

Żaneta Broniowska

Niektóre aspekty toksycznego działania pochodnej benzofenonu (BP-2)

Streszczenie

W niniejszej pracy przedmiotem badań był chemiczny filtr UV, 2,2',4,4'-tetrahydroksybenzofenon, zwany również benzofenonem-2. Badany związek podobnie jak cała grupa pochodnych benzofenonu należy do związków hormonalnie czynnych (Endocrine Disruptor Chemicals; EDC). Zwiększające się narażenie człowieka na te związki, może być związane z upośledzeniem niektórych funkcji organizmu. Właściwości lipofilowe, zdolność do kumulacji w organizmie oraz fakt, że filtry UV stosowane są na dużą powierzchnię ciała i często przez cały okres życia powoduje, że związki te mogą wywoływać niekorzystne efekty nie tylko na obwodzie, ale także mogą osłabiać przeżywalność komórek mózgu. Dotychczas efekty działania BP-2 są bardzo słabo zbadane, a wpływ tego związku na komórki mózgu, aktywność układu immunologicznego czy parametry hematologiczne w warunkach *in vivo* nie był w ogóle przedmiotem badań.

Głównym celem podjętych badań było określenie zdolności BP-2 do przechodzenia przez barierę krew-mózg i jego wpływu na przeżywalność komórek nerwowych. We wstępnych badaniach *in vitro* określono potencjalne, cytotoksyczne i pro-apoptotyczne działania BP-2 w linii komórkowej ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y. Po 72-godzinnym narażeniu komórek na działanie benzofenonu-2 określono żywotność (test redukcji MTT), poziom uwalnianej dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do pożywki (marker nekrozy) oraz aktywność kapsazy-3 (marker apoptozy) wraz z oceną procesu apoptozy z zastosowaniem barwienia Hoescht. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki świadczą o nekrotycznym działaniu benzofenonu-2 w wysokich, u człowieka praktycznie nieosiągalnych stężeniach, natomiast w niższych stężeniach, związek ten wykazał działanie proapoptotyczne.

Ze względu na ograniczenia metody *in vitro*, przeprowadzono badania na modelu zwierzęcym, w którym BP-2 podawany był na skórę (główna droga narażenia na ten związek u ludzi) dorosłym samcom szczurów Wistar przez okres 4 tygodni. W badaniach *ex vivo*, oznaczano poziom tego związku w strukturach mózgu oraz wybranych tkankach obwodowych. W celu określenia wpływu benzofenonu-2 na wybrane układy organizmu oznaczono stężenie

wolnej frakcji oraz frakcji całkowitej (związek macierzysty oraz jego metabolity: glukuronian i siarczan) metodą LC/MS. Wykazano, że badany związek wchłania się przez skórę do krążenia ogólnego, uzyskując w surowicy krwi wysokie stężenia. Zgodnie z przewidywaniami w wątrobie oraz tkance tłuszczowej stężenie badanego związku było znacznie wyższe niż w surowicy. W przeciwieństwie do tkanek obwodowych w strukturach mózgu stężenie benzofenonu-2 było niskie, co może wynikać z obecności czterech grup hydroksylowych w cząsteczce tego związku, zwiększających jego właściwości hydrofilowe oraz osłabiających przechodzenie przez barierę krew-mózg.

Celem określenia potencjalnego, neurodegeneracyjnego działania BP-2 w najbardziej wrażliwych na uszkodzenia strukturach mózgu, to znaczy hipokampie i korze czołowej, oceniono wpływ tego związku na markery stresu oksydacyjnego (ROS, całkowita aktywność antyoksydacyjna, peroksydacja lipidów) oraz procesu apoptozy (poziomy formy aktywnej kaspazy-3 oraz głównych białek regulujących proces apoptozy - Bax i Bcl), czyli procesów leżących u podstaw chorób neurodegeneracyjnych. W modelu zwierzęcym BP-2 nie nasilał procesu apoptozy w hipokampie i korze czołowej, natomiast w korze czołowej zwiększał całkowitą zdolność antyoksydacyjną, obniżał poziom ROS oraz proces peroksydacji lipidów. Korzystne działanie BP-2 w korze czołowej jest prawdopodobnie związane z aktywacją endogennych mechanizmów antyoksydacyjnych. Nie można jednak wykluczyć, że wzrost stężenia lub czasu ekspozycji może spowodować niewydolność mechanizmów kompensacyjnych i doprowadzić do inicjacji apoptozy.

BP-2, jako związek zaburzający funkcje endokrynne może także wpływać na powiązany z układem hormonalnym układ immunologiczny, dlatego kolejnym celem naszych badań było określenie wpływu tego związku na wybrane funkcje układu immunologicznego. Określono wpływ BP-2 na masę całkowitą i względną oraz komórkowość pierwotnego (grasicy) oraz wtórnego (śledziony) narządu limfatycznego. Oceniono funkcje splenocytów (aktywność proliferacyjną podstawową i stymulowaną mitogenami – konkanawaliną A oraz LPS), aktywność metaboliczną (test rezasuryny), efekty cytotoksyczne (uwalnianie LDH) oraz produkcję tlenku azotu. Funkcję tymocytów określono poprzez pomiar aktywności metabolicznej, żywotności oraz zdolności do uwalniania tlenku azotu. Przeprowadzone badania wykazały, że BP-2 nie wpływa na masę grasicy i śledziony oraz nie działa cytotoksycznie na badane narządy limfatyczne. Narażenie na BP-2 nasiliło immunoreaktywność zwiększając aktywność proliferacyjną splenocytów oraz aktywność metaboliczną, żywotność i zdolność do produkcji tlenku azotu zarówno przez splenocyty jak i tymocyty. Obserwowany stymulacyjny,

pozornie korzystny efekt BP-2 na układ immunologiczny wymaga jednak dalszych badań, ponieważ takie działanie może również zwiększać ryzyko rozwoju chorób alergicznych lub chorób autoimmunizacyjnych.

Ponieważ wcześniejsze dane literaturowe wykazały, że BP-2 zaburza działanie hormonów płciowych i wpływa na syntezę hormonów tarczycy, dlatego w zastosowanym modelu oceniono wpływ BP-2 na poziom hormonów tarczycy i hormonów płciowych we krwi oraz ekspresję receptorów estrogenowych ($ER\alpha$, $ER\beta$, GPR-30), androgenowych (AR) i progesteronowych (PR) w podwzgórzu metodą RT-PCR oraz Western Blot. W przeciwieństwie do wcześniejszych, nielicznych danych BP-2 nie obniżył poziomu hormonów tarczycy lecz wywołał nadczynność tarczycy, zwiększając poziomy FT3 i FT4 a obniżając stężenie TSH we krwi.

Określając stężenie hormonów płciowych, wykazano znaczne obniżenie poziomu testosteronu, a zwiększenie stężenia 17β -estradiolu we krwi. Obniżony poziom testosteronu we krwi, frakcji całkowitej oraz czynnej biologicznie frakcji wolnej, któremu towarzyszył zwiększony poziom 17β -estradiolu oraz obniżony poziom LH, sugeruje dysfunkcje na poziomie przysadki i/lub podwzgórza a także możliwość zbyt silnego działania 17β -estradiolu na mechanizm sprzężenia zwrotnego regulującego aktywność osi podwzgórze-przysadka mózgowa - jądra.

Narażenie na związki hormonalnie czynne, w coraz większym stężeniu występujące obecnie w środowisku, uważane jest za istotną przyczynę obniżającej się płodności mężczyzn. Celem określenia wpływu BP-2 na funkcję jąder określano liczbę, ruchliwość i morfologię plemników oraz ekspresję receptorów hormonów płciowych w jądrach. Podobnie jak we krwi poziom testosteronu w jądrach był obniżony, co mogło mieć wpływ na parametry nasienia, bowiem wykazano, że badany związek obniżał liczbę i ruchliwość plemników a zwiększał liczbę plemników wykazujących zmiany morfologiczne.

Przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały działanie benzofenonu-2 na ośrodkowy układ nerwowy, układ immunologiczny oraz morfologię krwi (brak zmian) a także potwierdziły niekorzystny wpływ tego związku na funkcję jąder. W przeciwieństwie do badań *in vitro* badania *in vivo* nie wykazały neurotoksycznego działania BP-2 u zwierząt dorosłych. Jednak ponieważ BP-2 przechodzi przez barierę krew-mózg, nie można wykluczyć takiego działania przy dłuższym narażeniu a zwłaszcza narażeniu w okresie prenatalnym czy wczesno postnatalnym, ponieważ w tym okresie komórki układu nerwowego są najbardziej podatne na

uszkodzenia. Także określenie konsekwencji aktywacji układu immunologicznego przez badany związek wymaga dalszych badań, a zwłaszcza wykluczenia możliwości nasilania reakcji alergicznych czy autoimmunizacyjnych. Ponieważ wykazano jednoznacznie niekorzystne działanie benzofenonu-2 na syntezę hormonów płciowych i proces spermatogenezy, dlatego określenie dokładnego mechanizmu tego efektu, mogłoby się przyczynić do wprowadzenia ograniczeń w stosowaniu benzofenonów.

Żaneta Broniowska,

Some aspects of toxic effects of benzophenone derivative (BP-2)

Abstract

In this study, the subject of research was a chemical UV filter, 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenon, also called benzophenone-2. The test compound, like the whole group of benzophenone derivatives, belongs to the hormonally active compounds (Endocrine Disruptor Chemicals; EDC). Increasing human exposure to these compounds may be associated with an impairment of some functions of the organism. Lipophilic qualities, the ability to accumulate in the organism and the fact that UV filters are applied to a large area of body and often throughout the entire life cycle may lead to adverse effects of BP-2 not only on the periphery, but also on the brain by weakening the survival of neuronal cells. To date, the effects of BP-2 are very poorly studied, and the effect of this compound on brain cells, immune system activity and hematological parameters *in vivo* has not been studied at all.

The main goal of the study was to determine the ability of BP-2 to cross the blood-brain barrier and its effect on the survival of nerve cells. Initial *in vitro* studies identified the potential cytotoxic and pro-apoptotic effects of BP-2 on the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. After 72-hour exposure of cells to benzophenone-2, viability (MTT reduction test), level of lactate dehydrogenase (LDH) released into the medium (necrosis marker) and capase-3 activity (apoptosis marker) were determined along with an assessment of the process of apoptosis using Hoescht staining. The results presented in this paper prove the necrotic effect of benzophenone-2 in high, practically unattainable concentrations in humans, while in lower concentrations this compound showed proapoptotic effects.

Due to the limitations of the *in vitro* method, studies were conducted in an animal model in which BP-2 was administered dermally (the main route of exposure to this compound in humans) to adult male Wistar rats for a period of 4 weeks. In *ex vivo* studies, the level of this compound was determined in brain structures and selected peripheral tissues. To determine the effect of benzophenone-2 on selected body systems, the concentration of free fraction and total fraction (parent compound and its metabolites: glucuronide and sulfate) was determined by LC/MS. It has been shown that the test compound is absorbed through the skin into the general

circulation, obtaining high concentrations in the blood serum. As expected, the concentration of test compound in the liver and adipose tissue was significantly higher than in serum. In contrast to peripheral tissues in the brain structures, benzophenone-2 concentration was low, which may be due to the presence of four hydroxyl groups in the molecule of this compound, increasing its hydrophilic properties and weakening the passage through the blood-brain barrier.

The potential neurodegenerative activity of BP-2 was determined in the most vulnerable brain structures, i.e. the hippocampus and frontal cortex. The effect of BP-2 on the selected brain structures was assessed by estimation of oxidative stress markers (ROS, total antioxidant activity, lipid peroxidation) and the process of apoptosis proteins (levels of active caspase-3 and the major proteins of apoptosis regulation – Bax and Bcl), i.e. the processes involved in neurodegenerative diseases development. In the animal model of BP-2 exposure the tested compound did not intensify the process of apoptosis in the hippocampus and frontal cortex, while in the frontal cortex it increased total antioxidant capacity, decreased ROS levels and lipid peroxidation. The beneficial effect of BP-2 in the frontal cortex is probably associated with the activation of endogenous antioxidant mechanisms. However, it cannot be excluded that an increase in concentration or time of exposure may cause failure of compensatory mechanisms and lead to the initiation of apoptosis.

BP-2, as an endocrine disrupting compound, can also affect the endocrine-related immune system, thus the next goal was to determine the effect of this compound on selected immune functions. The effect of BP-2 on total and relative mass and cellularity of the primary (thymus) and secondary (spleen) lymphoid organ were determined. The function of splenocytes (basal and proliferative response to mitogen stimulation – concanavalin A and LPS, metabolic activity (resazurin reduction assay), cytotoxic effects (LDH release) and nitric oxide production) were assessed. Thymocytes functions was determined by measuring metabolic activity, viability and the ability to release nitric oxide. The study showed that BP-2 does not affect the mass of the thymus and spleen and does not have cytotoxic effect on the examined lymphatic organs. Exposure to BP-2 stimulated the immunoreactivity by increasing the proliferative activity of splenocytes and metabolic activity, viability and the ability to release nitric oxide by both splenocytes and thymocytes. The observed stimulating, seemingly beneficial, effect of BP-2 on the immune system, requires further research, because such action may also increase the risk of allergic or autoimmune diseases development.

Because previous literature data showed that BP-2 interferes with the effects of sex hormones and affects the synthesis of thyroid hormones, therefore, the study was performed to

assess the effects of BP-2 on the level of thyroid hormones and sex hormones in the blood and the expression of estrogen receptors (ER α , ER β , GPR- 30), androgenic receptor (AR) and progesterone receptor (PR) in the hypothalamus by RT-PCR and Western blot. Unlike previous limited data, BP-2 did not lower thyroid hormone levels but caused hyperthyroidism, increasing fT3 and fT4 levels and lowering TSH blood levels.

By determining the concentration of sex hormones, a significant decrease in testosterone levels and an increase in blood levels of 17 β -estradiol were demonstrated. Reduced levels of testosterone in the blood, total fraction and biologically active free fraction, which was accompanied by increased levels of 17 β -estradiol and reduced levels of LH, suggests dysfunctions at the level of the pituitary and/or hypothalamus as well as the possibility of too strong action of 17 β -estradiol on the mechanism of feedback regulating activity hypothalamus-pituitary gland-testicles.

Exposure to hormonally active compounds, which concentrations increase in the environment overtime, is considered to be a significant cause of male fertility impairment. To determine the effect of BP-2 on testicular function, the number, motility and morphology of sperm as well as expression of sex hormone receptors in the testes were determined. Similarly to the results obtained from the blood samples, testosterone levels in the testes were lowered, which could affect sperm parameters, as it was shown that the test compound reduced the number and motility of sperm and increased the number of sperm showing morphological changes.

Results obtained in this study show for the first time the effect of benzophenone-2 on the central nervous system, the immune system and blood count (no change) and confirmed the adverse effect of this compound on testicular function. In contrast to *in vitro* studies, *in vivo* studies did not show BP-2 neurotoxic activity in adult animals. However, because BP-2 crosses the blood-brain barrier, this effect cannot be excluded with prolonged exposure, especially prenatal or early postnatal exposure, because during this period the cells of the nervous system are most susceptible to damage. Also, the consequences of the activation of the immune system by the test compound require further research, in particular the possible intensification of allergic or autoimmune reactions by this compound. Since, BP-2 has clearly been shown to have adverse effects on the synthesis of sex hormones and the process of spermatogenesis, therefore determining the exact mechanism of this effect could contribute to the introduction of restrictions on the use of benzophenones.