



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Developmental effects of polystyrene nanoparticles in the chicken embryo

Wang, M.

Citation

Wang, M. (2024, January 16). *Developmental effects of polystyrene nanoparticles in the chicken embryo*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3704678>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3704678>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse Samenvatting

Plastic producten hebben ons dagelijks leven veel voordelen opgeleverd. Helaas wordt 60% van het plastic op vuilnisbelten gestort of komt als plastic afval in het milieu terecht (Geyer et al. 2017). Dit afval laat langzaam kleine plastic deeltjes vrij, die op basis van hun grootte worden onderverdeeld in microplastics en nanoplastics (MP's en NP's). Deze micro- en nanoplastic deeltjes zijn alomtegenwoordig in het milieu en vormen een potentieel gevaar voor dieren en mensen (Allen et al. 2022; Zolotova et al. 2022).

Van MP's en NP's is aangetoond dat ze in zebravissen worden overgedragen van moeder naar haar larven (Pitt et al. 2018). Bovendien kunnen ze zich zelfs via voedselwebben verspreiden (Chae et al. 2018; Kim et al. 2022). Van MP's en NP's wordt vermoed dat ze een potentieel gezondheidsrisico kunnen vormen voor de mens vanwege de toxiciteit in celculturen (Aguilar-Guzmán et al. 2022; Cortés et al. 2020; Gopinath et al. 2021; Ramsperger et al. 2020), en het feit dat ze gedetecteerd zijn in lichaamsvloeistoffen van meerdere menselijke weefsels (Jenner et al. 2022; Leslie et al. 2022; Ragusa et al. 2021; Zhao et al. 2023). Indirect bewijs van mogelijke toxiciteit voor mensen is het feit dat kleine plastic deeltjes giftig zijn in verschillende diermodellen (Yin et al. 2021; Yong et al. 2020). De toxiciteit van MP's en NP's is bijvoorbeeld uitgebreid bestudeerd bij waterdieren, waaronder *Daphnia magna* (Abdolahpur Monikh et al. 2020; Kelpsiene et al. 2020) de zebravis (*Danio rerio*) (Lee et al. 2022; Torres-Ruiz et al. 2021) en de Japanse oester (*Crassostrea gigas*) (Cole en Galloway 2015). Er is echter weinig bekend over het potentiële risico voor warmbloedige gewervelde dieren.

In **Hoofdstuk 1** hebben we de huidige kennis over MP's en NP's en hun potentiële risico voor de mens samengevat. Daarnaast hebben we in de literatuur gezocht naar het gebruik van het kippenembryo als model voor het testen van toxische stoffen en dan vooral het effect op de embryonale ontwikkeling. Kippenembryo's zijn inderdaad

al gebruikt voor verschillende toxiciteitsstudies van nanodeeltjes, met name metaal- en koolstofdeeltjes.

In **Hoofdstuk 2** heb ik laten zien dat PS-NP's (polystyreen-nanoplastics) neurale buis defecten kunnen veroorzaken in de kop, romp, staart of een combinatie van deze gebieden in het kippenembryo. De neurale buis defecten worden veroorzaakt door het falen van de van de neurale buis sluiting (Greene en Copp 2014), wat leidt tot verhoogde morbiditeit en mortaliteit (Copp en Greene 2010; Madrid et al. 2023). Wij suggereren het falen van deze sluiting te wijten is aan toxische effecten van PS-NP's op de neurale lijst cellen - een populatie van neuro-ectodermale cellen grenzend aan de fusiezone van de sluitende neurale buis (Creuzet 2009; Green et al. 2015; Le Douarin et al. 2012; Le Douarin en Kalcheim 1999; Martik en Bronner 2021; Waldo et al. 1998). Dit model (dat we samenvatten in Fig. 1) komt overeen met een studie die aantoont dat de neurale lijst essentieel is voor het sluiten van de neurale buis, althans in het craniale gebied (Creuzet 2009; Creuzet et al. 2006; Wang et al. 2023).

Vervolgens hebben we in **Hoofdstuk 3** het eerste bewijs geleverd dat blootstelling van kippenembryo's aan PS-NP's hartafwijkingen kunnen veroorzaken. We hebben met name cardiovasculaire misvormingen gedetecteerd, waaronder ventriculair septumdefect, overtollige slagaders, blijvende truncus arteriosus, abnormale bloedvaten en overtollige cardiale gelei. Bovendien hebben we aangetoond dat PS-NP's een verminderde hartfunctie veroorzaken. Deze bevindingen zijn logisch in het licht van eerdere rapporten dat neurale lijstcellen een essentiële rol spelen bij de cardiovasculaire ontwikkeling (Le Douarin en Kalcheim 1999). Nadat bijvoorbeeld neurale lijstcellen chirurgisch waren verwijderd, vertoonde het resulterende embryofenotype cardiovasculaire afwijkingen (Keyte en Hutson 2012; Kirby en Waldo 1995; Waldo et al. 1999).

Naast de cardiovasculaire misvormingen beschreven in **Hoofdstuk 3**, hebben we ook craniofaciale defecten opgemerkt in de behandelde embryo's. Deze defecten omvatten misvorming (hypoplasie of aplasie) van de bovensnavel en het falen van

Meckel's kraakbeen om te fuseren met zijn contralaterale partner. Deze misvormingen kunnen, net als de andere hierboven, ook worden verklaard door het effect van NP's op de neurale lijstcellen. Dit komt doordat neurale lijstcellen een essentiële rol spelen bij de craniofaciale ontwikkeling (Martik en Bronner 2021).

De waarneming van zowel cardiovasculaire als craniofaciale defecten komen overeen met het concept van een 'cardiocraniofaciale module' (Gans en Northcutt 1983; Keyte en Hutson 2012; Martik en Bronner 2021) die voor zijn normale ontwikkeling afhankelijk is van de neurale lijstcellen. Opmerkelijk is dat eerder is aangetoond dat de blootstelling van kippenembryo's aan metalen nanodeeltjes (zinkoxide) craniofaciale afwijkingen veroorzaken, waarvan gesuggereerd werd dat ze het gevolg zijn van een verstoorde ontwikkeling van de neurale lijstcellen (Yan et al. 2020). We moeten voorzichtig zijn met het interpreteren van bovenstaande bevindingen, omdat veel soorten metalen nanodeeltjes ionen afgeven, en dus wordt de toxiciteit van zinkoxide-nanodeeltjes die in deze studie werd waargenomen niet noodzakelijkerwijs gemedieerd door dezelfde nanoplastische toxiciteit mechanismen. We merken ook op dat craniofaciale defecten die we hier hebben waargenomen niet noodzakelijkerwijs een weerspiegeling zijn van abnormale ontwikkeling van de neurale lijstcellen.

Bij enkele met NP behandelde embryo's was de staartknop hypoplastisch of aplastisch; één embryo vertoonde agenesie van de staart en phocomelia van de achterpoten (**Hoofdstuk 2 en 3**). We suggereren dat deze afwijkingen het effect zijn van PS-NP's die hechten aan de blootgestelde mesenchymale populaties aan het oppervlak van de primitieve streep van de staartknop. Tijdens gastrulatie en het proces van ingressie ondergaat het epitheel van het dorsale oppervlak een epitheel-mesenchymale overgang met plaatselijk verlies van de basale lamina (Bellairs 1986; Shook en Keller 2003). Dit proces is nog steeds actief tijdens het stadium waarin we de PS-NP's in het ei introduceerden (Knezevic et al. 1998).

Een andere potentiële bron van mesenchymale cellen in het caudale gebied, die kan worden beïnvloed door blootstelling aan PS-NP, is de overgang van primaire naar secundaire neurulatie, dit proces begint rond stadium 8 (Dady et al. 2014). Binding van de PS-NP's aan deze overgangs mesenchymcellen zou de grove dysplasie van de neurale buis in het caudale gebied van sommige embryo's kunnen verklaren (**Hoofdstuk 2 en 3**). We hebben embryo's blootgesteld aan PS-NP's in stadium 8. Zowel gastrulatie als neurulatie zijn nog steeds actief in dit stadium (Keibel en Abraham 1900).

In **Hoofdstuk 4** tonen onze experimenten, met fluorescerende PS-NP's toegevoegd aan levende embryo's, een sterke labelling in de neurale lijst, maar weinig of geen in andere weefsels (**Hoofdstuk 4**, Fig.4-1). Bovendien vinden we dat die fluorescentie binnen 2 uur in het cytoplasma wordt gezien en er na 6 uur nog steeds is. Deze experimenten moeten echter met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd, omdat: afzonderlijke deeltjes van 25 nm te klein zijn om direct met optische microscopen te worden gevisualiseerd; en het is mogelijk dat de fluorescentie die we zagen gedeeltelijk te wijten was aan lekkage van het fluorochroom van de deeltjes. Het is in ieder geval duidelijk dat sterke fluorescentie specifiek wordt aangetroffen in neurale lijstcellen.

Onze TUNEL-labelexperimenten lieten verhoogde celdood zien in zowel de dorsale middellijn van de neurale buis (**Hoofdstuk 4**, Fig.4-7), als in ectopische klompjes cellen in het lumen van de neurale buis die we identificeerden als neurale lijstcellen met neurale lijst markers (**Hoofdstuk 4**, Fig.4-2 tot 4). Dezelfde markers identificeren ook een populatie van neurale lijstcellen in de dorsale middellijn van met PS-NP behandelde embryo's die niet zijn gemigreerd. We zien ook bewijs van verminderde migratie van neurale lijstcellen naar de pharyngale bogen wanneer TFAP2A-expressie wordt gebruikt als een marker voor migrerende cardiale neurale lijstcellen (**Hoofdstuk 3**, Fig.3-6).

Samen suggereren deze gegevens dat neurale lijstcellen na binding van PS-NP's beschadigd raken of celdood ondergaan en niet migreren (Fig. 5-1; (Wang et al. 2023)). Kandidaat-mechanismen van PS-NP's celbeschadiging zijn: de denaturatie van eiwitten (Gopinath et al. 2019; Hollóczki en Gehrke 2019), en de accumulatie van PS-NP's in het cytoplasma, nadat ze zijn opgenomen door endocytose, en vervolgens weerstand bieden aan afbraak door lysosomale enzymen (Nie et al. 2021). Onze hypothese, dat PS-NP's de migratie van de neurale lijst remmen, komt overeen met experimenten met andere migrerende celtypen. Er is bijvoorbeeld aangetoond dat PS-NP's de migratie en verspreiding van geaggregeerde CT26-muizencarcinoomcellen in vitro onderdrukken (Beaune et al. 2019).

Uit ons onderzoek blijkt dat PS-NP's schadelijke effecten kunnen hebben op vroege kippenembryo's, waarbij ze een verscheidenheid van misvormingen veroorzaken. Uit onze resultaten blijkt dat de toxiciteit van PS-NP's te wijten is aan het feit dat ze zich richten op een specifieke subpopulatie van embryonale cellen. Deze doelgerichtheid is passief, in de zin dat PS-NP's sterk lijken te binden aan neurale lijstcellen en niet aan andere cellen. Het feit dat NP's misvormingen in meerdere systemen veroorzaken is zorgwekkend; vooral gezien de uitgebreide blootstelling van mensen aan kleine plastic deeltjes in het milieu, de gerapporteerde aanwezigheid van kleine plastic deeltjes in menselijke weefsels en de huidige ontwikkeling van een nieuwe generatie nano-geneesmiddelen bedoeld voor medische therapieën.

In de toekomst zal het belangrijk zijn om het onderliggende mechanisme van de selectieve binding van nanoplastics aan neurale lijstcellen te onderzoeken. Eén hypothese is dat nanoplastics zich binden aan specifieke celadhesiemoleculen waarvan bekend is dat ze tot expressie worden gebracht door neurale lijst cellen, zoals cadherine 6B. Cadherine 6B wordt geassocieerd met epitheliale mesenchymale transformatie in zowel embryonale cellen als sommige kankercellen. Als deze hypothese wordt bevestigd, zou de bevinding bijdragen aan zowel ons begrip van de embryonale toxiciteit van nanoplastics als mogelijk ook aan het kankeronderzoek.

