

*Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum*

*Żaneta Broniowska*

Niektóre aspekty toksycznego działania  
pochodnej benzofenonu (BP-2)

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Prof. dr hab. Bogusława Budziszewska

Kraków, 2020

Badania były finansowane z grantu badawczego  
(UMO-2016/21/N/NZ7/03284) z Narodowego Centrum Nauki  
w Krakowie oraz z badań statutowych z Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Collegium Medicum.



**Pani Profesor Bogusławie Budziszewskiej**

składam serdeczne podziękowania za ogromną cierpliwość, wsparcie merytoryczne oraz bezcenną pomoc udzieloną w trakcie pisania niniejszej pracy.

Pracownikom i doktorantom Katedry Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego dziękuję za znakomitą współpracę w przyjaznej atmosferze.

<b>1. Wstęp</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Szkodliwość promieniowania ultrafioletowego</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 Wpływ promieniowania UV na prawidłowe funkcjonowanie organizmu</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Niewłaściwe korzystanie lub nadmiar promieniowania UV.....	10
1.2.2 Fotostarzenie się skóry.....	11
1.2.3 Zmiany nowotworowe .....	11
1.2.4 Fotoprotekcja .....	12
1.2.4.1 Naturalna ochrona skóry .....	12
1.2.4.2 Filtry UV .....	13
1.2.4.2.1 Filtry fizyczne (mineralne) .....	13
1.2.4.2.2 Filtry chemiczne .....	14
<b>1.3 Narażenie człowieka na działanie benzofenonu-2</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 Wpływ benzofenonu-2 na funkcje układu endokrynologicznego</b> .....	<b>19</b>
1.4.1 Receptory estrogenowe– badania in vitro.....	19
1.4.2 Działanie estrogenne pochodnych benzofenonu w badaniach in vivo .....	22
1.4.3 Receptory androgenowe.....	23
1.4.4 Receptory progesteronowe (PR) .....	24
<b>1.5 Wpływ pochodnych benzofenonu na układ rozrodczy</b> .....	<b>25</b>
<b>1.6 Wpływ BP-2 na poziom hormonów tarczycy</b> .....	<b>27</b>
<b>1.7 Działanie benzofenonów na komórki centralnego systemu nerwowego</b> .....	<b>29</b>
<b>2. Cel pracy</b> .....	<b>35</b>
<b>3. Metodyka</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1 Materiały i odczynniki</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2 Badania in vitro</b> .....	<b>36</b>
3.2.1 Hodowla komórek ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y).....	37
3.2.2 Badanie wpływu benzofenonu-2 na żywotność neuronów .....	37
3.2.3 Badanie cytotoksycznego działania benzofenonu-2 .....	38
3.2.4 Oznaczenie aktywności kaspazy-3 .....	38
3.2.5 Barwienie Hoechst .....	39
<b>3.3 Badania ex-vivo</b> .....	<b>39</b>

3.3.1 Zwierzęta.....	39
3.3.1.1 Schemat podawania.....	40
3.3.2 Oznaczenia hematologiczne.....	40
3.3.3 Oznaczenie poziomu BP-2 – Analiza LC / MS .....	41
3.3.3.1 Odczynniki .....	41
3.3.3.2 Przygotowanie próbek .....	41
3.3.3.3 Analiza metodą chromatografii cieczowej / spektrometrii mas .....	41
3.3.4 Oznaczenie poziomu hormonów we krwi i testosteronu całkowitego w jądrach ....	43
3.3.4.1 Przygotowanie tkanek do oznaczeń .....	43
3.3.4.2 Metoda ELISA kompetycyjna.....	44
3.3.4.2.1 Oznaczenie poziomu testosteronu w surowicy.....	46
3.3.4.2.2 Oznaczenie poziomu testosteronu – frakcji wolnej.....	46
3.3.4.2.3 Oznaczenie poziomu progesteronu w osoczu.....	46
3.3.4.2.4 Poziom prolaktyny w osoczu krwi .....	46
3.3.4.2.5 Poziom hormonu luteinizującego (LH) .....	47
3.3.4.2.6 Oznaczenie 17 $\beta$ -estradiolu .....	47
3.3.4.2.7 Stężenia fT3 i fT4 w osoczu .....	47
3.3.4.3 Metoda bezpośrednia ELISA .....	48
3.3.4.3.1 Stężenie tyreotropiny (TSH) w osoczu.....	48
3.3.5 Wpływ BP-2 na układ immunologiczny.....	48
3.3.5.1 Hodowla splenocytów i tymocytów .....	48
3.3.5.2 Oznaczanie aktywności proliferacyjnej splenocytów .....	49
3.3.5.3 Test redukcji MTT .....	49
3.3.5.4 Aktywność metaboliczna splenocytów i tymocytów .....	50
3.3.5.5 Uwalnianie tlenku azotu (NO) z tymocytów i splenocytów .....	50
3.3.5.6 Oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej .....	50
3.3.6 Określenie wpływu BP-2 na markery stresu oksydacyjnego i procesu apoptozy w strukturach mózgu.....	51
3.3.6.1 Markery stresu oksydacyjnego w korze czołowej i hipokampie.....	51
3.3.6.1.1 Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS).....	51
3.3.6.1.2 Całkowita aktywność antyoksydacyjna (TAC) .....	51
3.3.6.1.3 Poziom peroksydacji lipidów (MDA) .....	52
3.3.6.2 Markery apoptozy oznaczane metodą Western Blot.....	53
3.3.6.2.1 Przygotowanie próbek .....	53

3.3.6.2.2	Analiza ekspresji białek metodą Western Blot.....	53
3.3.6.2.3	Standaryzacja.....	54
3.3.6.2.4	Stężenie białka.....	54
3.3.7	Wpływ benzofenonu-2 na ekspresję receptorów hormonów płciowych.....	55
3.3.7.1	Metoda Western Blot .....	55
3.3.7.1.1	Przygotowanie próbek podwzgórza i jądra .....	55
3.3.7.1.2	Analiza ekspresji białek oraz standaryzacja procesu.....	56
3.3.7.2	Analiza RT-qPCR .....	56
3.3.7.2.1	Homogenizacja i izolacja RNA .....	56
3.3.7.2.2	Oznaczenie stężenia RNA .....	57
3.3.7.2.3	Odwrotna transkrypcja .....	57
3.3.7.2.4	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) .....	57
3.3.8	Określenie wpływu BP-2 na funkcję jąder .....	58
3.3.8.1	Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS).....	58
3.3.8.2	Analiza nasienia .....	58
3.3.8.3	Liczba plemników .....	58
3.3.8.4	Żywotność plemników - test eozynowy .....	59
3.3.8.5	Morfologia plemników .....	59
<b>3.4</b>	<b>Analiza statystyczna .....</b>	<b>60</b>
<b>4.</b>	<b>Wyniki .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Wyniki badań in vitro .....</b>	<b>61</b>
4.1.1	Określenie działania cytotoksycznego i pro-apoptycznego benzofenonu-2 w komórkach SH-SY5Y .....	61
4.1.2	Wpływ BP-2 na żywotność komórek SH-SY5Y .....	62
4.1.3	Wpływ BP-2 na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH).....	63
4.1.4	Wpływ BP-2 na aktywność kaspazy-3 .....	64
4.1.5	Barwienie Hoechst .....	65
<b>4.2</b>	<b>Wyniki badań ex-vivo.....</b>	<b>67</b>
4.2.1	Stężenie benzofenonu-2 w wybranych strukturach OUN oznaczane metodą LC/MS .....	67
4.2.1.1	Stężenie benzofenonu-2 w tkankach obwodowych .....	67
4.2.2	Wpływ BP-2 na układ hormonalny.....	69

4.2.2.1 Wpływ benzofenonu-2 na wydzielanie hormonów tarczycy .....	69
4.2.2.2 Poziom testosteronu całkowitego we krwi i jądrach .....	71
4.2.2.3 Poziom frakcji wolnej testosteronu .....	72
4.2.2.4 Poziom 17 $\beta$ -estradiolu oraz progesteronu we krwi .....	72
4.2.2.5 Wpływ BP-2 na poziom prolaktyny oraz hormonu luteinizującego (LH) .....	73
4.2.3 Wpływ benzofenonu-2 na układ immunologiczny .....	74
4.2.3.1 Wpływ BP-2 na aktywność proliferacyjną splenocytów .....	75
4.2.3.2 Wpływ BP-2 na aktywność metaboliczną splenocytów .....	75
4.2.3.3 Aktywność metaboliczna tymocytów .....	77
4.2.4 Wpływ BP-2 na markery uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego.....	78
4.2.4.1 Markery stresu oksydacyjnego.....	78
4.2.4.1.1 Reaktywne formy tlenu – ROS (reactive oxygen species).....	78
4.2.4.1.2 Całkowita aktywność antyoksydacyjna.....	79
4.2.4.1.3 Poziom peroksydacji lipidów (MDA) .....	80
4.2.4.2 Wpływ BP-2 na markery procesu apoptozy w OUN .....	81
4.2.5 Wpływ BP-2 na komórki rozrodcze męskie .....	81
4.2.5.1 Zmiany zachodzące w jądrach pod wpływem działania benzofenonu-2 .....	81
4.2.5.1.1 Poziom reaktywnych form tlenu w jądrach .....	82
4.2.5.1.2 Zmiany morfologiczne plemników .....	82
4.2.5.1.3 Żywotność plemników – test eozynowy .....	83
4.2.5.1.4 Wpływ BP-2 na liczbę plemników .....	83
4.2.5.1.5 Ruchliwość plemników .....	83
4.2.5.2 Wpływ benzofenonu-2 na receptory estrogenowe: ER $\alpha$ i ER $\beta$ , GPR30, receptory progesteronowe oraz androgenowe w jądrach i podwzgórzu .....	84
4.2.6.2.1 Zmiany oznaczone metodą RT-PCR .....	84
4.2.5.2.2 Ekspresja receptorów estrogenowych $\alpha$ i $\beta$ , GPR30, androgenowych i progesteronowych oznaczona metodą Western Blot.....	86
4.2.6 Badania hematologiczne .....	89
<b>5. Dyskusja wyników.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1 Wpływ BP-2 na żywotność komórek nerwowych.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2 Wpływ BP-2 na funkcję tarczycy .....</b>	<b>95</b>
<b>5.3 Wpływ BP-2 na funkcję jąder i poziom hormonów płciowych .....</b>	<b>97</b>

5.4 Wpływ BP-2 na układ immunologiczny .....	99
5.5 Wpływ BP-2 na parametry hematologiczne.....	101
6. Podsumowanie .....	103
7. Wnioski.....	106
8. Streszczenie.....	108
9. Abstract.....	111
10. Referencje .....	114
11. Wykaz skrótów .....	132
12. Spis Tabel i Rycin.....	136
12.1 Spis Tabel: .....	136
12.2 Spis Rycin .....	136
13. Spis publikacji zawierających wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej .....	139



# 1. Wstęp

## 1.1 Szkodliwość promieniowania ultrafioletowego

Promieniowanie ultrafioletowe (UVR) jest to promieniowanie elektromagnetyczne o różnej długości fali, mieszczące się w zakresie od 100 do 400 nm, niewidoczne dla człowieka. UVR zostało odkryte niezależnie od siebie przez dwóch naukowców: Johann, Wilhelm Ritter'a oraz William, Hyde Wollaston'a. Nazwa UV pochodzi od nazw łacińskich oznaczających: *ultra* – ponad, poza oraz *fiolet* oznaczający barwę fali o najmniejszej długości w świetle widzialnym.

Głównym, naturalnym źródłem promieniowania UV jest słońce, które stanowi ok. 7% energii emitowanej w widmie promieniowania słonecznego docierającego do ziemi. Promieniowanie słoneczne będące niezbędne dla prawidłowego rozwoju organizmów żywych, wywiera także wiele działań niepożądanych. Ze względu na skutki oddziaływania na organizmy żywe promieniowanie ultrafioletowe dzielimy na:

- UV-A : 315 - 380 nm
- UV-B : 280 - 315 nm
- UV-C : 100 – 280 nm

Promieniowania UVC oraz UVB są prawie całkowicie pochłaniane przez warstwę ozonową ziemi. W wyniku pojawienia się dziury ozonowej do powierzchni Ziemi przenika promieniowanie UVC, jednak nie powoduje znaczących działań niepożądanych na organizm człowieka (Zalewska i wsp., 2012). Do powierzchni Ziemi dociera zaledwie 1-4% promieniowania UVB oraz 96 - 99% promieniowania UVA (Ata i wsp., 2013; Pościk i wsp., 2009).

Do sztucznych źródeł promieniowania UV zaliczamy różnego rodzaju lampy (rtęciowe, ksenonowe, metalohalogenowe, świetlówki) stosowane w urządzeniach takich jak: lampy na owady, lampy dezynfekujące, czy lampy utwardzające lakiery do paznokci, a także w różnych gałęziach przemysłu (np. poligrafia). Ze względu na obowiązujący trend oraz popularność istotnym narażeniem na działanie promieniowania UVA stały się urządzenia opalające – solaria. Urządzenia te posiadają źródła promieniowania UVA oraz UVB (Raport z 2010; Ebisz i wsp., 2015).

Narażenie człowieka zarówno na działanie naturalnych jak i sztucznych źródeł promieniowania UV może prowadzić do rozwoju chorób skóry, w tym nowotworów złośliwych. Najczęstszym błędem ludzi jest zbyt długi czas ekspozycji oraz zbyt częste narażenie bez właściwej ochrony skóry, skutkiem czego dochodzi do powstania ostrych lub przewlekłych zmian zapalnych, a także do zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworów skóry.

## **1.2 Wpływ promieniowania UV na prawidłowe funkcjonowanie organizmu**

Promienie słoneczne, a zatem promieniowanie UV jest konieczne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Główną rolę pełni w aktywacji syntezy witaminy D<sub>3</sub>, która jest ważna nie tylko w zapobieganiu krzywicy u dzieci, osteoporozy u osób dorosłych poprzez regulację gospodarki wapniowo-fosforanowej, ale także w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego. Zwiększenie wydzielania melatoniny pod wpływem UVR prowadzi do zwiększenia wydolności psychoruchowej poprzez wzrost stężenia tlenu w tkankach. Pozytywne skutki działania promieniowania UV wykorzystywane są w dermatologii ze szczególnym uwzględnieniem leczenia atopowego zapalenia skóry (AZS), łojotoku oraz łuszczycy (Peterson i wsp., 2004; Stanisławski, 2009; Ebisz i wsp., 2015).

### **1.2.1 Niewłaściwe korzystanie lub nadmiar promieniowania UV**

Promieniowanie UV oddziałuje głównie na skórę, a zmiany zachodzące w jej strukturze zależą w znacznej mierze od czasu ekspozycji oraz częstotliwości narażenia. Promieniowanie UVC, które charakteryzuje się największą energią, powoduje silny rumień skóry oraz uszkodzenia DNA. Należy zaznaczyć, że zmiany te dotyczą wyłącznie naskórka. W przeciwieństwie do UVC, promieniowanie UVB wpływa nie tylko na naskórek, ale także na skórę właściwą powodując oparzenia i rumień skóry. Dodatkowo uszkadza wiązania pomiędzy zasadami pirymidynowymi powodując powstanie dimerów cyklobutanu zaburzając proces elongacji transkrypcji (Borkowska i wsp., 2013). Oprócz właściwości mutagennych zaburza również działanie komórek Langerhansa będących elementem układu immunologicznego (Ebisz i wsp., 2015). Najgłębiej penetrującym promieniowaniem jest UVA, gdyż jego skutki są widoczne nie tylko w naskórku, skórze właściwej, ale także w tkance podskórnej. Promieniowanie UVA oprócz wpływu na komórki rozrodcze keranocytów i melanocytów, oddziałuje na komórki rozrodcze naskórka różnicujące się w kierunku macierzy włosa (Ata i wsp., 2013). Efektem narażenia mogą być reakcje fotoalergiczne oraz fototoksyczne, wytwarzanie wolnych rodników, teleangiektazje, uszkodzenia białek strukturalnych oraz DNA (Zalewska i wsp., 2012; Ebisz i wsp., 2015). W wyniku oddziaływania UVA na skórę dochodzi

do nadmiernego powstawania reaktywnych form tlenu (ROS), a w konsekwencji zwiększenia uszkodzeń DNA oraz inicjacji procesu kancerogenezy (Ebisz i wsp., 2015; Gibka, 2010). Powstawanie nowotworów skóry jest indukowane przez powtarzającą się, nadmierną ekspozycję na UVR, powodując mutacje genu p53 lub innych genów kodujących antyjonkogeny (Brash i wsp., 2006; Ebisz i wsp., 2015).

### **1.2.2 Fotostarzenie się skóry**

Fotostarzenie skóry może być spowodowane czynnikami endogennymi lub egzogennymi. Do czynników egzogennych zalicza się zanieczyszczenie powietrza, w tym dymem tytoniowym, klimat oraz promieniowanie UV. Proces ten charakteryzuje się zmianami dotyczącymi macierzy zewnątrzkomórkowej oraz znacznego upośledzenia funkcji układu immunologicznego. Wywołana immunotolerancja jest jedną z przyczyn powstawania stanów przed rakowych oraz raków skóry. Do innych zmian związanych z fotostarzeniem się skóry należą: zmiany przerostowe, szorstkość i suchość skóry, zmniejszenie elastyczności i wiotkości skóry w wyniku czego, powstają zmarszczki głębokie. Dochodzi również do przerostu gruczołów łojowych, zaburzeń pigmentacji oraz powstawania teleangiektazji (Gliwa i wsp., 2013; Ebisz i wsp., 2015).

### **1.2.3 Zmiany nowotworowe**

Rak podstawnokomórkowy (BBC - Basal Cell Carcinoma), który stanowi 80% wszystkich złośliwych zmian skórnych, cechuje się miejscową złośliwością oraz powolnym wzrostem. Do kancerogenezy prowadzącej do jego powstania dochodzi pod wpływem działania promieniowania UVB. Zachorowalność na BBC jest największa po 65 r.ż., co stanowi 95% wszystkich zachorowań (Kapka- Skrzypczak i wsp., 2014; Glogau i wsp., 1997; Fitzpatric i wsp., 1988).

Drugim pod względem częstości występowania nowotworem skóry jest rak kolczystokomórkowy (SCC – Squamous Cell Carcinoma), który jest nowotworem powstającym z komórek keratonizujących naskórka. Charakteryzuje się niskim stopniem zróżnicowania histologicznego oraz zdolnością do przerzutów w przypadku 3-5% zmian. Powstanie SCC jest związane z uszkodzeniem skóry pod wpływem nadmiernego promieniowania UV (Kapka- Skrzypczak i wsp., 2014; Chicheł i wsp., 2005; Fitzpatric, 1988).

Do najbardziej złośliwych nowotworów skóry należy czerniak złośliwy. Istnieje wiele czynników ryzyka powstawania czerniaka takich jak: niska zawartość barwnika w skórze, wiek,

współistnienie znamion oraz predyspozycje genetyczne. Jednak jednym z najważniejszych czynników jest długotrwała ekspozycja na słońce z współistniejącymi oparzeniami słonecznymi i pęcherzami. W patogenezie powstawania czerniaka kluczową rolę odgrywa zarówno UVA jak i UVB. Czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju czerniaka złośliwego, nawet o 75%, jest narażenie na sztuczne promieniowanie UV (Ebisz i wsp., 2015; Borkowska i wsp., 2013).

## **1.2.4 Fotoprotekcja**

### **1.2.4.1 Naturalna ochrona skóry**

Do podstawowych mechanizmów ochrony skóry należy wytwarzanie melaniny, która ma zdolność do absorpcji promieniowania UV. Gromadzi się w komórce pomiędzy jądrem a powierzchnią zwróconą w stronę światła chroniąc materiał genetyczny. Posiada zdolność do absorbowania promieniowania UVA i UVB oraz w paśmie światła widzialnego. Innym ważnym mechanizmem fotoprotekcji jest wytwarzanie kwasu urokainowego w wyniku rozpadu filagryny. Kwas urokainowy ma zdolność pochłaniania promieniowania UV o długości fali 290 nm. Jego stężenie w pocie oraz naskórku wzrasta wraz z ekspozycją na promieniowanie UV, które powoduje przekształcenie z formy trans do formy cis, posiadającej silne działanie immunosupresyjne (Węglowska i wsp., 2011). Do ochrony przeciwsłonecznej służy również specyficzna budowa naskórka z kerytynizacją warstwy rogowej. Nadmierna ekspozycja na działanie promieniowania UV prowadzi do pogrubienia warstwy rogowej naskórka, która ma zdolność zarówno do pochłaniania jak i rozpraszania promieniowania UV.

W świetle aktualnej wiedzy medycznej wiadomo, że naturalna ochrona przed promieniowaniem UV jest niewystarczająca. Istnieje więc konieczność korzystania ze sposobów sztucznej ochrony przeciwsłonecznej.

Powszechnie znany jest fakt, że promieniowanie UV jest potencjalnie rakotwórcze i może wywoływać niepożądane efekty zdrowotne. Podstawowe rekomendacje Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego dotyczą trzech głównych elementów:

- Unikanie nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV, szczególnie w godzinach 10-16
- Stosowanie odzieży ochronnej w tym okularów przeciwsłonecznych oraz nakrycia głowy
- Prawidłowej aplikacji preparatów zawierających filtry UV

Szczególną ochroną powinny zostać objęte dzieci, osoby z niedoborami odporności oraz osoby z jasną karnacją. Preparaty przeciwsłoneczne zawierające filtry UV powinny być aplikowane na całe ciało, minimum 20 minut przed ekspozycją na słońce, czynność ta powinna być powtarzana co 2 godziny.

#### **1.2.4.2 Filtry UV**

Preparaty kosmetyczne zawierające filtry UV pełnią funkcję ochronną skóry przed negatywnymi skutkami działania promieniowania UV. Filtry mają na celu pochłanianie, rozpraszanie lub odbijanie promieniowania ultrafioletowego. Ze względu na mechanizm działania można je podzielić na: filtry fizyczne oraz filtry chemiczne.

##### **1.2.4.2.1 Filtry fizyczne (mineralne)**

Do filtrów fizycznych zalicza się barwne pigmenty oraz tzw. pigmenty mikronizowane pochodzenia mineralnego. Są to związki, które nie ulegają reakcji chemicznej oraz nie są wchłaniane z powierzchni skóry, tworząc warstwę ochronną. Ich zadaniem jest odbicie promieniowania UV z całego zakresu długości fal. Jako barwne pigmenty o wielkości cząstek 200-300 $\mu$ m są stosowane tlenek tytanu ( $\text{TiO}_2$ ), tlenek cynku ( $\text{ZnO}$ ), oraz tzw. mika, czyli blaszki miki pokryte tlenkiem tytanu. Barwne pigmenty są niewygodne do stosowania ze względu na wielkość cząsteczek oraz pozostawianie białego nalotu. Pigmenty mikronizowane posiadają wielkość cząstek 20-80 nm, pochłaniają lub odbijają promieniowanie UVA oraz UVB, a są przepuszczalne dla promieniowania powyżej 400 nm. Pigmenty te są bazą do tworzenia delikatnych pudrów ochronnych zalecanych w szczególności dla niemowląt, dzieci oraz osób z alergiami. Mogą ulegać zbrylaniu tworząc luki w jednolitym filmie (Wang i wsp., 2010).

- **Ditlenek Tytanu**

Jest najczęściej stosowanym związkiem pochodzenia mineralnego, który efektywnie odbija promieniowanie UVB oraz zapewnia wysoką ochronę przed UVA. Cząstki o wielkości 100-200 nm mają bardzo dobre właściwości kryjące. Pod wpływem UVA ditlenek tytanu indukuje wytwarzanie znacznych ilości wolnych rodników, które uszkadzają keranocyty, dlatego w celu uniknięcia tego efektu cząsteczki  $\text{TiO}_2$  są pokrywane silikonem. Wykazano bezpieczeństwo stosowania  $\text{TiO}_2$  oraz  $\text{ZnO}$  w postaci nanocząstek. Są to cząsteczki dobrze tolerowane przez skórę oraz posiadające niską toksyczność układową, a ich stosowanie nie stwarza zagrożenia dla zdrowia (Bojarowicz i wsp., 2014).

#### **1.2.4.2.2 Filtry chemiczne**

Są to związki chemiczne, należące do różnych klas, których cechą wspólną jest obecność w strukturze wiązań nienasyconych lub wolnych par elektronów. Taka budowa chemiczna umożliwia zmianę energii światła słonecznego na energię ciepłą.

Ze względu na zakres pochłanianego promieniowania możemy je podzielić na:

- **Filtry UVB**

Są to związki, które absorbują promieniowanie w zakresie ok. 290-320 nm. Do najczęściej stosowanych klas związków należą:

#### **Pochodne kwasu p-aminobenzoowego**

Kwas p-aminobenzoowy (PABA) to jeden z najstarszych stosowanych filtrów UV. Ze względu na działania niepożądane został wycofany w 2009 roku z listy substancji promieniochronnych dozwolonych do stosowania w kosmetykach. Aktualnie stosowana jest jego pochodna oksyetylenowa (PEG-25 PABA) o właściwościach hydrofilowych oraz ester oktylodimetylowy (Octyl Dimethyl PABA). Są to związki odporne podczas kontaktu skóry z wodą. U ok. 4% populacji związki te mogą powodować alergię, dlatego też ich zastosowanie zostało ograniczone. Wykazano także, że związki te mogą wykazywać potencjalne działanie rakotwórcze (Gasparro i wsp., 1998; Lowe, 2006).

#### **Pochodne kwasu p-metoksycynamonowego**

Do pochodnych kwasu p-metoksycynamonowego należą: metoksycynamonian oktylu oraz p-metoksycynamonian izoamylu. Są to związki, które praktycznie zastąpiły pochodne PABA, co jest związane z ich intensywnym pochłanianiem promieniowania w wąskim zakresie ok. 308 nm. Dodatkowo są to związki niepowodujące podrażnień, jednak wraz ze wzrostem ich zastosowania w kosmetykach obserwuje się wzrost liczby alergii (Dondi i wsp., 2006; Krause i wsp., 2012).

#### **Pochodne kwasu salicylowego**

Do najczęściej stosowanych w kosmetykach związków należą salicylan oktylu oraz ester trimetylocykloheksylowy (INCI: Homosalate). Ze względu na niewysoki współczynnik absorpcji są najczęściej stosowane wraz z innymi filtrami chemicznymi. Nie przenikają przez

warstwę rogową naskórka do krążenia ogólnego oraz bardzo rzadko wywołują alergię kontaktową (Bauman, 2013; Krause i wsp., 2012; Scheuer i Warsaw, 2006).

### **Pochodne kamfory**

Do najczęściej stosowanych pochodnych kamfory należy 3-(4-metylobenzylideno)-kamfora, która rzadko powoduje reakcje alergiczne. Pomimo dużej stabilności pod wpływem słońca pochodna kamfory nie została zaakceptowana przez FDA (Food and Drug Administration). W Europie najczęściej występuje pod nazwą Eusolex 6300. W badaniach stwierdzono jej silne działanie estrogenne, a dodatkowo związek ten przenika do mleka matki wpływając na gospodarkę hormonalną również u niemowląt (DeBuys i wsp., 2000; Krause i wsp., 2012).

- **Filtry UVA**

Do filtrów pochłaniających wyłącznie promieniowanie w zakresie 320-400 nm należą dwa związki pochodne dibenzoilometanu oraz benzyliidenokamfory.

**Butylometoksydibenzoilometan** jest to związek stosowany najczęściej z filtrami UVB (3-(4-metylobenzylideno) kamforą oraz oktokrylenem. W preparatach kosmetycznych występuje pod nazwą Avobenzon oraz Parsol 1789. Ze względu na małą stabilność i częste wywoływanie fotoalergicznego zapalenia skóry opracowano bardziej stabilne formy (Helioplex Neutrogeny i Active Photobarrier Complex), które są obecnie powszechnie stosowane (Bauman, 2013; Wang i wsp., 2010).

**Pochodna benzyliidenokamfory** (Mexoryl SX- Terephthalylidene Dicamphor Sulfonic Acid), bardzo skutecznie chroni przed promieniowaniem UVA w zakresie 320-340 nm. Ze względu na unikalną strukturę oraz skuteczną ochronę przed promieniowaniem UV, została opatentowana przez koncern L'Oreal (Wang i wsp., 2010).

- **Filtry UVA + UVB**

Są to związki które absorbują promieniowanie UVA oraz UVB. Do filtrów o szerokim spektrum działania należą fenylobenzotriazole oraz pochodne benzofenonu.

**Fenylobenzotriazole**, do których zaliczamy Tinosorb M (INCI: Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol) oraz Tinosorb S (INCI: Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine) posiadają właściwości filtrów chemicznych poprzez absorpcję promieniowania UV jak i filtrów fizycznych, gdyż rozpraszają UVR dzięki swojej zmikronizowanej strukturze.

Wielkość cząsteczek wynosi ok. 200 nm, co zmniejsza ryzyko penetracji w głąb skóry. Są to filtry dobrze tolerowane, niepowodujące podrażnień oraz reakcji alergicznych (Bojarowicz i wsp., 2014; Wang i wsp., 2010; Stanisz, 2009).

Odrębną grupą związków są **poходne benzofenonu**. Do najbardziej znanych i najczęściej stosowanych w kosmetykach należy benzofenon-3 (Oxybenzone). Jest to związek posiadający właściwości fotouczulające oraz podrażniające skórę. Występuje nie tylko w kosmetykach, ale także w tkaninach oraz tworzywach sztucznych.

Do tej grupy należy także badany przeze mnie związek, będący 2,2',4,4'-tetrahydroksybenzofenonem, który występuje pod nazwą benzofenon-2. Benzofenony są składnikami wielu kosmetyków, ale także są dodawane do opakowań żywności chroniąc ją przed niszcącym działaniem promieni słonecznych (Gonzalez i wsp., 2006). Benzofenon-2 wykorzystywany jest również jako dodatek do tworzyw sztucznych oraz produktów wykorzystywanych w przemyśle samochodowym. BP-2, jako żółty proszek, łatwo ulegający rozpylaniu, może narażać pracowników koncernów samochodowych poprzez bezpośredni kontakt ze skórą lub zanieczyszczonym powietrzem (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Benzophenone-2, HSDB).

### **1.3 Narażenie człowieka na działanie benzofenonu-2**

Ze względu na niekorzystne działanie promieniowania ultrafioletowego, powodujące uszkodzenia DNA i hamujące aktywność systemu immunologicznego w skórze, czego skutkiem jest zwiększona zapadalność na nowotwory skóry, w tym czerniaka złośliwego, stosowanie preparatów z filtrami UV jest rekomendowane przez Polskie Towarzystwo Dermatologiczne. Preparaty kosmetyczne zawierające pochodne benzofenonu stosowane są na duże powierzchnie ciała. Dodatkowo, aplikowanie po każdym kontakcie z wodą w celu zapewnienia właściwej ochrony oraz stosowanie wielu preparatów kosmetycznych powoduje zwiększenie narażenia na działanie benzofenonów. Należy zauważyć, że związki te znajdują się również w preparatach dedykowanych dla dzieci, których skóra jest jeszcze niedojrzała i wykazuje większą przepuszczalność.

Ekspozycja człowieka na filtry UV zachodzi głównie poprzez wchłanianie z powierzchni skóry, ale także poprzez spożywanie zanieczyszczonej żywności (Brausch i Rand, 2011; Gago-Ferrero i wsp., 2012; Weisbrod i wsp., 2007). Ze względu na powszechne stosowanie benzofenonów, ich wysokie stężenia są wykrywane w wodach jezior i rzek, a także w ściekach i tkankach organizmów wodnych, zwłaszcza w tłuszczu ryb. Przykładowo poziom



benzofenonu-2 u ryb wynosi 41,9 ng/g m.c., natomiast w wodzie stężenie tego związku wynosi 109 ng/L (Díaz-Cruz i wsp., 2019). Najczęściej oznaczanym benzofenonem jest BP-3, którego stężenie zostało oznaczone w wodach powierzchniowych Chin i wynosi 30 ng/L (Kim i Choi, 2014). Ze względu na swoje właściwości lipofilowe benzofenony mogą być kumulowane w organizmie przez wiele lat i negatywnie wpływać na organizm (DiNardo i Downs, 2018; Kim i Choi, 2014). W badaniach prowadzonych u *Danio rerio* stwierdzono, że 5-dniowe narażenie na działanie BP-2 w stężeniu większym niż 40  $\mu$ M (9,85 mg/L) u większości zarodków powoduje zaburzenia metabolizmu lipidów i ich kumulację w woreczku żółtkowym oraz zaburzenia rozwoju komórek nerwowych, co objawia się deformacjami czaszki (Fong i wsp., 2016). Kumulacja benzofenonów w tkance tłuszczowej została również potwierdzona u ludzi. Poziom BP-3 w tkance tłuszczowej korelował z wiekiem, a więc wydłużonym czasem ekspozycji na badane związki i wynosił średnio 4940 ng/g mokrej masy (Wang i wsp., 2015).

W grupie pochodnych benzofenonu większość danych dotyczących absorpcji, stężenia i działania niepożądanego dotyczy benzofenonu-3, jako najczęściej stosowanego filtra UV. Obecność BP-3 w moczu została stwierdzona prawie w 97% próbek pozyskanych od populacji USA (Calafat i wsp., 2008). Wyższe stężenia BP-3 były częściej stwierdzane u kobiet charakteryzujących się wyższym wskaźnikiem BMI, należących do rasy kaukaskiej oraz o wyższym statusie materialnym, a więc u kobiet, które stosują więcej kosmetyków, a poprzez to są bardziej narażone na działanie BP-3 (Ferguson i wsp., 2018; Ko i wsp., 2016). Stwierdzono także, że stężenie benzofenonów w moczu i osoczu krwi mężczyzn jest wyższe niż u kobiet (Janjua i wsp., 2004), natomiast inne badania wykazały wyższe stężenia benzofenonów w moczu kobiet niż mężczyzn (Louis i wsp., 2014). Różnice w stężeniach benzofenonów we krwi prawdopodobnie wynikają z częstości stosowania kosmetyków, z szybkości metabolizowania i dystrybucji tych związków oraz ich kumulacji w tkance tłuszczowej. Stwierdzono również zwiększone narażenie na działanie benzofenonów w miesiącach letnich. Narażenie na pochodne benzofenonu jest znaczne i dotyczy nie tylko dorosłych, w tym kobiet w ciąży, ale także dzieci. Poziom benzofenonów u matek korelował ze zwiększoną masą urodzeniową u chłopców i obniżoną u dziewczynek. Stwierdzono również wzrost obwodu głowy u chłopców, którzy w trakcie życia płodowego byli narażeni na benzofenony (Philippat i wsp., 2012; Wolff i wsp., 2008). Przenikanie przez łożysko do płodu zostało udowodnione poprzez pomiar poziomu pochodnych benzofenonu w krwi pępowinowej. Stężenie BP-3 oraz jego metabolitu BP-1 było 10-krotnie niższe w krwi pępowinowej niż w surowicy krwi matek oraz prawie 1000 niższe niż stężenie tych związków w moczu. U kobiet

najbardziej narażonych na działanie BP-3 oznaczono jego poziom również w płynie owodniowym, który korelował ze stężeniem w surowicy matki, co wskazuje na bezpośrednie oddziaływanie na płód (Krause i wsp., 2018; Valle-Sistac i wsp., 2016). Niemowlęta oraz małe dzieci rozwijają się bardzo szybko i są jednocześnie najbardziej wrażliwe na działanie benzofenonów pochodzących nie tylko z zastosowanych kosmetyków, ale także dostarczanych wraz z pokarmem. Obecność pochodnych benzofenonu została potwierdzona w 85% próbek mleka kobiecego (Schlumpf i wsp., 2010). Badania kohortowe w Danii wykazały obecność BP-3 w moczu dorosłych mężczyzn, ciężarnych kobiet ale także dzieci w różnych przedziałach wiekowych. Pomimo zwiększonego poziomu BP-3 w moczu osób dorosłych w porównaniu do dzieci, nie stwierdzono tak wysokiego narażenia jak w populacji amerykańskiej (Frederiksen i wsp., 2014). U duńskich dzieci stwierdzono wyższe stężenia BP-3 w miesiącach letnich w porównaniu do zimowych, jednakże dzieci u których wykryto wyższe stężenia BP-3 w miesiącach letnich wykazywały również w miesiącach zimowych wyższe stężenia tego związku.

Benzofenony mogą być dostarczane zarówno z pożywieniem jak i wchłaniane przez skórę. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na komórkach ludzkiej skóry stwierdzono, że pochodne benzofenonu, głównie BP-3 stosowany jednorazowo szybko się wchłania i przenika przez warstwy skóry w ilości 10% aplikowanej dawki, co zostało również potwierdzone w badaniach *in vivo* (Hayden i wsp., 1997; Jiang i wsp., 1999). Dodatkowo stwierdzono, że filtry UV można wykryć w surowicy i moczu dorosłych ochotników wkrótce po aplikacji ich na skórę, co dowodzi, że mogą one przejść przez skórę do krążenia ogólnego (Janjua i wsp., 2008). W innych badaniach przeprowadzonych na dorosłych ochotnikach, którzy stosowali wybrane preparaty kosmetyczne przez krótki, 4-dniowy okres, stężenie BP-3 w surowicy krwi wynosiło nawet 1 195 ng/ml, co stanowiło 52% nałożonej dawki (Matta i wsp., 2019). Biodostępność substancji chemicznej aplikowanej naskórną różni się od podanej doustnie. Najbardziej znanym i zbadanym przedstawicielem pochodnych benzofenonu jest benzofenon-3, który szybko pojawia się osoczu krwi szczurów, którym podawano go naskórną w dawce 200 mg/kg mc, bo już 5 minut po podaniu. Maksymalne stężenie BP-3 występowało po 2,5 godzinach po podaniu. Stwierdzono również silne wiązanie zarówno BP-3 jak i jego metabolitów z białkami (Okereke i wsp., 1994). Benzofenony są wydalane głównie z moczem (67%) oraz kałem (21%) (Gustavsson Gonzalez i wsp., 2002). Benzofenon-3, po wnikięciu do krążenia ogólnego jest metabolizowany w reakcji utleniania do beznofenonu-1, który wykazuje silniejsze działania niepożądane w porównaniu do związku macierzystego. BP-3 ulega

przemianom zarówno w I jak i II fazie biotransformacji, w których biorą udział cytochrom p450 głównie cyt P450 1A1 oraz GSH (Okereke i wsp., 1994; Watanabe i wsp., 2015). Benzofenon-2, który posiada w swojej budowie już cztery grupy hydroksylowe, nie podlega reakcjom I fazy biotransformacji jak to ma miejsce w przypadku BP-3, lecz jest wyłącznie metabolizowany w reakcjach II fazy biotransformacji, co zostało potwierdzone zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* (Le Fol i wsp., 2015). Sprzężenie grup kwasu siarkowego lub glukuronowego z BP-2 ułatwia jego wydalanie z organizmu. Stężenie BP-2 sprzężonego z glukuronianem jest znacznie wyższe niż sprzężonego z siarczanem (Jeon i wsp., 2008; Schlecht i wsp., 2008). Także badania przeprowadzone na larwach (4-dniowych) i osobnikach dorosłych *Danio rerio* wykazały że BP-2 jest wyłącznie metabolizowany w reakcjach II fazy. Dodatkowo stwierdzono, że przyłączanie grupy glukuronowej dominowało u larw, natomiast u osobników dorosłych przeważało przyłączanie grupy siarczanowej. W przypadku larw stwierdzono prawie 40-krotnie większe stężenie BP-2 niż u osobników dorosłych (Fol i wsp., 2017).

#### **1.4 Wpływ benzofenonu-2 na funkcje układu endokrynologicznego**

Przez wiele lat uważano, że związki stosowane jako chemiczne filtry UV mogą mieć jedynie niekorzystny wpływ na skórę, poprzez wywoływanie podrażnienia lub alergicznego, kontaktowego zapalenia skóry. Obecnie wiadomo, że działanie toksyczne pochodnych benzofenonu jest ściśle związane z ich oddziaływaniem na układ hormonalny (EDC, z ang. Endocrine disruptor chemicals). Większość danych *in vitro* oraz *in vivo* wskazuje na działanie estrogenne i antyandrogenne tych związków, a niektóre doniesienia pokazują, że benzofenony również zakłócają czynność tarczycy.

##### **1.4.1 Receptory estrogenowe– badania *in vitro***

W ciągu ostatniej dekady lista substancji chemicznych, które naśladują działanie naturalnego hormonu, jakim jest estrogen, zakłócając tym samym gospodarkę hormonalną, gwałtownie wzrosła. Poprzez wiązanie się z receptorami estrogenowymi (ER), które należą do rodziny receptorów jądrowych, mogą wpływać na szlaki sygnałowe estrogenu. Wyróżniamy dwa rodzaje wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenowych: ER $\alpha$  i ER $\beta$ , które są kodowane na dwóch niehomologicznych genach. ER $\alpha$  jest bardziej rozpowszechnionym receptorem estrogenowym niż ER $\beta$  i występuje głównie w macicy, przysadce mózgowej, podwzgórzu, wątrobie, kościach, gruczole sutkowej, szyjce macicy i pochwie, natomiast nasiloną ekspresję ER $\beta$  wykazano w jajniku, płucach oraz prostaty (Hamilton i wsp., 2017).

Estrogeny oraz ksenoestrogeny działają poprzez kilka mechanizmów, które można podzielić na związane z szybkimi efektami niegenomowymi oraz z aktywnością genomową (Hewitt i wsp., 2004). Klasycznym mechanizmem działania estrogenów jest wpływ na receptory ER, które poprzez dimeryzację, fosforylację i zmianę konformacji są zdolne do przyłączenia się do elementu odpowiedzi na estrogeny (ERE- estrogen responsive element). Kompleks estrogen-receptor może również działać poprzez utworzenie dimerów, lecz bez połączenia z ERE, wpływać na działanie innych czynników transkrypcyjnych związanych z DNA. W efekcie dochodzi do zwiększenia stabilizacji kompleksu DNA-czynnik transkrypcyjny i/lub ułatwienia rekrutacji innych koaktywatorów inicjujących transkrypcję. Do czynników transkrypcyjnych mających zdolność łączenia się z receptorem ER $\alpha$  należą: białka SP1 (ang. specificity protein 1), AP-1 (ang. activating protein 1) oraz czynnik NF- $\kappa$ B (ang. nuclear factor kappa B) (Safe i Abdelrahim, 2005; Ebisz i wsp., 2015).

Oprócz działania genomowego estrogeny mogą wywierać wpływ na komórkę poprzez oddziaływanie z receptorami błonowymi. Badania, przeprowadzone głównie na liniach komórkowych, wykazały, że szybkie zmiany zachodzące w ciągu kilku minut po podaniu hormonu można wyciszyć poprzez hamowanie szlaków sygnałowych kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), w tym kinazy regulowanej zewnątrzkomórkowo (ERK) lub poprzez serynowo-treoninową kinazę białkową B (Akt) (Clark i wsp., 2014; Kelly i Levin, 2001). Wykazano, że aktywacja tych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych obejmuje proces związany z błoną cytoplazmatyczną, w których pośredniczy receptor sprzężony z białkiem G, czyli GPR30 lub postać ER $\alpha$  związana z kaweoliną (Levin, 2015; Prossnitz i Hathaway, 2015).

Estrogeny nasilają proliferację i przeżywalność wielu komórek organizmu. Biologiczne działanie estrogenów oraz substancji o działaniu estrogenym jest związane z oddziaływaniem na receptory estrogenowe, które pełniąc funkcję czynników transkrypcyjnych, wpływają na ekspresję genów odpowiedzialnych za zwiększoną proliferację, a więc sprzyjają także przeżyciu oraz wzrostowi nowotworów (Chen i wsp., 2008). Aktywne formy ER mogą również hamować ekspresję wybranych genów poprzez wytwarzanie białek hamujących transkrypcję. W wyniku aktywacji receptorów ER dochodzi do zmian w transkrypcji genów oraz białek o właściwościach antyproliferacyjnych oraz antyangiogennych (Qi i wsp., 2011; Ullah i wsp., 2011). W badaniach *in vitro* stwierdzono, że benzofenony są agonistami receptorów ER (Morohoshi i wsp., 2005). Wykazano, że BP-2 jest pełnym agonistą ludzkich receptorów estrogenowych  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) oraz  $\beta$  (hER $\beta$ ), jednakże wykazuje silniejsze powinowactwo do receptorów hER $\beta$  niż hER $\alpha$  (Molina-Molina i wsp., 2008). Wpływ na receptory estrogenowe

benzofenony wywierają w zakresie stężeń mikromolowych, a więc wyższych niż stężenia, które występują w osoczu krwi ludzi stosujących kosmetyki z filtrami UV (Janjua i wsp., 2004). Należy jednak zwrócić uwagę, że człowiek jest narażony na działanie benzofenonów przez cały okres życia począwszy od okresu prenatalnego, a dodatkowo, jako związki o właściwościach lipofilowych ulegają kumulacji w organizmie w wyniku czego, stężenia na które człowiek jest narażony mogą być znacznie wyższe.

Wyniki badań wskazują na zależność pomiędzy budową chemiczną pochodnych benzofenonu, a ich właściwościami estrogennymi. Wpływ na receptory estrogenowe zależy od liczby oraz miejsca przyłączenia grup hydroksylowych. Obecność tych grup w położeniu meta- oraz para- w znacznym stopniu zwiększa aktywność estrogeną związku (Suzuki i wsp., 2005). Liczna grupa pochodnych benzofenonu może różnić się zarówno podstawnikami jak i ich liczbą oraz położeniem. Do najbardziej znanych i przebadanych benzofenonów należy BP-3, który jest uznany jako częściowy agonista, natomiast jego metabolit BP-1 oraz BP-2 należą do grupy pełnych agonistów hER $\alpha$  (Kunz i Fent, 2006; Watanabe i wsp., 2015). Estrogenność benzofenonów oceniano przez określenie wartości EC<sub>50</sub> czyli efektywnego stężenia, które wywołuje odpowiedź estrogeną w 50% komórek. Wartość EC<sub>50</sub> dla benzofenonu-3, była oznaczana w komórkach nowotworu piersi MCF-7 i wynosiła 3,73  $\mu$ M (Schlumpf i wsp., 2004). Dla poszczególnych receptorów hER $\alpha$  oraz hER $\beta$  wartość ta wynosiła odpowiednio 2,9 i 25  $\mu$ M (Schreurs i wsp., 2005). BP-1, który jest metabolitem BP-3 wykazał silniejsze działanie estrogenne niż związek macierzysty, ponieważ wartość EC<sub>50</sub> wynosiła 2,08  $\mu$ M. Wśród badanych związków największą aktywność estrogenową wykazał benzofenon-2, którego EC<sub>50</sub> wynosiło tylko 0,68  $\mu$ M (Schlumpf i wsp., 2004). Działanie estrogenne benzofenonów określano również poprzez ocenę proliferacji komórek nowotworu piersi MCF-7, które charakteryzują się ekspresją receptorów ER $\alpha$  (Nakagawa i Suzuki, 2002; Williams i Darbre, 2019). Zaobserwowana bardzo silna proliferacja komórek linii MCF-7 po ekspozycji na BP-2 w stężeniu 10<sup>-6</sup>M, była porównywalna do zwiększenia liczby komórek poddanych działaniu 17 $\beta$ -estradiolu. W tym stężeniu stwierdzono również zwiększoną inkorporację bromodezoksyurydyny (BrdU) do DNA komórek w fazie S, co koreluje z działaniem nasilającym proliferację wykazany przez innych autorów (Kerdivel i wsp., 2013; Williams i Darbre, 2019). Wpływ benzofenonów na ER może powodować różne molekularne efekty, a więc wpływać na komórki, w tym na ich żywotność i namnażanie. Wzrost proliferacji komórkowej może być związany z aktywacją genów, takich jak gen dla chemokiny CXCL12 (czynnik pochodzenia stromalnego – 1), amfireguliny oraz receptora progesteronowego (PR).

Do genów docelowych działania estrogenów oraz ksenoestrogenów regulowanych bezpośrednio przez ER należy również gen dla pS2 (presenilina). Białko presenilina, które jest strukturalnie podobne do niektórych czynników wzrostu nasila proliferację komórek (Kim i wsp., 2000; Stack i wsp., 1988). Wzrost ekspresji genów CXCL12 oraz amfireguliny zaobserwowano w komórkach narażonych na działanie BP-2 w stężeniu  $10^{-6}$  M. Dodatkowo benzofenon-2 nieznacznie zwiększał ekspresję genu dla receptora progesteronowego (Kerdivel i wsp., 2013). Wyniki tych badań sugerują znaczny wpływ benzofenonu-2 na receptory ER $\alpha$ , a w konsekwencji na wzrost proliferacji komórek MCF-7 poprzez aktywację genów CXCL12 oraz amfireguliny a także poprzez zwiększenie poziomu pS2 (Kerdivel i wsp., 2013). Obecność pS2 jest również stwierdzana w 50% nowotworów złośliwych piersi, a jego nadekspresja może być wykorzystana jako czynnik monitorujący skuteczność hormonoterapii chorych z nowotworami piersi ER $\alpha$  (Markićević i wsp., 2008).

W celu określenia mechanizmu działania pochodnych benzofenonu na ER $\alpha$  badano aktywność genów reporterowych kodujących lucyferazę, połączonych z promotorem zawierającym sekwencję ERE (dla mechanizmu działania bezpośredniego), jak i promotorami zawierającymi Sp1, AP1 oraz C3 (dla działania pośredniego). Wykazano, że BP-2 już w stężeniu 0.1 $\mu$ M wpływa na indukowaną przez ER $\alpha$  aktywację genów na drodze bezpośredniej (ERE) jak i pośredniej (Sp1 oraz C3), natomiast nie wpływa na ekspresję genu stymulowanego przez czynnik AP1. Wyniki badań sugerują, że pochodne benzofenonu mogą wpływać na działanie ER poprzez liczne mechanizmy molekularne, które nie są jeszcze dokładnie poznane (Kerdivel i wsp., 2013).

#### **1.4.2 Działanie estrogenne pochodnych benzofenonu w badaniach *in vivo***

Działanie estrogenne zaobserwowane w badaniach *in vitro*, zostało potwierdzone w doświadczeniach prowadzonych u zwierząt poprzez wykazanie zmian w niektórych parametrach fizjologicznych. W badaniach u ryb narażenie na działanie BP-2 przez okres 14 dni spowodowało zmniejszenie długości ciała, ale efekt ten obserwowano wyłącznie przy wysokim stężeniu tego związku w wodzie, bo 8 783  $\mu$ g/L. Po tym okresie czasu nie obserwowano nasilenia śmiertelności wśród ryb, jednakże wystąpiły oznaki obrzęku ciała. W badaniu tym określono również poziom witellogeniny (VTG), która jest swoistym markerem ekspozycji na substancje o działaniu estrogennym. U ryb narażonych na działanie BP-2 stwierdzono wzrost VTG. Podobne wyniki uzyskano dla BP-1 (4919  $\mu$ g/l), natomiast po ekspozycji na BP-3 nie stwierdzono indukcji VTG w organizmach ryb (Kunz i wsp., 2006).

Ze względu na występujące znaczne różnice w narażeniu, metabolizmie oraz działaniach niepożądanych pomiędzy rybami a ssakami, przeprowadzono badania mające na celu określenie wpływu benzofenonów na organizmy ssaków. W badaniach toksyczności podostrej, samice szczurów po usunięciu jajników były narażane na działanie BP-2 w dawce 250 mg/kg masy ciała przez okres 5 dni. Zastosowanie BP-2 przez krótki okres czasu, okazało się wystarczające do wywołania efektu estrogennego (podobnego do działania  $17\beta$ -estradiolu), a zatem wykazano zaburzenia układu hormonalnego (Jarry i wsp., 2004; Schlecht i wsp., 2004). Podobne zmiany zaobserwowano po przewlekłym narażeniu na działanie benzofenonu-2, który był podawany przez okres 3 miesięcy, w dawce 185 mg/kg masy ciała samicom szczura po usunięciu jajników. Stwierdzono zwiększenie masy macicy oraz zmniejszenie ekspresji receptorów ER $\beta$ , a także obserwowano działanie estrogenne w pochwie oraz kościach (Seidlova-Wuttke i wsp., 2004).

### **1.4.3 Receptory androgenowe**

Receptory androgenowe (AR) należą do grupy receptorów jądrowych, zlokalizowanych w cytoplazmie lub w jądrach komórek docelowych (Dohle i wsp., 2003). Ekspresję AR wykazują takie tkanki jak: jądra, najądrza i prostata oraz żołądek, płuca, jelita, odbyt, nerki, tarczyca (Banerjee i wsp., 2001; Goyal i wsp., 1998; Wilson i McPhaul, 1996). Wśród androgenów najsilniejsze powinowactwo do receptorów AR wykazują  $5\alpha$  - dihydrotestosteron oraz testosteron (Bryś i wsp. 1997). Aktywacja receptorów androgenowych jest odpowiedzialna za różnicowanie płci, wykształcenie drugorzędowych cech płciowych oraz zapoczątkowanie i utrzymanie spermatogenezy (O'Hara i Smith, 2015; Wang i wsp., 2009). Występujące mutacje w genie kodującym AR są ściśle związane z chorobami występującymi u mężczyzn takimi jak: rak prostaty, zespół niewrażliwości na androgeny (AIS), choroba Kennedy'ego (SBMA) oraz niepłodność (Brinkmann, 2001; Holdcraft, 2003). Natomiast u kobiet nadmiar androgenów odpowiada za wystąpienie męskiej budowy ciała, hirsutyzmu, zaburzenia płodności oraz łojotoku i trądziku. U kobiet androgeny mogą również przyczyniać się do rozwoju nowotworów piersi, jajnika oraz endometrium (Giguère i wsp., 2001; Rebbeck i wsp., 2002; Sasaki i wsp., 2000). Działanie antagonistyczne benzofenonów na receptory androgenowe może być związane z nieprawidłowym rozwojem narządów płciowych, a w konsekwencji zaburzeniem procesu spermatogenezy i płodności. Oddziaływanie pochodnych benzofenonu na receptory androgenowe badano w linii komórkowej MDA-kb2 wykazującej ekspresję endogennych receptorów AR oraz w rekombinowanych komórkach drożdży z ekspresją ludzkich receptorów androgenowych (hAR). Działanie antyandrogenne

benzofenonów zostało potwierdzone przez Kunz'a, który w swoich badaniach wykazał, że BP-2, BP-1 oraz 4-hydroksybenofenon posiadają silniejsze działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów hAR niż antagonistą referencyjny, jakim jest flutamid (Kunz i Fent, 2006). Podobne wyniki uzyskano wykorzystując linię komórkową U2-OS z nadekspresją AR, która jest uważana za bardziej wrażliwą na działanie androgenne niż linia MDA-kb2 (Schreurs i wsp., 2005). Najbardziej przebadany wśród benzofenonów, BP-3 również wykazał znaczące działanie antagonistyczne na AR, jednocześnie był całkowicie pozbawiony efektów agonistycznych (Ma i wsp., 2003; Schreurs i wsp., 2005). Antyandrogenne działanie benzofenonów może wynikać również z ich wpływu na poziom testosteronu poprzez hamowanie aktywności dehydrogenazy 17 $\beta$ -hydroksysteroidowej typu 3 (17 $\beta$ -HSD3), enzymu zaangażowanego w proces steroidogenezy oraz białkowego regulatora steroidogenezy (StAR). Enzym 17 $\beta$ -HSD3 uczestniczy w ostatnim etapie wytwarzania testosteronu w komórkach Leydiga, natomiast białko StAR jest odpowiedzialne za transport cholesterolu do mitochondriów, z którego powstają hormony steroidowe. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na linii komórek Leydiga MA-10 stwierdzono, że BP-2 zmienia ekspresję genów kodujących białka StAR oraz 3 $\beta$ -HSD (Kim i wsp., 2011). Badania *in vivo* przeprowadzone na myszach potwierdziły hamujący wpływ BP2 na ekspresję białka StAR oraz 3 $\beta$ -HSD, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia produkcji testosteronu w jądrach (Kim i wsp., 2011). W testach enzymatycznych, benzofenon-1 również skutecznie blokował konwersję androstendionu do testosteronu u myszy i szczurów, poprzez wpływ na 17-beta-HSD3. Co więcej, BP-1 antagonizował zależną od testosteronu aktywację receptorów androgenowych (IC<sub>50</sub> 5.7  $\mu$ M), sugerując działanie antyandrogenne BP-1 poprzez dwa mechanizmy: hamowanie syntezy testosteronu i blokowanie aktywacji receptora (Nashev i wsp., 2010). Dodatkowo stwierdzono, że BP-1 może zwiększać progresję raka prostaty poprzez wpływ na cykl komórkowy i ekspresję genów związanych z przerzutami za pośrednictwem szlaku sygnałowego AR (Kim i wsp., 2015).

#### **1.4.4 Receptory progesteronowe (PR)**

Receptor progesteronowy należy do rodziny receptorów jądrowych. Wyróżniamy dwie izoformy PR: izoformę A oraz B, które mogą tworzyć homo- oraz heterodimery. Receptory progesteronowe występują w tkankach takich jak: macica, gruczoł piersiowy, jajniki oraz jądra odpowiadając za prawidłowy ich rozwój. W mózgu receptory progesteronowe występują głównie w takich strukturach jak podwzgórze oraz kora mózgowa. Dodatkowo w kościach progesteron poprzez specyficzne receptory wpływa na aktywność osteoblastów (Dinny i wsp.,



1997; Bland, 2000; Tincello i wsp., 2009). Działanie receptora progesteronowego jest ściśle związane z funkcjonowaniem ER. Indukcja syntezy PR zachodzi głównie poprzez estrogeny, natomiast hamowanie tego procesu jest zależne od poziomu progesteronu (Kim i wsp., 2013). Wykazano, że benzofenony podobnie jak na receptory AR, wywierają działanie antagonistyczne także na receptory progesteronowe, a wartość IC<sub>50</sub> równa 5,2 μM, jest stężeniem na które mogą być narażeni ludzie (Schreurs i wsp., 2005).

Zidentyfikowano także receptor progesteronowy związany z błoną komórkową (mPR), który jest odpowiedzialny m.in. za aktywację białka G oraz kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK). Przykładem oddziaływania progesteronu z receptorami mPR znajdującymi się w błonie komórek linii nabłonka gruczołu piersiowego MCF10A, jest aktywacja ścieżki sygnalizacyjnej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K/AKT). W wyniku oddziaływania dochodzi do pojawienia się populacji komórek o cechach rakowych (Piasecka i wsp. 2015). Wzrost mRNA dla receptora mPR u zarodków *Chironomus riparius*, które były poddane działaniu BP-3 zaobserwowano w każdym stadium rozwoju zarodków, jednakże dorosłe larwy tego gatunku poddane działaniu BP-3 nie wykazały zmian w ekspresji mRNA dla mPR (Ozáez i wsp., 2014). Wyniki badań sugerują iż BP-3 może wpływać na proces nowotworzenia poprzez zwiększanie gęstości receptorów mPR.

### **1.5 Wpływ pochodnych benzofenonu na układ rozrodczy**

Ksenoestrogeny jako związki endokrynnie czynne mogą zaburzać homeostazę hormonalną zarówno u kobiet jak i mężczyzn. Wydzielanie hormonów płciowych jest sterowane przez oś podwzgórze - przysadka mózgowa - gonady poprzez sprzężenie zwrotne. Podwzgórze wydziela gonadoliberynę, która kontroluje uwalnianie gonadotropin: hormonu luteinizującego (LH) i hormonu folikulotropowego (FSH) przez przedni płat przysadki mózgowej. W efekcie dochodzi do zmian w wytwarzaniu i wydzielaniu przez gonady zarówno androgenów (testosteronu) jak i estrogenów oraz gestagenów. Zaburzenia homeostazy hormonalnej może być przyczyną zwiększonej zapadalności na nowotwory hormonozależne piersi i prostaty oraz na choroby w których patogenezie biorą udział estrogeny m.in. endometrioza oraz mięśniaki macicy. Zaburzenie działania hormonów płciowych może także prowadzić do obniżenia płodności, która u mężczyzn manifestuje się zaburzeniami spermatogenezy, natomiast u kobiet zaburzeniami cyklu miesięczkowego a dodatkowo może dochodzić do zmian w drugorzędowych cechach płciowych.

W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* benzofenon-2 wykazywał działanie agonistyczne na ER oraz antagonistyczne w stosunku do AR. Oddziaływanie pochodnych benzofenonu na receptory hormonów płciowych, może w konsekwencji wywołać zaburzenia płodności. Wpływ benzofenonów na funkcje układu rozrodczego badano poprzez ekspozycję ryb na BP-2 przez okres 15 dni, co prowadziło do indukcji witellogeniny, biomarkera działania estrogenów. Ponadto zaobserwowano istotny, zależny od stężenia wpływ BP-2 na gonady. Przy stężeniach 1,2 mg/L i wyższych rozwój plemników i oocytów był znacząco zahamowany, odpowiednio u samców i samic ryb. W jądra narażonych na działanie BP-2 samców wykazano znacznie mniej spermatocytów, a w jajnikach samic stwierdzono mniej dojrzałych oocytów w stosunku do zwierząt z grup kontrolnych (Kunz i wsp., 2006; Weisbrod i wsp., 2007). Ze względu na różnice międzygatunkowe pomiędzy rybami a ssakami przeprowadzono badania *in vivo* na szczurach. U samców szczurów narażonych na działanie BP-2 w okresie prenatalnym, stwierdzono częstsze występowanie spodziectwa, natomiast podawanie BP-2 wraz z antagonistą receptorów ER (EM-800) zapobiegało występowaniu tej wady rozwojowej (Hsieh i wsp., 2007). U samic szczurów z usuniętymi jajnikami benzofenon-2 prowadził do prawie dwukrotnego zwiększenia masy macicy oraz wzrostu grubości warstw komórek nabłonka pochwy (Nakagawa i Tayama, 2002; Schlecht i wsp., 2004; Seidlova-Wuttke i wsp., 2004). Podobne wyniki otrzymali również Jarry i wsp., którzy oprócz zwiększenia masy macicy, wzrostu poziomu IGF-1 w pochwie, zaobserwowali zmiany w przysadce mózgowej (zmniejszona synteza LH), wątrobie (zwiększona ekspresja IGF1) (Jarry i wsp., 2004; Schlecht i wsp., 2006). Benzofenony mogą również zaburzać oogenezę. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na hodowlach całych jajników pobranych od szczurów zaobserwowano zależne od stężenia BP-3 zaburzenia rozwoju komórek jajowych na wczesnych etapach ich powstawania. Benzofenon-3 w stężeniu 5,8 nM powodował zmniejszenie całkowitej liczby oocytów, gniazd w jajniku oraz populacji wczesnych pęcherzyków pierwotnych. W wyższych stężeniach BP-3 (276 nM) zaburzał powstawanie oocytów poprzez zwiększenie całkowitej liczby komórek jajowych, liczby gniazd w jajniku oraz zmniejszanie liczby wczesnych pierwotnych pęcherzyków. Badania te wykazały więc, że benzofenon-3 zakłóca powstawanie oraz różnicowanie komórek rozrodczych (Santamaría i wsp., 2019).

U ludzi stwierdzono korelację pomiędzy stężeniem benzofenonów w moczu, w szczególności BP-1, który podobnie jak BP-2 wykazuje silne działanie agonistyczne w stosunku do ER, a częstością występowania endometriozy (Kunisue i wsp., 2012). Endometrioza jest jednostką chorobową estrogenozależną, której etiopatogeneza nie jest do

końca poznana. Komórki ektopowego endometrium posiadają na swej powierzchni receptory estrogenowe, androgenowe oraz progesteronowe. Posiadają również enzym aromatazę, który przekształca androgeny w estrogeny. Pobudzenie receptorów estrogenowych ułatwia implantację oraz proliferację komórek endometrialnych (Bulun i wsp., 2000). Zaobserwowano również tendencję do występowania mięśniaków macicy u kobiet, u których występowały wyższe stężenia substancji hormonalnie czynnych, w tym pochodnych benzofenonu. Sugeruje to, że związki te mogą zwiększać ryzyko powstawania mięśniaków, choroby w której dużą rolę odgrywają estrogeny (Pollack i wsp., 2015). U mężczyzn pochodne benzofenonu mogą wpływać na płodność. Zwiększone narażenie na działanie BP-2 było związane z obniżoną płodnością mężczyzn prawie o 31%, co znacznie wydłużało czas oczekiwania na ciążę (Louis i wsp., 2014). Pomimo udowodnionego działania estrogennego, mechanizm działania benzofenonów na proces spermatogenezy nie został jeszcze wyjaśniony. W badaniach *in vivo* zaobserwowano korelację pomiędzy stężeniem BP-2 w moczu, a koncentracją plemników. Benzofenon-2 zmniejszał procent plemników poruszających się ruchem progresywnym oraz zwiększał liczbę niedojrzałych plemników (Buck Louis i wsp., 2015; Louis i wsp., 2014). Oprócz budowy i ruchliwości benzofenony, głównie BP-3 mogą wpływać na funkcję plemników poprzez aktywację kanałów jonowych dla  $Ca^{2+}$  (Catsper) i wpływ na wewnątrzkomórkowy stężenie tych jonów (Schiffer i wsp., 2014).

### **1.6 Wpływ BP-2 na poziom hormonów tarczycy**

Substancje chemiczne zaburzające gospodarkę hormonalną, w tym chemiczne filtry UV, oprócz wpływu na poziom hormonów płciowych, często zaburzają również funkcjonowanie tarczycy (Hofmann i wsp., 2009; Schmutzler i wsp., 2004). Pochodne benzofenonu należą do grupy związków o działaniu podobnym do naturalnych estrogenów. Toksyczny wpływ ksenoestrogenów zwykle nie dotyczy wpływu na jeden gruczoł wydzielania wewnętrznego, lecz częściej związki te zaburzają funkcję różnych gruczołów dokrewnych. Związki czynne endokrynnie mogą zaburzać homeostazę hormonów tarczycy poprzez oddziaływanie na ich syntezę, transport oraz metabolizm. Kluczowym enzymem w wytwarzaniu hormonów tarczycy jest peroksydaza tarczycowa (TPO), występująca w postaci dimeru w pęcherzykach tarczycy, która katalizuje utlenianie anionu jodkowego do jodu przy udziale nadtlenu wodoru. Utleniony jod dostaje się do pęcherzyków tarczycy, gdzie podlega wbudowywaniu do reszt tyrozolowych tyreoglobuliny. Powstanie jodotyrozyn (MIT - monojodotyrozyny oraz DIT - diiodotyrozyny) oraz ich sprzężanie w triiodotyroninę (T3) i tetrajodotyroninę (T4) jest katalizowane przez tyreoperoksydazę. Badania mechanizmu

działania benzofenonu-2 na funkcjonowanie tarczycy są głównie skoncentrowane na określaniu wpływu tego związku na aktywność peroksydazy tarczycowej, a więc na kluczowy etap organifikacji jodu (Krause i wsp., 2012; Schmutzler i wsp., 2007). W badaniach *in vitro* stwierdzono, że BP-2 hamuje aktywność TPO w obecności nadtlenu wodoru (Paul i wsp., 2014; Song i wsp., 2012). Przykładem podobnego działania jest genisteina która może być alternatywnym substratem do jodowania, przyłączać się do TPO i doprowadzać do jej inaktywacji (Divi i wsp., 1997). Ze względu na podobieństwo w budowie cząsteczki jest wysoce prawdopodobne, że BP-2 wykazuje podobny mechanizm hamowania TPO, ponieważ stwierdzono, że BP-2 nie powodował inaktywacji TPO komórek wykazujących silną ekspresję tego enzymu, jeśli w mieszaninie reakcyjnej obecny był również jod (Lee i wsp., 2018; Schmutzler i wsp., 2007). Wyniki te są ważne ze względu na możliwe wystąpienie niepożądanych działań EDC u ludzi z niedoborem jodu, zwiększonym zapotrzebowaniem na jod jak kobiety w ciąży oraz dzieci lub przy nadmiarze jodu (Schmutzler i wsp., 2007). Prawidłowe stężenie jodu w organizmie jest konieczne do wytwarzania hormonów oraz warunkuje prawidłowe funkcjonowanie tarczycy. Zaobserwowano, że wzrost spożycia jodu w diecie ludzi zamieszkujących USA koreluje ze wzrostem chorób tarczycy o podłożu autoimmunologicznym. U osób podatnych genetycznie na zapalenie tarczycy, nadmiar jodu zapoczątkowuje i przyspiesza proces autoagresji (Rose i wsp., 2002). Dodatkowo, jodowanie tyreoglobuliny jest związane ze wzrostem jej immunoreaktywności (Papanastasiou i wsp., 2007). Wystąpienie przeciwciał przeciw peroksydazie tarczycowej (anty-TPO) oraz przeciw tyreoglobulinie silnie koreluje z występowaniem chorób tarczycy o podłożu autoimmunologicznym. Przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej są wykrywane prawie u wszystkich pacjentów z chorobą Hashimoto, u 75% chorych na Gravesa- Basedowa oraz 2/3 pacjentek z zapaleniem tarczycy po porodzie (Fröhlich i Wahl, 2017). Choroby te mogą objawiać się zarówno niedoczynnością jak i nadczynnością tarczycy (Ross i wsp., 2016; Siriwardhane i wsp., 2018).

Badania przeprowadzone na liniach komórkowych przysadki mózgowej (GH3), pęcherzyka tarczycowego (FRTL-5) oraz na zarodkach *Danio rerio* wykazały wpływ pochodnych benzofenonów na ekspresję genów receptorów hormonów tarczycy i TSH. Benzofenony, w tym najlepiej zbadany BP-3 i jego metabolit BP-1 zmniejszały ekspresję genów podjednostki  $\beta$  cząsteczki TSH (TSH $\beta$ ), receptora dla tyreoliberyny (TRH-R) i receptora  $\beta$  dla hormonów tarczycy (TR $\beta$ ) oraz genu kodującego peroksydazę tarczycową w linii komórkowej przysadki mózgowej. Natomiast zarodki *Danio rerio* wykazywały

obniżenie poziomu hormonów tarczycy (T3 oraz T4), a także wzrost ekspresji genów kodujących izoformę 1 dejodynazy jodotyroninowej (dio1) oraz glukuronylotransferazy urydynodifosforanu (UGT1ab), co może świadczyć o wpływie benzofenonów na metabolizm hormonów tarczycy (Lee i wsp., 2018).

Nieliczne dane wskazują, że również BP-2 może hamować syntezę lub uwalnianie hormonów tarczycy (Schmutzler i wsp., 2007). Dotychczas zmiany poziomu hormonów tarczycy określono tylko u samic szczurów z usuniętymi jajnikami, tak więc w modelu, w którym wpływ hormonów płciowych został wyeliminowany oraz po podaniu doustnym czyli w warunkach szybkiej eliminacji z krwi benzofenonu-2 (Jarry i wsp., 2004; Schmutzler i wsp., 2007; Seidlová-Wuttke i wsp., 2005). U ludzi stwierdzono, że stężenie benzofenonów w moczu koreluje z obniżonym poziomem całkowitego T4 u mężczyzn oraz obniżonym poziomem T4 zarówno całkowitego jak i wolnego u kobiet (Kim i wsp., 2017). Ponadto, u kobiet w ciąży narażonych na działanie BP-3 wykazano obniżony poziom fT3 (Aker i wsp., 2016; Berger i wsp., 2018).

### **1.7 Działanie benzofenonów na komórki centralnego systemu nerwowego**

Komórki ośrodkowego układu nerwowego, a zwłaszcza neurony, są szczególnie podatne na uszkodzenia. Zmiany morfologiczne oraz funkcjonalne neuronów mogą być wywołane czy nasilane przez związki egzogenne. Mechanizmy molekularne prowadzące do neurodegeneracji nie są jeszcze w pełni poznane, jednakże wykazano, że kluczową rolę w inicjowaniu śmierci neuronów odgrywają: nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu (ROS), aktywacja komórek immunologicznych OUN – mikrogleju, ekscytotoksyczność związana z nadmiernym działaniem glutaminianu oraz hamowanie neuroprotekcyjnych efektów hormonów: estrogenów, progesteronu i hormonów tarczycy. Związki egzogenne mogą obniżać i tak niski poziom enzymów antyoksydacyjnych w mózgu, co w efekcie prowadzi do wystąpienia czy nasilenia zmian apoptotycznych, które mogą pojawiać się wiele lat przed objawami klinicznymi chorób neurodegeneracyjnych. Ksenobiotyki, które w krótkim czasie nie powodują istotnych zmian w OUN, w dłuższym okresie czasu mogą zaburzać funkcjonowanie komórek i mechanizmów neuroprotekcji, a w konsekwencji prowadzić do inicjacji lub nasilenia procesów patologicznych. Stwierdzono, że jednym z pierwszych czynników zaangażowanych w powstawanie chorób neurodegeneracyjnych może być stres oksydacyjny (Garza-Lombo i wsp., 2018; Ray i wsp., 2012). Nadmierne powstawanie reaktywnych form tlenu może wynikać z zaburzeń funkcji mitochondriów, uszkodzenia łańcucha oddechowego, wysokiego

poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia oraz nadmiernej aktywności cyklooksyzgenazy (COX), syntetazy tlenku azotu (NOS) czy oksydazy ksantynowej (Agnihotri i Aruoma, 2020). Zwiększony poziom ROS przy niedostatecznym działaniu endogennych mechanizmów antyoksydacyjnych prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego i w efekcie może dochodzić do uszkodzeń DNA, białek i lipidów. Utlenienie lipidów w błonach komórkowych prowadzi do powstawania toksycznych produktów m.in. dialdehydu malonowego (MDA) oraz 4-hydroksynonenalu. Innym, ważnym mechanizmem prowadzącym do neurodegeneracji jest ekscytotoksyczność, definiowana jako uszkodzenie i śmierć neuronów z powodu nadmiernej lub długotrwałej ekspozycji na aminokwasy pobudzające, głównie glutaminian. Zwiększone uwalnianie i / lub zmniejszony wychwyt glutaminianu ze szczeliny synaptycznej powoduje nadmierną stymulację jego receptorów, głównie receptora jonotropowego NMDA i nadmierny napływ jonów wapnia do wnętrza komórki prowadzący do uszkodzenia neuronów (Gregory i wsp., 2020; Muddapu i wsp., 2019). Istotnym mechanizmem prowadzącym do uszkodzenia neuronów jest także nadmierna aktywacja komórek mikrogleju i nasilanie syntezy cytokin prozapalnych. Mechanizmy te prowadzą do śmierci komórek, zaburzenia uwalniania neuroprzebieżników, a w efekcie do manifestacji objawów choroby. Główną przyczyną śmierci neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych jest proces apoptozy.

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki jest procesem aktywnym, wymagającym dostarczenia ATP. W procesie tym dochodzi do obkurczenia komórki, skondensowania chromatyny, fragmentacji DNA oraz wytworzenia tzw. ciałek apoptotycznych, które następnie ulegają fagocytozie i nie dochodzi do powstania stanu zapalnego. Indukcja apoptozy może zachodzić poprzez różne szlaki biochemiczne: wewnątrzpochodny (mitochondrialny) lub zewnątrzpochodny (receptorowy). Aktywacja procesu na drodze receptorowej jest związana z pobudzeniem przez specyficzne ligandy (hormony, cytokiny, ksenobiotyki) receptorów z rodziny TNF zawierających w części wewnątrzkomórkowej domenę śmierci. Po połączeniu liganda z receptorem dochodzi do aktywacji białka adaptorowego, wytworzenia kompleksu i aktywacji prokaspazy-8 lub prokaspazy-10 (kaspazy inicjatorowych), które z kolei aktywują kaspazy efektorowe (Franklin, 2011). Aktywacja szlaku receptorowego może także przez białko tBid, które oddziałuje z mitochondrium indukować czy wzmacniać, proces apoptozy zainicjowany drogą mitochondrialną. Mitochondrialny szlak apoptozy aktywowany może być przez wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie, stres oksydacyjny, zaburzenia elektrolitowe czy uszkodzenia DNA. W wyniku interakcji pomiędzy białkami z rodziny Bcl-2 (proapoptotycznymi

i antyapoptotycznymi) w błonie mitochondriów dochodzi do utworzenia kanałów przez które uwalniane są czynniki apoptotyczne. W przypadku uszkodzeń DNA kluczowym czynnikiem jest białko p53, które przemieszcza się z cytoplazmy do mitochondrium, gdzie łączy się z białkami anty-apoptotycznymi (Bcl-2 oraz Bcl-xL), powodując ich unieczynnienie oraz wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych. W wyniku otwarcia megakanałów mitochondrialnych dochodzi do uwolnienia z mitochondriów cytochromu c, który łączy się z białkowym czynnikiem Apaf-1 oraz prokaspazą-9, tworząc apoptosom. W apoptosomie dochodzi do aktywacji kaspazy inicjatorowej - kaspazy -9, która aktywuje kaspazy efektorowe (Franklin, 2011). W proces apoptozy są zaangażowane również kinazy MAP (MAPK), będące białkowymi kinazami serynowo-treoninowymi, które regulują wiele procesów fizjologicznych takich jak: ekspresja genów, metabolizm, różnicowanie oraz podziały komórkowe, a także odpowiedź na stres, przeżycie lub apoptozę komórek (Plotnikov i wsp., 2011). Kinazy MAP są odpowiedzialne za przekazywanie licznych bodźców zewnątrzkomórkowych. W konsekwencji MAPK są zdolne do fosforylowania i zmiany aktywności niezliczonych substratów w różnych strukturach komórkowych. Substraty MAPK znaleziono nie tylko w cytoplazmie, ale także w mitochondriach, aparacie Golgiego, retikulum endoplazmatycznym i jądrze (Yao i Seger, 2009; Yoon i Seger, 2006). Ze względu na pełnione liczne funkcje komórkowe, odgrywają również istotną rolę w patogenezie wielu chorób. Badania sugerują, że mogą się przyczyniać do związanych z chorobą Parkinsona procesów patologicznych, takich jak stres oksydacyjny, zapalenie nerwów, autofagia i śmierć neuronów. Przykładem może być p38 -MAPK, która odgrywa ważną rolę w apoptozie neuronów, poprzez fosforylację białek z rodziny Bcl-2 (De Chiara i wsp., 2006). Pobudzenie szlaku p38 MAPK w neuronach dopaminergicznych może prowadzić do niekontrolowanej aktywacji apoptozy, obserwowanej w modelach komórkowych oraz zwierzęcych choroby Parkinsona (Choi i wsp., 2004; Jiang i wsp., 2014). Niezależnie od sposobu zapoczątkowania apoptozy, w procesie tym dochodzi do aktywacji kaskady kaspaz poprzez wzbudzenie kaspaz inicjatorowych (kaspaza -8, -9), które pobudzają kaspazy wykonawcze (kaspaza-3) (Rudnicka i wsp. 2011; Przybylski i wsp. 2013).

Pochodne benzofenonu jako związki o budowie predysponującej do kumulacji w tkance tłuszczowej oraz przechodzenia przez barierę krew-mózg mogą oddziaływać na neurony. Badania *in vitro* przeprowadzone na pierwotnych hodowlach komórek nerwowych hipokampa oraz kory mózgowej myszy wykazały neurotoksyczne działanie benzofenonu-3. Mechanizm indukcji apoptozy przez ten związek wynika z obniżania potencjału błony mitochondrialnej, aktywacji kaspaz-9 i -3, kinaz aktywowanych mitogenami (p38) oraz kinazy syntazy

glikogenu 3 (Gsk3 $\beta$ ). Stwierdzono także, że działanie BP-3 na komórki mózgu w badaniach *in vitro* zależy od badanej struktury mózgu oraz czasu działania (Wnuk i wsp., 2018a). Nieliczne badania *ex vivo* także wskazują na neurotoksyczne działanie BP-3, ponieważ stwierdzono, że związek ten aktywuje proces apoptozy, indukuje zmiany epigenetycznych w genach regulujących procesy neurodegeneracji/neuroprotekcji oraz wywołuje zmiany w poziomach receptorów estrogenowych. Wykazano, że BP-3 podawany ciężarnym myszom podskórnie w dawce 50 mg/kg wywołuje aktywację kaspazy-3, nasila uwalnianie z komórek dehydrogenazy mleczanowej (LDH), a także obniża potencjał błony mitochondrialnej oraz zwiększa ekspresję genów białka Bax oraz kaspazy-3 w komórkach kory mózgowej embrionów (Wnuk i wsp., 2018a). Jednym z mechanizmów prowadzących do nasilenia procesów apoptozy neuronów zwierząt narażonych na działanie BP-3 w okresie prenatalnym, może być obniżenie całkowitej aktywności antyoksydacyjnej. Nadmierne powstawanie wolnych rodników i ich oddziaływanie na wielonienasycone kwasy tłuszczowe błon komórkowych prowadzi do zwiększenia peroksydacji lipidów oraz nasilenia stresu oksydacyjnego (Pomierny i wsp., 2019). Innym, ważnym mechanizmem neurotoksycznego działania BP-3 jest wpływ na poziom glutaminianu, a w konsekwencji wywołanie zjawiska ekscytotoksyczności. BP-3 podawany ciężarnym samicom szczurów oraz ich potomstwu zwiększa stężenie zewnątrzkomórkowego glutaminianu w hipokampie oraz korze czołowej oraz zmienia ekspresję transporterów glutaminianu (Pomierny i wsp. 2019). Wzrost poziomu zewnątrzkomórkowego glutaminianu, najprawdopodobniej wywołany zmianami w ekspresji transporterów glutaminianu GLT-1 i xCT, może być więc istotnym mechanizmem wywoływania przez BP-3 uszkodzeń neuronów.

Oprócz działania neurotoksycznego, benzofenony mogą zaburzać działanie protekcyjne hormonów płciowych oraz hormonów tarczycy. W okresie prenatalnym komórki nerwowe są najbardziej wrażliwe na działanie ksenobiotyków, ponieważ w tym okresie proliferacja, różnicowanie, migracja neuronów, synaptogeneza i mielinizacja są najbardziej intensywne (Li i wsp., 2014; Lien i wsp., 2015). Nieliczne na razie dane wskazują, że benzofenony mogą hamować syntezę hormonów tarczycy, hormonów które nie tylko odgrywają istotną rolę w rozwoju mózgu a także są niezbędne dla prawidłowej funkcji komórek nerwowych u dorosłych (Schmutzler i wsp., 2007). Trójiodotyronina regulując ekspresję genów kodujących czynniki wzrostu i czynniki transkrypcyjne, zmniejsza proliferację, a pobudza różnicowanie komórek. Z kolei tyroksyna znacząco wpływa na migrację neuronów. W wyniku zaburzenia poziomu hormonów tarczycy w okresie płodowym może dojść do upośledzenia funkcji mózgu. Przez długi czas uważano, że w przeciwieństwie do okresu rozwojowego, geny regulowane



przez hormony tarczycy w centralnym systemie nerwowym są już niewrażliwe na działanie tych hormonów u dorosłych. Obecne badania wskazują, że nawet w dorosłym mózgu niedobór hormonów tarczycy upośledza niektóre funkcje (nastrój, pamięć i procesy uczenia się) i prawdopodobnie wynika to z ich wpływu na procesy metaboliczne i wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału (Vallortigara i wsp., 2009). W procesie prawidłowej neurogenezy uczestniczą receptory hormonów tarczycy, ale także receptory hormonów płciowych. Przykładem może być nieprawidłowy rozwój mózgu obserwowany u myszy pozbawionych receptora ER $\beta$ . Estrogeny pobudzają proliferację astrogleju i macierzystych komórek nerwowych, sprzyjają przeżywalności neuronów. Wpływają również na plastyczność synaptyczną poprzez stymulację tzw. kolców dendrytycznych oraz receptorów ER $\alpha$  występujących w błonach synaptycznych (Kajta i wsp., 2013). Hormony płciowe nie tylko regulują rozwój i funkcje komórek układu nerwowego w okresie rozwojowym, lecz także wpływają na komórki OUN u dorosłych osobników. Estrogeny wywierają działanie neuroprotektcyjne poprzez oddziaływanie z jądrowymi receptorami ER oraz z receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), które pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych (Chu i wsp., 2014). Regulują geny ważne w różnicowaniu komórek i procesach metabolicznych, zwłaszcza w metabolizmie lipidów i glukozy (Derosa i wsp., 2018). Agoniści PPAR $\gamma$  zastosowani w mysich modelach chorób neurodegeneracyjnych powodują zmniejszenie zmian neurodegeneracyjnych (Feinstein i wsp., 2002), a także wpływają pozytywnie na efekty wywoływane udarem niedokrwinnym mózgu (Villapol i wsp., 2012). Jednocześnie badania aktywacji PPAR $\gamma$  wykazały ich ochronny wpływ na parametry stresu oksydacyjnego, dysfunkcję mitochondriów i apoptozę w chorobie Alzheimerza (AD), chorobie Huntingtona (HD) oraz stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS) (Quintanilla i wsp., 2014).

Egzogenne związki hormonalnie czynne zaburzając funkcję estrogenów, mogą nasilać proces apoptozy. Doniesienia literaturowe wskazują jako główny mechanizm działania benzofenonów, wpływ na ekspresję receptorów hormonów płciowych. Stwierdzono, że ekspozycja ciężarnych myszy na BP-3 obniża ekspresję ER $\alpha$  i ER $\beta$ , przy jednoczesnym wzroście ekspresji GPR30. Dodatkowo, BP-3 hamuje metylację DNA, w szczególności genów GPR30 i Bax, czemu towarzyszy zwiększony poziom ekspresji mRNA i białka. Ponadto BP-3 powoduje hipermetylację genów ER $\alpha$ , ER $\beta$  i Bcl-2, co w efekcie obniża poziom białka receptorów estrogenowych i białek anty-apoptotycznych. Ekspozycja na działanie BP-3 powoduje również zmiany poziomu ekspresji mRNA oraz białka receptorów PPAR $\gamma$ . Indukcja

apoptozy komórek neuronalnych narażonych na działanie BP-3 zachodzi w wyniku zmniejszenia ekspresji ER $\alpha$  / PPAR $\gamma$  oraz stymulacji sygnalizacji ER $\beta$  / GPR30 (Wnuk i wsp., 2018b). Do receptorów regulujących proces apoptozy należą również receptory retinoidowe X (RXR), które występują we wszystkich komórkach organizmu. Odgrywają kluczową rolę poprzez oddziaływanie z receptorami jądrowymi tworząc m.in. heterodimery z PPAR $\gamma$ . Mogą również tworzyć homodimery RXR, które w obecności selektywnego agonisty regulują ekspresję genów, zwiększając proliferację komórek lub indukując apoptozę (Wagner i wsp., 2017). Stwierdzono, że BP-3 może wpływać na proliferację neuronów za pośrednictwem receptorów retinoidowych X i poprzez stymulację receptorów RXR $\alpha$  oraz hamowanie sygnalizacji RXR $\beta$  / RXR $\gamma$  powodować zaburzenia proliferacji neuronów (Wnuk i wsp., 2018b). Należy zaznaczyć, że wpływ na poziom receptorów estrogenowych, a w konsekwencji na ekspresję genów zależnych od ER, ma również aktywacja receptorów węglowodorów aromatycznych (AhR). BP-3 znacząco zwiększa poziom AhR w cytoplazmie komórek kory czołowej, chociaż nie wywiera takiego wpływu na zawartość tego receptora w hipokampie. Obserwowana po narażeniu na BP-3 indukcja mitochondrialnego szlaku apoptozy w korze czołowej szczura może więc wynikać także z osłabienia neuroprotekcijnego działania estrogenów lub nasilenia ekspresji czy funkcji AhR (Pomierny i wsp., 2019).

## 2. Cel pracy

Zwiększające się narażenie człowieka na związki hormonalnie czynne, w tym na benzofenon-2 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. Efekty działania BP-2 są dotychczas 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* określano potencjalne, cytotoksyczne i pro-apoptotyczne działania BP-2 w linii komórkowej ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y. W badaniach *ex vivo*, po 4 tygodniowym, naskórnym podawaniu BP-2 samcom szczura, oznaczano poziom tego związku w strukturach mózgu oraz wybranych tkankach obwodowych. 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 oraz procesu apoptozy, czyli procesów leżących u podstaw chorób neurodegeneracyjnych.

BP-2, jako związek zaburzający funkcje endokrynne może także wpływać na powiązany z układem hormonalnym układ immunologiczny, dlatego kolejnym celem obecnych badań było określenie wpływu tego związku na wybrane funkcje układu immunologicznego.

Ponieważ wiadomo, 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, hormonów płciowych i gonadotropin we krwi oraz ekspresję receptorów estrogenowych ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , GPR-30), androgenowych (AR) i progesteronowych (PR) w podwzgórz.

Dane literaturowe sugerują, że narażenie na związki hormonalnie czynne, w coraz większym stężeniu występujące obecnie w środowisku, jest odpowiedzialne za obniżającą się płodność u mężczyzn. Celem określenia wpływu BP-2 na funkcję jąder określano liczbę, ruchliwość i morfologię plemników oraz poziom testosteronu.

## 3. Metodyka

Działanie benzofenonu-2 zostało ocenione w badaniach zarówno *in vitro* jak i *ex vivo*. Pierwszym etapem eksperymentu było badanie *in vitro* mające na celu ocenę wpływu BP-2 na komórki ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y). Następnie przeprowadzono badania *ex vivo* na samcach szczurów rasy Wistar oceniające poziom BP-2 w poszczególnych tkankach oraz skutki oddziaływania badanego związku na wybrane układy organizmu (hormonalny, immunologiczny, OUN, rozrodczy).

### 3.1 Materiały i odczynniki

Zastosowany w badaniach benzofenon-2 został zakupiony w firmie Sigma-Aldrich (2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone, CAS nr 131-55-5). W celu przygotowania roztworów, BP-2 rozpuszczono w mieszaninie etanolu i wody (1:3), następnie roztwory filtrowano przez jałowe filtry strzykawkowe i przechowywano w temperaturze -20°C.

W celu przygotowania maści aplikowanej zwierzętom, zostało wykorzystane podłoże Hascobaza (Hasco-Lek S.A, Polska), które było przechowywane w temperaturze pokojowej.

Metanol, heptan, octan etylu (czystość LC/MS) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), natomiast lodowaty kwas octowy pochodził z firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska).

### 3.2 Badania *in vitro*

Zwiększona śmiertelność neuronów związana z procesami nekrozy i/lub apoptozy jest jedną z głównych przyczyn chorób neurodegeneracyjnych. Dlatego też w badaniach *in vitro* określano cytotoksyczne i/lub proapoptotyczne efekty benzofenonu-2 na komórki ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y). Potencjalny mechanizm cytotoksyczny został oceniony poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w pożywce hodowlanej oraz badanie żywotności komórek SH-SY5Y, metodą redukcji MTT. Działanie proapoptotyczne benzofenonu-2 zostało określone poprzez ocenę aktywności kluczowego enzymu apoptozy, jakim jest kaspaza-3. Zmiany zachodzące w komórkach apoptotycznych takie jak: kondensacja jąder i obkurczanie komórek, zostały określone w preparatach barwionych metodą Hoescht`a.

### **3.2.1 Hodowla komórek ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y)**

Do badań wykorzystano komórki linii SH-SY5Y (ludzka neuroblastoma), które zakupiono w firmie American Type Culture Corporation (ATCC). Hodowla komórkowa była prowadzona w butelkach o powierzchni 75 cm<sup>2</sup>, w pożywce hodowlanej DMEM Glutamax (LifeTechnologies, USA) z dodatkiem 10 % inaktywowanej surowicy bydlęcej (Foetal Bovine Serum, LifeTechnologies, USA), streptomycyny (100 µg/ml, Sigma Aldrich, USA) i penicyliny (100 U/ml, Sigma Aldrich, USA). Komórki SH-SY5Y hodowano w warunkach wysokiej wilgotności, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>/ 95% O<sub>2</sub> oraz w temperaturze 37°C. Po uzyskaniu konfluencji komórki były pasażowane i wysiewane na 96-dołkowe płytki w celu przeprowadzenia wybranych testów biochemicznych. W przypadku barwienia Hoescht komórki były wysiewane na Millicell EZ slide (Millipore). Wszystkie czynności były prowadzone w warunkach jałowych z zastosowaniem komory laminarnej, jałowych narzędzi laboratoryjnych oraz inkubatora CO<sub>2</sub>.

Do przeprowadzenia testu żywotności oraz testu cytotoksyczności komórki SH-SY5Y wysiewano na 96 dołkowe płytki w liczbie 40 000/dołek. Celem oceny aktywności kaspazy-3, koncentracja komórek wynosiła 80 000/dołek. Po 24 godzinach od wysiania, pożywkę hodowlaną zmieniano na pożywkę (190 µl) zawierającą zmniejszoną do 1% surowicę bydlęcą. W celu wykonania testu LDH oraz testu redukcji MTT dodawano 10 µl roztworu benzofenonu-2 w zakresie stężeń końcowych od 10<sup>-4</sup> do 10<sup>-8</sup> M. Taki sam zakres stężeń BP-2 zastosowano do oceny aktywności kaspazy-3. W barwieniu Hoechst oceniano zmiany apoptotyczne zachodzące w neuronach pod wpływem działania benzofenonu-2 w stężeniach 10<sup>-8</sup> oraz 10<sup>-7</sup>M.

### **3.2.2 Badanie wpływu benzofenonu-2 na żywotność neuronów**

Wpływ BP-2 na żywotność komórek mierzono po 24 - i 72 - godzinnej ekspozycji na badany związek, określając zdolność komórek do przekształcania 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylo tetrazoliny (MTT) do nierozpuszczalnych kryształów formazanu. Reakcja redukcji MTT jest zależna od aktywności enzymów mitochondrialnych, głównie dehydrogenaz i jest możliwa w żywych i aktywnych metabolicznie komórkach. Po 24- lub 72- godzinnej ekspozycji komórek na działanie benzofenonu-2 pożywkę hodowlaną zastąpiono 190 µl DMEM'u (zawierający 1% surowicę bydlęcą oraz standardowe ilości antybiotyków) oraz 10 µl roztworu MTT, który przygotowano w PBS i dodano w stężeniu 0,15 mg/ml. Komórki SH-SY5Y inkubowano przez 2h w temperaturze 37°C, następnie powstałe kryształy formazanu

rozpuszczono w 100  $\mu$ l DMSO i mierzono absorbancję każdej próbki przy długości fali 570 nm w czytniku płytek Multiscan (Labsystem, USA). Wyniki przedstawiono jako procent kontroli, a za 100% przyjęto absorbancję z hodowli komórek inkubowanych wyłącznie z rozpuszczalnikiem.

### **3.2.3 Badanie cytotoksycznego działania benzofenonu-2**

Cytotoksyczne działanie benzofenonu-2 było oznaczane poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), uwalnianej z uszkodzonych komórek do pożywki hodowlanej po 24- lub 72-godzinnym narażeniu na działanie badanego związku. Śmierć lub uszkodzenie błony komórkowej powoduje wzrost aktywności LDH w pożywce hodowlanej. Aktywność LDH oznaczano stosując komercyjnie dostępny zestaw odczynników (Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Niemcy). Podstawą oznaczenia jest zredukowanie przez dehydrogenazę mleczanową substratu  $\text{NAD}^+$  do  $\text{NADH}^+/\text{H}^+$ . W wyniku reakcji dochodzi do utlenienia mleczanu do pirogronianu. Następnie dehydrogenaza  $\text{NADH}$  przenosi proton z  $\text{NADH}^+/\text{H}^+$  na sól tetrazolową redukując ją do barwnego (czerwonego) formazanu. Ilość powstającej barwnej soli formazanu jest proporcjonalna do aktywności dehydrogenazy mleczanowej, a zatem do ilości uszkodzonych komórek. Barwny produkt reakcji wykazuje maksymalną absorbancję przy długości fali 492 nm, przy której sól tetrazolowa nie wykazuje żadnej absorbancji.

Pożywkę hodowlaną w objętości 100  $\mu$ l pobierano z komórek, a następnie przenoszono na 96-dółkową płytkę. Do każdego dołka dodawano po 100  $\mu$ l odczynnika zawierającego mleczan,  $\text{NAD}^+$ , sól tetrazolową. Po 25 minutach inkubacji w ciemności i temperaturze 37°C dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 492 nm z odczytem referencyjnym przy 620 nm. Wyniki wyrażono, jako procent kontroli, a za 100 procent przyjęto aktywność LDH w pożywce pobranej z komórek kontrolnych zawierających wyłącznie rozpuszczalnik (mieszanina wody i etanolu). W tym teście zastosowano Triton XC, jako kontrolę pozytywną, ponieważ ten związek uszkadza wszystkie komórki.

### **3.2.4 Oznaczenie aktywności kaspazy-3**

Aktywność kaspazy-3 została zmierzona 24 godziny po dodaniu roztworów benzofenonu-2 w zakresie stężeń końcowych  $10^{-4}$  -  $10^{-8}$  M do hodowli komórek SH-SY5Y, metodą fluorometryczną z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu odczynników (Caspase-3 Activity Fluorometric Assay Kit, Sigma Aldrich, kat. CASP3F-1KT). Metoda opiera się na reakcji rozszczepienia substratu Ac-DEVD-AMC (acetylo-Asp-Val-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylokumaryna) przez enzym, aktywną kaspazę-3 do 7-amino-4-metylokumaryny

(AMC). Żółto-zielona fluorescencja wytwarzana przez wolny AMC jest proporcjonalna do aktywności kaspazy-3 obecnej w próbce.

Badane komórki poddano działaniu 25  $\mu$ l buforu lizującego (czas trwania lizy: 30 min, inkubacja na lodzie). Następnie inkubowano z Ac-DEVD-AMC (0,003  $\mu$ mola zawarte w 200  $\mu$ l) przez 90 min w temperaturze 30°C. W trakcie inkubacji z substratem dla kaspazy-3 dokonywano pomiaru fluorescencji za pomocą czytnika płytek fluorescencji (długości fali Ex/Em = 360/460 nm). Po odjęciu niespecyficznego fluorescencji, określonej w dołkach płytki zawierającej wyłącznie odczynnik bez obecności komórek, aktywność kaspazy-3 obliczono z krzywej wzorcowej, której zakres wynosił od 0,1  $\mu$ M do 6  $\mu$ M i wyrażono w pmol AMC / min / ml.

### **3.2.5 Barwienie Hoechst**

W celu wizualnej oceny zmian apoptotycznych, takich jak kondensacja jądra i obkurczenie komórek, neurony wybarwiano barwnikiem Hoechst (Hoechst 33342, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), jak opisano przez Leśkiewicz i wsp., 2008. Dwadzieścia cztery godziny po podaniu benzofenonu-2 w stężeniu  $10^{-7}$  i  $10^{-8}$  M lub staurosporyny (kontrola pozytywna) do hodowli, komórki utrwalano 4% paraformaldehydem przez 30 minut. Następnie eksponowano na działanie barwnika Hoechst 33342 (0,8  $\mu$ g/ml) również przez 30min. Hodowle płukano 3-krotnie 10mM PBS i suszono. Kondensację jądrową i obkurczanie się komórek oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Leica. Komórki z jasnymi, skondensowanymi lub pofragmentowanymi jądrami uznano za apoptotyczne. Liczono komórki apoptotyczne oraz wszystkie komórki znajdujące się w czterech polach widzenia w hodowlach z wybranymi stężeniami BP-2, rozpuszczalnikiem lub staurosporyną z trzech niezależnych doświadczeń. Wyniki przedstawiono jako procent komórek apoptotycznych w stosunku do całkowitej liczby komórek policzonych z 10 pól widzenia (min. 750 komórek).

## **3.3 Badania ex-vivo**

### **3.3.1 Zwierzęta**

Eksperymenty zostały przeprowadzone na samcach szczurów rasy Wistar o masie 250-280g pochodzących z hodowli Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. W trakcie hodowli oraz trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w plastikowych klatkach zaopatrzonych w ściółkę, po 5 szczurów na klatkę. Po podaniu maści zwierzęta przez godzinę przebywały pojedynczo w klatkach bez ściółki. Zwierzęta były hodowane w naturalnym cyklu dnia i nocy,

w temperaturze  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ze stałym dostępem do pożywienia (standardowa granulowana karma) i wody. Wszystkie procedury zostały przeprowadzone za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach (nr 135/2014 oraz 10/2017).

### **3.3.1.1 Schemat podawania**

Szczury podzielono losowo na dwie grupy po dziesięć zwierząt w każdej, pierwsza grupa otrzymała maść z benzofenonem-2, natomiast druga grupa dostawała maść z rozpuszczalnikiem. Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta były oswajane z badaczem przez codzienne branie do ręki (handling). W pierwszym dniu eksperymentu, sierść pomiędzy karkiem a łopatkami została ogolona. Procedurę powtarzano w trakcie eksperymentu, gdy tylko sierść zaczęła ponownie się pojawiać.

W celu wykonania maści, benzofenon-2 zwilżano małą ilością etanolu i rozpuszczano w oliwie. Następnie dodawano do podłoża Hascobase (Hasco-Lek, Polska) i wykonano maść przy zastosowaniu unguatora (GAKO 2100). Maść nakładano w dawce 100 mg/kg, dwa razy dziennie (8:00 i 17:00) przez okres 4 tygodni. Zwierzętom kontrolnym podawano Hascobazę z odpowiednią ilością etanolu i oliwy. Przed każdym nałożeniem maści skórę oczyszczano gazikiem zwilżonym wodą destylowaną. Następnie maść delikatnie nakładano i rozprowadzano cienko na ogolonej skórze. Masę ciała rejestrowano co tydzień i w dniu dekapitacji. Natychmiast po dekapitacji wyizolowano organy: mózg (wyodrębniono struktury), grasnicę, śledzionę, wątrobę, tkankę tłuszczową oraz jądra wraz z najądrzami. Jedno z jąder zamrażano w ciekłym azocie i sproszkowano, natomiast z najądrza drugiego jądra pobrano plemniki. Struktury mózgu, wątrobę i tkankę tłuszczową zamrażano bezpośrednio po izolacji a narządy limfatyczne (śledzionę i grasnicę) ważono i zakładano z nich hodowle. Krew pobierano do próbek zawierających heparynę i odwirowywano przy 1000 x g, w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  przez 15 minut. Pozyskane osocze oraz organy zamrażano i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.2 Oznaczenia hematologiczne**

Dzień przed dekapitacją pobierano krew z ogona do próbek zawierających heparynę. Natychmiast po zebraniu próbki krwi pełnej przeprowadzano analizę hematologiczną. Liczbę krwinek czerwonych (RBC), hematokryt (HCT), średnią objętość krwinek (MCV), stężenie hemoglobiny (HGB), średnie stężenie hemoglobiny w krwince (MCHC), średnią masę hemoglobiny (MCH) oraz liczbę leukocytów (WBC) i liczbę płytek krwi (PLT) określano za pomocą analizatora COBAS MICROS (Roche, Palo Alto, CA, USA).



### **3.3.3 Oznaczenie poziomu BP-2 – Analiza LC / MS**

#### **3.3.3.1 Odczynniki**

Jako standard wewnętrzny (IS) zastosowano metanolowy roztwór zawierający deuterową pochodną benzofenonu - benzofenon-d10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, CAS nr 2583) o stężeniu 25 µg/ml. Wszystkie roztwory wzorcowe przechowywano w ciemności w temperaturze -20°C.

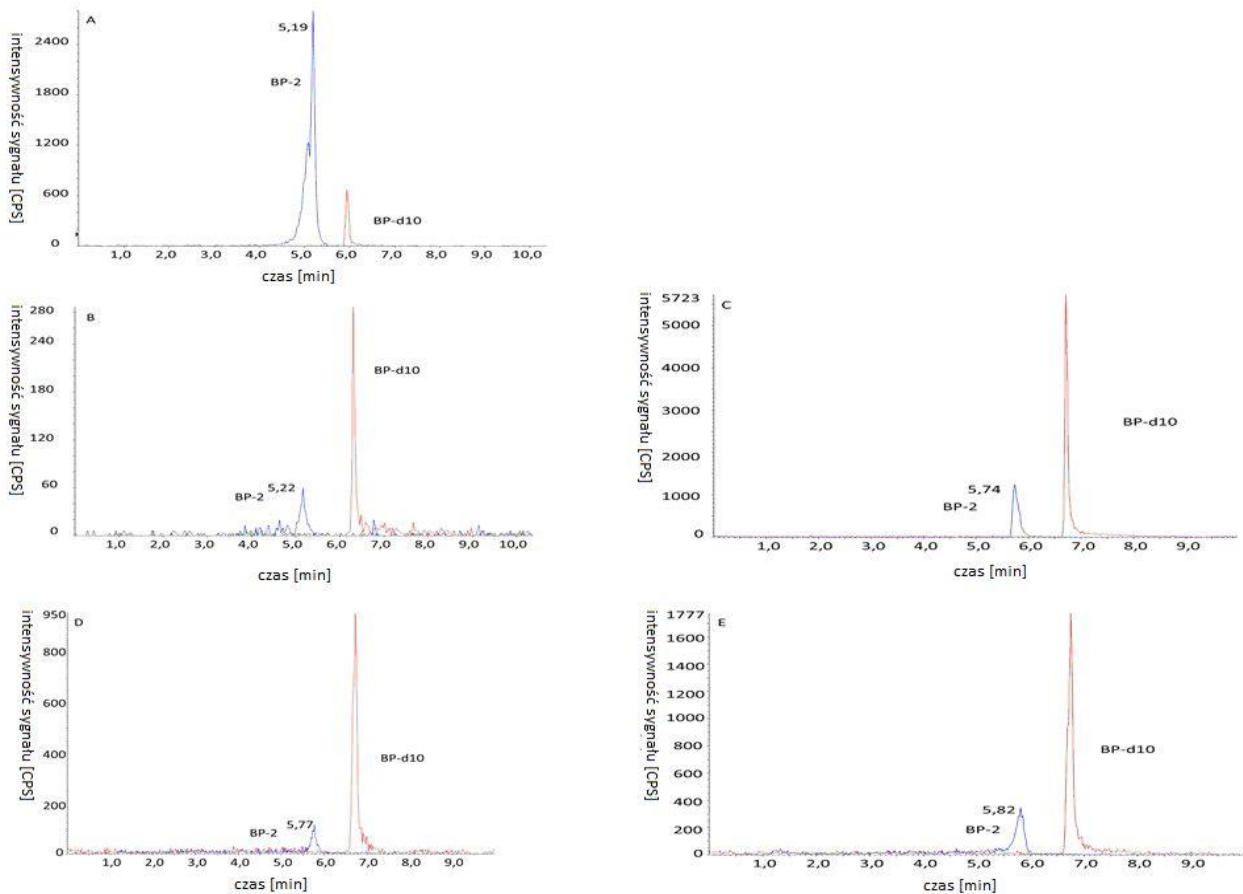
#### **3.3.3.2 Przygotowanie próbki**

Zamrożone tkanki odważano, następnie zostały rozmrożone w temperaturze pokojowej i zhomogenizowane w wodzie w proporcji 10 mg tkanki (wątroba, tkanka tłuszczowa) lub 20 mg tkanki (kora czołowa, hipokamp, mózdzek) na 200 µl wody. Osocze zmieszano z wodą w stosunku 1:1. Do próbek homogenatu lub rozcieńczonego osocza (200 µl) dodawano po 2 µl wzorca wewnętrznego oraz 200 µl wody. Następnie dodano 1,5ml mieszaniny heptanu i octanu etylu (1:1, v/v). Tak przygotowane próbki wytrząsano przez 10 minut a następnie wirowano przez 10 minut przy 4000 x g. Po zwirowaniu zebrano warstwę organiczną i odparowano do sucha w strumieniu azotu w 37°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 100 µl metanolu i poddano analizie chromatograficznej. Dodatkowo, w celu oceny poziomu całkowitego BP-2 (związek macierzysty i jego metabolity - glukuronian i siarczan) próbki poddano trawieniu enzymatycznemu. W tym celu wątrobę zhomogenizowano w 1 M buforze octanu amonu, pH 5,0 w proporcji 10 mg tkanki na 200 µl buforu. Osocze zmieszano z buforem 1 M octanu amonu w stosunku 1:1. Bezpośrednio przed inkubacją do wszystkich próbek dodano po 10 µl świeżo przygotowanych mieszanin enzymów (20 v/v% β-glukuronidazy i 20 v/v% sulfatazy rozpuszczonych w 1M buforze octanu amonu, pH 5,0) do 200 µl homogenatu. Próbkę zmieszano i inkubowano przez 6 godzin w łaźni wodnej. Reakcja enzymatyczna została zakończona przez zamrożenie w -80°C.

#### **3.3.3.3 Analiza metodą chromatografii ciekowej / spektrometrii mas**

Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w układzie HPLC, seria Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Niemcy), wyposażony w odgazowywacz, binarną pompę oraz autosampler. Do analizy wykorzystano kolumnę Xterra RP18 (Waters) (100mm x 3,0mm ID, wielkość cząstek 3,5 µm). Kolumna była termostatowana w temperaturze 30°C. Faza ruchoma składała się z 0,25% lodowatego kwasu octowego w wodzie (B) i metanolu (A). Rozdział chromatograficzny uzyskano stosując następujący program gradientowy: 0-1,5min, gradient

izokratyczny 40,0% (A); 1,5-2,5min, gradient liniowy 40,0-95,0% (A); 2,50-6,50min, gradient izokratyczny 95,0% (A); 6,5-8,0 minut, gradient liniowy 95,0-40,0% (A); 8,0-10,0min, gradient izokratyczny 40,0% (A). Szybkość przepływu wynosiła 0,4ml/min; objętość nastrzyku wynosiła 40 µl. Zastosowano detektor masowy API 2000 (Applied Biosystems MDS Sciex; Concord, Ontario, Canada) z jonizacją próbek metodą rozpylania (ESI). Analiza była prowadzona z wykorzystaniem jonizacji dodatniej. Parametry źródła jonów były następujące: napięcie źródła jonów (IS): 5000 V; gaz rozpylający (gaz 1): 20psi; gaz turbo (gaz 2): 10psi; temperatura źródła jonów (TEM): 250 °C; gaz osłonowy (CUR): 20 psi. Jako zasłonę i gaz kolizyjny zastosowano azot (99,9%) z piku NM20ZA. Parametry detektora dla BP-2 i BP-d10 były następujące: potencjał rozproszenia (DP): 8 V; potencjał ogniskowania (FP): 380 V; potencjał wejściowy (EP): 10 V; potencjał wejściowy komórki kolizyjnej (CEP): 13 V; potencjał wyjścia komórki kolizji (CXP): odpowiednio 18 V. Analizę ilościową wykonano w trybie MRM (monitorowanie wybranych reakcji). Monitorowano następujące pary jonów o następujących wartościach m / z: 247,0 / 137,1 dla BP-2 i 193,0 / 110,0 dla BP-d10. Uzyskane chromatogramy opracowano przy użyciu programu Analyst 1.6 (Perlan Technologies) (Rycina 1). Stężenia BP-2 w badanych tkankach obliczono za pomocą krzywej kalibracji, wykonanej z materiału biologicznego nie poddanego eksperymentowi.



*Rycina 1. Reprezentatywne chromatogramy: wybranego, przykładowego stężenia BP-2 (A); zawartości BP-2 w surowicy szczurów traktowanych benzofenonem-2 bez (B) i po (C) hydrolizie enzymatycznej oraz zawartości BP-2 w wątrobie bez (D) i po (E) hydrolizie enzymatycznej.*

### 3.3.4 Oznaczenie poziomu hormonów we krwi i testosteronu całkowitego w jądrach

#### 3.3.4.1 Przygotowanie tkanek do oznaczeń

Do oznaczenia wykorzystano osocze (plazmę). Krew pobrano do próbek zawierających heparynę, wirowano przez 15 minut w 1000 x g w temperaturze 4°C a uzyskane osocze podzielono i przechowywano w temp -80°C.

Do oznaczenia poziomu testosteronu całkowitego w jądrach wykorzystano nadsącz, przygotowany według dołączonych do zestawu instrukcji producenta. 100 mg tkanki homogenizowano w 1 ml PBS 1X i przechowywano przez całą noc w temperaturze -20°C. W celu uszkodzenia błon komórkowych przeprowadzono 2 cykle zamrażania i odmrażania, a następnie homogenaty wirowano przez 5 min. w 5000 x g w temp. 2°C. Nadsącze zostały podzielone do kilku próbek i przechowywane w temperaturze -80°C.

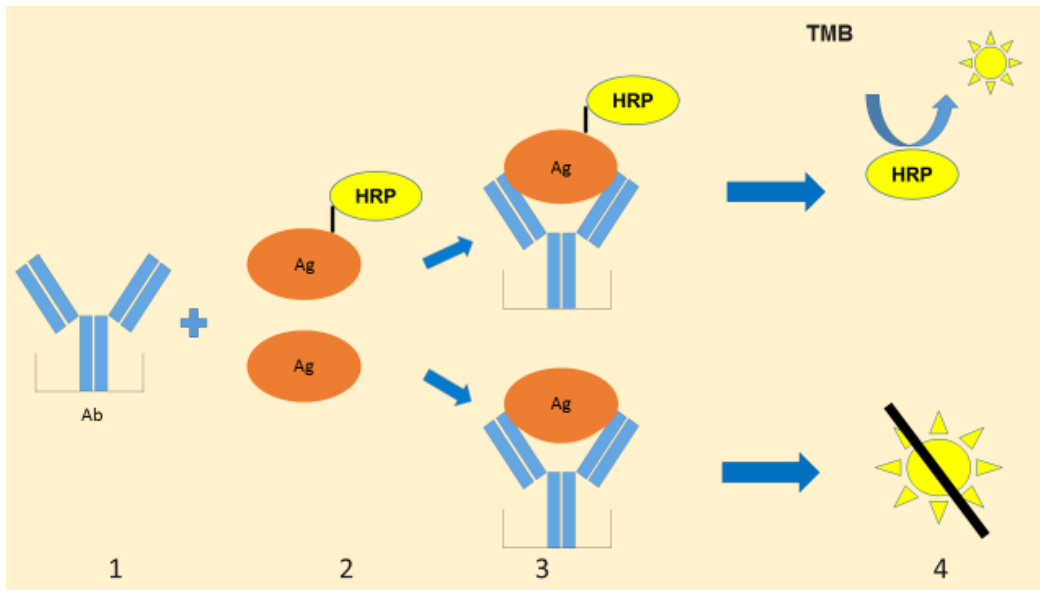
### 3.3.4.2 Metoda ELISA kompetycyjna

#### Zasada oznaczenia:

Stężenia wybranych hormonów były oznaczone metodą ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Test immunoenzymatyczny został przeprowadzony w 96-dołkowych płytkach zgodnie z instrukcją producenta. Zasada metody została przedstawiona na Rycinie 2.

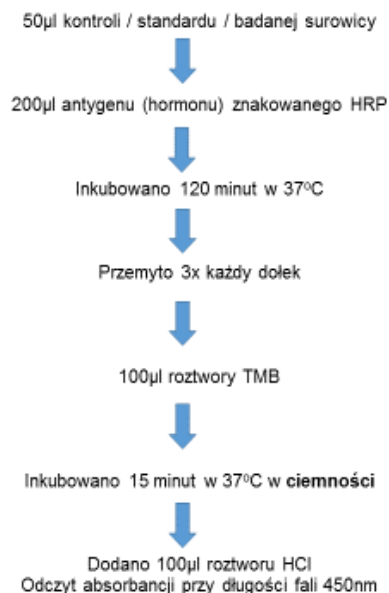
Wykonanie Do każdej studzienki opłaszczonej przeciwciałem przeciwko wybranemu hormonowi dodawano 25 µl osocza / wzorca / kontroli, a następnie dodano po 200 µl hormonu znakowanego peroksydazą chrzanową. Po 2 godzinnej inkubacji w ciemności, wypłukano nadmiar hormonu znakowanego peroksydazą chrzanową. Dodano roztwór 100 µl TMB i inkubowano przez 30 minut. Reakcję katalizowaną przez HRP zatrzymano poprzez dodanie 100 µl roztworu HCl. Poziom hormonu jest odwrotnie proporcjonalny do uzyskanego zabarwienia. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm i fali referencyjnej 620 nm. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej 4-parametrowej logistycznej (4-PL). Poziom badanych hormonów był oznaczony w podwójnych powtórzeniach. Intensywność uzyskanej reakcji barwnej była odwrotnie proporcjonalna do stężenia badanego hormonu zawartego w osoczu.

Pomiar stężenia testosteronu całkowitego oraz frakcji wolnej, progesteronu, prolaktyny, hormonu luteinizującego, 17β-estradolu oraz hormonów tarczycy (fT3 i fT4) przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną na Rycinie 3.



Rycina 2. Zasada oznaczenia metodą ELISA kompetycyjną: 1- studzienki opłaszczane przeciwciałami (Ab) przeciwko wybranemu antygenowi (Ag), 2- dodanie osocza zawierającego Ag oraz dodanie wystandaryzowanego antygeny sprzężonego z peroksydazą chrzanową (Ag-HRP), 3- dodanie substratu czyli 3,3',5,5'-Tetrametylobenzydyny (TMB), 4- dodanie odczynnika zatrzymującego reakcję

Do płytki pokrytej przeciwciałem dodawano:



Rycina 3. Procedura wykonania oznaczenia stężenia hormonów metodą ELISA kompetycyjną z zastosowaniem dostępnych komercyjnie zestawów odczynników firmy Cusabio.

#### **3.3.4.2.1 Oznaczenie poziomu testosteronu w surowicy**

Pomiar stężenia testosteronu całkowitego w osoczu krwi oraz nadsączu uzyskanym z jąder został przeprowadzony z wykorzystaniem zestawu odczynników firmy Cusabio (CSB-E05100r). Czulość testu wynosiła 0,06 ng/ml, wewnętrzny oraz zewnętrzny współczynnik zmienności wynosił mniej niż 15%, a zastosowane przeciwciało nie wykazywało istotnych reakcji krzyżowych ze związkami pokrewnymi. Wszystkie etapy oznaczenia przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną na Rycinie 3. Krzywa wzorcowa została przygotowana od 0.13 do 25,6 ng/ml.

#### **3.3.4.2.2 Oznaczenie poziomu testosteronu – frakcji wolnej**

Poziom frakcji wolnej testosteronu został oznaczony metodą ELISA kompetycyjną przy zastosowaniu zestawu odczynników firmy Cusabio (CSB-E05097r). Czulość testu wynosiła 0,15 pg/ml, wewnętrzny oraz zewnętrzny współczynnik zmienności wynosiły mniej niż 15%, a zastosowane przeciwciało nie wykazywało istotnych reakcji krzyżowych ze związkami pokrewnymi. Oznaczenie oraz obliczenia zostały przeprowadzono w sposób analogiczny do oznaczenia frakcji całkowitej testosteronu, postępując zgodnie z procedurą przedstawioną na Rycinie 3. Krzywa wzorcowa została przygotowana z dołączonych do zestawu standardów w zakresie od 0.3 do 60 pg/ml.

#### **3.3.4.2.3 Oznaczenie poziomu progesteronu w osoczu**

W celu oznaczenia poziomu progesteronu w osoczu metodą ELISA kompetycyjną wykorzystano zestaw odczynników zakupiony w firmie Cusabio (CSB-E07282r) i postępowano zgodnie z procedurą przedstawioną na Rycinie 3. Zastosowany test charakteryzował się: czulość testu wynosiła 0,2 ng/ml, wewnętrzny oraz zewnętrzny współczynnik zmienności wynosiły mniej niż 15%, a zastosowane przeciwciało nie wykazywało istotnych reakcji krzyżowych ze związkami pokrewnymi. Zakres stężeń progesteronu, które mogą być oznaczane wybranym testem wynosił 0,5-30 ng/ml.

#### **3.3.4.2.4 Poziom prolaktyny w osoczu krwi**

Poziom prolaktyny został oznaczony w osoczu krwi metodą ELISA kompetycyjną z wykorzystaniem dostępnego komercyjnie zestawu odczynników firmy Cusabio (CSB-E06881r). Czulość testu wynosiła 0,125 ng/ml, wewnętrzny oraz zewnętrzny współczynnik zmienności wynosiły mniej niż 15%, a zastosowane przeciwciało nie wykazywało istotnych reakcji krzyżowych ze związkami pokrewnymi. W celu określenia

poziomu PRL postępowano zgodnie z wytycznymi producenta, co zostało przedstawione na Rycinie 3. Krzywa wzorcowa była przygotowana w zakresie stężeń 0,125 - 50 ng/ml.

#### **3.3.4.2.5 Poziom hormonu luteinizującego (LH)**

W osoczu krwi oznaczono stężenie hormonu luteinizującego stosując zestaw odczynników zakupiony w firmie Cusabio (CSB-E12654r) i postępując zgodnie procedurą przedstawioną na Rycinie 3. Zakres oznaczenia hormonu luteinizującego wynosił 0,3-60 mIU/ml, natomiast krzywa wzorcowa została przygotowana od 0 do 60 mIU/ml. Czulość zastosowanego testu wynosiła 0,15 mIU/ml, wewnętrzny oraz zewnętrzny współczynnik zmienności wynosiły mniej niż CV<15%, a zastosowane przeciwciała nie wykazywały istotnych reakcji krzyżowych ze związkami pokrewnymi.

#### **3.3.4.2.6 Oznaczenie 17β-estradolu**

Poziom 17β-estradol oznaczono testem ELISA kompetycyjnym przy zastosowaniu komercyjnego zestawu odczynników firmy Abcam (ab108667) zgodnie z dołączoną instrukcją. Zasada oznaczenia została przedstawiona na Rycinie 2. Czulość testu wynosiła 8.68 pg/mL, wewnętrzny współczynnik zmienności wynosił mniej niż 9%, a zewnętrzny współczynnik zmienności wynosił mniej niż 10%. Zastosowano przeciwciała wykazujące następujące reakcje krzyżowe: z estronem - 2.0%; z estriolem - 0.39%; z testosteronem - 0.02 %; z kortyzolem  $7 \times 10^{-3}$  %; z progesteronem  $3 \times 10^{-4}$  % a z dehydroepiandrosteronem  $1 \times 10^{-4}$  %.

#### **3.3.4.2.7 Stężenia fT3 i fT4 w osoczu**

Stężenie fT3 i fT4 określono odpowiednio za pomocą zestawu FT3 (DCM037-10) lub FT4 (DCM038-11) ELISA (DiaMetra, Włochy). Podstawą oznaczenia był test ELISA wykonany w 96-dołkowych płytkach zgodnie z zasadą przedstawioną na Rycinie 2. Krzywą kalibracyjną przygotowano w następującym zakresie: dla fT3 od 0 do 18 pg/ml oraz dla fT4 od 0 do 7 ng/dL.

Tabela I Charakterystyka testów dla hormonów tarczycy.

	fT3	fT4
czułość testu	0.05 pg/mL	0.05 ng/dL
współczynnik wewnątrzseryjny (CV%)	≤ 4.94%	≤10.98%
współczynnik zewnątrzseryjny (CV%)	≤ 13.19%	≤10.81%
Reakcje krzyżowe	Tyroksyna (0,0002 %)	Trójiodotyronina (0,03 %)

### 3.3.4.3 Metoda bezpośrednia ELISA

#### 3.3.4.3.1 Stężenie tyreotropiny (TSH) w osoczu

Stężenie tyreotropiny (TSH) oznaczano w osoczu krwi testem immunoenzymatycznym (ELISA) zakupionym w firmie Demeditec (DEV9977), Niemcy.

Wykonanie: Do każdego dołka opłaszczonego przeciwciałami przeciwko TSH dodano wzorce, surowicę pozbawioną hormonów (kontrola) lub próbki. Następnie dodano przeciwciało przeciwko TSH znakowane HRP i inkubowano przez 24 godziny. Po wypłukaniu nadmiaru przeciwciał znakowanych HRP dodano TMB i inkubowano przez 30 minut. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie roztworu HCl. Intensywność zabarwienia była wprost proporcjonalna do stężenia szczurzego TSH obecnego w próbce. Stężenie TSH w próbkach obliczano z krzywej kalibracyjnej (2,5-40 ng/ml). Czulość zastosowanego testu wynosiła 0,081ng/ml, wewnątrzseryjny współczynnik zmienności wynosił mniej niż 3,4%, a zewnątrzseryjny współczynnik zmienności wynosił mniej niż 8,8%. Zastosowane przeciwciało wykazywało reakcje krzyżowe z hormonami: LH - 2,8% oraz FSH - 0,3%.

### 3.3.5 Wpływ BP-2 na układ immunologiczny

#### 3.3.5.1 Hodowla splenocytów i tymocytów

Natychmiast po dekapitacji wyizolowano i zważono grasicę oraz śledzionę. Względna masa śledziony i grasicy została obliczona według następującego wzoru: masa organu / masa ciała x 100. Następnie w celu wyizolowania komórek do hodowli śledzionę i grasicę delikatnie homogenizowano w szklanym homogenizatorze. Uzyskane komórki zawieszano w pożywce



RPMI-1640 (Sigma, USA), a następnie wirowano przy 500 x g przez 5min w temperaturze pokojowej. Osad komórek ponownie zawieszono w tej samej pożywce, z dodatkiem antybiotyków (50 mg/ml penicyliny, 50 mg/ml streptomycyny), 10% płodowej surowicy bydlęcej i 2 mM L-glutaminy (wszystkie te odczynniki zakupiono w firmie Sigma, USA). Następnie komórki ( $2 \times 10^6$  komórek / ml) wysiewano na 96 dołkowe płytki w objętości 200  $\mu$ l na studzienkę i hodowano w standardowych warunkach (37°C; 5% CO<sub>2</sub>; 95% wilgotności).

### **3.3.5.2 Oznaczanie aktywności proliferacyjnej splenocytów**

Komórki ( $2 \times 10^6$  komórek / ml) stymulowano konkanawaliną A (Kon A, Sigma, USA) w stężeniu 1,25 i 2,5  $\mu$ g / ml lub lipopolisacharydem (5,0  $\mu$ g/ml) uzyskanym z *Escherichia coli*, serotyp 026: B6, (LPS, Sigma, USA). Komórki w końcowej objętości 0,2ml inkubowano na 96-studzienkowych płytkach w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Proliferację komórek określono przez dodanie 10  $\mu$ l (0,5  $\mu$ Ci) [3H] -tymidyny na studzienkę (ICN Pharmaceuticals, USA; SpA 6,7 Ci / mmol) 16 godzin przed końcem inkubacji. Komórki zebrano za pomocą automatycznego urządzenia do zbierania komórek (Scatron, Norwegia). Radioaktywną [3H] -tymidynę liczono w liczniku scyntylicyjnym (Beckman LS 6500). Wyniki porównano do aktywności proliferacyjnej splenocytów, inkubowanych bez mitogenu (100%) i przedstawiano jako procent kontroli  $\pm$  SEM.

### **3.3.5.3 Test redukcji MTT**

Oznaczenie redukcji bromku 3- (4,5 – dimetylo – 2 - tiazolilo) - 2,5 – difenylo - 2H - tetrazoliowego (MTT) jest szeroko stosowane do określania aktywności metabolicznej komórek.

Test MTT przeprowadzono na nie stymulowanej hodowli tymocytów, pozyskanych od zwierząt, a następnie poddanych 24 godzinnej inkubacji. Do 100  $\mu$ l zawiesiny tymocytów ( $2 \times 10^6$  komórek na ml) dodano 10  $\mu$ l 0,5% roztworu MTT (Sigma Chem., St Louis, MI, USA) w PBS i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1,5 godziny. Następnie powstałe kryształy formazanu rozpuszczono w 100  $\mu$ l 2-propanolu (POCh, Polska) zakwaszonego 0,1 mol / l HCL (POCh, Polska). Absorbancję zmierzono przy długości fali 570 nm stosując detektor Infinite 2000 PRO (TECAN, Szwajcaria). Wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto żywotność komórek pochodzących od zwierząt otrzymujących maść z rozpuszczalnikiem.

### **3.3.5.4 Aktywność metaboliczna splenocytów i tymocytów**

Aktywność metaboliczną splenocytów i tymocytów określono za pomocą testu resazuryny, jak opisano przez Roman i wsp., 2009. Po 24-godzinnej inkubacji nie stymulowanych hodowli ( $2 \times 10^6$  komórek / ml), do każdej studzienki dodano 10  $\mu$ l roztworu resazuryny (Sigma, USA; 0,44 mM w PBS), następnie komórki inkubowano przez 4 godziny. Absorbancję zmierzono przy długości fali 570 nm oraz przy referencyjnej długości fali 600 nm stosując detektor Infinite 2000 PRO (TECAN, Szwajcaria). Wyniki przedstawiono jako % kontroli. Grupę porównawczą (100%) stanowiła aktywność metaboliczna splenocytów lub tymocytów pochodzących od zwierząt otrzymujących maść z rozpuszczalnikiem.

### **3.3.5.5 Uwalnianie tlenu azotu (NO) z tymocytów i splenocytów**

Uwalnianie tlenu azotu z komórek do pożywki hodowlanej mierzono za pomocą reakcji Griessa. Test przeprowadzono po 24 godzinach od wyizolowania komórek z tymocytów / splenocytów (nie stymulowana hodowla). W celu wykonania oznaczenia pobierano 50  $\mu$ l pożywki hodowlanej i przenoszono do 96-studzienkowych płytek w trzech powtórzeniach. Do każdej studzienki dodano równą objętość odczynnika Griessa A (1% sulfanilamidu w 5% kwasie fosforowym) i odczynnika Griessa B (0,1%, dichlorowodoru N - (1-naftyłu) - etylenodiaminy). Inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję zmierzono przy długości fali 540 nm w czytniku płytek Multiscan (detektor Infinite 2000 PRO, TECAN, Szwajcaria). Dane znormalizowano do ilości NO uwalnianej przez komórki wyizolowane z organów pochodzących od grupy kontrolnej zwierząt (100%) i wyrażono jako procent kontroli  $\pm$  SEM.

### **3.3.5.6 Oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej**

Toksyczne działanie BP-2 na splenocyty i tymocyty oznaczano poprzez ocenę aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianej z uszkodzonych komórek do pożywki hodowlanej. Aktywność LDH badano przy użyciu metody kolorymetrycznej (Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Niemcy), którą przeprowadzono po 24 godzinach inkubacji nie stymulowanych hodowli. W celu wykonania oznaczenia 50  $\mu$ l pożywki hodowlanej przeniesiono do 96-studzienkowych płytek w trzech powtórzeniach i inkubowano z odpowiednią mieszaniną odczynników w temperaturze pokojowej przez 20 min zgodnie z dołączonymi instrukcjami. Test oparty jest na reakcji kwasu pirogronowego z 2,4-dinitrofenylohydrazyną, w wyniku której powstaje barwny formazan, którego ilość jest

proporcjonalna do aktywności LDH w próbce. Absorbancję mierzono przy długości fali 492 nm, stosując Infinite 2000 PRO (TECAN, Szwajcaria). Dane znormalizowano do ilości LDH uwolnionej z hodowli komórek pozyskanych od zwierząt kontrolnych (100%) i wyrażono jako procent kontroli  $\pm$  SEM.

### **3.3.6 Określenie wpływu BP-2 na markery stresu oksydacyjnego i procesu apoptozy w strukturach mózgu**

#### **3.3.6.1 Markery stresu oksydacyjnego w korze czołowej i hipokampie**

##### **3.3.6.1.1 Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS)**

W badaniu poziomu reaktywnych form tlenu wykorzystano barwnik fluorescencyjny DCFH-DA (dioctan 2',7'- dichlorodihydrofluorescyny), który w wyniku działania estera komórkowych zostaje deacetylowany do niefluorescencyjnego związku (2',7'-dichlorofluorescyna - DCFH). Pod wpływem działania reaktywnych form tlenu wytworzonych w badanej tkance DCFH jest utleniany do 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF).

Badane tkanki (kora czołowa, hipokamp) homogenizowano w lodowatym 0,1 M buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4). Homogenaty wirowano przy 13 000 rpm/min przez 20 min w 4°C. Następnie oznaczano poziom białka w uzyskanych 10% nadsączach. W celu określenia wpływu BP-2 na wytwarzanie reaktywnych form tlenu, 10  $\mu$ l nadsącza przeniesiono do czarnych 96-dołkowych płytek. Kolejno dodano 135  $\mu$ l roztworu PBS o stężeniu 75 mM oraz 5  $\mu$ l roztworu 1mM dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA), po czym inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie próbki chłodzono na łaźni lodowej przez 15 minut i fluorescencję DCF zmierzono stosując fluorescencyjny czytnik płytek (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems) przy Ex/Em 485/538 nm. Wytwarzanie ROS w próbkach obliczano z krzywej wzorcowej (0,01-1000 nM) i wyrażano w nmol ROS na mg białka.

##### **3.3.6.1.2 Całkowita aktywność antyoksydacyjna (TAC)**

Analizę całkowitej aktywności antyoksydacyjnej (TAC) przeprowadzono w homogenatach wybranych struktur mózgu (kora czołowa, hipokamp) zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Benzie i Strain (1996) dostosowaną do analizy tkanki mózgowej. Podstawą oznaczenia jest zdolność antyoksydantów znajdujących się w badanej tkance do redukcji jonów  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ . W kwaśnym środowisku (pH = 3,5) jony żelaza (II) tworzą barwny kompleks z 2,4,6-tripirydylo-S-triazyną (TPTZ), który wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali 573 nm.

W celu wykonania oznaczenia wybrane struktury mózgu zostały poddane homogenizacji w mechanicznym homogenizatorze Ultra-Turrax, w 50 mM buforze fosforanowym z 0.05mM EDTA o pH = 7.4 na lodzie. Następnie 10% homogenaty były wirowane w temperaturze 4°C, 20 min, 12 000 x g. W uzyskanych nadsącach oznaczono poziom białka. Analiza TAC została przeprowadzona w 96-dółkowych płytkach. Do każdego dołka odmierzano po 10 µl nadsącza (w trzech powtórzeniach), a następnie dodawano mieszaninę reakcyjną (250 µl) złożoną z: 10 obj. 0.3 M buforu octanowego o pH = 3.6, 1 obj. 10 mM roztworu TPTZ w 40 mM HCl oraz 1 obj. 20 mM roztworu FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O. Przygotowane płytki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Absorbancję mierzono przy długości fali 573 nm za pomocą wielofunkcyjnego czytnika płytek TECAN Infinite M200 PRO. Całkowitą aktywność antyoksydacyjną próbek obliczono z krzywej standardowej (100-1000 µM) i wyrażono jako µmol Fe (II) na mg białka.

#### **3.3.6.1.3 Poziom peroksydacji lipidów (MDA)**

Poziom peroksydacji lipidów oznaczono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu odczynników z firmy BioVision (BioVision Inc., USA). Oznaczenie jest oparte na reakcji głównego produktu peroksydacji lipidów - malonylodilaldehydu (MDA) z kwasem tiobarbiturowym (TBA) w temperaturze 95°C przez 60 min. W niniejszej metodzie określono poziomu powstałego adduktu MDA-TBA metodą fluorometryczną (Ex / Em = 532/553). W celu wykonania oznaczenia wybrane struktury mózgu (kora czołowa, hipokamp) homogenizowano w buforze lizującym w proporcji 10 mg tkanki / 300 µl buforu. Uzyskane roztwory zawierające struktury komórkowe wirowano w 13 000 x g przez 10 min. Uzyskane nadsącze (200 µl) przenoszono do probówek z zamknięciem, dodawano 600 µl wcześniej przygotowanego odczynnika TBA i mieszano. Mieszaninę gotowano w temperaturze 95°C przez 60 minut, następnie schładzano na lodzie do temperatury pokojowej. Przenoszono po 200 µl mieszaniny na 96-dółkową płytkę (w 3 powtórzeniach) i mierzono fluorescencję w czytniku fluorescencyjnym (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems). Peroksydację lipidów w próbkach obliczono na podstawie krzywej wzorcowej (0 - 5 nmol) i wyrażano w nmol MDA / mg białka.

### **3.3.6.2 Markery apoptozy oznaczane metodą Western Blot**

#### **3.3.6.2.1 Przygotowanie próbek**

##### Kora czołowa i hipokamp

Poziom markerów procesu apoptozy (aktywna forma kapazy-3, białko proapoptotyczne – Bax i antyapoptotyczne – Bcl-2) oznaczono w tkance mózgowej metodą Western Blot. Wybrane struktury mózgu: kora czołowa i hipokamp homogenizowano na lodzie w 2% SDS zawierającym 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM NaF oraz mieszaninę inhibitorów fosfataz i proteaz (Sigma Aldrich St. Louis, USA) przy użyciu homogenizatora mechanicznego Ultra-Turrax. Homogenaty denaturowano przez 10 minut w temperaturze 95°C, a następnie wirowano (12 000 x g, 10 minut, temperatura 4°C). Dziesięć mikrolitrów nadsącza użyto do oznaczenia białka i po doprowadzeniu do odpowiedniego stężenia białka, roztwory mieszano z buforem obciążającym (zawierającym 10% 2-merkaptoetanolu) w stosunku 1: 1 i ogrzewano w temperaturze 95°C przez 10 minut. Próbki przechowywano w temperaturze -80°C.

#### **3.3.6.2.2 Analiza ekspresji białek metodą Western Blot**

Badane próbki zawierające 30 µg białka w 10 µl nakładano na poliakrylamidowe żele gradientowe 4-15% (BioRad, USA). Elektroforezę prowadzono przez 45 minut przy napięciu 180 V. Przy użyciu Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, USA) przeprowadzono szybki transfer półsuchy (12 minut, 25V, 2A) białek na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF). Uzyskane membrany płukano dwukrotnie w wodnym roztworze TBS (roztwór soli fizjologicznej buforowanej Trisem (tris-(hydroksymetylo)-aminometan) (Sigma Aldrich, USA); pH 7,4). Następnie poddano je godzinnemu blokowaniu przez inkubację w 5% roztworze surowicy bydlęcej (Bio-Shop, Kanada) w TBST (TBS z dodatkiem Tweenu 20, Bio-Shop, Kanada). Tak przygotowane membrany inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 4°C z I-rzędowymi przeciwciałami rozpuszczonymi w 1% roztworze surowicy bydlęcej w TBST.

W celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych przeciwciał I-rzędowych membrany płukano cztery razy roztworem TBST (każdorazowo po 10 minut). Następnie inkubowano membrany z II-rzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową: kozimi anti-króliczymi (1:10000; Abcam, ab6721, UK ) lub kozimi anti-mysimi (1:7500; sc-2005 Santa Cruz Biotechnology, USA) w zależności od zastosowanych przeciwciał I-rzędowych. Przeciwciała II-rzędowe były rozpuszczane w 1% roztworze BSA w TBST w temperaturze pokojowej.

Po godzinie inkubacji membrany płukano pięciokrotnie (każdorazowo po 5 minut) w TBST i wywołano przy użyciu odczynnika WesternBright Quantum HRP substrate (Advansta Inc., USA). Do odczytu użyto kamery G:Box (Syngene, Cambridge, UK) oraz oprogramowania GenSys (Syngene, Cambridge, UK). Otrzymane wyniki analizowano za pomocą programu GeneTools (v. 4.03, Syngene, Cambridge, UK) i przedstawiono jako % kontroli.

*Tabela II Przeciwciała I-rzędowe zastosowane w analizie markerów procesu apoptozy metodą Western Blot*

Nazwa	Rozcieńczenie	Producent
Anty-aktywna postać kaspazy-3, przeciwciała królicze poliklonalne;	1:700	SCB, sc-7148
Anty-Bcl-2, przeciwciała mysie monoklonalne;	1:500	SCB, sc-7382
Anty-Bax, przeciwciała mysie monoklonalne;	1:500	SCB, sc-7480

### 3.3.6.2.3 Standaryzacja

W celu przeprowadzenia normalizacji metody Western Blot zastosowano zestaw odczynników „Total Protein Staining” (Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes, Thermo Fisher Scientific, USA). Metoda ta umożliwia określenie całkowitej ilości białka przeniesionego z żelu na membranę. Obliczenia polegają na porównaniu intensywności prążków badanego białka do zabarwienia wszystkich białek ścieżki. Wybrano tą metodę normalizacji, ponieważ nie dochodzi w niej do wysycenia sygnału w porównaniu do metod z zastosowaniem tzw. białek referencyjnych jak np.  $\beta$ -aktyna. Wszystkie etapy zostały wykonane zgodnie z instrukcją wytwórcy.

### 3.3.6.2.4 Stężenie białka

Poziom białka całkowitego zawartego w nadsączach uzyskanych z homogenatów wybranych struktur mózgu oraz jąder oznaczano metodą BCA, z użyciem kwasu biscinchoninowego (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA , kat 23225). Podstawą oznaczenia jest reakcja redukcji jonów  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{1+}$  w środowisku zasadowym, które następnie łączą się z dwoma cząsteczkami kwasu biscinchoninowego tworząc kompleks o zabarwieniu purpurowym i maksymalnej absorbancji przy długości fali 562 nm.

Oznaczenia wykonywano w 96-dółkowych płytkach. Do dołków dodawano odpowiednio rozcieńczone nadsącze w objętości 10  $\mu$ l w 3 powtórzeniach oraz 200  $\mu$ l odczynnika zawierającego kwas biscinchoninowy oraz jony  $\text{Cu}^{2+}$ . Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C odczytano absorbancję przy długości fali 562 nm. Ilość białka w nadsącach obliczano na podstawie krzywej wzorcowej uwzględniając wartość próby ślepej oraz rozcieńczenia.

### **3.3.7 Wpływ benzofenonu-2 na ekspresję receptorów hormonów płciowych**

#### **3.3.7.1 Metoda Western Blot**

##### **3.3.7.1.1 Przygotowanie próbek podwzgórza i jądra**

Poziom receptorów estrogenowych  $\alpha$ ,  $\beta$  i GPR30, androgenowych oraz progesteronowych oznaczano w wybranych frakcjach komórkowych, zgodnie z występowaniem tych receptorów w komórkach. W celu uzyskania frakcji: jądrowej, cytozolowej oraz błonowej zastosowano zestaw odczynników ProteoExtract Subcellular Proteome firmy Calbiochem.

Zgodnie z dołączoną procedurą, w celu separacji poszczególnych frakcji zastosowano kolejno bufor: dla frakcji cytozolowej (frakcja 1) bufor ekstrakcyjny I, dla frakcji błonowej (frakcja 2) bufor ekstrakcyjny II, natomiast frakcję jądrową (frakcja 3) uzyskano dzięki zastosowaniu buforu ekstrakcyjnego III.

500  $\mu$ l zimnego buforu ekstrakcyjnego I zmieszano z 2,5  $\mu$ l koktajlu inhibitorów proteaz i dodano mieszaninę do wybranej tkanki (podwzgórze, jądra). Tkanki delikatnie rozdrabniano w homogenizatorze teflon-szkło i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając na wytrząsarce. Homogenaty wirowano przez 10 minut, 750 x g, 4°C, a uzyskane nadsącze (frakcja 1) przenoszono do czystej probówki i zamrażano w temp -80°C. Analogicznie postępując zgodnie z wytycznymi producenta uzyskano kolejne frakcje. Z wszystkich próbek pobrano po 10  $\mu$ l nadsącza i oznaczono poziom białka całkowitego stosując zestaw odczynników Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Wszystkie próbki doprowadzono do jednakowego stężenia białka. Do każdej próbki dodano bufor obciążający (4x) i denaturowano przez 5 minut w temperaturze 85°C (termoblok TS-100C, BioSan). Walidacja rozdziału frakcji polegała na oznaczeniu specyficznego markera dla frakcji jądrowej (białko HDAC1, ab109411, Abcam, Wielka Brytania), błonowej (ATPaza  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; ab76020, Abcam, Wielka Brytania) oraz cytozolowej (GAPDH).

### 3.3.7.1.2 Analiza ekspresji białek oraz standaryzacja procesu

Analizę ekspresji białek oraz standaryzację procesu wykonano analogicznie do wcześniej opisanej procedury przeprowadzania metody Western Blot dotyczącej ekspresji markerów apoptozy. W celu oznaczenia wybranych receptorów wykorzystano specyficzne dla danego białka przeciwciała I – rzędowe, które przedstawiono w Tabeli III.

*Tabela III Rodzaje przeciwciał I – rzędowych użytych do oznaczenia ekspresji białek metodą Western Blot.*

Nazwa	Rozcieńczenie	Producent
Anty- ER alfa – mysie monoklonalne	1 : 400	Santa Cruz Biotechnology Sc-787
Anty ER beta - królicze poliklonalne	1 : 1 000	Abcam ab3576
Anty GPR 30 - królicze poliklonalne	1 : 2 000	Abcam ab39742
Anty AR - królicze monoklonalne	1 : 1 000	Abcam ab52615
Anty progesteronowe - mysie monoklonalne	1 : 1 000	Abcam ab2765

### 3.3.7.2 Analiza RT-qPCR

#### 3.3.7.2.1 Homogenizacja i izolacja RNA

Po dekapitacji zwierząt podwzgórza zostały wyizolowane i umieszczone w buforze stabilizującym RNA (RNA lather, Ambion, USA) na 24 godziny w temperaturze 4°C, natomiast jądra zamrażano w ciekłym azocie i sproszkowano. Tkanki były przechowywane w temp – 80°C.

Tkanki homogenizowano w TRIZOLU (TRI reagent Solution, Invitrogen, USA) w mechanicznym homogenizatorze Ultra-Turrax. W celu izolacji oraz oczyszczenia RNA



zastosowano komercyjnie dostępny zestaw kolumn (Direct-Zol RNA MiniPrep Kit, Zymo Research, USA) postępując zgodnie z dołączoną instrukcją.

#### **3.3.7.2.2 Oznaczenie stężenia RNA**

Oznaczenie stężenia oraz czystości RNA wykonano przy użyciu płytki NanoQuant (NanoQuant Plate, Tecan, Szwajcaria). Czysty RNA posiada stosunek absorbancji mierzonej w 260 nm oraz 280 nm między 1,8 - 1,9. Jeśli ta wartość jest niższa niż 1,8 to materiał jest zanieczyszczony białkami lub innymi związkami. W przeprowadzonym eksperymencie uzyskano zadawalającą czystość oraz stężenie RNA. Otrzymany RNA przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

#### **3.3.7.2.3 Odwrotna transkrypcja**

cDNA zostało zsyntezowane w reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu odczynnikowego SuperScript IV VILO Master Mix zgodnie z instrukcją producenta (Thermo Fisher Scientific). Do syntezy użyto 1 µg RNA.

#### **3.3.7.2.4 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)**

Reakcje RT-qPCR przeprowadzono z użyciem odczynników TaqMan (Thermo Fisher Scientific) i systemu 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reakcje prowadzono na płytkach 96 dołkowych w objętości końcowej 10 µl, która obejmowała 4,5 µl cDNA, 5 µl TaqMan Fast Advanced Master Mix oraz 0,5 µl sondy TaqMan i zestawu primerów specyficznych dla oznaczanego genu: *Esr1*, *Esr2*, *Gper1*, *Ar*, *Pgr*, *Actb* (Tabela IV). Reakcję prowadzono w trybie *fast* w następującym profilu termicznym: aktywacja polimerazy 95°C przez 20 sekund oraz 45 cykli denaturacji w 95°C przez 3 sekundy i przyłączenie starterów w 60°C przez 30 sekund.

Linie bazowe (*baseline*), linie graniczne (*threshold*) oraz cykl progowy (*Ct*, *threshold cycle*) zostały wyznaczone automatycznie z użyciem oprogramowania 7500 Software ver. 2.3 (Applied Biosystems). Ekspresję genów przedstawiono przy użyciu metody porównawczej obliczając względną ekspresję badanego genu wobec kontroli endogennej ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), którą stanowił gen *Actb*. Stabilność tego genu i użyteczność jako kontroli endogennej została zweryfikowana doświadczalnie. Wyniki końcowe przedstawiono w postaci względnej zmiany ekspresji genu wobec grupy kontrolnej (*fold change*).

Tabela IV Rodzaje sond zastosowanych w oznaczeniach RT-qPCR.

Białko	Gen	Numer identyfikacyjny sondy
ER alfa	Esr1	Rn01640372_m1
ER beta	Esr2	Rn00562610_m1
GPR 30	Gper1	Rn01643280_s1
AR	Ar	Rn00560747_m1
PR	Pgr	Rn01448227_m1
Beta aktyna	Actb	Rn00667869_m1.

### 3.3.8 Określenie wpływu BP-2 na funkcję jąder

#### 3.3.8.1 Określenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS)

W celu określenia wpływu BP-2 na stres oksydacyjny w jądrach zwierząt narażonych na badany związek oraz w grupie kontrolnej, oznaczono poziom reaktywnych form tlenu. Przygotowanie tkanki do badań oraz procedura wykonania oznaczenia została opisana w rozdziale Metodyka badań *ex-vivo*, w podrozdziale 3.3.6 „Określenie wpływu BP-2 na markery stresu oksydacyjnego i procesu apoptozy w strukturach mózgu”.

#### 3.3.8.2 Analiza nasienia

Do wewnętrznej części szalki Petriego (z podwójną koncentryczną komorą) nałożono 500 µl płynu do zapłodnienia pozaustrojowego (IVF, ORIGO, Måløv, Denmark), a do zewnętrznej części wodę destylowaną w celu zachowania odpowiedniej wilgotności. Wyizolowano część ogonową najądrza i umieszczono ją w płynie IVF. Tkanka najądrza została nakłuta kilkakrotnie i inkubowana w temperaturze 37°C przez 10 min. Po uzyskaniu zawiesiny plemników, 14 µl zawiesiny pobrano i umieszczono w komorze do analizy. Następnie analizowano ruch 100 plemników (ruch progresywny, ruch nieprogresywny, brak ruchu).

#### 3.3.8.3 Liczba plemników

W celu określenia liczby plemników pobrano 10 µl z zawiesiny przygotowanej do analizy ruchliwości plemników. Zawiesinę przeniesiono do szalki Petriego i rozcieńczono 20 razy przez dodanie 190 µl medium M2 (EmbryoMax KSOM Mouse Embryo Media, Merck

KGaA, Darmstadt, Germany). Następnie 10 µl mieszaniny umieszczono w komorze Bürkera i liczono plemniki w 3 dużych kwadratach. Po przeliczeniu wyniki uśredniono, a ostateczna liczba została obliczona przy użyciu równania:

$$X = a * 10^4 * 20$$

a – średnia liczba w dużym kwadracie

X – liczba plemników na ml

#### **3.3.8.4 Żywotność plemników - test eozynowy**

20 µl zawiesiny plemników umieszczono w małej szalce Petriego i zmieszano z 20 µl 0,2% wodnego roztworu eozyny Y (barwnik wnikaający do martwych komórek). Po inkubacji na stoliku grzewczym przez 10 minut, 10 µl mieszaniny umieszczono na szkiełku podstawowym. Żywotność plemników analizowano w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 40x. Za plemniki martwe uznano te, gdzie zaobserwowano wnikięcie barwnika do wnętrza główki plemnika nadając jej ciemnoróżowe zabarwienie. Oceniono zabarwienie główek 200 plemników, a wyniki przedstawiono jako procent martwych plemników.

#### **3.3.8.5 Morfologia plemników**

20 µl zawiesiny plemników naniesiono na szkiełko podstawowe i wykonano rozmaz, który pozostawiono do wyschnięcia. Po utrwaleniu preparatu w mieszaninie kwasu octowego i etanolu (w stosunku 1:3), szkiełka wysuszono i pozostawiono na 24 godziny w wodnym roztworze 0,2% eozyny Y. Po wybarwieniu preparaty płukano wodą destylowaną dwa razy po 5 minut. Szkiełka nakrywkowe nałożono przy użyciu preparatu Entellan i analizowano zmiany morfologiczne plemników w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 100x. Jakikolwiek zmiany w kształcie główki plemnika (brak akrosomu, skrzywiony akrosom) zostały zakwalifikowane jako wyniki nieprawidłowe. Przeanalizowano 400 plemników, a wyniki przedstawiono jako procent nieprawidłowych plemników.

### 3.4 Analiza statystyczna

W badaniach *in vitro* wyniki przedstawiono, jako wartości średnie  $\pm$  średni błąd średniej (SEM) uzyskane z 3 niezależnych eksperymentów. Każda grupa badana zawierała 9-10 próbek. Różnice między grupami określano na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testem post hoc Dunnett'a. Istotność statystyczną ustalono na poziomie  $p < 0,05$ .

Wszystkie wyniki uzyskane w badaniach *ex-vivo* wyrażono, jako średnie ( $\pm$  SEM) z 8-10 próbek oznaczanych w dwóch lub trzech powtórzeniach. Przy porównywaniu dwóch grup zastosowano test t-studenta, natomiast różnice między kilkoma grupami określano na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testem post hoc Dunnett'a. Istotność statystyczną ustalono na poziomie  $p < 0,05$ .

## 4. Wyniki

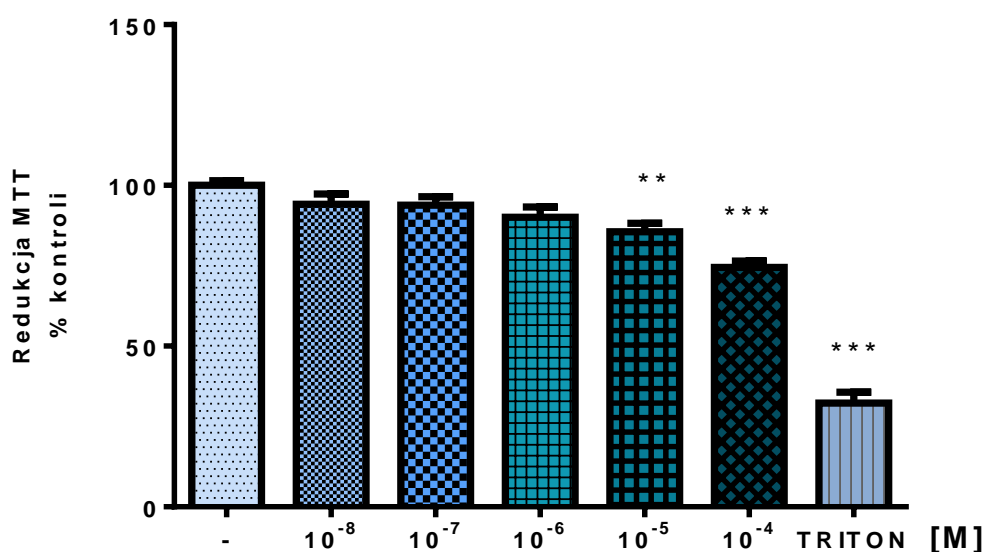
### 4.1 Wyniki badań *in vitro*

#### 4.1.1 Określenie działania cytotoksycznego i pro-apoptycznego benzofenonu-2 w komórkach SH-SY5Y

Apoptoza oraz efekt cytotoksyczny, a więc procesy leżące u podstaw chorób neurodegeneracyjnych były badane po 24- oraz 72-godzinach ekspozycji komórek na działanie benzofenonu-2. W badaniach *in vitro* oceniono działanie cytotoksyczne poprzez pomiar uwalniania dehydrogenazy mleczanowej do pożywki hodowlanej oraz żywotność komórek SH-SY5Y w teście redukcji MTT. Badano również aktywność kluczowego enzymu procesu apoptozy, czyli kaspazy-3, a także oceniono zmiany apoptotyczne występujące zarówno w jądrze komórkowym jak i całym neuronie w preparatach barwionych odczynnikiem Hoechst.

#### 4.1.2 Wpływ BP-2 na żywotność komórek SH-SY5Y

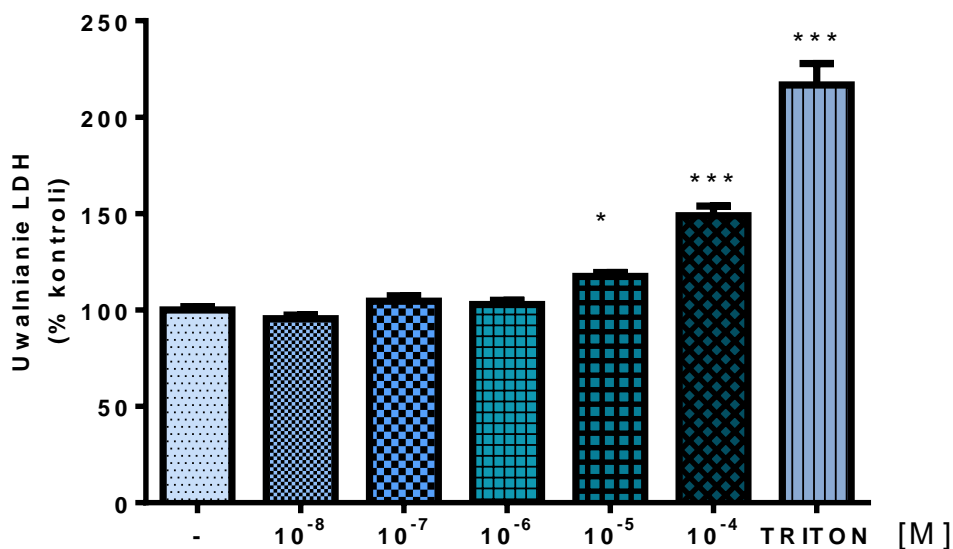
Żywotność komórek została oceniona testem redukcji MTT (Rycina 4). Badanie zostało wykonane w zakresie stężeń od  $10^{-8}$  do  $10^{-4}$  M benzofenonu-2. Obniżona aktywność metaboliczna mitochondriów komórek była obserwowana po 72 h ekspozycji na BP-2 w stężeniu  $10^{-5}$  oraz  $10^{-4}$  M (odpowiednio  $p < 0,01$  oraz  $p < 0,001$ ). Przy niższych stężeniach benzofenonu-2 nie wykazano istotnych różnic w żywotności komórek pomiędzy grupą narażoną na działanie BP-2, a grupą która otrzymywała wyłącznie rozpuszczalnik. Jako kontrolę pozytywną zastosowano Triton XC.



Rycina 4. Wpływ benzofenonu-2 na żywotność komórek SH-SY5Y oznaczaną testem redukcji MTT. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli, a za 100% przyjęto żywotność komórek hodowanych w obecności rozpuszczalnika (-). Istotność statystyczną analizowano jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA), a następnie stosowano test post-hoc Dunnett'a.  $n=10$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  w stosunku do grupy kontrolnej.

#### 4.1.3 Wpływ BP-2 na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

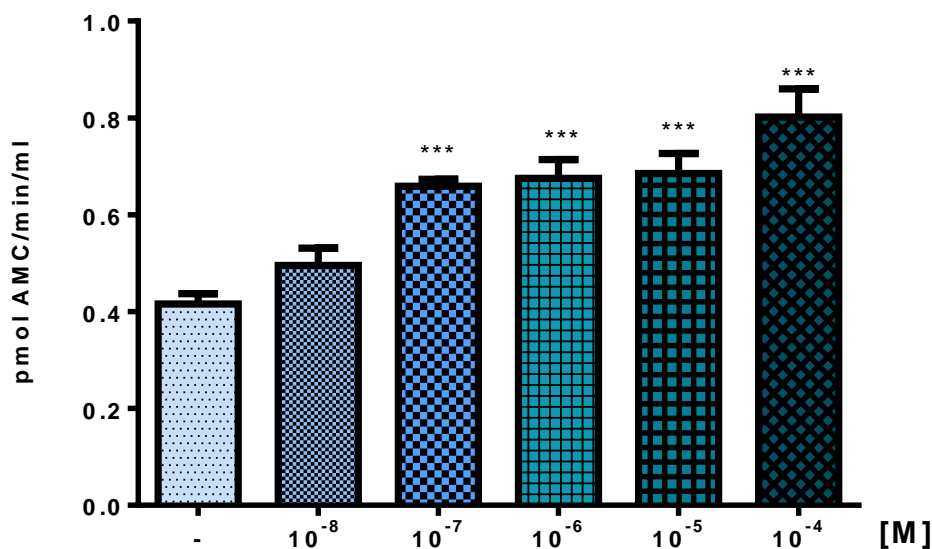
Śmiertelność komórek była oceniana testem uwalniania enzymu dehydrogenazy mleczanowej do medium hodowlanego (Rycina 5). Benzofenon-2 w stężeniu  $10^{-5}$  M ( $p < 0,05$ ) oraz w  $10^{-4}$  M ( $p < 0,001$ ) obecny w pożywce hodowlanej przez 72 h znacznie nasilał uwalnianie LDH, co świadczyło o wzroście śmiertelności komórek. W niższych stężeniach począwszy od  $10^{-6}$  do  $10^{-8}$  M nie stwierdzono cytotoksycznego działania benzofenonu-2.



Rycina 5. Wpływ benzofenonu-2 na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej z komórek SH-SY5Y do pożywki hodowlanej. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli, a za 100% przyjęto aktywność LDH uwolnionej z komórek hodowanych w obecności rozpuszczalnika (-). Istotność statystyczną analizowano jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA), a następnie testem post-hoc Dunnett'a.  $n=10$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  w stosunku do grupy kontrolnej.

#### 4.1.4 Wpływ BP-2 na aktywność kaspazy-3

Benzofenon-2 powodował wzrost aktywności kaspazy-3, enzymu wykonawczego w procesie apoptozy (Rycina 6). Stwierdzono statystycznie znamiennej wzrost aktywności kaspazy-3 w komórkach hodowanych z dodatkiem benzofenonu-2 w stężeniach od  $10^{-7}$  do  $10^{-4}$  M ( $p < 0,001$ ), natomiast stężenie  $10^{-8}$  M nie powodowało istotnego wzrostu aktywności kaspazy-3.

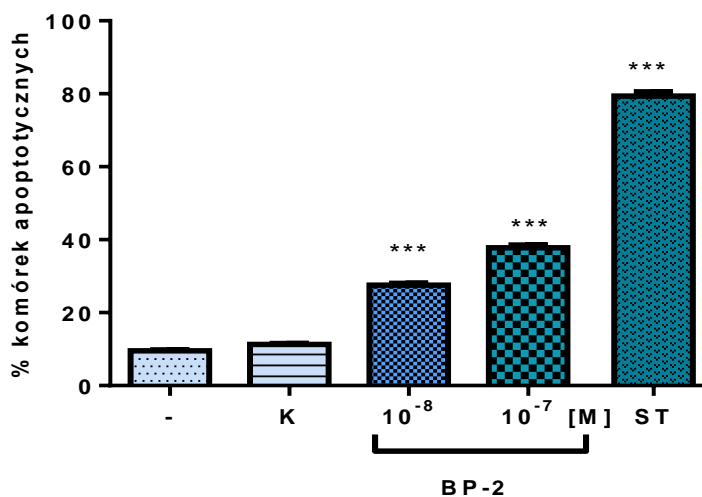


Rycina 6. Wpływ benzofenonu-2 na aktywność kaspazy-3. Wyniki przedstawiono w nmol fluorescencyjnego produktu (AMC) powstającego pod wpływem aktywnej kaspazy-3 w czasie 1 min, znajdującej się w 1 ml lizatu. Istotność statystyczną określano jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA), a następnie stosowano test post-hoc Dunnett'a.  $n=12$ , \*\*\*  $p < 0.001$  w stosunku do grupy kontrolnej.

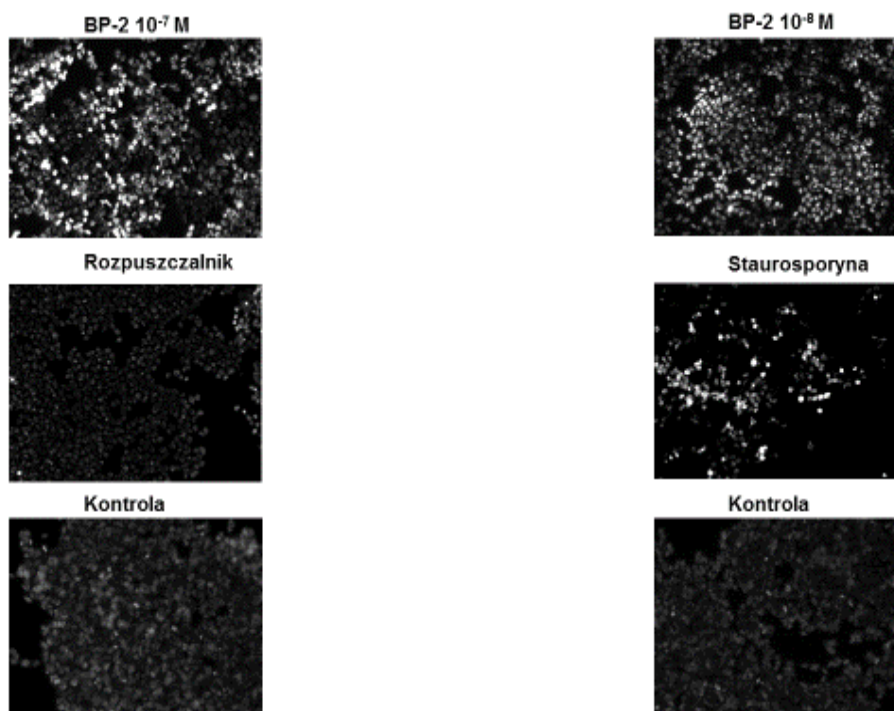


#### 4.1.5 Barwienie Hoechst

W celu wizualnej oceny zmian apoptotycznych zachodzących w neuronach, takich jak kondensacja jąder komórkowych, zmiana kształtu i objętości, komórki zostały wybarwione barwnikiem Hoechst (Rycina 7-8). Neurony, które posiadały jasne, skondensowane lub pofragmentowane jądra zostały uznane za apoptotyczne. Znamienne większą liczbę komórek apoptotycznych stwierdzono w hodowlach z benzofenonem-2 w stężeniu  $10^{-7}$  oraz  $10^{-8}$  M w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Zastosowana w badaniu jako kontrola pozytywna staurosporyna (1  $\mu$ M), związek który indukuje mitochondrialną ścieżkę apoptozy, znamienne zwiększa liczbę komórek apoptotycznych.



Rycina 7. Ocena ilościowa zmian apoptotycznych zachodzących w komórkach SH-SY5Y po 24-godzinnej ekspozycji na działanie benzofenonu-2 (barwienie Hoechst). Wyniki przedstawiono jako procent komórek apoptotycznych w porównaniu do całkowitej liczby komórek. Istotność statystyczną analizowano jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA), a następnie stosowano test post-hoc Dunnett'a. \*\*\*  $p < 0.001$  w stosunku do grupy kontrolnej (K – kontrola, ST - staurosporyna).



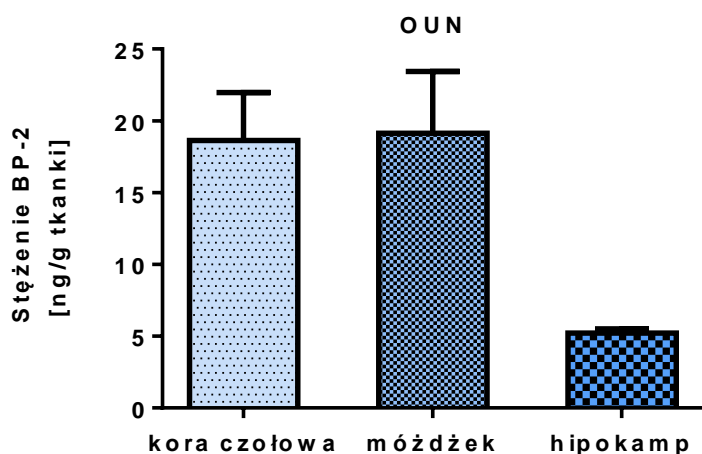
Rycina 8. Przykładowe obrazy komórek linii SH-SY5Y po ekspozycji na BP-2 w stężeniu  $10^{-7}$  i  $10^{-8}$  M, rozpuszczalnik oraz staurosporynę (barwienie Hoechst). Przedstawiono także zdjęcia komórek hodowanych bez żadnych dodatków (kontrola).

## 4.2 Wyniki badań ex-vivo

U zwierząt otrzymujących BP-2 nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w masie ciała oraz względnych masach jąder w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

### 4.2.1 Stężenie benzofenonu-2 w wybranych strukturach OUN oznaczane metodą LC/MS

Stwierdzono, że benzofenon-2 podawany w postaci maści przenika do krążenia ogólnego, a następnie przez barierę krew-mózg (Rycina 9). Wykazano, że średnie stężenie tego związku w korze czołowej wynosiło 16,14 ng/g tkanki. Podobne poziomy, bo 19,14 ng/g tkanki były obecne w mózdzku, natomiast w hipokampie średnie stężenie wynosiło 5,22 ng/g tkanki, a więc było prawie 4-krotnie niższe niż w pozostałych badanych strukturach mózgu. W grupie kontrolnej w żadnej ze struktur mózgu nie wykryto obecności benzofenonu-2.

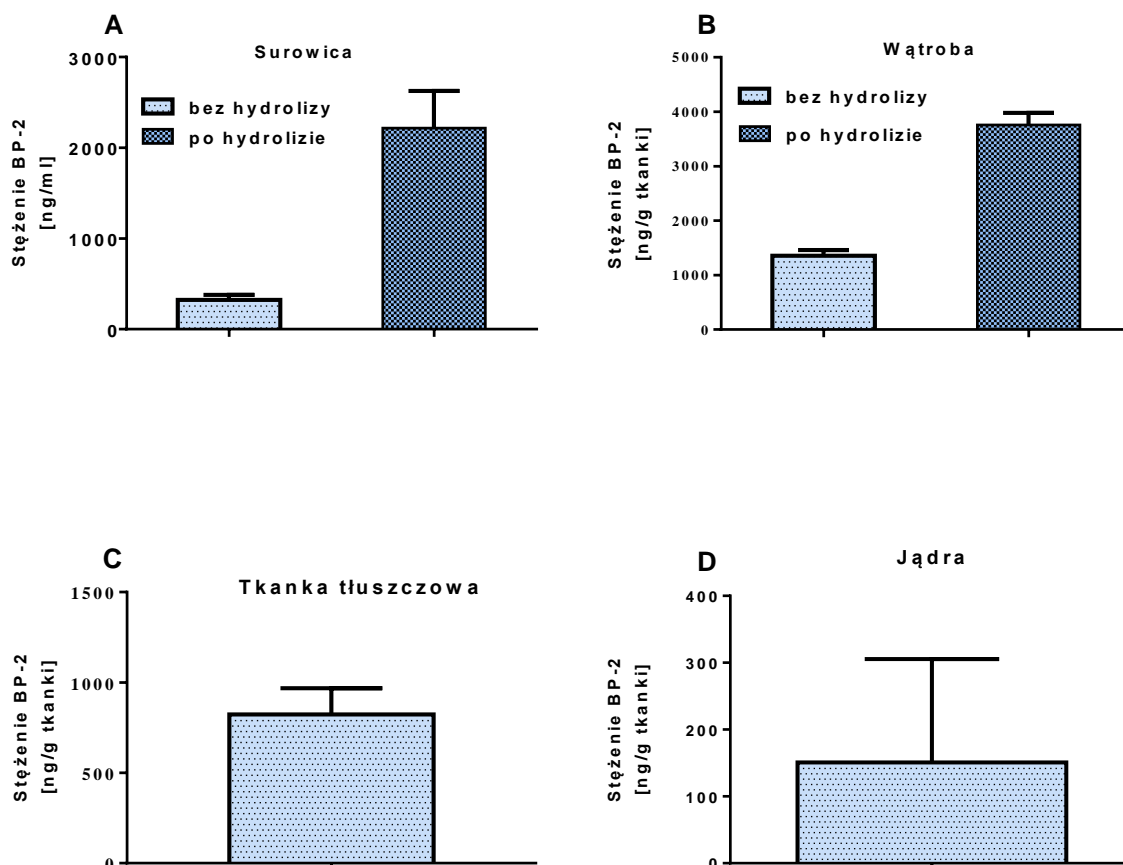


Rycina 9. Stężenie benzofenonu-2 w wybranych strukturach mózgu: kora czołowa, mózdzek, hipokamp. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM);  $n=10$ .

#### 4.2.1.1 Stężenie benzofenonu-2 w tkankach obwodowych

Aplikowany naskórnie BP-2 przenika do krążenia ogólnego, a jego średnie stężenie w surowicy krwi w postaci wolnej wynosiło 324,27 ng/ml, natomiast średnie stężenie BP-2 po hydrolizie enzymatycznej z  $\beta$ -glukuronidazą oraz sulfatazą było prawie 7-krotnie wyższe i wynosiło 2217,78 ng/ml (Rycina 10A). W wątrobie, organie odpowiedzialnym za metabolizm ksenobiotyków, średnie stężenie frakcji wolnej tego związku wynosiło 1354,14 ng/g tkanki, a po hydrolizie enzymatycznej średnie stężenie BP-2 (obejmujące zarówno frakcję wolną jak i związaną z glukuronianem i siarczanem) było 2,5 – krotnie większe i wynosiło 3757,55 ng/g tkanki (Rycina 10B). Benzofenon-2 jako związek o właściwościach lipofilowych może ulegać

kumulacji w tkance tłuszczowej. Wykazano, że średnie stężenie BP-2 w tkance tłuszczowej szczurów otrzymujących ten związek wynosiło 823,07 ng/g tkanki (Rycina 10C). Benzofenon-2 został oznaczony w jądrach, w których średnie stężenie tego związku wynosiło 150,92 ng/g tkanki (Rycina 10D). W grupach kontrolnych w żadnej z badanych tkanek nie wykryto obecności BP-2.



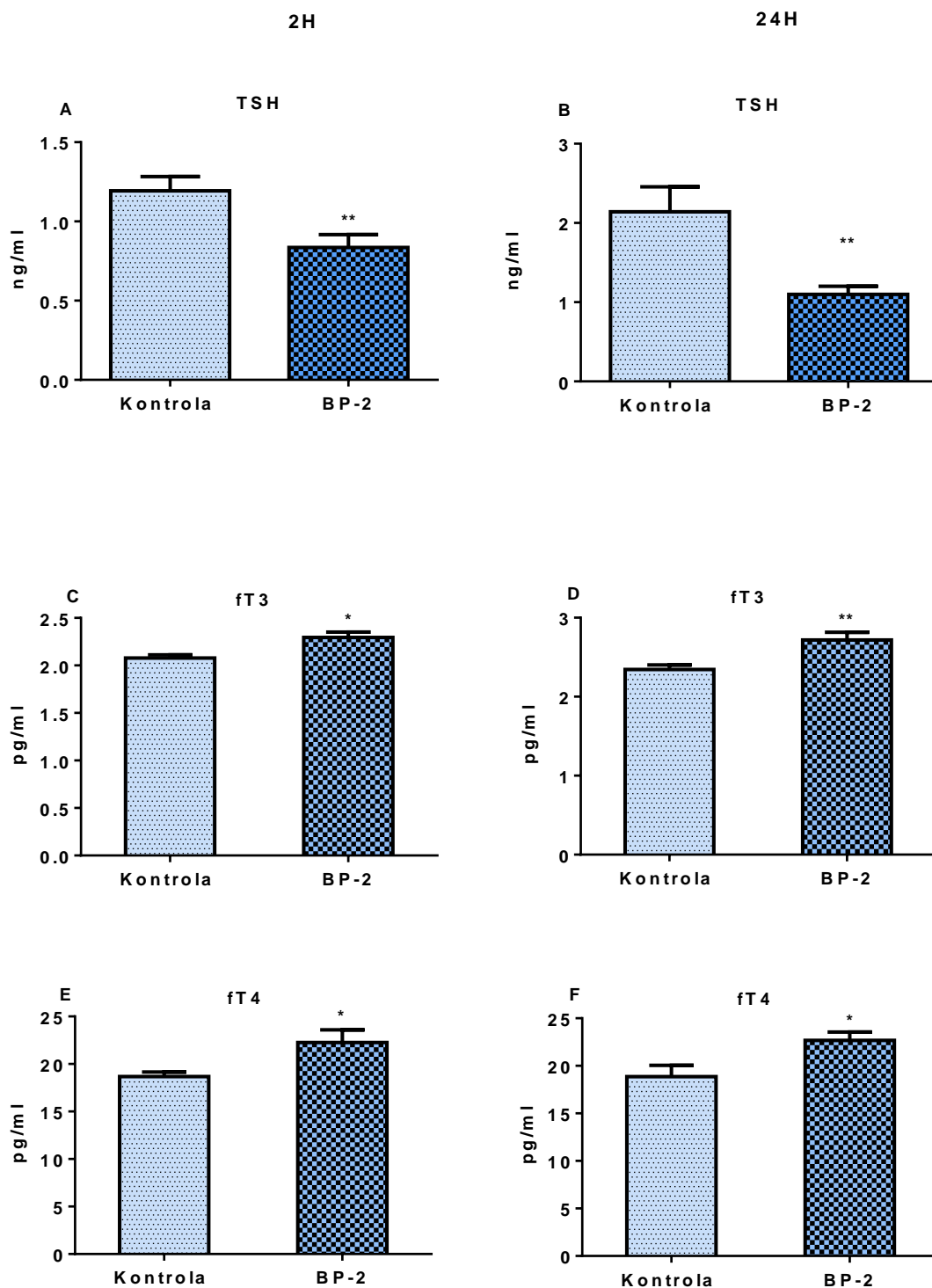
Rycina 10. Stężenie benzofenonu-2 w surowicy krwi i wątrobie w postaci wolnej oraz po zastosowanej hydrolizie enzymatycznej oraz w tkance tłuszczowej i jądrach. Na wykresach przedstawiono: A - surowica, B - wątroba, C - tkanka tłuszczowa, D - jądra. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM)  $n=10$ .

## **4.2.2 Wpływ BP-2 na układ hormonalny**

Celem określenia działania BP-2 na funkcję tarczycy oznaczono we krwi poziomy fT3, fT4 i TSH, a wpływ na funkcję jąder badano określając stężenia hormonów płciowych (testosteronu całkowitego, wolnej frakcji testosteronu, progesteronu i 17 $\beta$ -estradiolu) oraz hormonów przysadki (hormonu luteinizującego i prolaktyny) we krwi oraz testosteronu całkowitego w jądrach.

### **4.2.2.1 Wpływ benzofenonu-2 na wydzielanie hormonów tarczycy**

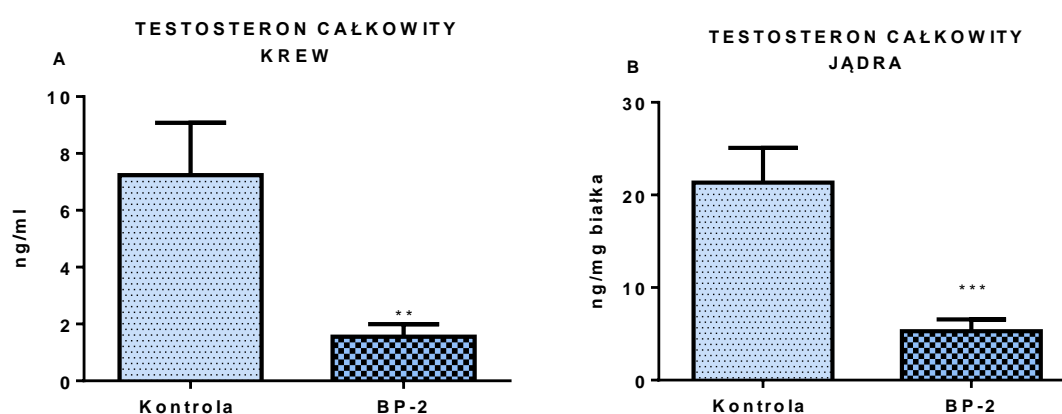
Oznaczano poziom frakcji wolnej hormonów tarczycy, gdyż lepiej odzwierciedlają działanie biologiczne na organizm niż ich formy związane z białkami. Dodatkowo pomiar stężenia hormonów tarczycy dokonano po 2 godzinach (Rycina 11 A,C,E) oraz po 24 godzinach (Rycina 11 B,D,F) od ostatniego podania BP-2. Narażenie zwierząt przez 4-tygodnie na działanie BP-2 spowodowało obniżenie o ponad 30% poziomu TSH w porównaniu do zwierząt otrzymujących samą maść po 2 godzinach ( $p < 0,01$ ) oraz o 50% ( $p < 0,01$ ) po 24 godzinach od podania badanego związku. Wzrost poziomu tyroksyny w stosunku do stężenia fT4 oznaczonego w grupie kontrolnej był znamienny i podobny w obydwu punktach czasowych ( $p < 0,05$ ). Poziom frakcji wolnej trójjodotyroniny był znamiennie wyższy w obu grupach czasowych, ale bardziej nasilony w grupie badanej po 24 godzinach od podania BP-2 ( $p < 0,01$ ). Zmiany w poziomach TSH i hormonów tarczycy świadczą o występowaniu nadczynności tarczycy u szczurów narażonych na BP-2. Obniżone stężenie TSH wynika z nadprodukcji fT3 oraz fT4 i nasilenia mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego.



Rycina 11. Wpływ benzofenonu-2 na poziom TSH, fT3 i fT4 oznaczonego we krwi szczurów po 2 h (A,C,E) i 24 h (B,D,F) od ostatniego podania związku. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta  $n=10$ , \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

#### 4.2.2.2 Poziom testosteronu całkowitego we krwi i jądrach

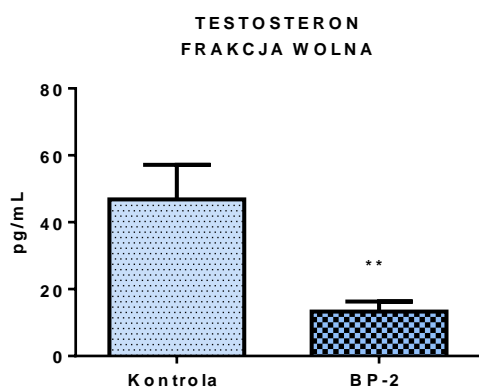
Poziom testosteronu całkowitego został oznaczony w osoczu krwi oraz w jądrach w grupie zwierząt, którym podawano BP-2 oraz w grupie kontrolnej (Rycina 12). Stwierdzono ponad 4-krotnie niższy poziom testosteronu całkowitego u zwierząt narażonych na działanie BP-2 w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,01$ ). Podobną zmianę wykazano w jądrach, gdzie u zwierząt otrzymujących BP-2 poziom testosteronu całkowitego był 4-krotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ).



Rycina 12. Poziom testosteronu całkowitego w osoczu krwi oraz w jądrach. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta  $n=10$  \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 4.2.2.3 Poziom frakcji wolnej testosteronu

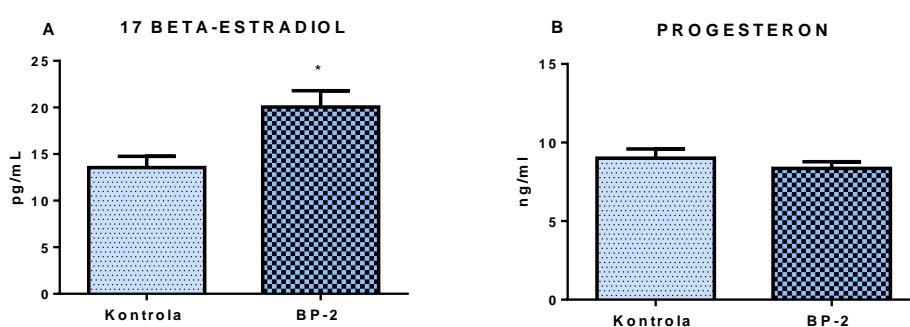
Stężenie frakcji wolnej testosteronu we krwi było ponad 3-krotnie niższe u zwierząt po ekspozycji na BP-2 w porównaniu do poziomu tego hormonu oznaczonego u zwierząt, które nie były eksponowane na działanie BP-2 ( $p < 0,01$ ) (Rycina 13).



Rycina 13. Poziom frakcji wolnej testosteronu w osoczu krwi. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta  $n=10$   $**p < 0,01$ .

### 4.2.2.4 Poziom $17\beta$ -estradiolu oraz progesteronu we krwi

Poziom  $17\beta$ -estradiolu oznaczony w osoczu krwi zwierząt po ekspozycji na BP-2 był statystycznie znacząco wyższy niż w grupie zwierząt otrzymującej samą masę ( $p < 0,05$ ) (Rycina 14A). Poziom progesteronu we krwi szczurów narażonych na działanie BP-2 i w grupie zwierząt kontrolnych był porównywalny (Rycina 14B).

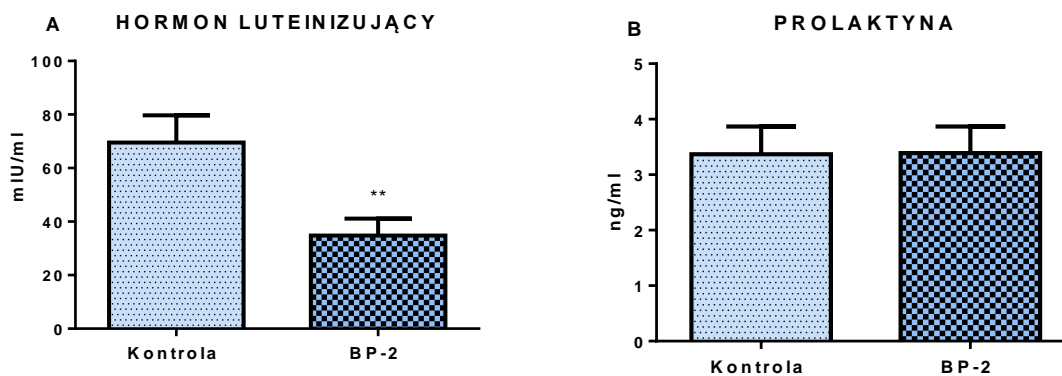


Rycina 14. Stężenie  $17\beta$ -estradiolu oraz progesteronu w osoczu krwi u zwierząt kontrolnych i otrzymujących benzofenon-2. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta,  $n=10$ ,  $*p < 0,05$ .



#### 4.2.2.5 Wpływ BP-2 na poziom prolaktyny oraz hormonu luteinizującego (LH)

W celu określenia możliwej przyczyny zmian w poziomie testosteronu oznaczano poziom LH w osoczu krwi. Zaobserwowano prawie 2-krotne obniżenie poziomu hormonu LH u zwierząt po ekspozycji na BP-2 ( $p < 0,01$ ) (Rycina 15A). Poziom prolaktyny w osoczu krwi zwierząt, którym podawano BP-2 i w grupie kontrolnej nie wykazał statystycznie znamiennej różnicy (Rycina 15B).



Rycina 15. Poziom LH oraz prolaktyny u zwierząt narażonych na działanie BP-2 oraz w grupie kontrolnej. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta,  $n=10$ ,  $**p < 0,01$ .

### 4.2.3 Wpływ benzofenonu-2 na układ immunologiczny

Celem wstępnej oceny funkcji układu immunologicznego określono wpływ BP-2 na masę całkowitą i względną oraz komórkowość pierwotnego (grasicy) oraz wtórnego (śledziony) narządu limfatycznego (Tabela V). Nie wykazano znamienych różnic w żadnym z tych parametrów pomiędzy zwierzętami kontrolnymi a otrzymującymi BP-2.

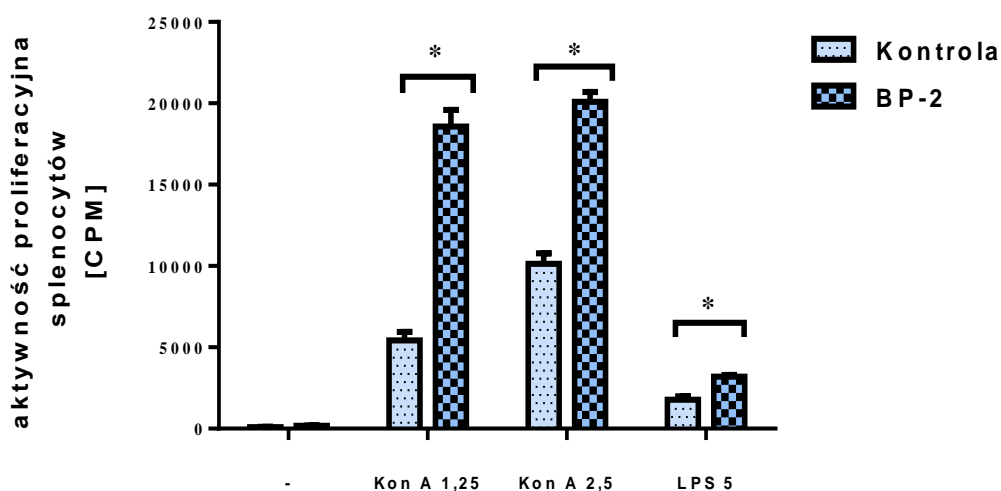
*Tabela V Wpływ BP-2 na masę całkowitą i względną oraz komórkowość śledziony i grasicy*

	Kontrola	BP-2
	średnia $\pm$ SEM	średnia $\pm$ SEM
Masa ciała (g)	328,9 $\pm$ 5,41	315,3 $\pm$ 7,73
Masa śledziony (g)	0,41 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,04
Masa grasicy (g)	0,59 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,02
Względna masa śledziony	0,12 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01
Względna masa grasicy	0,18 $\pm$ 0,004	0,18 $\pm$ 0,006
Komórkowość śledziony (mln/g)	114,4 $\pm$ 78	77,9 $\pm$ 43
Komórkowość grasicy (mln/g)	178,5 $\pm$ 95	182,4 $\pm$ 83

*Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta.*

#### 4.2.3.1 Wpływ BP-2 na aktywność proliferacyjną splenocytów

Niski, podstawowy wychwyty  $[H^3]$ -tymidyny nie różnił się znacząco pomiędzy splenocytami pochodzącymi od zwierząt kontrolnych, a komórkami zwierząt narażonych przez 4 tygodnie na działanie BP-2 (Rycina 16). Natomiast aktywność proliferacyjna splenocytów aktywowanych konkanawaliną (Kon A) w obydwu zastosowanych stężeniach (1,25 oraz 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) oraz LPS (5,0  $\mu\text{g/ml}$ ) była statystycznie znacznie wyższa w splenocytach uzyskanych od zwierząt otrzymujących BP-2 w porównaniu do grupy otrzymującej samą maść. Silniejsze działanie, prawie 4-krotny wzrost aktywności proliferacyjnej, był obserwowany w splenocytach pochodzących od zwierząt otrzymujących BP-2 po stymulacji Kon A w niższym stężeniu, natomiast wyższe stężenie Kon A i LPS wywołały około dwukrotny wzrost wychwyty  $[H^3]$ -tymidyny ( $p < 0,05$ ).

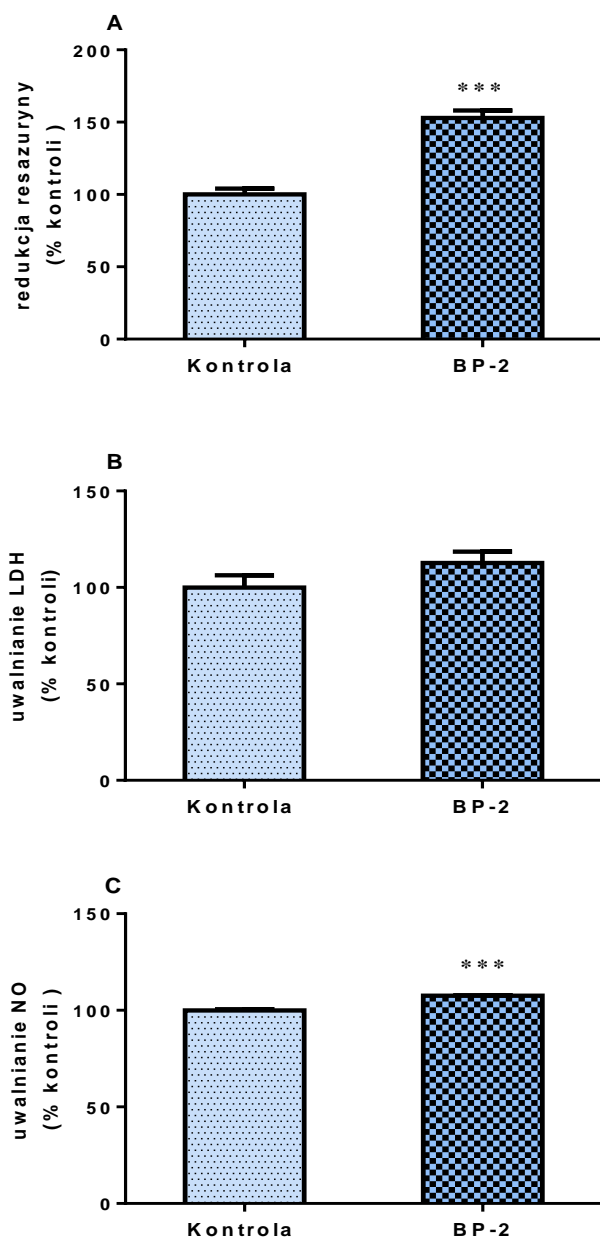


Rycina 16. Wpływ benzofenonu-2 na aktywność proliferacyjną splenocytów. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testem post-hoc Dunetta,  $n=10$ ,  $*p < 0,05$  vs kontrola.

#### 4.2.3.2 Wpływ BP-2 na aktywność metaboliczną splenocytów

Wpływ benzofenonu-2 na splenocyty określany testem redukcji rezazuryny do rezorufiny wykazał wzrost aktywności metabolicznej splenocytów uzyskanych od zwierząt narażonych na działanie badanego związku, prawie o 50% w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ) (Rycina 17A). Nie stwierdzono znamienych statystycznie zmian w poziomie dehydrogenazy mleczanowej uwolnionej z komórek do pożywki hodowlanej, co świadczy

o braku cytotoksycznego działania BP-2 (Rycina 17B). Wykazano ponadto, że 4-tygodniowe narażenie zwierząt na działanie benzofenonu-2 zwiększa uwalnianie tlenu azotu przez splenocyty w porównaniu do grupy kontrolnej, która nie otrzymywała BP-2 ( $p < 0,001$ ) (Rycina 17C).



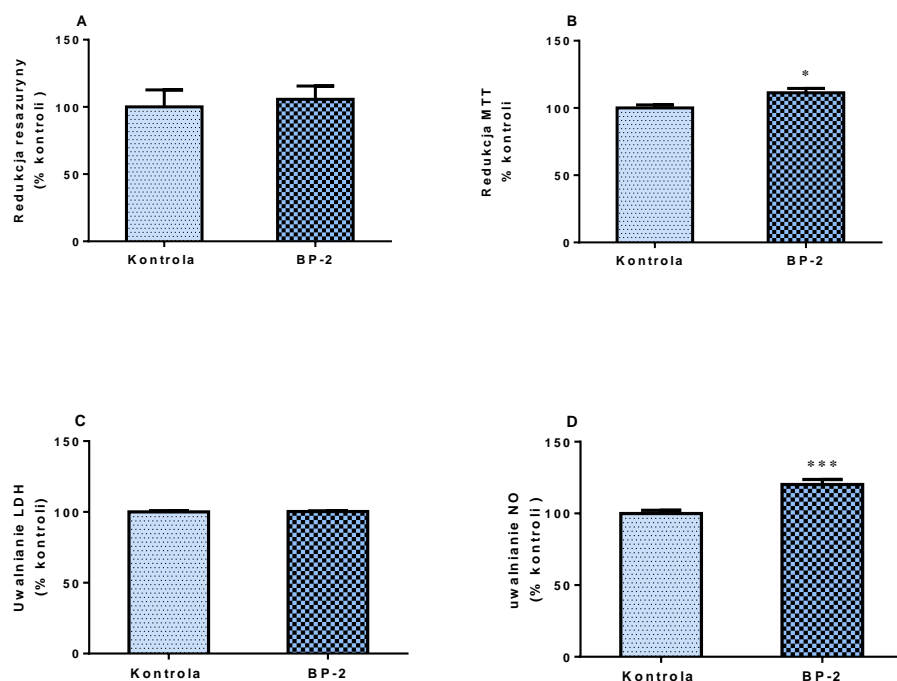
Rycina 17. Wpływ BP-2 na aktywność metaboliczną splenocytów mierzoną testem redukcji rezasuryny (A) oraz uwalnianie LDH (B) i NO (C) ze splenocytów. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta  $n=10$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs kontrola.

### 4.2.3.3 Aktywność metaboliczna tymocytów

Aktywność metaboliczna tymocytów pochodzących od zwierząt otrzymujących BP-2, oznaczana testem redukcji rezasuryny, nie różniła się znacząco od aktywności metabolicznej tymocytów grupy kontrolnej (Rycina 18A). Natomiast w teście redukcji MTT stwierdzono nieznaczny, lecz znaczący statystycznie wzrost aktywności oksydacyjnej mitochondriów tymocytów ( $p < 0,05$ ), pochodzących od zwierząt narażonych na działanie BP-2 w porównaniu do żywotności tymocytów grupy kontrolnej (Rycina 18B).

Wpływ benzofenonu-2 na śmiertelność tymocytów został oceniony poprzez pomiar aktywności uwalnianej do pożywki hodowlanej dehydrogenazy mleczanowej. Wykazano, że aktywność LDH w tymocytach zwierząt narażonych na benzofenon-2 nie różniła się istotnie od aktywności tego enzymu oznaczonego w grupie kontrolnej (Rycina 18C).

Wykazano także, że narażenie na działanie BP-2 skutkowało znaczącym wzrostem uwalniania NO przez tymocyty w porównaniu do tymocytów pozyskanych od zwierząt, które otrzymywały samą maść ( $p < 0,001$ ) (Rycina 18D).



Rycina 18. Wpływ benzofenonu-2 na aktywność metaboliczną tymocytów ocenianą testem redukcji rezasuryny (A) i testem redukcji MTT (B) oraz na uwalnianie LDH (C) i NO (D) z tymocytów. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta  $n=10$  \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$

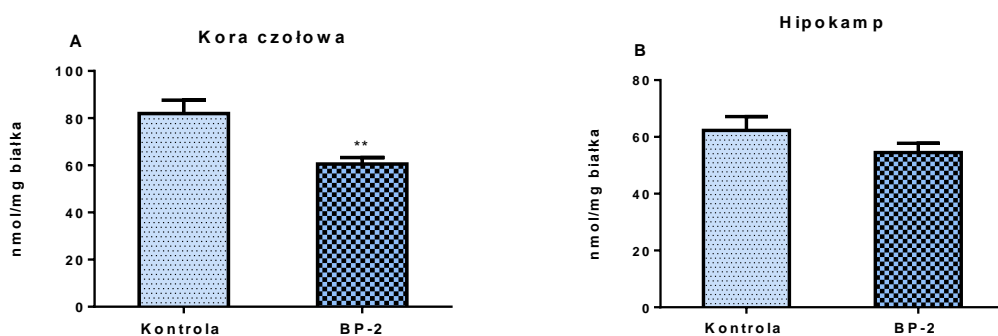
## 4.2.4 Wpływ BP-2 na markery uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego

### 4.2.4.1 Markery stresu oksydacyjnego

Celem oceny potencjalnego niekorzystnego wpływu BP-2 na wybrane struktury mózgu, oznaczano poziom reaktywnych form tlenu, całkowitą aktywność antyoksydacyjną oraz peroksydację lipidów w korze czołowej i hipokampie, strukturach mózgu najbardziej wrażliwych na uszkodzenia.

#### 4.2.4.1.1 Reaktywne formy tlenu – ROS (reactive oxygen species)

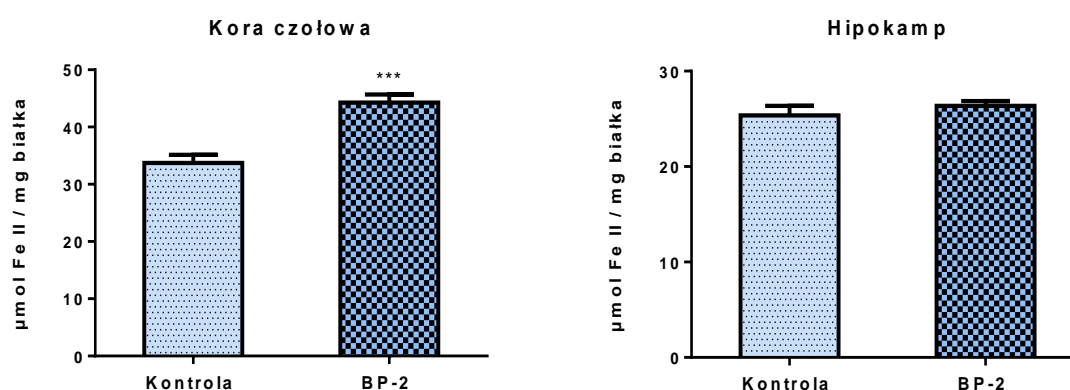
Aplikacja naskórna BP-2 skutkowała istotnym obniżeniem poziomu reaktywnych form tlenu w korze czołowej, w stosunku do poziomu ROS występującego u zwierząt otrzymujących samą maść ( $p < 0,01$ ) (Rycina 19). W hipokampie także zaobserwowano obniżenie poziomu ROS, jednakże zmiana ta nie była statystycznie istotna.



Rycina 19. Wpływ benzofenonu-2 na poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w korze czołowej oraz w hipokampie. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem *t*-studenta,  $n=10$ ,  $**p < 0,01$ .

#### 4.2.4.1.2 Całkowita aktywność antyoksydacyjna

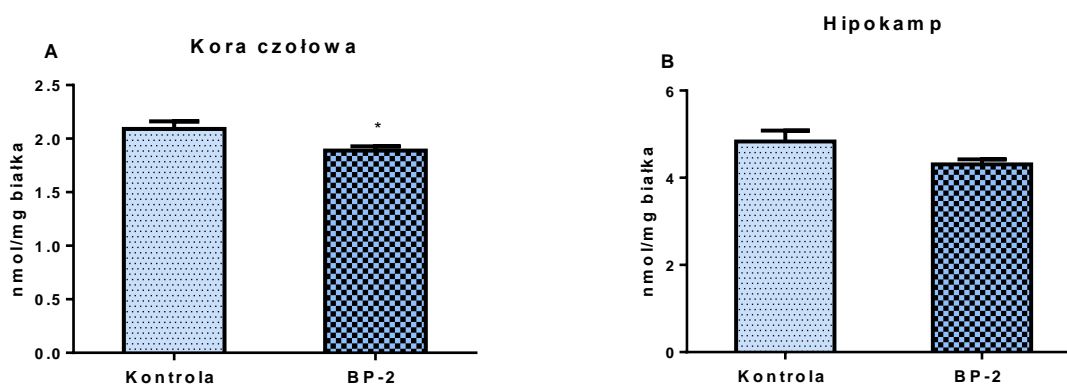
Narażenie zwierząt przez okres 4-tygodni na benzofenon-2 w dawce 100 mg/kg m.c. skutkowało znamienym statystycznie wzrostem całkowitej aktywności antyoksydacyjnej w korze czołowej ( $p < 0,001$ ), natomiast w hipokampie nie stwierdzono istotnych zmian tego parametru pomiędzy grupą kontrolną, a grupą, której podawano BP-2 (Rycina 20).



Rycina 20. Wpływ benzofenonu-2 na całkowitą aktywność antyoksydacyjną w korze czołowej oraz w hipokampie. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta,  $n=10$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.4.1.3 Poziom peroksydacji lipidów (MDA)

W wyniku podawania zwierzętom benzofenonu-2 poziom malonyldialdehydu (marker uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym) został obniżony w stosunku do poziomu tego markera w korze czołowej zwierząt kontrolnych ( $p < 0,05$ ) (Rycina 21). W hipokampie nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic w poziomie malonyldialdehydu pomiędzy badanymi grupami zwierząt.



Rycina 21. Wpływ benzofenonu-2 na poziom peroksydacji lipidów (MDA) w korze czołowej oraz w hipokampie. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem *t*-studenta  $n=10$ ,  $*p < 0,05$ .



#### 4.2.4.2 Wpływ BP-2 na markery procesu apoptozy w OUN

Nie wykazano istotnych zmian w poziomie białek związanych z procesem apoptozy: aktywnej formy kaspazy-3, pro-apoptotycznego białka Bax oraz anty-apoptotycznego białka Bcl-2, w korze czołowej oraz hipokampie szczurów narażonych na BP-2 w porównaniu z grupami kontrolnymi (Tabela VI).

*Tabela VI Wpływ BP-2 na ekspresję białek związanych z apoptozą w korze czołowej oraz hipokampie.*

	<b>Kontrola</b>	<b>BP-2</b>
	<b>Kora czołowa</b>	
<i>kaspaza-3, forma aktywna</i>	<i>100 ± 10.22</i>	<i>92.1 ± 11.51</i>
<i>Bax</i>	<i>100 ± 7.1</i>	<i>107.7 ± 7.5</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>100 ± 5.51</i>	<i>103.2 ± 8,56</i>
	<b>Hipokamp</b>	
<i>kaspaza-3, forma aktywna</i>	<i>100 ± 11.41</i>	<i>112.2 ± 7.62</i>
<i>Bax</i>	<i>100 ± 7.62</i>	<i>88.22 ± 4.48</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>100 ± 8.65</i>	<i>102.6 ± 11.25</i>

*Wyniki przedstawiono, jako średnią ± średni błąd średniej (±SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta n=10.*

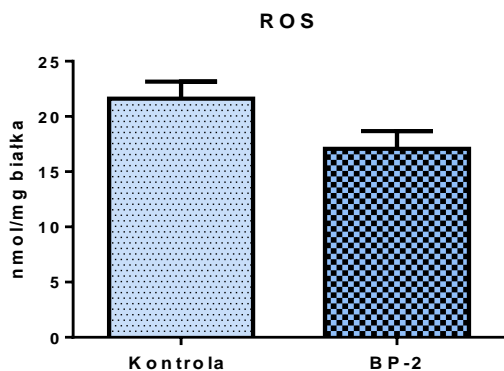
#### 4.2.5 Wpływ BP-2 na komórki rozrodcze męskie

##### 4.2.5.1 Zmiany zachodzące w jądrach pod wpływem działania benzofenonu-2

Po 4-tygodniowej ekspozycji na BP-2 nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic we względnych masach jąder w stosunku do grupy kontrolnej.

#### 4.2.5.1.1 Poziom reaktywnych form tlenu w jądrach

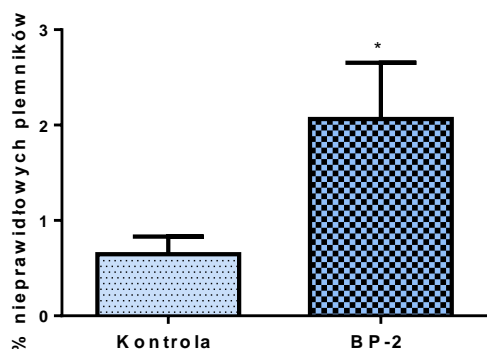
W poziomie reaktywnych form tlenu w jądrach zwierząt poddanych ekspozycji na BP-2 obserwowano tendencję spadkową, jednak zmiany te nie osiągnęły znaczenia statystycznego (Rycina 22).



Rycina 22. Poziom ROS w jądrach. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem *t*-studenta  $n=10$ .

#### 4.2.5.1.2 Zmiany morfologiczne plemników

Stwierdzono, że w nasieniu szczurów otrzymujących BP-2 występuje ok. 2% plemników nieprawidłowych, co jest ponad 3-krotnie więcej w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych (0,6%) ( $p<0,05$ ) (Rycina 23). Zmiany w kształcie główki plemnika (brak akrosomu, skrzywiony akrosom) zostały zakwalifikowane jako wyniki nieprawidłowe.



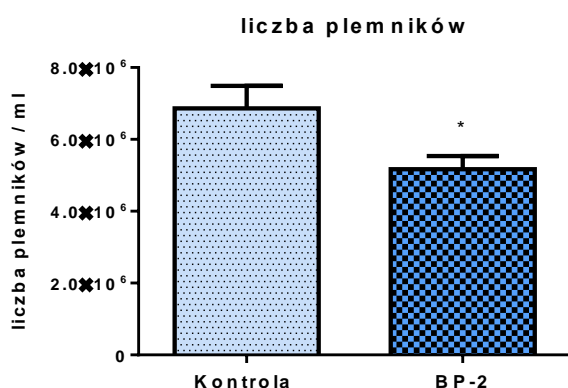
Rycina 23. Procent nieprawidłowych form plemników. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem *t*-studenta  $n=10$ ,  $*p<0,05$ .

#### 4.2.5.1.3 Żywotność plemników – test eozynowy

W celu określenia wpływu BP-2 na żywotność plemników, oceniono zabarwienie główek plemników pobranych z najądrza każdego zwierzęcia, a następnie określono procent martwych plemników. U zwierząt narażonych na benzofenon-2 procent martwych plemników wynosił  $3,85\% \pm 1,8$  ( $\pm$  SEM), natomiast w grupie kontrolnej wartość ta wynosiła  $3,05\% \pm 1,08$  ( $\pm$ SEM). Nie zaobserwowano znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną.

#### 4.2.5.1.4 Wpływ BP-2 na liczbę plemników

Średnia liczba plemników w grupie zwierząt nie otrzymujących BP-2 wynosiła ok. 7mln/ml, natomiast liczebność plemników w grupie zwierząt, które były narażone na działanie BP-2 obniżyła się o prawie 30%, do około 5 mln/ml ( $p < 0,05$ ) (Rycina 24).



Rycina 24. Wpływ BP-2 na liczbę plemników. Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta  $n=10$ ,  $*p < 0,05$ .

#### 4.2.5.1.5 Ruchliwość plemników

W celu określenia wpływu benzofenonu-2 na ruchliwość plemników pobranych z najądrza oceniono liczbę plemników poruszających się ruchem progresywnym, nieprogresywnym oraz nieruchomych. W grupie zwierząt narażonych na działanie BP-2 stwierdzono prawie 3-krotne zmniejszenie liczby plemników poruszających się ruchem progresywnym ( $p < 0,001$ ), natomiast liczba plemników poruszających się ruchem nieprogresywnym wzrosła 3-krotnie ( $p < 0,05$ ). Ponadto, wykazano około 2-krotny wzrost liczby plemników nieruchomych u zwierząt otrzymujących BP-2 w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ) (Tabela VIII).

Tabela VIII Wpływ BP-2 na ruchliwość plemników.

Ruch	Progresywny ± SEM	Nieprogresywny ± SEM	Nieruchome ± SEM
Kontrola	58 ± 4	10 ± 1	32 ± 3
BP-2	20 ± 5↓***	30 ± 7↑*	50± 6↑*

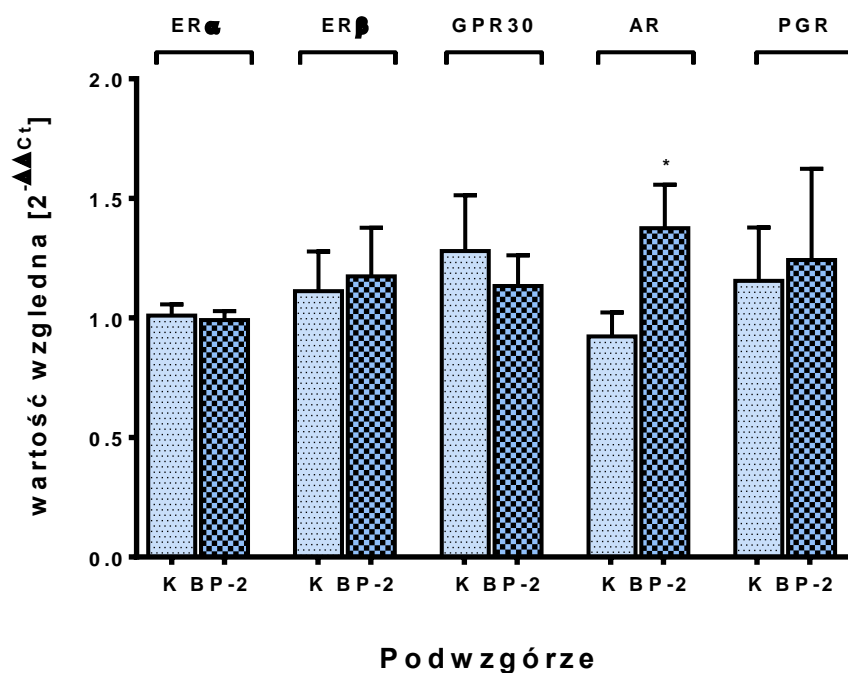
Wyniki przedstawiono, jako średnią ± średni błąd średniej (±SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta n=10 \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

#### 4.2.5.2 Wpływ benzofenonu-2 na receptory estrogenowe: ER $\alpha$ i ER $\beta$ , GPR30, receptory progesteronowe oraz androgenowe w jądrach i podwzgórzu

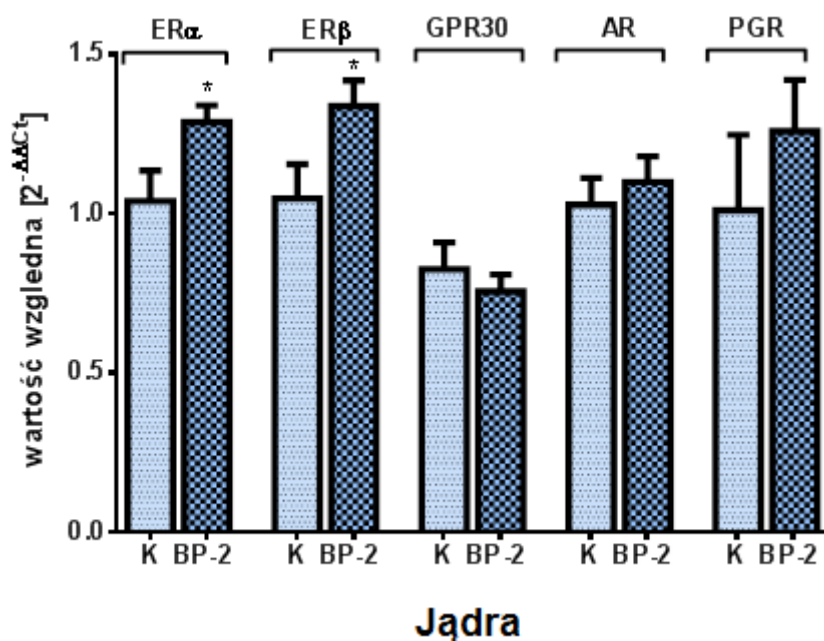
##### 4.2.6.2.1 Zmiany oznaczone metodą RT-PCR

W podwzgórzu nie stwierdzono zmian ekspresji mRNA dla receptorów estrogenowych i progesteronowych, natomiast wykazano znamiennej wzrost poziomu mRNA receptorów androgenowych (p<0,05) u zwierząt otrzymujących BP-2 (Rycina 25).

W jądrach stwierdzono wzrost mRNA receptorów estrogenowych ER $\alpha$  (p<0,05) oraz ER $\beta$  (p<0,05) u zwierząt otrzymujących BP-2, natomiast nie obserwowano różnic w poziomach mRNA receptorów błonowych 17 $\beta$ -estradiolu (GPR30) oraz receptorów androgenowych i progesteronowych (Rycina 26).



Rycina 25. Ekspresja mRNA receptorów estrogenowych, GPR30, androgenowych oraz progesteronowych w podwzgórze. Dane są przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM,  $n=8$ . Istotność statystyczną oceniono testem  $t$ -studenta. \*  $p<0,05$



Rycina 26. Ekspresja mRNA receptorów estrogenowych, GPR30, androgenowych oraz progesteronowych w jądrach. Dane są przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM,  $n=8$ . Istotność statystyczną oceniono testem  $t$ -studenta. \*  $p<0,05$

#### 4.2.5.2 Ekspresja receptorów estrogenowych $\alpha$ i $\beta$ , GPR30, androgenowych i progesteronowych oznaczona metodą Western Blot

Receptory hormonów steroidowych ER $\alpha$ , AR i PR w formie nie związanej ze steroidem mogą być zlokalizowane w cytozolu lub jądrze komórkowym, natomiast po związaniu hormonu i aktywacji wiążą się do DNA w jądrze komórkowym i regulują transkrypcję genów. Poziom receptorów ER $\alpha$ , AR i PR oceniono zarówno w frakcji cytozolowej jak i jądrowej, natomiast receptory ER $\beta$  we frakcji jądrowej, a błonowe dla 17 $\beta$ -estradiolu GPR-30 oznaczono we frakcji błonowej.

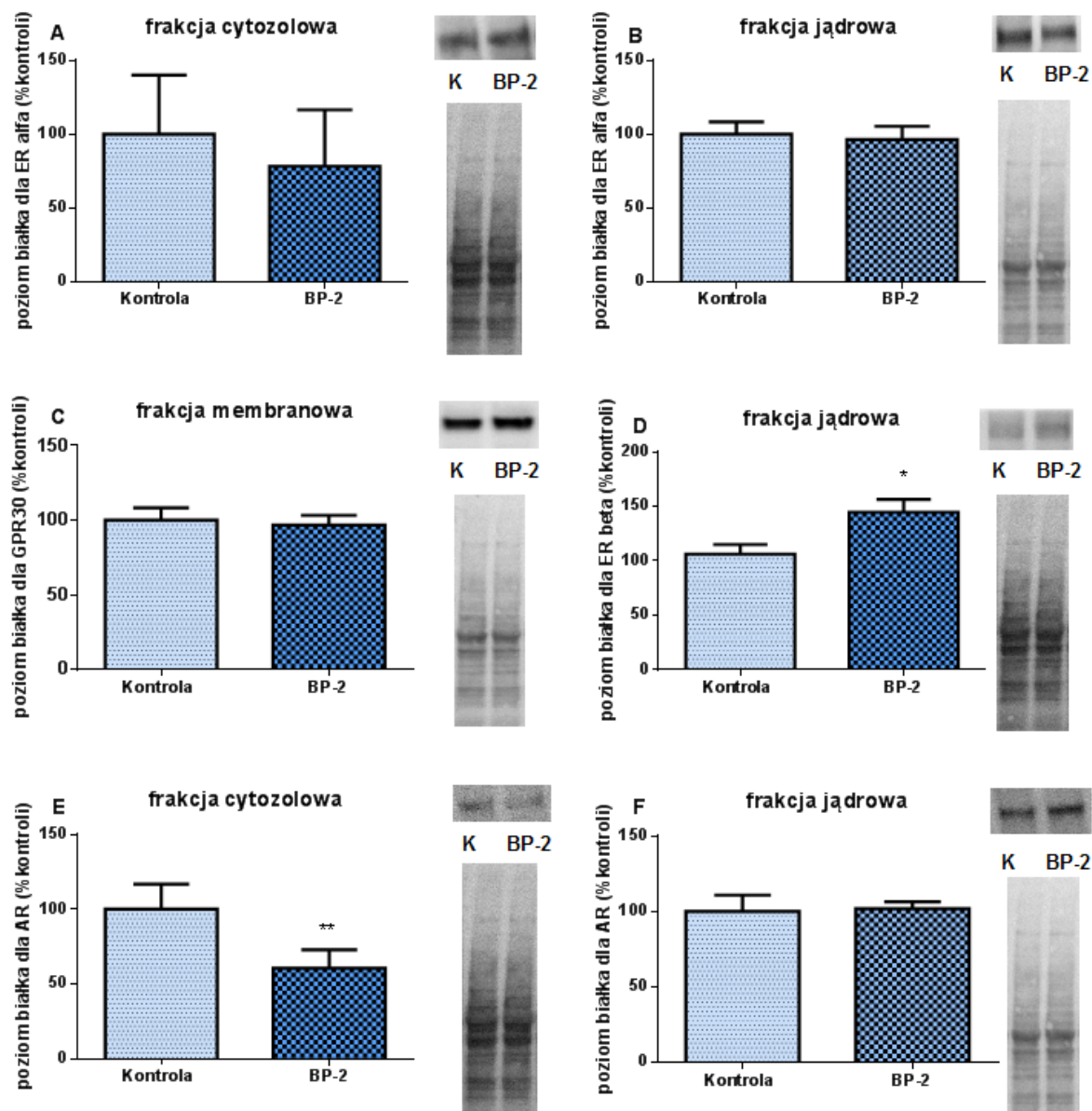
W podwzgórzu zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost poziomu białka dla receptorów ER $\beta$  we frakcji jądrowej (Rycina 27D). W frakcji cytozolowej zaobserwowano znamienne statystycznie obniżenie poziomu białka dla AR, natomiast nie obserwowano zmian w poziomie tego receptora we frakcji jądrowej (Rycina 27E,F). Nie zaobserwowano zmian znamiennych statystycznie również dla receptorów estrogenowych alfa oraz GPR30 (Rycina 27 A-C).

W jądrach zarówno poziom białka dla ER $\alpha$  jak i ER $\beta$  był znamienne statystycznie obniżony we frakcji jądrowej u zwierząt otrzymujących BP-2 (Rycina 28 B,D). Nie obserwowano różnic w poziomie ER $\alpha$  we frakcji cytozolowej, poziomie AR we frakcji cytozolowej i jądrowej (Rycina 28 A,E,F), natomiast poziom GPR30 we frakcji błonowej był znamienne wyższy u zwierząt otrzymujących BP-2, niż u szczurów kontrolnych (Rycina 28 A).

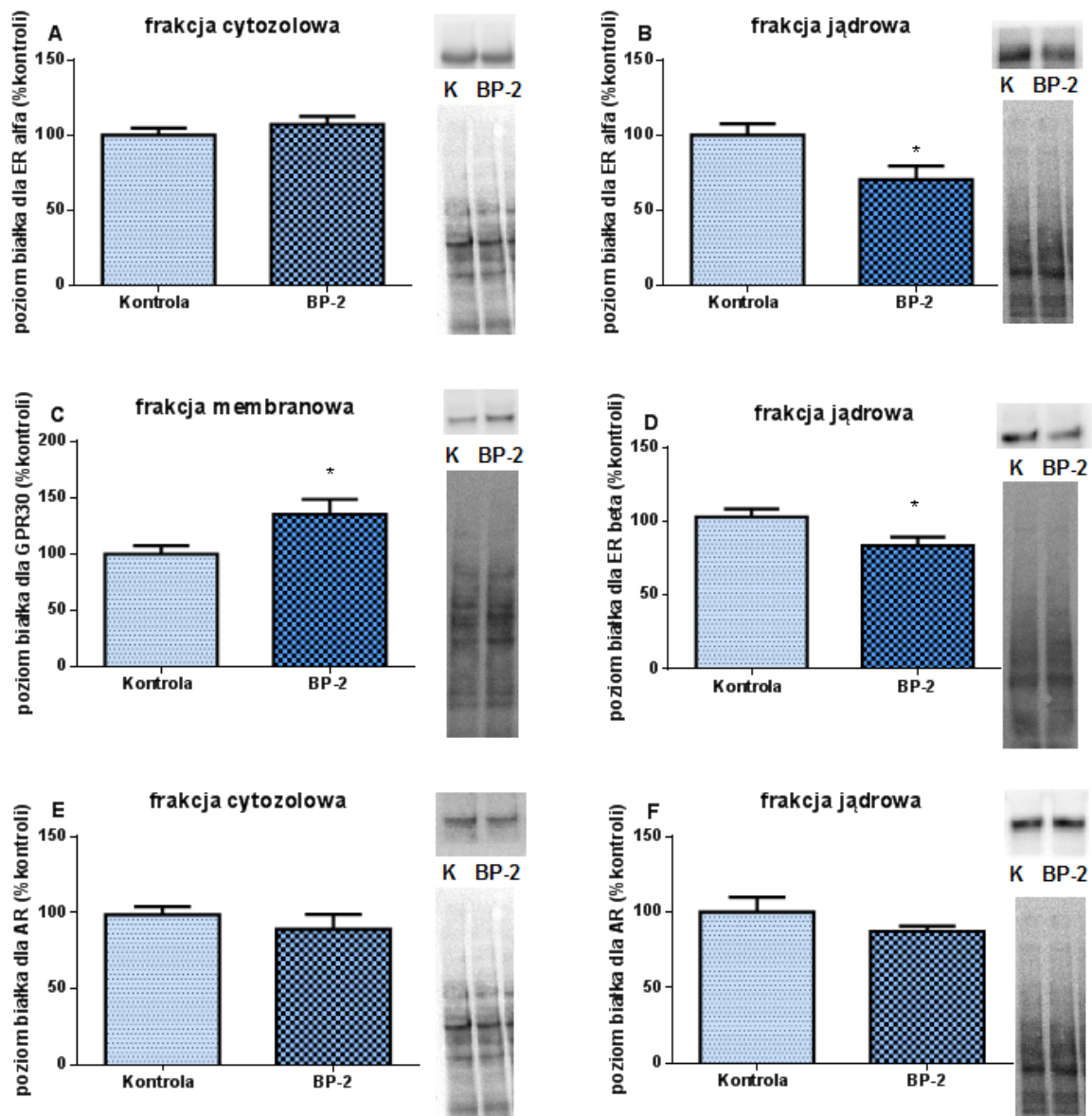
*Tabela VIII Zestawienie zmian zachodzących w podwzgórzu oraz w jądrach z uwzględnieniem podziału na frakcje*

frakcje	ER $\alpha$		ER $\beta$	GPR30	AR	
	jądrowa	cytozolowa	jądrowa	membranowa	jądrowa	cytozolowa
podwzgórze	-	-	↑*	-	-	↓**
jądra	↓*	-	↓*	↑*	-	-

*Wyniki przedstawiono, jako średnią  $\pm$  średni błąd średniej ( $\pm$ SEM). Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta  $n=10$  \* $p<0,05$ ,. Liczba zwierząt w każdej grupie wynosiła  $n=10$ .*



Rycina 27. Wpływ benzofenonu-2 na poziom białka receptorów: ER- $\alpha$  (frakcja cytozolowa – A oraz jądrowa - B), GPR30 (frakcja błonowa – C), ER- $\beta$  (frakcja jądrowa - D), AR (frakcja cytozolowa - E oraz jądrowa - F) w podwzgórzu. Dane są przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM. Istotność statystyczną oceniono testem *t*-studenta. Liczba zwierząt w każdej grupie  $n=10$ , \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  vs kontrola.



Rycina 28. Wpływ benzofenonu-2 na poziom białka receptorów: ER- $\alpha$  (frakcja cytozolowa – A oraz jądrowa - B), GPR30 (frakcja błonowa – C), ER- $\beta$  (frakcja jądrowa - D), AR (frakcja cytozolowa - E oraz jądrowa - F) w jądrach. Dane są przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM. Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta. Liczba zwierząt w każdej grupie  $n=10$ , \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  vs kontrola.



#### 4.2.6 Badania hematologiczne

W pobranej krwi oznaczano liczbę erytrocytów, leukocytów, płytek krwi oraz poziom hemoglobiny, hematokryt, średnią objętość krwinek, średnią masę hemoglobiny w krwince, średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach. Żaden z badanych parametrów nie wykazał znamienych statycznie różnic pomiędzy grupą kontrolną, a grupą narażoną na działanie BP-2 (Tabela IX).

Tabela IX. Morfologia krwi szczura

RBC (mln/ml)			WBC (tys./ml)		
Kontrola	BP-2		Kontrola	BP-2	
8,56 ± 0,13	8,73 ± 0,11	p=0,59	13,05 ± 0,76	12,33 ± 0,70	p=0,49
HGB (g/dl)			PLT(tys./ml)		
Kontrola	BP-2		Kontrola	BP-2	
13,85 ± 0,18	13,93 ± 0,14	p=0,49	575,6 ± 18,66	538,6 ± 46,7	p=0,47
HCT (%)			MCV (fl)		
Kontrola	BP-2		Kontrola	BP-2	
46,16 ± 0,67	46,83 ± 0,61	p=0,47	53,90 ± 0,48	53,60 ± 0,43	p=0,65
MCH (g/dl)			MCHC (pg)		
Kontrola	BP-2		Kontrola	BP-2	
30,09 ± 0,55	29,71 ± 0,42	p=0,59	16,09 ± 0,18	15,91 ± 0,23	p=0,57

Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM, n=10. Istotność statystyczną oceniono testem t-studenta n=10. Krwinki czerwone - RBC (mln/ml), Krwinki białe - WBC (tys./ml), Hemoglobina - HGB (g/dl), Płytki krwi - PLT (tys./ml), Hematokryt - HCT (%), Średnia objętość krwinek - MCV (fl), Średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach - MCH (g/dl), Średnia masa hemoglobiny w krwince - MCHC (pg)

## 5. Dyskusja wyników

Coraz większe zanieczyszczenie środowiska licznymi ksenobiotykami, w tym szczególnie związkami zaburzającymi funkcje układu endokrynologicznego, może być istotną przyczyną coraz częstszego występowania chorób neurodegeneracyjnych, obniżenia płodności, zaburzeń układu immunologicznego oraz dysfunkcji tarczycy. Benzofenony, stosowane jako chemiczne filtry UV są związkami lipofilnymi wchłaniającymi się przez skórę oraz z przewodu pokarmowego i wiele danych dotyczących głównie benzofenonu-3 wskazuje, że mogą one zaburzać funkcję gonad, tarczycy oraz prowadzić do uszkodzenia komórek mózgu (Janjua i wsp., 2004; Jeon i wsp., 2008; Krause i wsp., 2012). W przeciwieństwie do benzofenonu-3, działania benzofenonu-2 na przeżywalność komórek mózgu i funkcje układu immunologicznego w warunkach *in vivo* nie były dotychczas badane, natomiast wiadomo, że związek ten silniej niż BP-3 zaburza funkcję gonad.

### 5.1 Wpływ BP-2 na żywotność komórek nerwowych

W świetle obecnych badań bardzo istotną konsekwencją narażenia na benzofenony może być indukowanie czy nasilanie uszkodzeń neuronów i w konsekwencji zwiększania ryzyka rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Choroba Parkinsona, Alzheimerera oraz stwardnienie boczne zanikowe należą do najczęściej występujących chorób, u podłoża których leży stopniowa, postępująca utrata neuronów. Aktualne dane wskazują, że apoptoza odgrywa kluczową rolę w patogenezie zaburzeń neurodegeneracyjnych (Uttara i wsp., 2009, Li i wsp., 2014). Warto wspomnieć, że zmiany apoptotyczne w neuronach pojawiają się na wiele lat przed klinicznymi objawami choroby. Narażenie na niskie stężenia związków chemicznych, które w krótkim czasie nie powodują znaczących zmian w OUN, w dłuższej perspektywie mogą zakłócać mechanizmy neuroprotekcji. Złożony patomechanizm chorób neurodegeneracyjnych sugeruje, że jednym z czynników inicjujących proces chorobowy jest aktywacja apoptozy przez związki egzogenne, w tym filtry UV (Krzyżanowska i wsp., 2018; Lien i wsp., 2015). Przeprowadzone badania miały na celu wykazanie, czy narażenie na BP-2 może faktycznie nasilać uszkodzenia komórek mózgu. Wstępne badania *in vitro* prowadzone w komórkach ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y faktycznie potwierdziły, że BP-2 w stosunkowo niskich stężeniach indukuje proces apoptozy badanych komórek, natomiast w wysokich stężeniach wywołuje również proces nekrozy. Działanie cytotoksyczne było zależne od czasu narażenia na badany związek. Po 24 godzinach hodowli komórek neuroblastomy z wybranymi stężeniami BP-2, nie stwierdzono wpływu badanego związku na uszkodzenia błony komórek określane

pomiarem aktywności LDH w pożywce hodowlanej ani na żywotność komórek ocenianą w teście redukcji MTT. W wyniku wydłużenia ekspozycji na działanie BP-2 do 72 godzin zaobserwowano zmniejszenie żywotności neuronów, któremu towarzyszył wzrost uwalniania LDH. Zmiany te sugerują, że benzofenon-2 w stężeniach  $10^{-4}$  M oraz  $10^{-5}$  M indukował proces nekrozy. Zmniejszenie redukcji MTT przez komórki odzwierciedla aktywność enzymów mitochondrialnych, co może być spowodowane zmniejszeniem metabolizmu, a tym samym żywotności, ale może również wynikać ze zmian proliferacyjnych komórek. Jednak równoczesny wzrost aktywności LDH wskazuje na uszkodzenie błony komórkowej, co w konsekwencji prowadzi do nekrozy. Zmiany nekrotyczne w komórkach obserwowano jedynie po wysokich stężeniach benzofenonu-2, dużo wyższych niż jego stężenie w mózgu, wynoszące około  $10^{-7}$  M. W przeciwieństwie do zmian nekrotycznych, aktywność głównego enzymu apoptozy, kaspazy-3 wzrosła w neuronach już przy niskich stężeniach badanego związku. Zmiany apoptotyczne zaobserwowano w stężeniach znacznie niższych niż stężenia wywołujące nekrozę, a więc w stężeniach, w których badany związek może występować w mózgu. Jednakże aktywacja kaspazy-3 nie jest jednoznacznie związana z apoptozą, gdyż enzym ten może być także zaangażowany w proces migracji, proliferacji i różnicowania komórek mózgowych (Garnier i wsp., 2004; Wnuk i wsp., 2018a). W barwieniu Hoechst zaobserwowano kondensację chromatyny oraz fragmentację jądra komórkowego pod wpływem niskich stężeń BP-2, co potwierdziło indukcję apoptozy przez badany związek. Wyniki sugerują, że benzofenony mogą być przyczyną indukcji lub nasilania procesu apoptozy w komórkach nerwowych, ale nie powinny inicjować nekrozy. Należy zauważyć, że neurony były narażone na działanie BP-2 przez maksymalnie 72-godziny, podczas gdy populacja ludzka może być narażona przez całe życie począwszy od życia płodowego. Uzyskane wyniki sugerują, że filtry UV mogą niekorzystnie wpływać na strukturę i funkcję komórek nerwowych, a w konsekwencji być jednym z czynników zaangażowanych w patogenezę zaburzeń neurodegeneracyjnych. Badania *in vitro* jednak nie ukazują w pełni złożonego środowiska organizmu żywego, zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym, dlatego po wykazaniu pro-apoptotycznego działania BP-2 *in vitro* badałam działanie tego związku w warunkach *in vivo*.

Przeprowadzone badania *ex vivo* miały na celu ocenę zmian zachodzących pod wpływem benzofenonu-2 w dłuższym okresie czasu, lepiej odzwierciedlającym narażenie człowieka. W pierwszym etapie badań określano przenikanie BP-2 przez skórę do krążenia ogólnego oraz zdolność tego związku do przechodzenia przez barierę krew – mózg. BP-2

podawany był na skórę, ponieważ jest to główna droga narażenia na benzofenony u ludzi (Frederiksen i wsp., 2014; Kim i wsp., 2017; Matta i wsp., 2019). Po 4-tygodniowym podawaniu stężenie BP-2 w osoczu, wynosiło 0,3 µg / ml, podczas gdy po hydrolizie całkowity poziom tego związku był około 7-krotnie wyższy niż frakcji wolnej. Także badania *in vivo* innych autorów wykazały, że benzofenony mogą szybko przenikać przez skórę do krążenia ogólnoustrojowego, ponieważ ich obecność w osoczu wykazano już 1 - 2 godzin po aplikacji (Janjua i wsp., 2008). Stwierdzono także, że poziomy benzofenonów w osoczu oraz moczu są zależne od płci i wynikają z różnic w metabolizmie, dystrybucji i kumulacji tych związków (Janjua i wsp., 2004). Nieliczne dane literaturowe wskazują, że w zależności od dawki, maksymalne stężenie BP-2 w surowicy po 30 minutach od podania dożołądkowego, waha się od 0,1 do 1,1 µg / ml (Schlecht i wsp., 2008). Wśród benzofenonów najwięcej danych dotyczy absorpcji i stężenia benzofenonu-3 we krwi u ludzi i zwierząt doświadczalnych. U ludzi, którzy stosowali komercyjnie dostępne preparaty zawierające BP-3 w ilości 4, 5 oraz 6%, przez krótki okres czasu (4 dni), stwierdzano odpowiednio średnie stężenia w osoczu 170, 195, 210 ng/ml, natomiast maksymalne stężenia wynosiły nawet 530 ng/ml. Dodatkowo maksymalne stężenie BP-3 w osoczu w 4 dniu było znacznie wyższe niż w pierwszym dniu eksperymentu, co jest związane z zdolnością badanego związku do kumulacji w organizmie. Potwierdza to również obecność BP-3 w trzecim dniu po zakończeniu stosowania preparatów w stężeniu wyższym niż 20 ng/ml (Matta i wsp., 2019, Tarazona i wsp., 2013, Janjua i wsp., 2008). Wykazane w naszych badaniach stężenie BP-2 w osoczu krwi, pobranej 24 godziny po ostatnim podaniu naskórnym wynosiło około 324 ng/ml, co jest zgodne z oznaczonymi poziomami benzofenonów, po doustnym podaniu (Janjua i wsp. 2008). Ogólnie szacuje się, że około 10% dawki skórnej benzofenonów jest wchłaniane do krążenia ogólnego (Jiang i wsp., 1999). Jak dotąd niewiele wiadomo na temat stężeń filtrów UV w innych tkankach. BP-3 jako związek lipofilowy gromadzi się w narządach, zwłaszcza w wątrobie, nerkach, śledzionie i jądrach, a jego stężenia w tych narządach szczurów są około 10-krotnie wyższe niż w surowicy (Okereke i wsp., 1994; Tarazona i wsp., 2013). Stwierdzono również, że benzofenony posiadają długi okres półtrwania bo wynoszący między 24 - 31 godzin (Matta i wsp., 2019).

Ze względu na brak danych na temat poziomów benzofenonu-2 w organizmie po podaniu naskórnym, określono stężenie benzofenonu-2 we krwi, tkankach obwodowych (wątrobie, tkance tłuszczowej) oraz strukturach mózgu. W wątrobie, organie metabolizującym ksenobiotyki, średnie stężenie frakcji wolnej benzofenonu-2 było prawie czterokrotnie wyższe (1354 ng/g tkanki) niż w surowicy. Stężenie całkowite BP-2 było prawie 3-krotnie wyższe

(3757 ng/g tkanki) niż frakcji wolnej oraz ponad 1,5-krotnie wyższe niż całkowite stężenie BP-2 w surowicy. Wysokie stężenia BP-2 obserwowane w wątrobie, są związane z jego metabolizmem w tym narządzie. Dodatkowo, benzofenon-2 jest związkami, który w procesie biotransformacji nie ulega reakcjom I fazy. W przeciwieństwie do BP-3, benzofenon-2, na który był narażony Danio rerio, jest metabolizowany wyłącznie w reakcjach fazy II (Fol i wsp., 2017). Badania przeprowadzone na szczurach, którym podawano badany związek doustnie potwierdzają wcześniejsze wyniki uzyskane w badaniach na rybach. Wykazano, że produkty sprzężania benzofenonu-2 były obecne w znacznie wyższym stężeniu niż związek macierzysty zarówno w surowicy jak i moczu (Schlecht i wsp., 2008). Badany związek jest szybko sprzężany, głównie z glukuronianem oraz w mniejszym stopniu z siarczanem i wydalany wraz z moczem. Obecne badania wykazały, że więcej BP-2 w postaci koniugatów występowało w osoczu niż w wątrobie, co sugeruje, że metabolizm tego związku występuje również w innych narządach (Jeon i wsp., 2008). Jelito może być kolejnym prawdopodobnym organem metabolizmu BP-2, ponieważ syntetyczne steroidy, do których benzofenony wykazują podobieństwo strukturalne, są metabolizowane głównie w jelitach (Back i wsp., 1990). Metabolizm oraz aktywność biologiczna związków zależy od budowy chemicznej oraz właściwości lipofilowych. Ze względu na lipofilowy charakter BP-2, który predysponuje do kumulacji wykazano stosunkowo wysokie stężenie badanego związku w tkance tłuszczowej, wynoszące 823 ng/g tkanki. W jądrach stężenie BP-2 było niższe i wynosiło około 150 ng/g tkanki, co prawdopodobnie związane jest z ochronnym działaniem bariery krew-jądro. Najniższe stężenia badanego związku były obserwowane w strukturach OUN, co może wynikać z obecności czterech grup hydroksylowych w cząsteczce BP-2, zwiększających jego właściwości hydrofilowe w porównaniu z benzofenonem-3 i osłabiające przechodzenie przez barierę krew-mózg. Niski poziom BP-2 w korze czołowej oraz hipokampie, może wynikać również z faktu, że związek ten oznaczany był dopiero po 24 godzinach od ostatniego podania (jeden punkt czasowy), a więc we wcześniejszych punktach czasowych jego stężenie mogło być wyższe. Spośród struktur mózgu najbardziej podatnych na uszkodzenia, wyższe poziomy BP-2 występowały w korze czołowej niż w hipokampie, co jest zgodne z często obserwowanym zjawiskiem większej kumulacji lipofilowych ksenobiotyków w korze mózgowej niż w obszarach podkorowych (Garza-Lombó i wsp., 2018; Kajta i wsp., 2013).

Badając efekty działania BP-2 w wybranych strukturach mózgu w przeciwieństwie do przewidywań, ani w korze czołowej ani w hipokampie nie wykazaliśmy nasilenia stresu oksydacyjnego ani zwiększenia poziomu markerów apoptozy, co wskazywałoby na indukcję

uszkodzenia komórek. Podawanie BP-2 przez okres 4-tygodni na skórę nie zmieniło poziomu aktywnej postaci kaspazy-3, enzymu wykonawczego w procesie apoptozy ani kluczowych białek regulujących apoptozę w obu obszarach mózgu. Uzyskane wyniki nie potwierdziły zatem naszych wcześniejszych danych z badań *in vitro* (Broniowska i wsp., 2016), w których wykazaliśmy, że BP-2 obecny w pożywce hodowlanej przez 72 godziny w stężeniach w zakresie od 0,1 do 100  $\mu\text{M}$  indukował apoptozę komórek linii SH-SY5Y. W hipokampie stężenie BP-2 wynosiło około 0,02  $\mu\text{M}$ , a więc jest to stężenie niższe niż te które indukowały apoptozę w komórkach SH-SY5Y. Jednak w korze czołowej stężenie BP-2 było tylko nieznacznie niższe (0,07  $\mu\text{M}$ ) od stężeń, które indukowały apoptozę w komórkach SH-SY5Y. Co ciekawe, w korze czołowej nie tylko nie obserwowano zmian w markerach apoptozy, ale narażenie na BP-2 wywołało korzystne zmiany w markerach stresu oksydacyjnego. Związek ten zmniejszał poziom ROS, zwiększał całkowitą zdolność antyoksydacyjną i obniżał peroksydację lipidów, a więc do pewnego stopnia zwiększał endogenne mechanizmy neuroprotekcji. Indukcja całkowitej aktywności antyoksydacyjnej przez BP-2 była prawdopodobnie przyczyną inaktywacji i obniżenia poziomu ROS, a w konsekwencji zmniejszenia peroksydacji lipidów. Wywołany przez BP-2 wzrost całkowitej zdolności antyoksydacyjnej może wynikać z nasilenia syntezy endogennych enzymów antyoksydacyjnych. Inaczej niż w korze czołowej, w hipokampie nie było zmian w markerach stresu oksydacyjnego, co może wynikać z niskiego poziomu BP-2 w tej strukturze. Korzystny wpływ BP-2 w korze czołowej jest trudny do wyjaśnienia, zwłaszcza dlatego, że badania przeprowadzone z innym związkiem z grupy benzofenonów, tj. benzofenonem-3, wykazały jego pro-apoptotyczne działanie w tej strukturze mózgu (Krzyżanowska i wsp., 2018; Skórkowska i wsp., 2020). Różnica w działaniu tych związków wynika prawdopodobnie z ich penetracji do OUN, a ta z kolei z różnic w strukturach chemicznych. Benzofenon-2 jest mniej lipofilowy niż benzofenon-3, co może być głównym powodem jego słabszej penetracji do mózgu, a zatem braku efektu neurotoksycznego. Z drugiej strony wiadomo, że nawet niewielka zmiana w strukturze związku może znacząco zmienić jego efekty biologiczne. Na przykład, badając wpływ fluorowanych pochodnych benzofenonu w modelach *in vitro*, wykazano, że w zależności od struktury chemicznej niektóre z nich wykazują właściwości przeciwutleniające (Belluti i wsp., 2014). Na podstawie istniejących danych nie jest możliwe ustalenie, czy działanie antyoksydacyjne BP-2 w korze czołowej wynika z aktywacji endogennych, antyoksydacyjnych mechanizmów wyzwalanych przez niskie stężenia związków neurotoksycznych czy jest wynikiem właściwości antyoksydacyjnych badanego związku.

Wydaje się jednak, że ze względu na silne właściwości proapoptotyczne BP-2 w badaniach *in vitro*, pierwsza sugestia jest bardziej prawdopodobna.

Różnice w działaniu na komórki mózgu pomiędzy badanym przez nas wcześniej BP-3, a obecnymi badaniami dotyczącymi BP-2 mogą wynikać nie tylko z budowy chemicznej związków, ale również ze sposobu narażenia. W przypadku BP-3 szczury były narażone na jego działanie w okresach najsilniejszej neurogenezy, a więc w trakcie życia płodowego oraz w wieku 6 i 7 tygodni, podczas gdy w obecnych badaniach BP-2 podawany był zwierzętom dorosłym (Krzyżanowska i wsp., 2018; Skórkowska i wsp., 2020).

Możliwe jest także, że korzystne działanie BP-2 w korze czołowej wynika z nasilania przez ten związek syntezy hormonów tarczycy, które wykazują działanie neuroprotektcyjne. Stwierdzono bowiem, że hormony tarczycy także w mózgu osobników dorosłych mogą wpływać na transkrypcję niektórych genów, zwłaszcza tych zaangażowanych w regulację metabolizmu w mózgu i wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału, a w konsekwencji wykazywać działanie ochronne na komórki ośrodkowego układu nerwowego (Vallortigara i wsp., 2009; Remaud i wsp., 2014; Wang i wsp., 2015).

## **5.2 Wpływ BP-2 na funkcję tarczycy**

Związki aktywne hormonalnie są to związki pochodzenia egzogenne, które mogą oddziaływać na układ dokrewny poprzez szereg różnych mechanizmów: wiążąc się z ich receptorami, wpływając na syntezę i wydzielanie hormonów, ich transport oraz metabolizm i wydalanie. Obecnie coraz więcej prac wskazuje, że związki te wpływają nie tylko na funkcję hormonów płciowych, lecz także na wydzielanie hormonów tarczycy. Nasilenie występowania chorób tarczycy związane jest także z nadmierną ekspozycją na ksenobiotyki, w tym szczególnie na związki z grupy EDCs. Ponieważ wykazano, że benzofenony mogą zaburzać funkcję tarczycy, dlatego w obecnej pracy określony został wpływ BP-2 na poziom hormonów tarczycy. U zwierząt poddanych działaniu BP-2 poziomy wolnych, aktywnych form zarówno T3, bardziej aktywnego hormonu tarczycy, jak i T4 były podwyższone, podczas gdy poziom TSH uwalniany z przysadki mózgowej zmniejszył się. Takie zmiany poziomów fT3, fT4 i TSH obserwowano nie tylko 24 godziny po ostatnim podaniu BP-2, ale także 2 godziny po podaniu, co świadczy o istnieniu ustalonej nadczynności tarczycy. W przeciwieństwie do naszych wyników, wcześniejsze dane wskazywały na indukcję przez BP-2 niedoczynności tarczycy. Wykazano bowiem, że doustne podawanie wysokich dawek BP-2 przez 5 dni samicom szczura szczepu Sprague Dawley z resekcją jajników nie zmienia poziomu TSH, ale zmniejsza

całkowite stężenie T3 i T4 we krwi (Jarry i wsp., 2004) lub zwiększa TSH z jednoczesnym zmniejszeniem całkowitego poziomu T4, ale nie wpływa na poziom T3 (Schmutzler i wsp., 2007). Jak wykazano w badaniach *in vitro*, BP-2 może zaburzać homeostazę hormonów tarczycy poprzez hamowanie peroksydazy tarczycowej, kluczowego enzymu w syntezie tych hormonów (Schmutzler i wsp., 2007) oraz poprzez bezpośrednie działanie agonistyczne na transkrypcję genu zależną od hormonów tarczycy (Hofmann i wsp., 2009). BP-2 ma również zdolność wiązania się z transtyretyną, białkiem surowicy transportującym T4 (Zhang i wsp., 2016). Różnice pomiędzy obecnymi badaniami wykazującymi nadczynność tarczycy u samców szczurów po 4-tygodniowym podawaniu BP-2 przez skórę, a wcześniejszymi danymi uzyskanymi u samic szczurów z resekcją jajników, którym podawano badany związek doustnie przez krótki okres mogą wynikać z różnych powodów (Jarry i wsp., 2004; Schmutzler i wsp., 2007). Główna przyczyna tych rozbieżności wydaje się być związana z różnicami w stężeniu badanego związku we krwi po podaniu naskórnym lub doustnym. Określając poziom BP-2 we krwi 24 godziny po ostatnim podaniu na skórę, stwierdziliśmy stężenie około 0,3 µg/ml, natomiast po podaniu doustnym maksymalne stężenie BP-2 w surowicy obserwowano po 30 minutach i zależnie od dawki wahało się od 0,1 do 1,1 µg/ml, ale po tym czasie poziom BP-2 we krwi szybko się obniżał (Schlecht i wsp., 2008). Dane te wykazują duże różnice w szybkości metabolizmu badanego związku, w zależności od drogi podawania. Dodatkowo różnice w czasie ekspozycji (4 tygodnie w porównaniu do 5 dni), płci (samice i samce) mogą być odpowiedzialne za odmienne działanie BP-2 na aktywność osi HPT. Ponadto wycięcie jajników prowadzące do usunięcia źródła 17β-estradiolu i progesteronu może również wpływać na syntezę hormonów tarczycy. Co więcej w badaniach przeprowadzonych przez Schlecht i wsp. (2008) oraz Jarry i wsp. (2004) określono całkowite poziomy T3 i T4, podczas gdy w obecnej pracy badaliśmy biologicznie aktywną, wolną frakcję T3 i T4, której poziomy bardziej korelują ze stanem klinicznym niż całkowite stężenia hormonów tarczycy.

Na podstawie uzyskanych wyników nie jest możliwe wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania BP-2 na syntezę lub uwalnianie hormonów tarczycy, ponieważ hamowanie peroksydazy tarczycowej stwierdzone w badaniu *in vitro* powinno mieć odwrotny skutek. Być może działanie BP-2 na receptory estrogenowe beta (ERβ), receptory związane z receptorem estrogenowym (ERR1) i ekspresję receptora węglowodorów aromatycznych (AhR) w tarczycy prowadzi do zmian w syntezie hormonów tarczycy (Schlecht i wsp., 2004). Niemniej jednak, biorąc pod uwagę zarówno wzrost poziomu hormonów tarczycy wywołany przez BP-2 stosowany na skórę, jak i stymulujące działanie tego związku na transkrypcję genu zależną od



hormonów tarczycy wykazaną w badaniu *in vitro* (Hofmann i wsp., 2009), jest możliwe, że związek ten może być istotną przyczyną nadczynności tarczycy. Nie można jednak wykluczyć, że wzrost poziomu hormonów tarczycy jest zmianą kompensującą ich słabsze działanie, ponieważ stwierdzono, że BP-2 może wywierać efekty przeciwne niż hormony tarczycy (Kim i wsp., 2011).

### **5.3 Wpływ BP-2 na funkcję jąder i poziom hormonów płciowych**

Niepłodność stała się nie tylko dramatem par, ale również problemem społecznym, co doprowadziło do zakwalifikowania jej jako choroby cywilizacyjnej. Coraz większa liczba osób cierpiących z powodu braku potomstwa, nasila poszukiwania przyczyn, mechanizmu oraz metod leczenia. Przyczyny są bardzo złożone, należą do nich chroniczny stres, nadmierny wysiłek fizyczny i psychiczny, nieprawidłowe odżywianie oraz narażenie na czynniki środowiskowe, w tym benzofenony prowadzące do zaburzeń hormonalnych. Zaburzenia płodności u mężczyzn manifestują się głównie poprzez zaburzenia liczby, ruchliwości, budowy plemników oraz ich żywotności. Przez ostatnie 40 lat liczba plemników w ejakulacie zmniejszyła się o 50-60%, co wiązane jest z zanieczyszczeniem środowiska związkami, które mogą zwiększać stężenie estrogenów lub obniżać stężenie testosteronu (Bae i wsp., 2016; Buck Louis i wsp., 2015; Pollack i wsp., 2015). Zaburzeniami hormonalnymi występującymi w okresie prenatalnym tłumaczy się obserwowany w ostatnich latach wzrost częstości występowania wnetrostwa, spodziectwa oraz zaburzeń płodności (Hsieh i wsp., 2007). Ze względu na kluczową rolę testosteronu w procesie spermatogenezy, oznaczono poziom tego hormonu zarówno we krwi jak i jądrach szczurów. Stężenie testosteronu całkowitego we krwi szczurów narażonych na działanie BP-2 było ponad czterokrotnie niższe w porównaniu do grupy kontrolnej, a stężenie frakcji wolnej testosteronu czyli czynnej biologicznie było ponad 3 – krotnie niższe. Podobnie jak we krwi również w jądrach poziom testosteronu całkowitego był około 4 krotnie niższy niż u zwierząt kontrolnych. Trudny do wytłumaczenia jest fakt, że u zwierząt otrzymujących BP-2 dochodziło równocześnie do obniżenia nie tylko poziomu testosteronu, lecz także poziomu LH we krwi, gonadotropiny stymulującej komórki Leydiga do syntezy testosteronu. Taka zmiana sugeruje, że przyczyną słabszej syntezy testosteronu może być nie uszkodzenie jąder lecz dysfunkcja na poziomie przysadki mózgowej lub podwzgórza. Obniżenie wydzielania LH nie wynika jednak ze zwiększonego wydzielania prolaktyny, hormonu który hamuje wydzielanie LH, ponieważ poziom prolaktyny nie ulegał zmianie pod wpływem BP-2. Przyczyną obniżenia sekrecji LH może być natomiast zwiększony poziom  $17\beta$ -estradiolu, który u samców silniej niż u samic w mechanizmie hamującego

sprężenia zwrotnego obniża syntezę gonadotropin. Ponadto w podwzgórzu u zwierząt otrzymujących BP-2 obserwowano wzrost poziomu receptora ER $\beta$  a spadek stężenia AR, mimo podniesionego poziomu AR mRNA, co także sugeruje udział estrogenu w hamowaniu wydzielania LH. Takie przesunięcie równowagi pomiędzy syntezą testosteronu, a 17 $\beta$ -estradiolu może być spowodowane zwiększoną aktywnością enzymu – aromatazy. Stwierdzono bowiem, że ekspresja mRNA aromatazy oraz wzrost jej aktywności, enzymu odpowiedzialnego za przekształcenie testosteronu do 17 $\beta$ -estradiolu, jest nasilana przez benzofenon-2 (Williams i Darbre, 2019). Wzrost aktywności aromatazy, może więc być przyczyną podwyższenia stężenia 17 $\beta$ -estradiolu, który działając na podwzgórze i nasilając ujemne sprzężenie zwrotne może obniżać poziom LH oraz testosteronu (Masterson i wsp., 2020). Mechanizm działania benzofenonów na syntezę testosteronu nie jest w pełni poznany, jednakże stwierdzono że BP-1 zmniejsza powstawanie testosteronu poprzez hamowanie dehydrogenazy 17-beta-hydroksysteroidowej typu 3 (17 $\beta$ -HSD3), kluczowego enzymu katalizującej przekształcanie androstendionu do testosteronu (Nashev i wsp., 2010). Zgodnie z wynikami obecnych badań korelację pomiędzy narażeniem na działanie benzofenonów, a obniżeniem poziomu testosteronu we krwi wykazano także w nielicznych badaniach u mężczyzn (Janjua i wsp., 2004; Scinicariello i Buser, 2016). Podobną zależność stwierdzono także w grupie chłopców w wieku 13-19 lat, gdzie testosteron pełni kluczową rolę w prawidłowym dojrzewaniu (Scinicariello i Buser, 2016).

Ze względu na wykazane zaburzenia w syntezie hormonów płciowych oraz właściwości estrogenne i antyandrogenne benzofenonu-2, w niniejszej pracy oceniono zmiany podstawowych parametrów nasienia szczurów narażonych na BP-2. Stwierdzono, że badany związek obniża całkowitą liczbę plemników a dodatkowo plemniki częściej wykazywały zmiany morfologiczne dotyczące główki. Liczba plemników poruszającym się ruchem progresywnym, a więc kluczowym dla procesu zapłodnienia, była obniżona, natomiast zwiększony był odsetek plemników o ruchu nieprogresywnym lub całkiem nieruchomych. Otrzymane wyniki są spójne z doniesieniami literaturowymi, w których wykazano zakłócenie procesów wytwarzania gamet pod wpływem BP-2 u ryb (Blüthgen i wsp., 2012; Weisbrod i wsp., 2007). Podobne wyniki uzyskano w badaniu określającym korelację pomiędzy stężeniem benzofenonów w moczu, a wybranymi parametrami nasienia. U mężczyzn stężenie BP-2 było związane z obniżoną liczbą plemników oraz mniejszym odsetkiem plemników poruszających się ruchem progresywnym, a dodatkowo w nasieniu występowała zwiększona liczba plemników niedojrzałych (Buck Louis i wsp., 2015). Zmiany te mogą wpływać na

plodność par, co zostało wykazane w badaniu kohortowym, gdzie obecność benzofenonów była związana z 31% wydłużeniem czasu oczekiwania na ciążę (Louis i wsp., 2014). Ostatnie badania wskazują na obecność benzofenonów nie tylko we krwi i moczu, lecz także w płynie nasiennym oraz na zaburzenie przez te związki nie tylko powstawania prawidłowych plemników, ale także procesu zapłodnienia poprzez aktywację kanałów CatSper  $Ca^{2+}$  (Frederiksen i wsp., 2020; Kim i wsp., 2011; León i wsp., 2010). Dodatkowo, u myszy narażenie na BP-2 związane jest ze zwiększonym występowaniem u potomstwa wady wrodzonej narządów płciowych, jaką jest spodziectwo (Hsieh i wsp., 2007; Weisbrod i wsp., 2007). W przeciwieństwie do badanego związku, BP-3 nie powoduje zmian w układzie płciowym u osobników dorosłych (Adoamnei i wsp., 2018; Daston i wsp., 1993), natomiast wykazano, że związek ten w wysokich dawkach stosowany u matek, może powodować u potomstwa obniżoną liczbę plemników, zmiany masy ciała i organów, a także zaburzenia drugorzędowych cech płciowych (Chen i wsp., 2016; Nakamura i wsp., 2015). Zmiany w układzie rozrodczym mogą być związane ze zmienioną równowagą pomiędzy  $17\beta$ -estradiolem i testosteronem w wyniku bezpośredniego oddziaływania benzofenonów lub poprzez zaburzenia poziomów hormonów tarczycy, które jak wiadomo prowadzą do zmian poziomów hormonów płciowych. Co ciekawe, BP2 wpływa na ekspresję genów białek zaangażowanych w proces wytwarzania hormonów w sposób odwrotny do oddziaływania trójiodotyroniny. Badania molekularnego mechanizmu działania BP2 na proces steroidogenezy sugerują, że związek ten działa częściowo jako antagonistą hormonów tarczycy (Kim i wsp., 2011). Bezpośrednim powodem zaburzenia procesu spermatogenezy jest znaczne obniżenie poziomu testosteronu, jednak nie obserwowaliśmy zmian, ani na poziomie mRNA ani białka, w receptorach dla androgenów w jądrach. Natomiast poziom receptorów  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  był obniżony, mimo wzrostu w mRNA, a receptora błonowego GPR30 podwyższony. Zmiana w gęstości  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  przy równocześnie podniesionym poziomie  $17\beta$ -estradiolu we krwi, wydaje się zmianą korzystną, zabezpieczającą przed zbyt silnym działaniem estrogenu w jądrach, ponieważ estrogeny mogą promować pochłanianie komórek Leydiga przez makrofagi. Natomiast wzrost w poziomie receptora błonowego, GPR30 w jądrach w świetle danych, że niektóre związki zaburzające funkcje endokrynne np. bisfenol A działając przez ten receptor zwiększają ryzyko rozwoju raka jąder wydaje się zmianą niekorzystną (Chimento i wsp., 2014).

#### **5.4 Wpływ BP-2 na układ immunologiczny**

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono działanie immunostymulujące benzofenonu-2. Zmiany te były nieoczekiwane, ponieważ nieliczne dotychczasowe badania

wskazywały raczej na działanie immunosupresyjne tego związku (Frikeche i wsp., 2015). W obecnej pracy wykazano, że benzofenon-2 nie zmienia masy grasicy i śledziony, czyli odpowiednio pierwotnego i wtórnego narządu limfatycznego. Wykazano również brak różnic w komórkowości grasicy lub śledziony między zwierzętami otrzymującymi BP-2, a zwierzętami kontrolnymi. Badany związek nie wpływał na aktywność LDH, czyli nie wykazał działania cytotoksycznego, natomiast nasilał, a nie zmniejszał aktywność metaboliczną, a tym samym żywotność tymocytów i splenocytów. Zmiany te, łącznie z faktem, że nie stwierdzono zmian w liczbie leukocytów we krwi, wskazują na brak toksycznego działania badanego związku na komórki układu immunologicznego. W przeciwieństwie do BP-2, benzofenon-3 indukował cytotoksyczność tymocytów, związaną z wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów cynku, prowadząc do wzrostu podatności komórek na stres oksydacyjny (Utsunomiya i wsp., 2019).

Według nielicznych danych literaturowych pochodzących wyłącznie z badań *in vitro*, BP-2 powinien hamować immunoreaktywność, podczas gdy otrzymane wyniki wskazują, że niektóre funkcje komórek układu immunologicznego uległy nasileniu. W przypadku splenocytów u zwierząt otrzymujących BP-2 komórki te wykazywały zarówno wyższą aktywność metaboliczną, jak i stymulowaną mitogenami aktywność proliferacyjną. Główną funkcją śledziony jest aktywacja limfocytów biorących udział w usuwaniu patogenów zawartych we krwi. Aktywacja zarówno proliferacji, jak i aktywności metabolicznej splenocytów przez BP-2 powinna zwiększyć ich zdolność do zwalczania patogenów. Szczególnie silna aktywność proliferacyjna została wykazana po stymulacji konkanawaliną A, mitogenem głównie limfocytów T. Również po zastosowaniu wyższego stężenia konkanawaliny A i po traktowaniu LPS, który uważany jest za bardziej skuteczny w stymulacji limfocytów B, zaobserwowano około dwukrotnie wyższą aktywność proliferacyjną splenocytów szczurów otrzymujących BP-2 niż zwierząt kontrolnych. Wydaje się, że BP-2 może stymulować proliferację zarówno limfocytów T, jak i limfocytów B, a zatem może zwiększać odporność komórkową i humoralną. Poprzednie badania *in vitro* wskazują, że BP-2 przesuwają równowagę między limfocytami Th1 i Th2 w kierunku odpowiedzi Th2, a tym samym może powodować lub nasilać choroby alergiczne (Rachoń i wsp., 2006). Na podstawie naszych badań, w których określiliśmy jedynie proces proliferacji limfocytów, ale nie ich różnicowanie, nie było możliwe ustalenie, czy w rzeczywistości zwiększona proliferacja limfocytów T obserwowana u szczurów otrzymujących BP-2 w większym stopniu prowadziła do produkcji limfocytów Th2 niż Th1. Na podstawie istniejących danych nie jest możliwe

określenie, czy zwiększona aktywność proliferacyjna splenocytów obserwowana u zwierząt otrzymujących BP-2 była związana z działaniem tego związku na receptory estrogenowe. Niektóre badania wykazują, że estrogeny nasilają proliferację komórek T śledziony (Priyanka i wsp., 2013; Zhou i wsp., 2011), natomiast indukcja atrofii grasicy jest dobrze znanym działaniem estrogenu i ten efekt nie był obserwowany u szczurów otrzymujących BP-2. Oprócz stymulującego wpływu na aktywność metaboliczną i proliferacyjną splenocytów, BP-2 zwiększał żywotność tymocytów i uwalnianie NO zarówno z komórek grasicy, jak i śledziony. Tlenek azotu odgrywa ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej na czynniki zakaźne i jest głównie wydzielany przez monocyty i makrofagi, ale także przez limfocyty (Karpuzoglu i wsp., 2006). Estrogeny zwiększają poziom NO uwalnianego ze splenocytów, tak więc wzrost uwalniania tlenu azotu w wyniku działania BP-2, może być związany ze stymulacją receptorów estrogenowych (Karpuzoglu i wsp., 2006). Nie można jednak wykluczyć, że wpływ BP-2 na aktywność układu odpornościowego, obserwowany w niniejszym badaniu, był również związany z nadczynnością tarczycy, która wystąpiła u zwierząt narażonych na ten związek. Stwierdzono bowiem, że nadczynność tarczycy zwykle zwiększa aktywność komórek odpornościowych, a więc wywołuje zmianę, która była obserwowana w zastosowanym modelu podawania BP-2. Liczne badania wskazują, że hormony tarczycy wpływają na funkcjonowanie prawie wszystkich komórek układu odpornościowego, w tym tymocytów i splenocytów (Savino i wsp., 1990; Varedi i wsp., 2014). Na przykład wykazano, że stan nadczynności tarczycy istotnie potęgował indukowaną mitogেনem proliferację limfocytów (Varedi i wsp., 2014), a zatem efekt obserwowany również w naszych badaniach prowadzonych u zwierząt z podwyższonym poziomem hormonów tarczycy. Podsumowując, 4-tygodniowe podawanie BP-2 na skórę samcom szczurów Wistar spowodowało nadczynność tarczycy oraz zwiększało aktywność splenocytów i tymocytów. Wydaje się, że nadczynność tarczycy mogła być odpowiedzialna za zmianę aktywności układu odpornościowego, ale tylko przyszłe badania mogą potwierdzić to przypuszczenie i wyjaśnić mechanizm tej interakcji.

## **5.5 Wpływ BP-2 na parametry hematologiczne**

Aktualnie nie ma doniesień dotyczących wpływu BP-2 na komórki krwi, ale w warunkach *in vitro* wykazano, że pochodna benzofenonu, garcynol, indukuje apoptozę ludzkich erytrocytów przez zwiększanie produkcji ROS, zmniejszanie syntezy ATP oraz zwiększanie aktywności  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie (Fazio i wsp., 2015). W naszych poprzednich badaniach stwierdziliśmy, że benzofenon-3 obniża poziom erytrocytów oraz stężenie hemoglobiny a zwiększa liczbę płytek krwi (Skórkowska et al., 2020). W przeciwieństwie do

niekorzystnych efektów BP-3 i garcynolu, 4-tygodniowe narażenie samców szczura na BP-2 nie wywołało zmian w liczbie leukocytów, erytrocytów i płytek krwi, ani nie wpłynęło na morfologię i zawartość hemoglobiny w erytrocytach.

## 6. Podsumowanie

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że benzofenon-2 wpływa na komórki centralnego systemu nerwowego, aktywność układu immunologicznego, funkcję tarczycy oraz proces spermatogenezy, natomiast nie zmienia parametrów hematologicznych.

Wyniki badań *in vitro* dotyczące wpływu BP-2 na żywotność komórek nerwowych wykazały, że badany związek już w niskich stężeniach wywierał działanie pro-apoptotyczne, a w wysokich stężeniach obserwowano również jego działanie nekrotyczne. Wyniki te są spójne z doniesieniami literaturowymi, dotyczącymi neurotoksycznego działania innych pochodnych benzofenonu. Jednak model *in vitro*, w których badaliśmy wpływ BP-2 wyłącznie na neurony, nie uwzględnia wpływu innych komórek mózgu m.in. astrocytów i mikrogleju ani wpływu zmian zachodzących na obwodzie i dlatego wyniki tych badań nie zawsze przekładają się na zmiany zachodzące w żywym organizmie. Ze względu na ograniczenia metody *in vitro*, przeprowadzono badania w modelu zwierzęcym, w którym narażano na benzofenon-2 dorosłe samce szczurów Wistar, przez okres 4 tygodni. Wykazano, że BP-2 po podaniu naskórnym wchłania się do krwi i przechodzi do mózgu przez barierę krew-mózg, chociaż jego stężenia w wybranych strukturach mózgu (hipokamp i kora czołowa) były niskie. W przeciwieństwie do badań *in vitro*, w warunkach *in vivo* BP-2 nie indukował procesu apoptozy a przeciwnie w korze czołowej zwiększał aktywność antyoksydacyjną i obniżał poziom reaktywnych form tlenu oraz peroksydację lipidów. Takie nieoczekiwane korzystne efekty BP-2 w korze czołowej mogą jednak wynikać nie z jego neuroprotekcijnego działania lecz z odpowiedzi adaptacyjnej organizmu indukowanej niskim stężeniem neurotoksycznego ksenobiotyku. Nie można także wykluczyć, że kolejne ekspozycje lub wydłużenie czasu ekspozycji spowoduje niewydolność mechanizmów kompensacyjnych prowadząc do inicjacji procesów patologicznych.

Badając wpływ BP-2 na funkcję tarczycy, stwierdziliśmy podwyższone poziomy hormonów tarczycy, podczas gdy poziom TSH uwalniany z przysadki mózgowej obniżył się. Takie zmiany poziomów FT3, FT4 oraz TSH, świadczą o nadczynności tarczycy. W przeciwieństwie do naszych wyników wcześniejsze badania *in vitro* oraz *in vivo* wskazywały na indukcję przez BP-2 niedoczynności tarczycy. Zarówno nadmiar jak i niedobór hormonów tarczycy jest jednak zmianą niekorzystną, zaburzającą metabolizm i powodującą zmiany w funkcjonowaniu innych układów organizmu. Co więcej, wywołana przez BP-2 nadczynność tarczycy mogła być także przyczyną nasilenia aktywności układu immunologicznego. Stwierdziliśmy bowiem, że BP-2 nasila aktywność metaboliczną i proliferacyjną splenocytów,

zwiększa żywotność tymocytów oraz uwalnianie NO zarówno z komórek grasicy, jak i śledziony. Według nielicznych danych literaturowych pochodzących wyłącznie z badań *in vitro*, BP-2 powinien hamować immunoreaktywność, podczas gdy otrzymane wyniki wskazują, że niektóre funkcje komórek układu immunologicznego uległy nasileniu. Nasilenie przez BP-2 żywotności, proliferacji i funkcji limfocytów może z jednej strony zwiększać zdolność układu immunologicznego do zwalczania drobnoustrojów, jednak może także zwiększać ryzyko rozwoju chorób alergicznych lub chorób o podłożu autoimmunologicznym. Dlatego dla pełniejszej oceny konsekwencji wpływu BP-2 na aktywność układu immunologicznego konieczne są dalsze badania, w tym określenie jego działania na proces różnicowania limfocytów.

W przeciwieństwie do zmian wywołanych narażeniem na BP-2 w komórkach OUN i aktywności układu immunologicznego, których konsekwencje są obecnie trudne do przewidzenia, badany związek wyraźnie niekorzystnie wpływa zarówno na poziom hormonów płciowych jak i proces spermatogenezy. U szczurów narażonych na działanie BP-2 wykazano silne obniżenie poziomu testosteronu (całkowitego i aktywnej formy wolnej) we krwi oraz w jądrach (frakcja całkowita) a zwiększenie poziomu  $17\beta$ -estradiolu we krwi. Zwiększony poziom  $17\beta$ -estradiolu, który w mechanizmie hamującego sprzężenia zwrotnego u samców silnie obniża syntezę gonadotropin może być przyczyną obniżenia poziomu LH i testosteronu. Zmianom poziomu hormonów towarzyszą zmiany parametrów nasienia. Stwierdzono, że badany związek obniża całkowitą liczbę plemników a zwiększa liczbę plemników wykazujących zmiany morfologiczne. Wpływ także na ruchliwość plemników, obniżając liczbę plemników poruszającym się ruchem progresywnym, a więc kluczowym dla procesu zapłodnienia.

Przeprowadzone badania potwierdziły niekorzystny wpływ benzofenonu-2 na funkcję jąder a także po raz pierwszy wykazały działanie tego związku na ośrodkowy układ nerwowy, układ immunologiczny oraz morfologię krwi (brak zmian). 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 nasilenia reakcji alergicznych czy autoimmunizacyjnych. Ponieważ wykazano jednoznacznie



niekorzystne działanie benzofenonu-2 na syntezę hormonów płciowych i proces spermatogenezy, dlatego potwierdzenie tego działania w innych modelach narażenia i określenie mechanizmu tego efektu, może być kluczowe dla wprowadzenia ograniczeń w stosowaniu benzofenonów.

## 7. Wnioski

1. W badaniach *in vitro* benzofenon-2 w wysokich stężeniach, działał nekrotycznie na komórki nerwowe, natomiast w niższych stężeniach indukował proces apoptozy.
2. Po podaniu na skórę benzofenon-2 wchłaniał się do krążenia ogólnego a jego stężenie w surowicy po 24 h od ostatniego podania wynosiło około 0,3 µg/ml. W stosunkowo wysokich stężeniach badany związek występował w wątrobie oraz tkance tłuszczowej (odpowiednio 1,3 oraz 0,8 µg/g tkanki).
3. Benzofenon-2 przechodzi przez barierę krew-mózg, jednak w przeciwieństwie do tkanek obwodowych w strukturach mózgu jego stężenie jest niskie (hipokamp – 5 ng/g tkanki; kora czołowa 16 ng/g).
4. W badaniach *ex vivo* BP-2 nie wywołuje procesu apoptozy w hipokampie i korze czołowej, natomiast w korze czołowej zwiększa całkowitą zdolność antyoksydacyjną, obniża poziom ROS oraz poziom peroksydacji lipidów. Działanie antyoksydacyjne BP-2 jest prawdopodobnie związane z aktywacją endogennych mechanizmów antyoksydacyjnych.
5. Nadczynność tarczycy wywołana narażeniem na działanie benzofenonu-2, przejawia się wzrostem poziomu aktywnych biologicznie form hormonów tarczycy (fT3, fT4) oraz obniżeniem poziomu TSH.
6. Benzofenon-2 nasilał funkcje układu immunologicznego zwiększając stymulowaną mitogenami aktywność proliferacyjną splenocytów oraz nasilając uwalnianie NO przez splenocyty i tymocyty. Benzofenon-2 nie działa cytotoksycznie na tymocyty i splenocyty, natomiast nasila ich aktywność metaboliczną.
7. Benzofenon-2 zaburzał poziom hormonów płciowych obniżając poziom testosteronu we krwi i jądrach, a zwiększając poziom 17β-estradolu we krwi. Obniżony poziom testosteronu może wynikać ze zmniejszonej sekrecji LH, natomiast nie wynika ze zmian w uwalnianiu prolaktyny.

8. Benzofenon-2 zaburzał proces spermatogenezy prowadząc do obniżenia liczby i ruchliwości plemników oraz zwiększając częstość występowania zmian morfologicznych. Zaburzenia procesu spermatogenezy wydają się wynikać głównie ze znacznego obniżenia syntezy testosteronu oraz zaburzenia równowagi pomiędzy testosteronem a  $17\beta$ -estradiolem.
  
9. Benzofenon-2 nie wpływał na parametry hematologiczne.

## 8. 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 tlenu azotu. Funkcję tymocytów określono poprzez pomiar aktywności metabolicznej, żywotności oraz zdolności do uwalniania tlenu 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 tlenu 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 17 $\beta$ -estradiolu we krwi. Obniżony poziom testosteronu we krwi, frakcji całkowitej oraz czynnej biologicznie frakcji wolnej, któremu towarzyszył zwiększony poziom 17 $\beta$ -estradiolu oraz obniżony poziom LH, sugeruje dysfunkcje na poziomie przysadki i/lub podwzgórza a także możliwość zbyt silnego działania 17 $\beta$ -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.

## 9. 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 ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , 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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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.

## 10. Referencje

1. Adoamnei E., Mendiola J., Moñino-García M., Vela-Soria F., Iribarne-Durán L. M., Fernández M. F., Olea N., Jørgensen N., Swan S. H., Torres-Cantero A. M., (2018). Urinary concentrations of benzophenone-type ultra violet light filters and reproductive parameters in young men. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 221:531-540.
2. Agnihotri A., Aruoma O. I., (2020). Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Nutritional Toxicology Perspective of the Impact of Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, Nutrigenomics and Environmental Chemicals. *Journal of the American College of Nutrition*. 39:16-27.
3. Aker A. M., Watkins D. J., Johns L. E., Ferguson K. K., Soldin O. P., Anzalota Del Toro L. V., Alshawabkeh A. N., Cordero J. F., Meeker J. D., (2016). Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women. *Environmental Research*. 151:30-37.
4. Ata P., Majewski S., (2013). Fotostarzenie skóry. *Prz Dermatol*, 100:178-183.
5. Back D.J., Madden S., Orme M.L.E., (1990). Gastrointestinal metabolism of contraceptive steroids. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 163:2138–2145.
6. Bae J. Kim S. Kannan K. & Buck Louis G. M. (2016). Couples' urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet filters and the secondary sex ratio. *Science of the Total Environment*. 543:28-36
7. Banerjee P. P., Banerjee S., Brown, T. R., (2001). Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology*. 142:4066-4075.
8. Bauman L., (2013). *Dermatologia estetyczna*. PZWL, Warszawa
9. Belluti, F., De Simone, A., Tarozzi, A., Bartolini, M., Djemil, A., Bisi, A., Gobbi, S., Montanari, S., Cavalli, A., Andrisano, V., Bottegoni, G., Rampa, A., (2014). Fluorinated benzophenone derivatives: Balanced multipotent agents for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 78:157–166.
10. Benzie I.F., Strain J.J., (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
11. Berger K., Gunier R. B., Chevrier J., Calafat A. M., Ye X., Eskenazi B., Harley K. G., (2018). Associations of maternal exposure to triclosan, parabens, and other phenols with prenatal maternal and neonatal thyroid hormone levels. *Environmental Research*. 165:379-386.

12. Bland R., (2000). Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clinical Science*. 98:217-240
13. Blüthgen N., Zucchi S., Fent K., (2012). Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 263:184-194.
14. Bojarowicz H., Bartnikowska N., (2014). Kosmetyki ochrony przeciwsłonecznej. Część I. Filtry UV oraz ich właściwości *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 95:596-601
15. Borkowska B., Kardynał A., Słowińska M., (2013). Czerniak u osób korzystających z urządzeń opalających emitujących promienie UV (solariów). *Przegląd Dermatologiczny*, 100: 345-352.
16. Brash D.E., (2006). Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *British Journal of Dermatology*, 154:8-10.
17. Brausch J. M., Rand G. M., (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. In *Chemosphere*. 82:1518-1532
18. Brinkmann A. O., (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 179:105-109.
19. Broniowska, Z., Pomierny, B., Smaga, I., Filip, M., Budziszewska, B., 2016. The effect of UV-filters on the viability of neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *Neurotoxicology* 54:44-52
20. Bryś M., Krajewska W., (1997). Receptor androgenowy — struktura, funkcja oraz udział w nowotworzeni gruczołu krokowego. *Postępy Biologii Komórki*. 24:49–66.
21. Buck Louis G. M., Chen Z., Kim S., Sapra K. J., Bae J., Kannan K., (2015). Urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet light filters and semen quality. *Fertility and Sterility*. 104:989-996
22. Bulun S. E., Zeitoun K. M., Takayama K., Sasano H., (2000). Molecular basis for treating endometriosis with aromatase inhibitors. In *Human Reproduction Update*. 6:413-418.
23. Calafat A. M. Wong L. Y. Ye X. Reidy J. A. & Needham L. L. (2008). Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*. 116:893-897.
24. Chen G.G. C., Zeng Q., Tse G.M.K., (2008). Estrogen and its receptors in cancer. *Medicinal Research Reviews*. 28:954-974.
25. Chen T. H., Wu Y. T., Ding W. H., (2016). UV-filter benzophenone-3 inhibits agonistic behavior in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Ecotoxicology*. 25:302-309.

26. Chichel A., Skowronek J., (2005). Współczesne leczenie raka skóry – dermatologia, chirurgia czy radioterapia? *Współczesna Onkologia*, 9:429-435.
27. Chimento A., Sirianni R., Casaburi I., Pezzi V., (2014). GPER Signaling in Spermatogenesis and Testicular Tumors. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 5:30.
28. Choi W. S., Eom D. S., Han B. S., Kim W. K., Han B. H., Choi E. J., Oh T. H., Markelonis G. J., Cho J. W., Oh Y. J., (2004). Phosphorylation of p38 MAPK Induced by Oxidative Stress Is Linked to Activation of Both Caspase-8- and -9-mediated Apoptotic Pathways in Dopaminergic Neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 279:20451-20460.
29. Chu R., Van Hasselt A., Vlantis A. C., Ng E. K. W., Liu S. Y. W., Fan M. D., Ng S. K., Chan A. B. W., Liu Z., Li X. Y., Chen G. G., (2014). The cross-talk between estrogen receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in thyroid cancer. *Cancer*. 120:142-153
30. Clark S., Rainville J., Zhao X., Katzenellenbogen B. S., Pfaff D., Vasudevan N., (2014). Estrogen receptor-mediated transcription involves the activation of multiple kinase pathways in neuroblastoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 139:45-53.
31. Daston G. P., Gettings S. D., Carlton B. D., Chudkowski M., Davis R. A., Kraus A. L., Luke C. F., Oellette R. E., Re T. A., Hoberman A. M., Sambuco C. P., (1993). Assessment of the reproductive toxic potential of dermally applied 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone to male B6C3F1 mice. *Toxicological Sciences*. 20:120-124.
32. De Chiara G., Marcocci M. E., Torcia M., Lucibello M., Rosini P., Bonini P., Higashimoto Y., Damonte G., Armirotti A., Amodei S., Palamara A. T., Russo T., Garaci E., Cozzolino F., (2006). Bcl-2 phosphorylation by p38 MAPK: Identification of target sites and biologic consequences. *Journal of Biological Chemistry*. 281:21353-21361.
33. DeBuys H. V., Levy S. B., Murray J. C., Madey D. L., Pinnell S. R., (2000). Modern approaches to photoprotection. *Dermatology Clinics*. 18:577-90.
34. Derosa G., Sahebkar A., Maffioli P., (2018). The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. In *Journal of Cellular Physiology*. 233:153-161.
35. DiNardo J. C., Downs C. A., (2018). Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/benzophenone-3. In *Journal of Cosmetic Dermatology*. 17:15-19.

36. Dinny G. J., Clarke C. L., (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. In *Endocrine Reviews*. 18:502-519.
37. Divi R. L., Chang H. C., Doerge D. R., (1997). Anti-Thyroid Isoflavones from Soybean. *Biochemical Pharmacology*. 54:1087-1096.
38. Dohle G. R., Smit M., Weber R. F. A., (2003). Androgens and male fertility. *World Journal of Urology*. 21:341-345.
39. Dondi D., Albin, A., Serpone N., (2006). Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection. *Photochemical and Photobiological Sciences*.5:835-843.
40. Ebisz M., Brokowska M., (2015). Szkodliwe oddziaływanie promieniowania ultrafioletowego na skórę człowieka *Hygeia Public Health*, 50:467-473.
41. Fazio A., Briglia M., Faggio C., Alzoubi K., Lang F., (2015). Stimulation of suicidal erythrocyte death by garcinol. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 37:805–815.
42. Feinstein D. L. Galea E. Gavriilyuk V. Brosnan C. F. Whitacre C. C. Dumitrescu-Ozimek L. Landreth G. E. Pershadsingh H. A. Weinberg G. & Heneka M. T. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology*. 51:694-702.
43. Feinstein D. L., Galea E., Gavriilyuk V., Brosnan C. F., Whitacre C. C., Dumitrescu-Ozimek L., Landreth G. E., Pershadsingh H. A., Weinberg G., Heneka M. T., (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology*. 51:694-702.
44. Ferguson K. K., Meeker J. D., Cantonwine D. E., Mukherjee B., Pace G. G., Weller D., McElrath T. F., (2018). Environmental phenol associations with ultrasound and delivery measures of fetal growth. *Environment International*.112:243-250.
45. Fitzpatrick T., (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Archives of Dermatology*, 124:869-871.
46. Fol V., Brion F., Hillenweck A., Perdu E., Bruel S., Aït-Aïssa S., Cravedi J., P., Zalko D., (2017). Comparison of the in vivo biotransformation of two emerging estrogenic contaminants, BP2 and BPS, in zebrafish embryos and adults. *International Journal of Molecular Sciences*, 18:704.
47. Fong H. C. H., Ho J. C. H., Cheung A. H. Y., Lai K. P., Tse W. K. F., (2016). Developmental toxicity of the common UV filter, benophenone-2, in zebrafish embryos. *Chemosphere*. 164:413-420

48. Franklin J. L. (2011). Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. In *Antioxidants and Redox Signaling*. 14:1437-1448.
49. Frederiksen H. Jensen T. K. Jørgensen N. Kyhl H. B. Husby S. Skakkebæk N. E. Main K. M. Juul A. & Andersson A. M. (2014). Human urinary excretion of non-persistent environmental chemicals: An overview of Danish data collected between 2006 and 2012. In *Reproduction*. 147:555-565
50. Frederiksen H., Krause M., Jørgensen N., Rehfeld A., Skakkebæk N. E., Andersson A. M., (2020). UV filters in matched seminal fluid-, urine-, and serum samples from young men. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*.
51. Frikeche J., Couteau C., Roussakis C., Coiffard L.J.M., (2015). Research on the immunosuppressive activity of ingredients contained in sunscreens. *Archives of Dermatological Research*. 307:211–218.
52. Fröhlich E., Wahl R., (2017). Thyroid autoimmunity: Role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. In *Frontiers in Immunology*. 521:1-16.
53. Gago-Ferrero P., Díaz-Cruz M. S., Barceló D., (2012). An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404:2597-2610.
54. Garnier P., Prigent-Tessier A., Van Hoecke M., Bertrand N., Demougeot C., Sordet O., Swanson R. A., Marie C., Beley A., (2004). Hypoxia induces caspase-9 and caspase-3 activation without neuronal death in gerbil brains. *European Journal of Neuroscience*. 20:937-946.
55. Garza-Lombó C., Posadas Y., Quintanar L., Gonsebatt M. E., Franco R., (2018). Neurotoxicity Linked to Dysfunctional Metal Ion Homeostasis and Xenobiotic Metal Exposure: Redox Signaling and Oxidative Stress. In *Antioxidants and Redox Signaling*. 28:1669-1703.
56. Gasparro F.P., Mitchnick M., Nash J. F., (1998). A Review of Sunscreen Safety and Efficacy. *Photochemistry and Photobiology*. 68:243-256.
57. Gibka J., (2010). Słońce, plaża... i co dalej? *Les Nouv Esthetic Spa*, 2:39-42.
58. Giguère Y., Forest V. I., Dodin S., Rousseau F., Dewailly E., Ayotte P., Demers A., Brisson J., Laflamme N., (2001). Short polyglutamine tracts in the androgen receptor are protective against breast cancer in the general population. *Cancer Research*. 61:5869-5874.
59. Gliwa E., Goździalska A., Jaśkiewicz J., (2013). Wpływ promieniowania UV na skórę. *Współczesne kierunki w medycynie prewencyjnej. KAAF*, 1:93-101.

60. Glogau R., (1997). Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatologic Clinic*, 4:555-559.
61. Gonzalez H., Farbrot A., Larkö O., Wennberg A. M., (2006). Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *British Journal of Dermatology*. 154:337–340.
62. Goyal H. O., Bartol F. F., Wiley A. A., Khalil M. K., Williams C. S., Vig, M. M., (1998). Regulation of androgen and estrogen receptors in male excurrent ducts of the goat: An immunohistochemical study. *Anatomical Record*. 250:164-71
63. Gregory J. M., Livesey M. R., McDade K., Selvaraj B. T., Barton S. K., Chandran S., Smith C., (2020). Dysregulation of AMPA receptor subunit expression in sporadic ALS post-mortem brain. *Journal of Pathology*. 250:67-78.
64. Gustavsson Gonzalez H., Farbrot, A., Larkö O., (2002). Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. *Clinical and Experimental Dermatology*, 27:691–694.
65. Hamilton K. J., Hewitt S. C., Arao Y., Korach K. S., (2017). Estrogen Hormone Biology. In *Current Topics in Developmental Biology*. 125:109-146.
66. Hayden C. G. J., Roberts M. S., Benson H. A. E., (1997). Systemic absorption of sunscreen after topical application. *Lancet*. 350:863-864.
67. Hewitt K.N., Pratis K., Jones M.E.E., Simpson E.R., (2004). Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology*. 145:1842-1848.
68. Hofmann P. J., Schomburg L., Köhrle J., (2009). Interference of endocrine disrupters with thyroid hormone receptor-dependent transactivation. *Toxicological Sciences*. 110:125–137.
69. Holdcraft R. W., (2003). Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*. 131:459-467.
70. Hsieh M. H., Grantham E. C., Liu B., Macapagal R., Willingham E., Baskin L. S. (2007). In Utero Exposure to Benzophenone-2 Causes Hypospadias Through an Estrogen Receptor Dependent Mechanism. *Journal of Urology*, 178:1637–1642.
71. Janjua N. R., Kongshoj B., Andersson A. M., Wulf, H. C., (2008). Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 22:456–461.
72. Janjua N. R., Mogensen B., Andersson A. M., Petersen J. H., Henriksen M., Skakkebaek N. E., Wulf H. C., (2004). Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical

- application and reproductive hormone levels in humans. *Journal of Investigative Dermatology*.123:57-61.
73. Jarry H., Christoffel J., Rimoldi G., Koch L., Wuttke W., (2004). Multi-organic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment. *Toxicology*, 205:87–93.
  74. Jeon H. K., Sarma S. N., Kim Y. J., Ryu J. C., (2008). Toxicokinetics and metabolisms of benzophenone-type UV filters in rats. *Toxicology*. 248:89-95.
  75. Jiang G., Hu Y., Liu L., Cai J., Peng C., Li Q., (2014). Gastrodin protects against MPP+-induced oxidative stress by up regulates heme oxygenase-1 expression through p38 MAPK/Nrf2 pathway in human dopaminergic cells. *Neurochemistry International*. 75:79-88
  76. Jiang R., Roberts M. S., Collins D. M., Benson H. A. E. (1999). Absorption of sunscreens across human skin: An evaluation of commercial products for children and adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 48:635–637.
  77. Kajta M., Wójtowicz A. K., (2013). Impact of endocrine-disrupting chemicals on neural development and the onset of neurological disorders. *Pharmacological Reports*. 65:1632-1639.
  78. Kapka-Skrzypczak L., Dudra-Jastrzębska M., Czajka M., (2014). Charakterystyka kliniczna oraz molekularne podstawy nowotworów skóry. *Hygeia Public Health*, 49:39-45.
  79. Karpuzoglu E., Ahmed S.A., (2006). Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide – Biology and Chemistry*. 15:177–186.
  80. Kelly M. J., Levin E. R., (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 12:152-156
  81. Kerdivel G., Le Guevel R., Habauzit D., Brion F., Ait-Aissa S., Pakdel F. (2013). Estrogenic Potency of Benzophenone UV Filters in Breast Cancer Cells: Proliferative and Transcriptional Activity Substantiated by Docking Analysis. *PLoS ONE*. 8:605-607.
  82. Kim J. J., Kurita T., Bulun S. E., (2013). Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. In *Endocrine Reviews*. 34:130-162.
  83. Kim J., Petz L. N., Ziegler Y. S., Wood J. R., Potthoff S. J., Nardulli A. M., (2000). Regulation of the estrogen-responsive pS2 gene in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 74:157-168



84. Kim S. H., Hwang K. A., Shim S. M., Choi K. C. (2015). Growth and migration of LNCaP prostate cancer cells are promoted by triclosan and benzophenone-1 via an androgen receptor signaling pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 39:568-576.
85. Kim S., Choi K., (2014). Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. In *Environment International*. 70:143-157.
86. Kim S., Kim S., Won S., Choi K., (2017). Considering common sources of exposure in association studies - Urinary benzophenone-3 and DEHP metabolites are associated with altered thyroid hormone balance in the NHANES 2007–2008. *Environment International*. 107:25-32.
87. Kim Y., Ryu J. C., Choi H. S., Lee K., (2011). Effect of 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP2) on steroidogenesis in testicular Leydig cells. *Toxicology*. 288:18-26.
88. Ko A., Kang H. S., Park J. H., Kwon J. E., Moon G. I., Hwang M. S., Hwang, I. G., (2016). The Association between Urinary Benzophenone Concentrations and Personal Care Product Use in Korean Adults. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 70:640-646.
89. Krause M., Frederiksen H., Sundberg K., Jørgensen F. S., Jensen L. N., Nørgaard P., Jørgensen C., Ertberg P., Juul A., Andersson, A. M. (2018). Presence of benzophenones commonly used as UV filters and absorbers in paired maternal and fetal samples. *Environment*. 110:51-60.
90. Krause M., Klit A., Blomberg Jensen M., Søeborg T., Frederiksen H., Schlumpf M., Lichtensteiger W., Skakkebaek N. E., Drzewiecki K. T., (2012). Sunscreens: Are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. In *International Journal of Andrology*. 35:424-436.
91. Krzyżanowska W., Pomierny B., Starek-Świechowicz B., Broniowska Ż., Strach B., Budziszewska B., (2018). The effects of benzophenone-3 on apoptosis and the expression of sex hormone receptors in the frontal cortex and hippocampus of rats. *Toxicology Letters*. 296:63-72
92. Kunisue T., Chen Z., Buck Louis G. M., Sundaram R., Hediger M. L., Sun L., Kannan K., (2012). Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in U.S. women and their association with endometriosis. *Environmental Science and Technology*. 46:4624-4632.

93. Kunz P. Y., Fent K., (2006). Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 217:86-99.
94. Kunz P. Y., Galicia H. F., Fent K., (2006). Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicological Sciences*. 90:349-361
95. Le Fol V., Aït-Aïssa S., Cabaton N., Dolo L., Grimaldi M., Balaguer P., Zalko D., (2015). Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environmental Science and Technology*. 49:3860-3868.
96. Lee J., Kim S., Park Y. J., Moon H. B., Choi K., (2018). Thyroid Hormone-Disrupting Potentials of Major Benzophenones in Two Cell Lines (GH3 and FRTL-5) and Embryo-Larval Zebrafish. *Environmental Science and Technology*. 52:8858-8865.
97. León Z., Chisvert A., Tarazona I., Salvador A.,(2010). Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398:831-43.
98. Levin E. R., (2015). Extranuclear Steroid Receptors Are Essential for Steroid Hormone Actions. *Annual Review of Medicine*. 66:271-280
99. Li X., Jiang L., Cheng L., Chen H., (2014). Dibutyl phthalate-induced neurotoxicity in the brain of immature and mature rat offspring. *Brain Dev*. 36: 653–660.
100. Lien Y. J., Ku H. Y., Su P. H., Chen S. J., Chen H. Y., Liao P. C., Chen W. J., Wang, S. L., (2015). Prenatal exposure to phthalate esters and behavioral syndromes in children at 8 years of age: Taiwan maternal and infant cohort study. *Environmental Health Perspectives*. 123:95–100
101. Louis G. M. B., Kannan K., Sapra K. J., Maisog J., Sundaram R., (2014). Urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet radiation filters and couples' fecundity. *American Journal of Epidemiology*. 180:1168-1175
102. Lowe N. J., (2006). An overview of ultraviolet radiation, sunscreens, and photo-induced dermatoses. *Dermatologic Clinics*. 24:9-17.
103. Ma R., Cotton B., Lichtensteiger W., Schlumpf M. (2003). UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences*. 74:43-50.
104. Markićević M., Petrović A., Kanjer K., Nešković-Konstantinović Z., Nikolić-Vukosavljević D., (2008). Estrogen-regulated cut-off values of ps2 and cathepsin

- d expression in breast carcinomas. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 617:341-348.
105. Masterson J. M., Cohen J. Blachman-Braun R., Machen G. L., Sandlow J., Ramasamy R., (2020). Pre-treatment estradiol does not predict testosterone response to clomiphene citrate. *Translational Andrology and Urology*. 9:609-613.
106. Matta M. K., Zusterzeel R., Pilli N. R., Patel V., Volpe D. A., Florian J., Oh L., Bashaw E., Zineh I., Sanabria C., Kemp S., Godfrey A., Adah S., Coelho S., Wang J., Furlong L. A., Ganley C., Michele T., Strauss D. G., (2019). Effect of Sunscreen Application under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 321:2082-2091.
107. Molina-Molina J. M., Escande A., Pillon A., Gomez E., Pakdel F., Cavaillès V., Olea N., Aït-Aïssa S., Balaguer P., (2008). Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 232:384-395
108. Morohoshi K., Yamamoto H., Kamata R., Shiraishi F., Koda T., Morita M., (2005). Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in Vitro*. 19:457-469.
109. Muddapu V. R., Mandali A., Chakravarthy V. S., Ramaswamy S., (2019). A computational model of loss of dopaminergic cells in parkinson's disease due to glutamate-induced excitotoxicity. *Frontiers in Neural Circuits*. 13:1-26
110. Nakagawa Y., Suzuki T., (2002). Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*. 139:115-128.
111. Nakagawa Y., Tayama K., (2002). Benzophenone-induced estrogenic potency in ovariectomized rats. *Archives of Toxicology*. 76:727-731.
112. Nakamura N., Inselman A. L., White G. A., Chang C. W., Trbojevich R. A., Sephr E., Voris K. L., Patton R. E., Bryant M. S., Harrouk W., McIntyre B. S., Foster P. M. D., Hansen D. K., (2015). Effects of maternal and lactational exposure to 2-hydroxy-4-methoxybenzone on development and reproductive organs in male and female rat offspring. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*. 104:35-51.
113. Nashev L. G., Schuster D., Laggner C., Sodha S., Langer T., Wolber G., Odermatt A. (2010). The UV-filter benzophenone-1 inhibits 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3:

- Virtual screening as a strategy to identify potential endocrine disrupting chemicals. *Biochemical Pharmacology*. 79:1189-1199.
114. O'Hara L., Smith L. B., (2015). Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 29:595-605.
115. Okereke C. S., Abdel-Rhaman M. S., Friedman M. A., (1994). Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. *Toxicology Letters*. 73:113–122.
116. Ozáez I., Martínez-Guitarte J. L., Morcillo G. (2014)., The UV filter benzophenone 3 (BP-3) activates hormonal genes mimicking the action of ecdysone and alters embryo development in the insect *Chironomus riparius* (Diptera). *Environmental Pollution*. 192:19-26.
117. Papanastasiou L., Vatalas I. A., Koutras D. A., Mastorakos G., (2007). Thyroid autoimmunity in the current iodine environment. In *Thyroid*. 17:729-739.
118. Paul K. B., Hedge J. M., Rotroff D. M., Hornung M. W., Crofton K. M., Simmons S. O., (2014). Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening. *Chemical Research in Toxicology*. 27:387-399.
119. Peterson D.A., Downes H., Robinson J., (2004). Skin cancer risk assessment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50:8
120. Philippat C., Mortamais M., Chevrier C., Petit C., Calafat A. M., Ye X., Silva M. J., Brambilla C., Pin I., Charles M. A., Cordier S., Slama R., (2012). Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environmental Health Perspectives*. 120:464-70.
121. Piasecka D., Składanowski A., Kordek R., Romańska H.M., Sądej R., (2015). Aspekty regulacji aktywności receptora progesteronu (PR) — znaczenie w progresji raka gruczołu piersiowego. *Postępy Biochemii*. 61: 198-206.
122. Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R., (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1813:1619-1633
123. Pollack A. Z., Buck Louis G. M., Chen Z., Sun L., Trabert B., Guo Y., Kannan, K., (2015). Bisphenol A, benzophenone-type ultraviolet filters, and phthalates in relation to uterine leiomyoma. *Environmental Research*. 137:101-107.
124. Pomierny B., Krzyżanowska W., Broniowska Ż., Strach B., Bystrowska B., Starek-Świechowicz B., Maciejska A., Skórkowska A., Wesółowska J., Walczak M., Budziszewska, B., (2019). Benzophenone-3 Passes Through the Blood-Brain Barrier,

- Increases the Level of Extracellular Glutamate, and Induces Apoptotic Processes in the Hippocampus and Frontal Cortex of Rats. *Toxicological Sciences*. 171:485-500.
125. Pościk A., Wolska A., Owczarek G., (2009). Ocena narażenia na promieniowanie nadfioletowe z zastosowaniem indywidualnych fotochromowych dozymetrów. CIOP-PIB Warszawa.
126. Priyanka H.P., Krishnan H.C., Singh R.V., Hima L., ThyagaRajan S., (2013). Estrogenmodulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Molecular Immunology*. 56:328–339.
127. Prossnitz E. R., Hathaway H. J., (2015). What have we learned about GPER function in physiology and disease from knockout mice? In *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 153:114-126.
128. Przybylski G., Wielikdzień J., Kopiński P., (2013). Mechanizmy zaprogramowanej śmierci efektorowych limfocytów T. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 67:1374-1390
129. Qi W., Weber C. R., Wasland K., Savkovic S. D., (2011). Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. *BMC Cancer*. 11:219.
130. Quintanilla R. A., Utreras E., Cabezas-Opazo F. A., (2014). Role of PPAR  $\gamma$  in the differentiation and function of neurons. In *PPAR Research*. 2014:1-9.
131. Rachoń D., Rimoldi G., Wuttke W., (2006). In vitro effects of benzophenone-2 and octylmethoxycinnamate on the production of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 by murinesplenocytes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 28:501–510.
132. Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y., (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. In *Cellular Signalling*. 24:981-990.
133. Rebbeck T. R., Kantoff P. W., Krithivas K., Neuhausen S., Blackwood M. A., Godwin A. K., Daly M. B., Narod S. A., Garber J. E., Lynch H. T., Weber B. L., Brown M., (2002). Modification of BRCA1-Associated Breast Cancer Risk by the Polymorphic Androgen-Receptor CAG Repeat. *The American Journal of Human Genetics*. 64:1371-1377.
134. Remaud S., Gothié J.D., Morvan-Dubois G., Demeneix B.A., (2014). Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 5:1-7.

135. Rose N. R., Bonita R., Burek C. L., (2002). Iodine: An environmental trigger of thyroiditis. In *Autoimmunity Reviews*. 1:97-103.
136. Ross D. S., Burch H. B., Cooper D. S., Greenlee M. C., Laurberg P., Maia A. L., Rivkees S. A., Samuels M., Sosa J. A., Stan M. N., Walter M. A., (2016). 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. *Thyroid*. 26:1343-1421.
137. Rudnicka K.W., Szczęśna E., Miszczyk E., Mikołajczyk-Chmiela M., (2011). Apoptoza i autofagia - mechanizmy i metody detekcji, *Postępy Biologii komórki*. 38: 247-265.
138. Safe S., Abdelrahim M., (2005). Sp transcription factor family and its role in cancer. *European Journal of Cancer*. 41:2438-2448
139. Santamaría C. G., Abud J. E., Porporato M. M., Meyer N., Zenclussen A. C., Kass L., Rodríguez, H. A., (2019). The UV filter benzophenone 3, alters early follicular assembly in rat whole ovary cultures. *Toxicology Letters*. 303:48-54.
140. Sasaki M., Dahiya R., Fujimoto S., Ishikawa M., Oshimura M., (2000). The expansion of the CAG repeat in exon 1 of the human androgen receptor gene is associated with uterine endometrial carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*. 27:237-244.
141. Savino, W., Ban, E., Villa Verde, D.M., Dardenne M., (1990). Modulation of thymic endocrine function, cytokeratin expression and cell proliferation, by hormones and neuropeptides. *International Journal of Neuroscience*. 51:201–204.
142. Scheuer E., Warshaw E., (2006). Sunscreen allergy: A review of epidemiology, clinical characteristics, and responsible allergens. *Dermatology*, 17:3-11.
143. Schiffer C., Müller A., Egeberg D. L., Alvarez L., Brenker C., Rehfeld A., Frederiksen H., Wäschle B., Kaupp U. B., Balbach M., Wachten D., Skakkebaek N. E., Almstrup K., Strünker T., (2014). Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm. *EMBO Reports*. 15:758-765.
144. Schlecht C., Klammer H., Frauendorf H., Wuttke W., Jarry H. (2008). Pharmacokinetics and metabolism of benzophenone 2 in the rat. *Toxicology*, 245:11–17.
145. Schlecht C., Klammer H., Jarry H., Wuttke, W. (2004). Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology*, 205:123–130.

146. Schlecht C., Klammer H., Wuttke W., Jarry H., (2006). A dose-response study on the estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary and uterus of female rats. *Archives of Toxicology*, 80:656–661.
147. Schlumpf M., Kypke K., Wittassek M., Angerer J., Mascher H., Mascher D., Vokt C., Birchler M., Lichtensteiger W. (2010). Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere*, 81:1171-83.
148. Schlumpf M., Schmid P., Durrer S., Conscience M., Maerker K., Henseler M., Gruetter M., Herzog I., Reolon S., Ceccatelli R., Faass O., Stutz E., Jarry H., Wuttke W., Lichtensteiger W., (2004). Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - An update. *Toxicology*. 205:113-122.
149. Schmutzler C., Bacinski A., Gotthardt I., Huhne K., Ambrugger P., Klammer H., Schlecht C., Hoang-Vu C., Grütters A., Wuttke W., Jarry H., Köhrle J., (2007). The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology*. 148:2835–2844.
150. Schmutzler C., Hamann I., Hofmann P. J., Kovacs G., Stemmler L., Mentrup B., Schomburg L., Ambrugger P., Grütters A., Seidlova-Wuttke D., Jarry H., Wuttke W., Köhrle J., (2004). Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology*. 205:95–102.
151. Schreurs R. H. M. M., Sonneveld E., Jansen J. H. J., Seinen W., Van der Burg B. (2005). Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Sciences*. 83:264-72.
152. Scinicariello F., Buser M. C. (2016). Serum testosterone concentrations and urinary bisphenol a, benzophenone-3, triclosan, and paraben levels in male and female children and adolescents: NHANES 2011–2012. *Environmental Health Perspectives*. 124:1898-1904.
153. Seidlová-Wuttke D., Jarry H., Christoffel J., Rimoldi G., Wuttke W., (2005). Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: A 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats. *Toxicology*. 213:13–24.

154. Seidlová-Wuttke D., Jarry H., Wuttke W., (2004). Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol a (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology*, 205:103–112.
155. Siriwardhane T., Krishna K., Ranganathan V., Jayaraman V., Wang T., Bei K., Rajasekaran J. J., Krishnamurthy H., (2018). Exploring systemic autoimmunity in thyroid disease subjects. *Journal of Immunology Research*. 2018:1-7.
156. Skórkowska A., Maciejska A., Pomierny B., Krzyżanowska W., Starek-Świechowicz B., Bystrowska B., Broniowska Ż., Kazek G., Budziszewska B. (2020). Effect of Combined Prenatal and Adult Benzophenone-3 Dermal Exposure on Factors Regulating Neurodegenerative Processes, Blood Hormone Levels, and Hematological Parameters in Female Rats. *Neurotoxicity Research*. 37:683-701.
157. Song M., Kim Y. J., Park Y. K., Ryu J. C., (2012). Changes in thyroid peroxidase activity in response to various chemicals. *Journal of Environmental Monitoring*. 14:2121-2126.
158. Stack G., Kumar V., Green S., Ponglikitmongkol M., Berry M., Rio M. C., Nunez A. M., Roberts M., Koehl C., Bellocq P., Gairard B., Renaud R., Chambon P., (1988). Structure and function of the pS2 gene and estrogen receptor in human breast cancer cells. *Cancer Treatment and Research*. 40:185-206.
159. Stanis B., (2009). Ochrona skóry przed negatywnymi skutkami promieniowania UV. *Farmacja Polska*, 65:363-368
160. Suzuki T., Kitamura S., Khota R., Sugihara K., Fujimoto N., Ohta S., (2005). Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203:9-17.
161. Tarazona I., Chisvert A., Salvador A., (2013). Determination of benzophenone-3 and its main metabolites in human serum by dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 116:388–395.
162. Tincello D. G., Taylor A. H., Spurling S. M., Bell S. C., (2009). Receptor Isoforms That Mediate Estrogen and Progestagen Action in the Female Lower Urinary Tract. *Journal of Urology*. 181:1474-1482.
163. Ullah M. F., Ahmad A., Zubair H., Khan H. Y., Wang Z., Sarkar F. H., Hadi S. M., (2011). Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Molecular Nutrition and Food Research*. 55:553-559.



164. Utsunomiya H., Hiraishi R., Kishimoto K., Hamada S., Abe S., Bekki Y., Kamemura N., (2019). Cytotoxicity of benzophenone-3, an organic ultraviolet filter, caused by increased intracellular Zn<sup>2+</sup> levels in rat thymocytes. *Chemico-Biological Interactions*. 298:52-56.
165. Uttara B., Singh A.V., Zamboni P., Mahajan R.T., (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*. 7:65-74.
166. Valle-Sistac J., Molins-Delgado D., Díaz M., Ibáñez L., Barceló D., Silvia Díaz-Cruz M., (2016). Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta: First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4. *Environment International*. 88:243-249.
167. Vallortigara J., Chassande O., Higuieret P., Enderlin V., (2009). Thyroid hormone receptor alpha plays an essential role in the normalisation of adult-onset hypothyroidism-related hypoeexpression of synaptic plasticity target genes in striatum. *Journal of Neuroendocrinology*. 21:49-56.
168. Varedi M., Shiri H., Moattari A., Omrani G.H.R., Amirghofran Z., (2014). Hyperthyroid state or in vitro thyroxine treatment modulates TH1/TH2 responses during exposure to HSV-1 antigens. *Journal of Immunotoxicology*. 11:160–165.
169. Villapol S., Yaszemski A. K., Logan T. T., Sánchez-Lemus E., Saavedra J. M., Symes A. J., (2012). Candesartan, an angiotensin II at 1-receptor blocker and PPAR- $\gamma$  agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice. *Neuropsychopharmacology*. 37:2817-2829.
170. Wang F., Zeng X., Zhu Y., Ning D., Liu J., Liu C., Jia X., Zhu D., (2015). Effects of thyroxine and donepezil on hippocampal acetylcholine content, acetylcholinesterase activity, synaptotagmin-1 and SNAP-25 expression in hypothyroid adult rats. *Molecular Medicine Reports*. 11:775-782.
171. Wang R. S., Yeh S., Tzeng C. R., Chang C., (2009). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: Lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. In *Endocrine Reviews*. 30:119-132.
172. Wang S.Q., Balagula Y., Osterwalder U., (2010). Photoprotection: A review of the current and future technologies. *Dermatologic Therapy*. 23:31-47.
173. Watanabe Y., Kojima H., Takeuchi S., Uramaru N., Sanoh S., Sugihara K., Kitamura S., Ohta S., (2015). Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicology and Applied*

Pharmacology. 282:119-128.

174. Węglowska J., Milewska A., (2011). Pozytywne i negatywne skutki promieniowania słonecznego. *Postępy Kosmetologii*, 2:93-97
175. Weisbrod C. J., Kunz P. Y., Zenker A. K., Fent K., (2007). Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 225:255-266.
176. Williams G. P., Darbre P. D., (2019). Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 486:55-64.
177. Wilson C. M., McPhaul M. J., (1996). A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 120:51-57.
178. Wnuk A., Rzemieniec J., Lasoń W., Krzeptowski W., Kajta M., (2018a). Apoptosis Induced by the UV Filter Benzophenone-3 in Mouse Neuronal Cells Is Mediated via Attenuation of  $Era/Ppar\gamma$  and Stimulation of  $Er\beta/Gpr30$  Signaling. *Molecular Neurobiology*. 55:2362-2383
179. Wnuk A., Rzemieniec J., Staroń J., Litwa E., Lasoń W., Bojarski A., Kajta M., (2018b). Prenatal Exposure to Benzophenone-3 Impairs Autophagy, Disrupts RXRs/PPAR $\gamma$  Signaling, and Alters Epigenetic and Post-Translational Statuses in Brain Neurons. *Molecular Neurobiology*. 56:4820-4837.
180. Wolff M. S., Engel S. M., Berkowitz G. S., Ye X., Silva M. J., Zhu C., Wetmur J., Calafat A. M., (2008). Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environmental Health Perspectives*. 116:1092-1097.
181. Yao Z., Seger R., (2009). The ERK signaling cascade-views from different subcellular compartments. *BioFactors*. 35:407-416.
182. Yoon S., Seger R., (2006). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 78:21-26.
183. Zalewska A., Cylkowska-Nowak M., (2012). Zdrowa skóra a Słońce – próba diagnozy wiedzy oraz wybranych postaw. *Nowiny Lekarskie*. 81:214-218.
184. Zhang J., Li Y., Gupta A.A., Nam K., Andersson P.L., (2016). Identification and molecular interaction studies of thyroid hormone receptor disruptors among household dust contaminants. *Chemical Research in Toxicology*. 29:1345–1354.

185. Zhou R., Lai Y., Yamabe N., Fukui M., Ting Zhu B., (2011). Estriol has different effects from 17 $\beta$ -estradiol in modulating mouse splenocyte function under inflammatory conditions. *Journal of Immunotoxicology*. 8:346–358.

**Inne źródła:**

1. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Benzophenone-2, Source=HSDB (2018),  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/8386#section=Toxicity>
2. Raport z kontroli urządzeń opalających (solariów), (2010). UOKiK, Warszawa.  
[www.uokik.gov.pl](http://www.uokik.gov.pl)

# 11. Wykaz skrótów

**Ac-DEVD-AMC** – acetylo-Asp-Val-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylokumaryna

**AD** – choroba Alzheimera

**AhR** – receptor węglowodorów aromatycznych (ang. aromatic hydrocarbon receptor)

**AKT** – serynowo-treoninowa kinaza białkowa (ang. serine/threonine protein kinase)

**ALS** – stwardnienie zanikowe boczne

**AP-1** – białko aktywujące 1 (ang. activating protein 1)

**AR** – receptor androgenowy

**AZS** – atopowe zapalenie skóry

**BBC** – rak podstawnokomórkowy (Basal Cell Carcinoma)

**BrdU** – bromodezoksyurydyna

**COX** — enzym cyklooksygenaza

**CXCL12** – czynnik pochodzenia stromalnego 1 (stromal cell-derived factor-1)

**DCF** – 2', 7'-dichlorofluoresceina

**DCFH-DA** – dioctan 2',7'- dichlorodihydrofluoresceiny

**EDC** – związki endokrynnie czynne (Endocrine disruptor chemicals)

**ER** – receptory estrogenowe

**ERE** – element odpowiedzi na estrogeny (estrogen responsive element)

**ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. Extracellular signal regulated kinase)

**E2** – 17 $\beta$ -estradiol

**FDA** – Agencja Żywności i Leków (Food and Drug Administration)

**FSH** – hormon folikulotropowy

**fT3** – trójjodotyronina

**fT4** – tyroksyna

**GPR 30** – receptor 17 $\beta$ -estradiolu sprzężony z białkiem G

**GSK3 $\beta$**  – kinaza syntazy glikogenu 3

**hAR** – ludzkie receptory androgenowe

**HPT** – oś podwzgórze – przysadka - tarczyca

**HD** – choroba Huntingtona

**hER $\alpha$  lub  $\beta$**  – ludzkie receptory estrogenowe  $\alpha$  lub  $\beta$

**IGF 1** – insulinopodobny czynnik wzrostu

**IS** – standard wewnętrzny (IS)

**Kon A** – konkanawalina A

**LDH** – dehydrogenaza mleczanowa

**LH** – hormon luteinizujący

**m.c.** – masa ciała

**MAPK** – kinaza aktywowana mitogenami ( ang. Mitogen activated kinases)

**MCF7** – ludzka linia komórkowa raka piersi (ang. human breast cancer cells)

**MDA** – dialdehyd malonowy

**MTT** – 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylo tetrazolina

**NF- $\kappa$ B** – czynnik jądrowy  $\kappa$ B (ang. nuclear factor kappa B)

**NOS** – syntetaza tlenu azotu

**PABA** – kwas p-aminobenzoowy

**PEG-25 PABA** – pochodna oksyetylenowa kwasu p-aminobenzoowego

**PI3K/AKT**- kinaza 3-fosfatydyloinozytolu/kinaza białkowa B

**PPAR $\gamma$**  – receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów  $\gamma$

**PR** – receptor progesteronowy

**PRL**- prolaktyna

**pS2** – presenilina

**RXR** – receptory retinoidowe X

**ROS** – reaktywnych form tlenu

**SCC** – rak kolczystokomórkowy (Squamous Cell Carcinoma)

**SCI** – uszkodzenie rdzenia kręgowego

**SH-SY5Y** – linia komórek ludzkiej neuroblastomy

**SP1** – białko specyficzności 1 (ang. specificity protein 1),

**StAR (STARD1)** – białkowy regulator steroidogenezy

**TAC** – całkowita aktywność antyoksydacyjna

**TBA** – kwas tiobarbiturowy

**TR** – receptor hormonów tarczycy

**TRH – R** – receptor dla tyreoliberyny

**TR $\beta$**  – receptor  $\beta$  dla hormonów tarczycy

**TSH** – tyreotropina

**TSH  $\beta$**  – gen podjednostki  $\beta$  cząsteczki TSH

**UVR** – promieniowanie ultrafioletowe

**VTG** – witellogenina

## 12. Spis Tabel i Rycin

### 12.1 Spis Tabel:

Tabela I Charakterystyka testów dla hormonów tarczycy.....	48
Tabela II Przeciwciała I-rzędowe zastosowane w analizie markerów procesu apoptozy metodą Western Blot.....	54
Tabela III Rodzaje przeciwciał I – rzędowych użytych do oznaczenia ekspresji białek metodą Western Blot.....	56
Tabela IV Rodzaje sond zastosowanych w oznaczeniach RT-qPCR.....	58
Tabela V Wpływ BP-2 na masę całkowitą i względną oraz komórkowość śledziony i grasicy .....	74
Tabela VI Wpływ BP-2 na ekspresję białek związanych z apoptozą w korze czołowej oraz hipokampie.....	81
Tabela VII Wpływ BP-2 na ruchliwość plemników.....	84
Tabela VIII Zestawienie zmian zachodzących w podwzgórzu oraz w jądrach z uwzględnieniem podziału na frakcje.....	86
Tabela IX. Morfologia krwi szczura.....	89

### 12.2 Spis Rycin

Rycina 1. Reprezentatywne chromatogramy.....	43
Rycina 2. Zasada oznaczenia metodą ELISA kompetycyjną.....	45
Rycina 3. Procedura wykonania oznaczenia stężenia hormonów metodą ELISA kompetycyjną .....	45
Rycina 4. Wpływ benzofenonu-2 na żywotność komórek SH-SY5Y oznaczaną testem redukcji MTT.....	62
Rycina 5. Wpływ benzofenonu-2 na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej z komórek SH-SY5Y do pożywki hodowlanej. ....	63
Rycina 6. Wpływ benzofenonu-2 na aktywność kaspazy-3.....	64



Rycina 7. Ocena ilościowa zmian apoptotycznych zachodzących w komórkach SH-SY5Y po 24-godzinnej ekspozycji na działanie benzofenonu-2 (barwienie Hoechst). .....	65
Rycina 8. Przykładowe obrazy komórek linii SH-SY5Y po ekspozycji na BP-2 (barwienie Hoechst).....	66
Rycina 9. Stężenie benzofenonu-2 w wybranych strukturach mózgu: kora czołowa, mózdzek, hipokamp. ....	67
Rycina 10. Stężenie benzofenonu-2 w surowicy krwi i wątrobie w postaci wolnej oraz po zastosowanej hydrolizie enzymatycznej oraz w tkance tłuszczowej i jądrach.....	68
Rycina 11. Wpływ benzofenonu-2 na poziom TSH, fT3 i fT4 oznaczonego we krwi szczurów po 2 h i 24 h od ostatniego podania związku.....	70
Rycina 12. Poziom testosteronu całkowitego w osoczu krwi oraz w jądrach.....	71
Rycina 13. Poziom frakcji wolnej testosteronu w osoczu krwi.....	72
Rycina 14. Stężenie 17 $\beta$ -estradiolu oraz progesteronu w osoczu krwi .....	72
Rycina 15. Poziom LH oraz prolaktyny .....	73
Rycina 16. Wpływ benzofenonu-2 na aktywność proliferacyjną splenocytów.....	75
Rycina 17. Wpływ BP-2 na aktywność metaboliczną splenocytów mierzoną testem redukcji rezasuryny oraz uwalnianie LDH i NO ze splenocytów.....	76
Rycina 18. Wpływ benzofenonu-2 na aktywność metaboliczną tymocytów ocenianą testem redukcji rezasuryny i testem redukcji MTT oraz na uwalnianie LDH i NO z tymocytów. ....	77
Rycina 19. Wpływ benzofenonu-2 na poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w korze czołowej oraz w hipokampie.....	78
Rycina 20. Wpływ benzofenonu-2 na całkowitą aktywność antyoksydacyjną w korze czołowej oraz w hipokampie. ....	79
Rycina 21. Wpływ benzofenonu-2 na poziom peroksydacji lipidów (MDA) w korze czołowej oraz w hipokampie. ....	80
Rycina 22. Poziom ROS w jądrach. ....	82
Rycina 23. Procent nieprawidłowych form plemników.....	82

Rycina 24. Wpływ BP-2 na liczbę plemników .....	83
Rycina 25. Ekspresja mRNA receptorów estrogenowych alfa i beta (ER $\alpha$ i ER $\beta$ ), GPR30, androgenowych (AR) oraz progesteronowych (PR) w podwzgórze. ....	85
Rycina 26. Ekspresja mRNA receptorów estrogenowych alfa i beta (ER $\alpha$ i ER $\beta$ ), GPR30, androgenowych (AR) oraz progesteronowych (PR) w jądrach.....	85
Rycina 28. Wpływ benzofenonu-2 na poziom białka receptorów: ER- $\alpha$ , GPR30, ER- $\beta$ , AR w podwzgórze. ....	87
Rycina 27. Wpływ benzofenonu-2 na poziom białka receptorów: ER- $\alpha$ , GPR30, ER- $\beta$ , AR w jądrach. ....	88

# **13. Spis publikacji zawierających wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej**

1. Broniowska Ż., Pomierny B., Smaga I., Filip M., Budziszewska B. (2016). The effect of UV-filters on the viability of neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *NeuroToxicology*. 54:44-52 (IF 3,263).
2. Broniowska Ż., Ślusarczyk J., Starek-Świechowicz B., Trojan E., Pomierny B., Krzyżanowska W., Basta-Kaim A., Budziszewska B., (2018). The effect of dermal benzophenone-2 administration on immune system activity, hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity and hematological parameters in male Wistar rats. *Toxicology*. 403:1-8 (IF 3,547).
3. Broniowska Ż., Bystrowska B., Starek-Świechowicz B., Pomierny B., Krzyżanowska W., Walczak M., Budziszewska B., (2019). Benzophenone-2 Concentration and Its Effect on Oxidative Stress and Apoptosis Markers in Rat Brain. *Neurotoxicity Research*. 36:39-48 (IF 3.311).