3 jest powszechnie wykorzystywany nie tylko w preparatach do opalania, ale także w codziennie stosowanych kosmetykach takich jak produkty do makijażu, płyny do kąpieli, szampony do włosów, perfumy, itp. Jest również składnikiem tworzyw sztucznych m.in. plastiku, tekstyliów, farb i lakierów. Jego stosowanie w przemyśle służy głównie do ochrony produktów przed degradacją wywołaną przez promieniowanie słoneczne.

Światowa produkcja i zużycie benzofenonu-3 są ogromne. Stwierdzono, że roczna produkcja benzofenonu-3 tylko na skalę europejską osiąga 100-1000 ton i wykazuje tendencję wzrostową w odpowiedzi na rosnące zapotrzebowanie przemysłu. Narażenie ludzi na działanie benzofenonu-3 dotyczy praktycznie całego społeczeństwa, na co wskazuje raport wykonany przez amerykańskie Centra Kontroli i Prewencji Chorób - CDC z 2017 roku. Ekspozycja człowieka na działanie benzofenonu-3 zachodzi bezpośrednio przez skórę, jak i pośrednio tj. poprzez układ pokarmowy i układ oddechowy. Zważywszy na fakt, że benzofenon-3 jest substancją silnie lipofilną, może się on z łatwością akumulować w tkance tłuszczowej (~5 mg/kg tkanki tłuszczowej ludzi). Szczególnie wrażliwy na działanie benzofenonu-3 może być mózg, który składa się minimum w 60% z tkanki tłuszczowej.

Prenatalna i postnatalna ekspozycja ludzi na benzofenon-3 wydaje się niezaprzeczalna. Aktualne dane populacyjne dostarczają dowodów na to, że benzofenon-3 łatwo przenika przez barierę łożyskową. Jego obecność stwierdzono bowiem w płynie owodniowym, tkance łożyska, krwi pępowinowej oraz płodowej. Noworodki i niemowlęta są również narażone na niekorzystne działanie benzofenonu-3, o czym świadczy fakt, że został on wykryty w próbkach kobiecego mleka. Dane populacyjne z ostatnich lat wskazują na silną korelację pomiędzy prenatalnym narażeniem na benzofenon-3 a ryzykiem wystąpienia choroby Hirschsprung'a, która objawia się deficytem unerwienia jelit u noworodków. Co więcej, bariera krew-mózg również wydaje się nie być przeszkodą dla tej substancji. Benzofenon-3 został zidentyfikowany w mózgach osób dorosłych w badaniach *post mortem*.

**Pomimo powszechnego stosowania benzofenonu-3, istnieją tylko nieliczne dane, które wskazują na szkodliwy wpływ tego związku chemicznego na organizmy ludzi i zwierząt. Większość tych doniesień dotyczy układu rozrodczego. Natomiast wiedza na temat wpływu benzofenonu-3 na układ nerwowy, zwłaszcza na wczesnych etapach rozwoju jest znikoma.**

Z tego względu celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest identyfikacja toksycznych i apoptotycznych efektów oraz mechanizmów działania benzofenonu-3 w komórkach nerwowych myszy, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu benzofenonu-3 na funkcję i ekspresję receptorów estrogenowych (ESR1, ESR2 i GPER1), receptorów retinoidowych typu X (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  i RXR $\gamma$ ) oraz receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PPAR $\gamma$ ), a także na proces autofagii i status epigenetyczny komórek nerwowych. Celem obecnej pracy jest również zbadanie wpływu prenatalnej ekspozycji na benzofenon-3 na procesy apoptotyczne, ekspresję receptorów estrogenowych oraz poziom metylacji DNA komórek nerwowych.

Doświadczenia prowadzono zarówno w układzie *in vitro* (komórki nerwowe były eksponowane na 25  $\mu$ M benzofenon-3 na szalkach hodowlanych), jak i w układzie *in vivo* (ciężarnym samicom myszy podawano benzofenon-3 w dawce 50 mg/kg). Należy podkreślić, że stężenie/dawka stosowanego w eksperymentach benzofenonu-3 odpowiada jego akumulacji w tkance tłuszczowej człowieka względnie poziomowi, w jakim obecny w kremach z filtrem UV benzofenon-3 oddziałuje na organizm ludzki. W obecnej pracy doktorskiej efekty neurotoksyczne były oceniane na podstawie pomiarów uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i żywotności komórek (barwienie kalceiną AM). Mierzono również powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS) przy użyciu 2',7'- dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF). Apoptozę oceniano w oparciu o pomiary błonowego potencjału mitochondrialnego, aktywności kaspaz (-3, -8) i poziomu specyficznych białek (BCL2, BAX, GSK3 $\beta$ , CASP3), analizy ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy oraz identyfikację fragmentacji jądrowego DNA (barwienie Hoechst'em 33342). Aktywność kaspaz (-8, -9) i kinaz (GSK3 $\beta$ , p38/MAPK) potwierdzano stosując selektywne inhibitory enzymów. W celu weryfikacji udziału poszczególnych receptorów w efektach działania benzofenonu-3 zastosowano selektywne ligandy i specyficzne siRNA. Ekspresję receptorów zmierzono stosując techniki qPCR, western blot oraz ELISA, zaś obecność receptorów w neuronach kory nowej potwierdzano dzięki barwieniom immunofluorescencyjnym i mikroskopii konfokalnej. Proces autofagii określano na podstawie pomiarów ekspresji specyficznych genów, poziomu białek MAP1LC3A i MAP1LC3B oraz formowania autofagosomów, czemu służyły analizy mikromacierzy, testy ELISA i pomiary fluorescencji. Zmiany statusu epigenetycznego komórek określano na podstawie pomiarów metylacji DNA oraz aktywności enzymów takich jak metylotransferaza DNA (DNMT), acetylotransferaza histonowa (HAT) i deacetylaza histonowa (HDAC).

W moich badaniach zawartych w cyklu trzech publikacji wykazałam po raz pierwszy, że benzofenon-3 zastosowany *in vitro* stężeniu, które odpowiada jego akumulacji w tkance tłuszczowej człowieka, wywołuje neurotoksyczność, indukuje procesy apoptotyczne, hamuje autofagię, a także zaburza status epigenetyczny komórek nerwowych myszy tj. obniża poziom globalnej metylacji DNA oraz hamuje aktywność enzymów HAT i HDAC. Efekty indukowane przez benzofenon-3 są uzależnione od rodzaju tkanki nerwowej oraz wieku hodowli *in vitro*. Bardziej wrażliwe na działanie tej substancji są komórki kory nowej niż komórki hipokampa, przy czym najbardziej wyraźne efekty enzymatyczne obserwowano w 7 dniu hodowli *in vitro*. Mechanizm działania benzofenonu-3 w komórkach nerwowych myszy w hodowli pierwotnej *in vitro* polega na upośledzeniu funkcji i ekspresji receptorów ESR1, PPAR $\gamma$ , RXR $\beta$  i RXR $\gamma$  oraz stymulacji ścieżek związanych z receptorami ESR2, GPER1 i RXR $\alpha$ . Zmiany ekspresji białek receptorów po 24-godzinnej ekspozycji na benzofenon-3 są skorelowane ze zmianami ekspresji mRNA *Esr1*, *Esr2*, *Gper1* i *Ppar $\gamma$*  obserwowanymi po 6 i 24 godzinach, jak również ze zmianami ekspresji mRNA *Rxra*, *Rxr $\beta$*  i *Rxr $\gamma$*  obserwowanymi po 3 godzinach. Ponadto, prenatalna ekspozycja na benzofenon-3 zastosowany *in vivo* w dawce, która odpowiada potencjalnemu narażeniu na tę substancję podczas stosowania kremów z filtrem UV, nasila procesy apoptotyczne w komórkach kory nowej mózgu myszy, czemu towarzyszy zaburzenie ekspresji receptorów estrogenowych (ESR1, ESR2 i GPER1) oraz zmiana statusu epigenetycznego komórek nerwowych związana z metylacją genomu.

Reasumując, w moich badaniach zawartych w cyklu trzech publikacji wykazałam po raz pierwszy, że benzofenon-3 użyty w stężeniu lub dawce, która odpowiada jego akumulacji w tkance tłuszczowej człowieka względnie poziomowi, w jakim obecny w kremach z filtrem UV benzofenon-3 oddziałuje na organizm ludzki, indukuje apoptozę, hamuje autofagię, a także zmienia status epigenetyczny embrionalnych komórek nerwowych ssaków. Tym efektom towarzyszą zmiany w ekspresji i zaburzenie funkcji receptorów estrogenowych (ESR1, ESR2, GPER1), receptorów retinoidowych typu X (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ) i receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów typu gamma (PPAR $\gamma$ ). Szczególna wartość przeprowadzonych badań polega na wykazaniu, że komórki nerwowe będące na wczesnych etapach rozwoju są wrażliwe na toksyczne i apoptotyczne działanie benzofenonu-3, co może się przyczynić do wystąpienia zaburzeń ujawniających się w dorosłym układzie nerwowym. Wykonane przeze mnie badania mogą pomóc w opracowaniu zasad profilaktyki ograniczającej narażenie rozwijającego się układu nerwowego na BP-3 względnie strategii terapeutycznych nakierowanych na mechanizmy działania tej substancji w neuronach ssaków.

## STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Benzophenone-3 (BP-3, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, oxybenzone or 2OH-4 MeO-BP) belongs to the group of ultraviolet (UV) chemical filters (called colloquially as 'sunscreens') used to protect against ultraviolet light by absorbing UVB and UVA radiations. Benzophenone-3 is not only a sunscreen cream agent, but also an ingredient in daily used cosmetics i.e. makeup products, bath liquids, hair shampoos, perfumes, etc., as well as a component of plastics, textiles, paints, inks and lacquers, mainly for protection from sun-induced fragility.

The worldwide production and usage of benzophenone-3 is enormous. Only European production reaches 100–1000 metric tons per year and shows an upward trend in response to the increasing demand of the industry. In 2017, the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) demonstrated that exposure to benzophenone-3 concerns practically the whole society. Human exposure to benzophenone-3 occurs directly through the skin, as well as indirectly, i.e. through the digestive or respiratory systems. Since benzophenone-3 is highly lipophilic, its bioaccumulation mainly occurs in fat tissue (~ 5 mg BP-3/kg in human adipose tissue). Particularly sensitive to the harmful effects of BP-3 can be the brain which consists of at least 60% of adipose tissue.

Prenatal and postnatal exposure to benzophenone-3 seems to be undeniable. Current data provide evidence that benzophenone-3 easily crosses through the placental barrier since it has been observed in amniotic fluid, placental tissue, cord blood and fetal blood in research studies with human participants. Even after birth, newborns and infants are exposed to benzophenone-3, since this chemical has been identified in human breast milk samples. Additionally, prenatal benzophenone-3 exposure has been linked to improper migration of enteric neural crest cells during embryogenesis, resulting in Hirschsprung's disease in offspring. Furthermore, the blood-brain barrier (BBB) does not seem to be an obstacle for benzophenone-3 either, since accumulated benzophenone-3 has been demonstrated in *post mortem* adult brains.

**Despite the widespread usage of benzophenone-3, there are only a few data indicating the harmful effect of this compound on human and animal organisms. Most of these reports concern the reproductive system. Therefore, the knowledge about the effects of benzophenone-3 on the nervous system, especially at the early stages of development, is negligible.**

Considering the above data, the aim of my dissertation is to identify toxic and apoptotic effects and mechanisms of benzophenone-3 actions in mouse neuronal cells, with particular emphasis on the impact of benzophenone-3 on the function and expression of estrogen receptors (ESR1, ESR2 and GPER1), retinoid X receptors (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  and RXR $\gamma$ ) and the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), as well as on the autophagy process and epigenetic status of the neuronal cells. The aim of the present study is also to examine the effects of prenatal exposure to benzophenone-3 on apoptosis, expression of estrogen receptors and the level of DNA methylation of the neuronal cells.

The experiments were carried out both in the *in vitro* (the neuronal cells were treated with 25  $\mu$ M benzophenone-3 on culture dishes) and *in vivo* systems (pregnant mice were administered benzophenone-3 at a dose of 50 mg/kg). It should be emphasized that the concentration/dose of benzophenone-3 used in the experiments corresponded to benzophenone-3 accumulation in human fat tissue or its amount in sunscreen cream used during single application for whole body. In the present dissertation, neurotoxic effects were assessed via the measurements of lactate dehydrogenase (LDH) release and cell viability (calcein AM staining). The formation of reactive oxygen species (ROS) was measured using the 2',7'- dichlorofluorescein. Apoptosis was determined based on the assessments of membrane mitochondrial potential, caspase activities (-3, -8), expression levels of specific proteins (BCL2, BAX, GSK3 $\beta$ , CASP3) as well as gene expression analyses using microarrays and identification of nuclear DNA fragmentation with the use of Hoechst 33342 staining. The activities of caspases (-8, -9) and kinases (GSK3 $\beta$ , p38 / MAPK) were confirmed by selective enzyme inhibitors. To verify the contribution of individual receptors in the effects of benzophenone-3, selective ligands and specific siRNAs were used. Expression levels of the receptors were measured using the qPCR, western blot and ELISA. Cellular distribution of the receptors was confirmed by immunofluorescence staining and a confocal microscopy. The autophagy process was determined based on expression levels of autophagy-related genes and specific proteins (MAP1LC3A and MAP1LC3B), as well as autophagosome formation that was obtained via microarray analyses, ELISA and fluorescence measurements. Benzophenone-3 induced epigenetic modifications were determined by assessment of global and gene-specific DNA methylation and the measurements of DNA methyltransferase (DNMT), histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) activities.

The results of the present study which were published in 3 original papers showed for the first time that benzophenone-3 *in vitro*, used at concentration that corresponds to its accumulation

in human adipose tissue, induces neurotoxic and apoptotic processes, inhibits autophagy, and disrupts the epigenetic status of mouse neuronal cells, i.e., it reduces the level of global DNA methylation and inhibits the activities of HAT and HDAC. Benzophenone-3 induced effects depend on type of neuronal tissue and the age of the cells in *in vitro* culture. The neocortical cells are more vulnerable to benzophenone-3 action than the hippocampal cells; most pronounced enzymatic effects were observed at 7 day *in vitro*.

The mechanism of action of benzophenone-3 in mouse neuronal cells in primary *in vitro* culture is mediated by the impairment of the function and expression of the ESR1, PPAR $\gamma$ , RXR $\beta$  and RXR $\gamma$  receptors and stimulation of pathways associated with the ESR2, GPER1 and RXR $\alpha$  receptors. Changes in receptor protein expression after 24 hours exposure to benzophenone-3 are correlated with changes in *Esr1*, *Esr2*, *Gper1* and *Ppar $\gamma$*  mRNA expression observed after 6 and 24 hours, as well as changes in *Rxra*, *Rxr $\beta$*  and *Rxr $\gamma$*  mRNA expression observed after 3 hours. Moreover, prenatal exposure to benzophenone-3 intensifies apoptotic processes in the neocortical cells, which is accompanied by the disruption of estrogen receptors expression (ESR1, ESR2 and GPER1) and changes in the epigenetic status of neuronal cells associated with genome DNA methylation.

In summary, my studies provided in a series of 3 publications shows for the first time that benzophenone-3 (used at environmentally relevant concentration/dose) induces apoptosis, inhibits autophagy, and also changes the epigenetic status of mammalian embryonic neuronal cells. These effects are accompanied by disruption of expression and function of estrogen receptors (ESR1, ESR2, GPER1), retinoid X receptors (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ) and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). The special value of this research is to provide an evidence that neuronal cells at early stages of development are sensitive to the toxic and apoptotic effects of benzophenone-3, which may be involved in the etiology of adult nervous system disorders. This research may contribute to the development of prevention principles limiting the exposure of the developing nervous system to benzophenone-3 and/or therapeutic strategies targeting the mechanisms of benzophenone-3 action in mammalian neurons.