

**Mgr Krzysztof Sawicki**

**Tytuł rozprawy doktorskiej:** „Wpływ chloropyrifosu na aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę witaminy D3 w komórkach skóry

**Promotor:** Dr hab. n. med. Lucyna Kapka-Skrzypczak, prof. IMW

**Promotor pomocniczy:** Dr n. biol. Kamil Brzóska

## **Streszczenie**

Witamina D należy do najważniejszych substancji endogennych w organizmie. Reguluje m.in. mineralizację kości, proliferację i różnicowanie komórek, wydzielanie reniny, produkcję insuliny, a także kontroluje funkcje limfocytów i makrofagów. Wykazano, że niedobór witaminy D istotnie zakłóca homeostazę organizmu i zwiększa ryzyko powstawania nowotworów skóry, jelita grubego, trzustki oraz chorób sercowo-naczyniowych i cukrzycy. Skóra, będąca organem w którym zachodzi synteza witaminy D, jest narażona na działanie ksenobiotyków środowiskowych, w tym związków fosforoorganicznych, tj. chloropyrifos (CPS). Insektycyd ten jest powszechnie stosowany w rolnictwie do zwalczania stonki ziemniaczanej oraz innych szkodliwych dla gospodarki człowieka owadów. CPS łatwo przenika przez skórę, dlatego też długotrwałe i intensywne używanie tego związku wywiera negatywny wpływ na organizm człowieka. Wykazano, że utleniona postać CPS (oxon) jest silnym inhibitorem cholinesteraz, enzymów powszechnie występujących w ustroju człowieka, rozkładających jeden z podstawowych neuroprzekaźników - acetylocholiny. Dodatkowo ekspozycję na CPS powiązano z powstawaniem zaburzeń rozwojowych oraz zaburzeń układu endokrynnego, a także układu immunologicznego.

Cytochrom P450 jest superrodziną białek, które pełnią bardzo ważną funkcję w metabolizmie, biorąc udział w regulacji syntezy związków endogennych, tj.: steroidy, kwasy żółciowe, kwasy tłuszczowe, prostaglandyny, leukotrieny, witaminy (m. in. witamina D), aminy biogenne czy retinoidy. Ponadto uczestniczy on w rozkładzie egzogennych ksenobiotyków, m. in. wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i pestycydów. Za regulację ekspresji cytochromu P450 odpowiadają czynniki fizjologiczne, patogenne, genetyczne i środowiskowe. Dane literaturowe wskazują, że metabolizowane pestycydy mogą wpływać na aktywność izoform cytochromu P450 poprzez indukcję ich ekspresji, bądź też poprzez zahamowanie aktywności metabolicznej. Modulacja aktywności cytochromu może wpływać na

metabolizm innych ksenobiotyków (w tym toksyn środowiskowych) czy też istotnych substancji endogennych, takich jak witamina D. Zmiany aktywności izoform cytochromu P450 stanowią główny mechanizm leżący u podstaw farmakokinetyki interakcji pomiędzy ksenobiotykami i substancjami endogennymi.

Celem niniejszej rozprawy było zweryfikowanie wpływu CPS, na aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę witaminy D w komórkach skóry. Ponadto celem dodatkowym było wyjaśnienie mechanizmu takiego działania.

Badania zostały przeprowadzone na dwóch liniach komórkowych *in vitro* skóry – keratynocytach ludzkiej linii HaCaT i fibroblastach ludzkiej linii BJ. W celu określenia toksyczności CPS i wyznaczenia dawek poniżej  $IC_{50}$  dla badanych linii komórkowych, które nie będą maskowały wpływu CPS na izoformy cytochromu P450 przeprowadzono test MTT. Natomiast w celu wyznaczenia odpowiednich dawek natężenia promieniowania UVB do dalszych badań, określono wpływ natężenia promieniowania UVB na żywotność komórek skóry za pomocą testu NR. W celu określenia wpływu CPS na ilość wytwarzanej witaminy D w komórkach skóry oraz medium hodowlanym przeprowadzono analizę HPLC. Dodatkowo w celu dokładnej identyfikacji składu mieszaniny substancji powstałej w wyniku syntezy witaminy D w komórkach skóry przeprowadzono analizę na spektrometrze mas. W celu zbadania wpływu CPS na ekspresję wybranych izoform cytochromu P450 oraz receptora VDR na poziomie mRNA przeprowadzono analizę Real-Time PCR. Wpływ CPS na ekspresję wybranych izoform cytochromu P450 na poziomie białka zbadano techniką Western blot. Z kolei w celu zbadania wpływu CPS na ekspresję dojrzałego receptora VDR przeprowadzono analizę za pomocą cytometrii przepływowej.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że ekspozycja fibroblastów i keratynocytów na CPS istotnie wpływa na zwiększenie, zależnej od promieniowania UVB syntezy witaminy D. Ponadto stwierdzono wpływ insekcydu na ekspresję kluczowych enzymów uczestniczących w metabolizmie witaminy D. Badania wykazały także, że ekspozycja na CPS zaburzała regulację ekspresji na poziomie mRNA i białka: 27-hydroksylazy sterolowej (CYP27A1), 1- $\alpha$ -hydroksylazy (CYP27B1) oraz enzymu uczestniczącego w rozkładzie witaminy D<sub>3</sub> 24-hydroksylazy 1,25-dihydrocholekalcyferolu (CYP24A1), wpływając tym samym bezpośrednio na syntezę i metabolizm witaminy D w komórkach skóry. Ponadto wykazano, że ekspozycja fibroblastów i keratynocytów na CPS powodowała istotną indukcję ekspresji receptora VDR na

blonach. Jest to niezmiernie ważne odkrycie z uwagi na pełnioną przez ten receptor funkcję w metabolizmie witaminy D<sub>3</sub>.

Z naukowego punktu widzenia niniejsza rozprawa rzuca nowe światło na rolę środków ochrony roślin w metabolizmie związków endogennych opartych na czterech pierścieniach cholesterolu oraz ich wpływu na organizm człowieka. Ponadto dostarcza również informacji na temat wpływu chloropirifosu na syntezę witaminy D zachodzącą w komórkach skóry.

## Summary

Vitamin D is one of the most important endogenous substances in the human organism. It regulates, among others, bone mineralization, cellular proliferation and differentiation, renin secretion and production of insulin. Vitamin D also controls functions of lymphocytes and macrophages. It has been shown that a lack of vitamin D significantly disrupts homeostasis and increases the risk of skin, colorectal and pancreatic cancers. Deficiencies of this vitamin may induce cardiovascular diseases, Crohn's disease, type 1 diabetes and multiple sclerosis. Skin, the organ responsible for vitamin D synthesis, is fully exposed to many exotoxins including chlorpyrifos. The rural population is the main group exposed to the harmful effect of this compound, due to its common application in agriculture. Chlorpyrifos easily penetrates the skin, therefore, an intensive use of this compound has a negative impact on the human health. It has been shown that oxidized form of chlorpyrifos (oxon) is a potent cholinesterase inhibitor that causes severe neurotoxic effects. In addition, exposure to chlorpyrifos is associated with developmental disorders and disorders of the endocrine system, as well as the immune system.

Cytochrome P450 is a protein superfamily that plays very important metabolic functions involved in the regulation of synthesis of endogenous compounds including steroids, bile acids, fatty acids, prostaglandins, leukotrienes or vitamins. In addition, it participates in metabolism of exogenous xenobiotics, i.e. polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides. Literature data indicate that metabolized pesticide may affect cytochrome P450 isoforms activity by induction of expression or by inhibiting enzymatic activity. Modulation of cytochrome P450 activity may influence metabolism of other xenobiotics (including drugs and toxins), or important endogenous substances, such as vitamin D. Alteration of cytochrome P450 activity is the main mechanism underlying pharmacokinetic interaction between various xenobiotics and endogenous substances.

The aim of this dissertation was to verify the effect of chlorpyrifos on the activity of enzymes responsible for vitamin D synthesis in skin cells. Furthermore, the aim of this research was also to explain the mechanism of such an action.

Studies were performed on two skin cell lines – human keratinocytes (HaCaT) and human fibroblasts (BJ). To determine the toxicity of CPS and to determine the concentration below the  $IC_{50}$  for tested cell lines, an MTT test was performed. In order

to determine the appropriate doses of UVB radiation for further studies, NR test was performed. The amount of vitamin D produced in skin cells and the culture medium was determined by HPLC analysis followed by determination of the amount of 7-dehydrocholesterol, 25-hydroxycholecalciferol and  $1\alpha$ , 25-dihydroxycholecalciferol by liquid chromatography. Additionally, in order to accurately identify the substances resulting from the vitamin D<sub>3</sub> synthesis in skin cells, a mass spectrometer analysis was carried out. The expression of selected cytochrome P450 isoforms and the VDR receptor was analysed by real-time PCR and Western blotting. The expression of VDR receptor on cell membranes studied by flow cytometry.

The research has shown that exposure of fibroblasts and keratinocytes to chlorpyrifos significantly increases the UVB-dependent synthesis of vitamin D. In addition, it was found that the pesticide interferes with expression of key enzymes involved in the vitamin D metabolism. Experiments showed that exposure to chlorpyrifos disturbed the regulation of expression of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1),  $1\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1), and 24-hydroxylase (CYP24A1) at the mRNA and protein level, directly affecting on the vitamin D<sub>3</sub> synthesis and metabolism in the skin cells. In addition, results showed that exposure of the skin cells to chlorpyrifos caused a significant induction of VDR receptor expression. This is an extremely important discovery due to the para- and autocrine functions performed by the receptor in the vitamin D<sub>3</sub> metabolism.

From a scientific point of view, this dissertation sheds new light on the role of pesticides in the metabolism of endogenous compounds based on four rings of cholesterol and their impact on the human body. As well as providing unique information on the effect of chlorpyrifos on vitamin D synthesis in skin cells.