

3 Dosisafhankelijke effecten van een negen dagen durende blootstelling aan Benzo[a]pyreen op gewichtsveranderingen en cytochroom P450 enzymen in de huisspitsmuis (*Crocidura russula*)

Albertus T.C. Bosveld, Paul A.F. de Bie, Hugh A.H. Jansman, Jannie Weggemans

3.1 Inleiding

Potentiële effecten van PAK's in zoogdieren uit de wilde fauna zijn zo goed als onbekend. Gezien het feit dat in *in vitro* experimenten aangetoond is dat verschillende PAK's in staat zijn om EROD te induceren (Till et al., 1999; Willett et al., 1997; Bosveld et al., in voorbereiding), wordt verondersteld dat effecten deels veroorzaakt worden middels binding van PAK's aan de Ah receptor. Binding van een stof aan deze receptor wordt geassocieerd met de initiatie van een reeks van effecten die onder andere leiden tot afweerziekten, groeivertraging, reproductiestoringen, en zelfs sterfte (Safe 1990). De vraag is of bij kleine zoogdieren uit de wilde fauna *in vivo* blootstelling aan PAK's leidt tot de inductie van EROD en daaraan gerelateerde effecten. Hiertoe is reeds eerder onderzoek verricht waarbij de effecten van TCDD en BaP in de huisspitsmuis (*Crocidura russula*) bestudeerd zijn (zie hoofdstuk 2). De huidige studie is gericht op de verificatie van de destijds waargenomen effecten op lichaamsgewichtverandering en de beoordeling van het effect van BaP op verschillende CYP activiteiten *direct na* de blootstellingperiode. In de voorgaande studie is tussen de laatste blootstelling en de sectie een periode van 36 uur opgetreden. Een dergelijke periode kan de oorzaak zijn van een terugval van de tijdens de blootstelling opgetreden inductie van enzymactiviteiten door de relatief snelle metabolisatie van het in het lichaam aanwezige BaP. Ter beoordeling van de effecten op CYP is de EROD, MROD, PROD en BROD activiteit bestudeerd, alsmede verschillende specifieke testosteronhydroxylasen.

3.2 Materiaal en Methode

3.2.1 Dieren & Blootstelling

Negen vrouwtjes huisspitsmuizen (*Crocidura russula*) geboren in de periode van april tot augustus 1995 uit in gevangenschap gehouden en gepaarde ouders zijn op de leeftijd van ca. 10 maanden verdeeld over drie groepen. De drie groepen ontvingen respectievelijk 0, 100, en 1000 µg BaP/dag toegevoegd aan het dieet (overeenkomend met ca. 0, 11 en 110 mg/kg lichaamsgewicht en met ca. 0, 6.6 en 66 mg/kg in het voer). De blootstellingperiode bedroeg 9 dagen in april 1996. Een dergelijke periode wordt verondersteld lang genoeg te zijn om zowel effecten op enzymwerkingen als op lichaamsgewichtveranderingen waar te kunnen nemen. Bij

aanvang van de blootstelling zijn alle dieren gewogen om in een later stadium de individuele gewichtstoename te kunnen bepalen.

De dieren kregen dagelijks om ca. 16.00 uur 2 gram voedsel met respectievelijk 0, 50 en 500 μg BaP/g voer toegevoegd. Voor de vermenging met het voer is BaP opgelost in arachidesolie (respectievelijk 0, 1 en 10 mg/ml) waarvan 100 μl toegevoegd werd aan 2 g voer. Nadat al het aangeboden voer opgegeten was, kregen alle dieren om ca. 23.00 uur nog 15 g ongecontamineerd voedsel aangeboden (zie fig. 3.1).

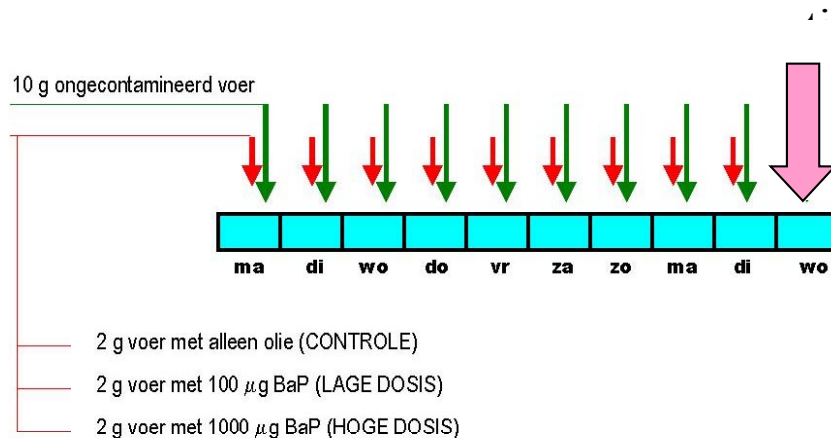


Fig. 3.1. Behandelingschema.

Rode pijlen: aanbieding van 2 g behandeld voer. Groene pijlen: gift van 15 g onbehandeld voer. Roze pijl: sectie.

3.2.2 Sectie

Na 9 dagen blootstelling zijn de dieren gedood door decapitatie. Na doding is de buikwand geopend en zijn de lever (zonder galblaas), milt, thymus, nieren, hersenen en ovarium verwijderd en gewogen. De lever is direct ingevroren in vloeibaar stikstof en bewaard bij -80°C voor verdere biochemische analyses.

3.2.3 Enzymactiviteit

De activiteit van verschillende microsomale cytochroom P450 enzymen in de lever is bepaald. De microsomale fracties zijn middels gedifferentieerde centrifugering geïsoleerd uit het leverhomogenaat. Van de microsomale fracties zijn de eiwitconcentraties fluorimetrisch bepaald volgens de methode van Lorenzen en Kennedy (1993). De microsomale EROD, MROD, PROD en BROD activiteiten zijn bepaald met behulp van een Cytofluor multiwell fluorescentiemeter. Reactiemengsels bestonden uit 25 μl microsomale suspensie met 375 μl 0.1 M TRIS buffer met NADPH (4.8 mM), BSA (10 mg/ml) en substraat (ER, MR en PR 1 μM ; BR 0.1 μM). Exact tien minuten na toevoeging van NADPH (start van de reactie)

werd de enzymactiviteit stilgelegd door 1 ml ijskoude methanol aan het mengsel toe te voegen. Vervolgens is de fluorescentie gemeten in een Cytofluor fluorescentie microtiter “platerreader” bij een excitatie golflengte van 530 nm en een emissie van 590 nm. Resorufine (Sigma R-3257) is gebruikt als standaard (zie ook §2.25). Naast de AROD activiteiten is eveneens het microsomaal testosteronmetabolisme bestudeerd. Hiertoe zijn microsomen geïncubeerd met testosteron en zijn de omzettingsproducten bepaald met behulp van HPLC. De gebruikte methoden zijn gedetailleerd beschreven in §2.2.6.

3.2.4 Statistiek

Verschillen tussen behandelingsgroepen zijn getest met ANOVA. Individuele relaties zijn getoetst met lineaire regressie modellen met StatGraphics plus (Statistical Graphics Corporation).

3.3 Resultaten

3.3.1 Lichaamsgewicht

Uit de lichaamsgewichtbepalingen bleek dat bij de hoogste blootstelling (1 mg/dag) een afname van het lichaamsgewicht optrad. Blootstelling aan 0.1 mg/dag resulteerde niet in een effect (zie tabel 3.1).

Tabel 3.1. Effecten op lichaamsgewichttoename.

	controle	0.1 mg BaP/dag	1.0 mg BaP/dag
lichaamsgewicht start (g)	9.8±0.9	8.6±0.7	8.9±0.3
lichaamsgewicht eind (g)	10.2±1.3 ^A	9.2±0.8	8.1±0.9 ^B (p=0.08)
lichaamsgewichttoename (g)	0.4±0.6 ^A	0.5±0.2 ^A	-0.9±0.6 ^B (p=0.06, p=0.02)

n.b. Verschillende letters geven aan dat de groepen significant verschillend van elkaar zijn (nivo van significantie weergegeven tussen haakjes)

3.3.2 Orgaangewichten

Bij beschouwing van de orgaangewichten blijkt het ovariumgewicht afgenomen in de hoogst blootgestelde groep. Het hersengewicht blijkt toegenomen in de BaP blootgestelde dieren. De overige beschouwde orgaangewichten vertoonden geen significante verschillen tussen de groepen (zie tabel 3.2). Ook wanneer de relatieve orgaangewichten (ten opzichte van het lichaamsgewicht) beschouwd worden, blijkt blootstelling aan de gegeven hoeveelheden BaP geen meetbaar effect te veroorzaken.

Tabel 3.2. Biometrie bij sectie. Gemiddelde \pm standaarddeviatie ($n=3$) van de orgaangewichten (in mg).

	controle	0.1 mg BaP/dag	1.0 mg BaP/dag
lever	531 \pm 29	537 \pm 79	462 \pm 73
milt	100 \pm 35	112 \pm 27	122 \pm 11
thymus	74 \pm 15	93 \pm 30	65 \pm 13
nier (links + rechts)	187 \pm 9	176 \pm 25	166 \pm 51
ovarium	4.0 \pm 2.1 ^{AB}	4.7 \pm 0.7 ^A	3.3 \pm 0.7 ^{B(p=0.05)}
hersenen	189 \pm 12 ^A	206 \pm 2 ^{B (p=0.09)}	223 \pm 62 ^{AB}

N.B. Verschillende letters in superscript geven aan dat een significant verschil is aangetoond tussen de groepen. Het significantie nivo is tussen haakjes aangegeven.

3.3.3 AROD

Van de vier verschillende alkoxyresorufines welke als substraat gebruikt zijn voor de vaststelling van de microsomale dealkylase-activiteiten werd methoxyresorufine, dat specifiek door CYP 1A2 gedemethyleerd wordt, het duidelijkst dosis-afhankelijk omgezet. Een dagelijkse blootstelling aan BaP van 100 en 1000 $\mu\text{g}/\text{dag}$ resulteerde in een significante verhoging van de MROD activiteit van respectievelijk vier en zeven keer. EROD was in beide blootgestelde groepen ca. 2x geïnduceerd. PROD bleek alleen in de hoogst gedoseerde groep significant ca. 2x verhoogd. De absolute PROD activiteit was veel geringer dan de EROD en MROD activiteit (respectievelijk 56x en 76x lager). De BROD activiteit vertoont wel een licht toenemende trend maar bleek niet significant veranderd te worden onder invloed van BaP (zie fig. 3.2).

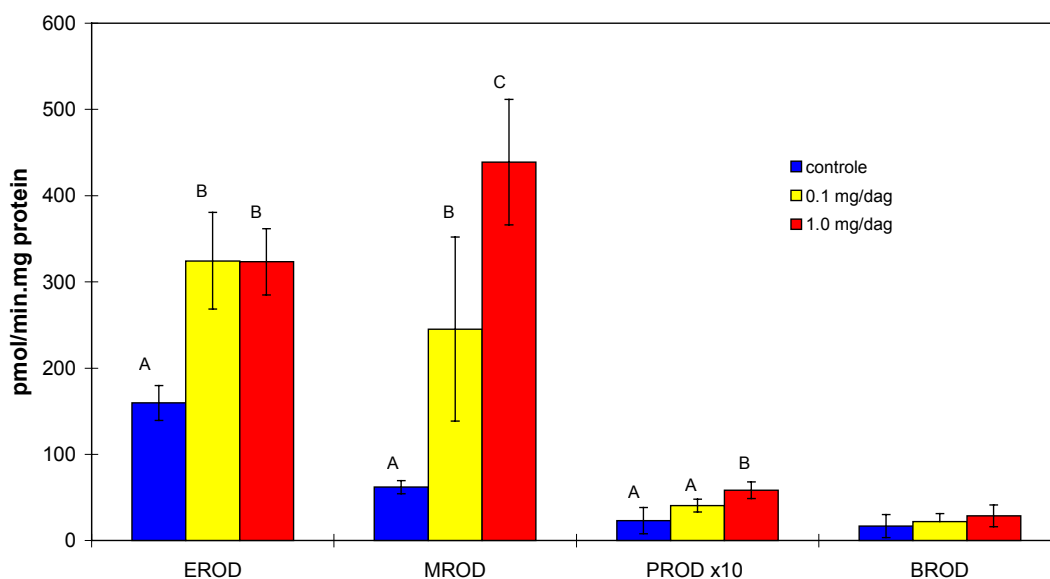


Fig. 3.2. AROD activiteiten in BaP blootgestelde huisspitsmuizen.

N.B. Groepen die significant ($p < 0.05$) verschillend van elkaar zijn, zijn aangegeven met verschillende letters.

Wanneer de onderlinge relaties gezien worden voor de verschillende AROD activiteiten, blijkt dat MROD het sterkst gerelateerd is aan de EROD en PROD

activiteit. Tabel 3.3 geeft voor de verschillende relaties de waarde voor r^2 op basis van lineaire regressie. In fig. 3.3 zijn voor de relaties met MROD ook de resultaten van de niet lineaire regressie analyses weergegeven.

Tabel 3.3. Lineaire Regressie coëfficiënten (r^2) voor de onderlinge relaties tussen EROD, MROD, PROD en BROD

	EROD	MROD	PROD	BROD
EROD	1	0.64	0.42	0.20
MROD		1	0.67	0.39
PROD			1	0.25
BROD				1

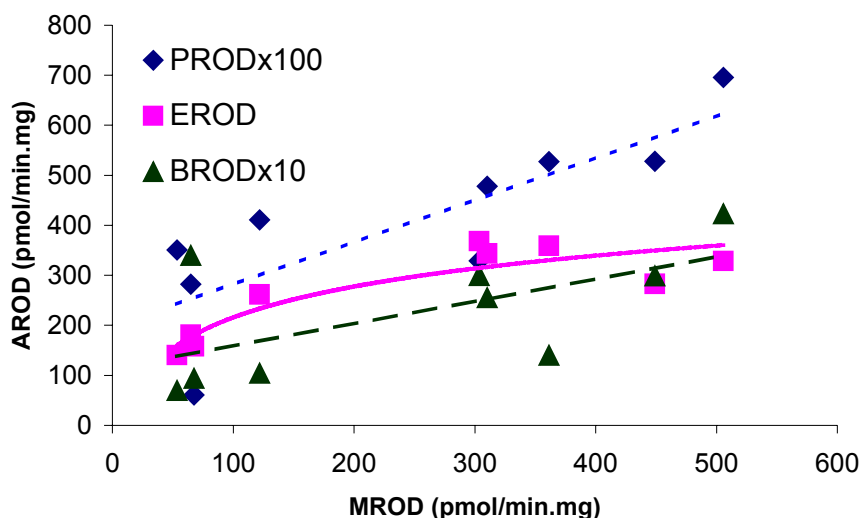


Fig. 3.3. Relatie tussen MROD en de overige AROD activiteiten. $PROD = 8.446 \times 10^{-3} \times MROD + 1.97$ ($r^2 = 0.671$), $EROD = 89.22 \times \ln(MROD) - 195.3$ ($r^2 = 0.818$), $BROD = 4.47 \times 10^{-2} \times MROD + 11.36$ ($r^2 = 0.387$).

3.3.4 Testosteronhydroxylase

Figuur 3.4 toont de resultaten van de testosteron(de)hydroxylase activiteiten. 17-T (androstenedion formatie) neemt significant toe in de hoogst gedoseerde groep ($p=0.016$). Van de overige testosteron hydroxylase (TH) activiteiten laat geen enkele een significante afwijking zien bij de BaP blootgestelde dieren ten opzichte van de controle dieren. Wel is er een positieve trend waar te nemen bij 6β -TH. De overige TH activiteiten laten een negatieve trend zien wanneer de activiteit in relatie met de blootstelling bezien wordt (zie fig. 3.4). Wanneer de relatieve TH responsen beschouwd worden, geeft dit een geheel ander beeld te zien. Het aandeel dat 6β -TH heeft op de totale TH respons neemt significant en dosis-afhankelijk toe. Deze

relatieve toename wordt gecompenseerd door een significante afname van het aandeel verwezenlijkt door 2 β -, 11 α -, 15 α - en 15 β -TH.

Wanneer de TH activiteit in relatie met EROD of MROD bezien wordt, blijkt dat 17-T marginaal significant ($p=0.101$) gerelateerd is aan de MROD activiteit (zie fig. 3.5). Geen enkele andere testosteronhydroxylase is significant lineair gerelateerd aan MROD of EROD (tabel 3.4). De r^2 waarden in de relatie met EROD variëren van 0.0002 (2 α -TH) tot 0.28 (7 α -TH). In relatie met MROD variëren de r^2 waarden van 0.009 (2 α -TH) tot 0.44 (17-T).

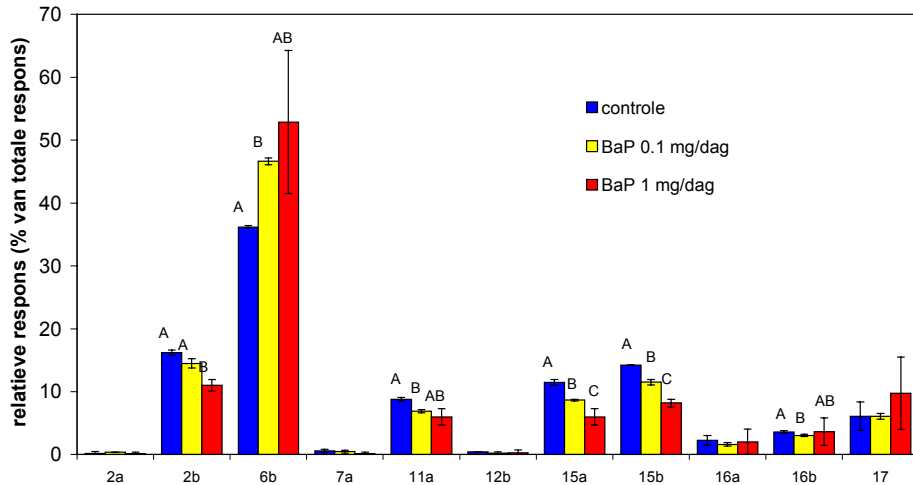
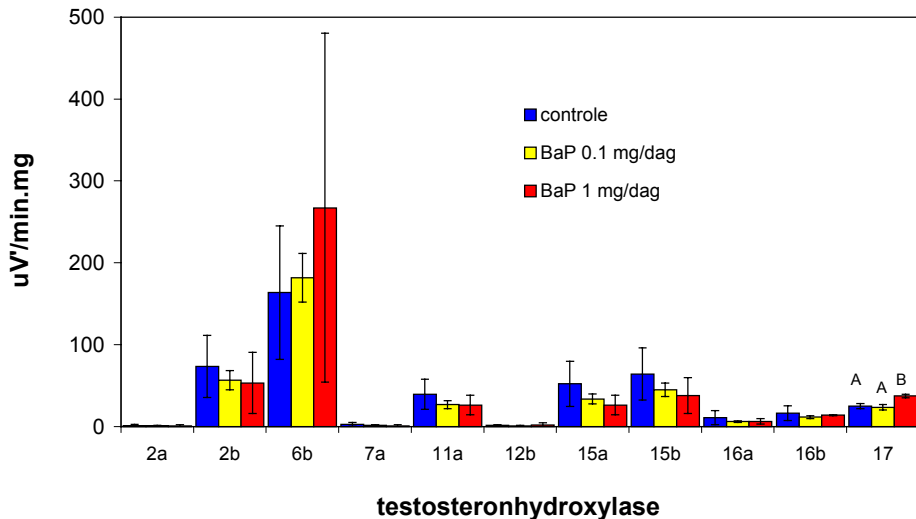


Fig. 3.4. Effecten van BaP op de absolute (boven) en relatieve (onder) testosteronhydroxylaseactiviteiten in huisspitsmuisen. Groepen met verschillende letters zijn significant ($p<0.05$) verschillend van elkaar.

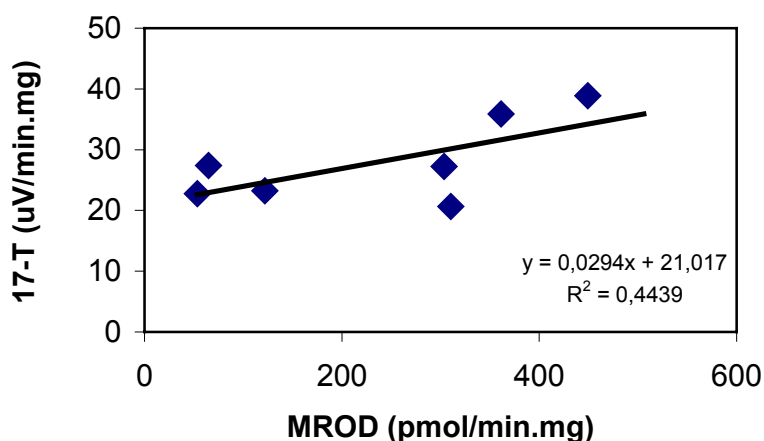


Fig. 3.5. Relatie tussen MROD en androsteendionformatie.

Tabel 3.4. Regressieanalyse parameters voor relatie tussen EROD/MROD en specifieke TH activiteiten.

TH	vs EROD		vs MROD	
	rc	r ²	rc	r ²
2α	0.0002	0.0002	0.0006	0.009
2β	-0.085	0.10	-0.020	0.016
6β	0.10	0.007	0.35	0.28
7α	-0.008	0.28	-0.0047	0.27
11α	-0.056	0.19	-0.021	0.088
12β	-0.003	0.031	0.0029	0.11
15α	-0.090	0.23	-0.051	0.22
15β	-0.10	0.21	-0.048	0.14
16α	-0.012	0.055	-0.011	0.14
16β	-0.011	0.048	-0.0040	0.021
17	0.021	0.073	0.029	0.44 ¹

rc = richtingscoëfficiënt

¹ p=0.101. Voor alle overige relaties geldt p>0.2.

3.4 Discussie

Uit de resultaten blijkt, dat de lichaamsgewichttoename in de 9 dagen durende blootstellingsperiode significant geremd is in de hoge blootstellingsgroep (1 mg BaP per dag). Waarnemingen aan de spitsmuizen gedurende de blootstelling duiden reeds op het feit dat de spitsmuizen in de hoogst gedoseerde groep een verminderde eetlust hadden. In een eerdere studie (hoofdstuk 2) is reeds gebleken dat een 5 dagen durende blootstelling aan 150 µg per dag (ca. 14 mg/kg lichaamsgewicht) eveneens een reductie in de lichaamsgewicht toename veroorzaakte (0.7 g). Een dergelijke reductie werd in de huidige studie bij een blootstelling aan 100 µg per dag (ca. 11 mg/kg lichaamsgewicht per dag) niet gevonden. Bij een tien keer hogere blootstelling (1 mg per dag; ca. 110 mg/kg lichaamsgewicht) werd in de huidige studie een gewichtsafname van 0.9 g over de blootstellingsperiode waargenomen. Deze

gezamenlijke resultaten duiden op een "lowest observed effect level" (LOEL) van 14 mg/kg lichaamsgewicht.

Naast een effect op de groei van de blootgestelde dieren bleek ook een duidelijk effect op de microsomale EROD en MROD activiteit. De EROD activiteit bleek in beide doseringsgroepen twee keer verhoogd. Deze resultaten suggereren dat bij een blootstelling van 0.1 mg BaP/dag (ca. 11 mg/kg.dag) de maximale EROD inductie reeds bereikt is. Uit eerdere blootstellingsexperimenten met TCDD (hoofdstuk 2) is echter gebleken dat EROD tot acht keer geïnduceerd kon worden in de huisspitsmuis (3036 pmol/min.mg ten opzichte van 391 ± 125 pmol/min.mg in de controlegroep). Mogelijk speelt de snelle afbraak van BaP in het lichaam een rol bij de beperkte induceerbaarheid van EROD door BaP. Wanneer echter de MROD inductie beschouwd wordt, blijkt deze wel nog toe te nemen in de hoogste doseringsgroep. De gezamenlijke resultaten suggereren dat wanneer enzymactiviteiten gemeten worden om het effect van een blootstelling aan BaP te meten, MROD een meer gedifferentieerd beeld geeft dan EROD.

De EROD activiteit in de controlegroep was in het huidige blootstellingsexperiment significant lager dan in het blootstellingsexperiment met TCDD (hoofdstuk 2) (160 ± 18 vs 391 ± 125 pmol/min.mg). Dit verschil kan niet verklaard worden uit leeftijd of geslacht. Mogelijk is dit verschil te wijten aan de verschillende herkomst van de dieren. De dieren die gebruikt zijn voor de huidige studie zijn geboren in gevangenschap en grootgebracht op gestandaardiseerd voer (FELIX kattenvoer en meelwormen). De dieren uit de vorige studie (hoofdstuk 2) waren afkomstig uit de natuur en zijn na een korte acclimatisatieperiode blootgesteld aan de teststoffen. Blootstellingen aan persistente AROD inducerende verbindingen tijdens het vrije leven zijn bij deze groep mogelijk de oorzaak van een lichte verhoging van de achtergrond enzymactiviteiten.

Naast effecten op EROD en MROD is een ruim twee keer verhoogde PROD activiteit waargenomen in de hoogst gedoseerde groep. De absolute activiteiten waren echter 10 tot 100 keer lager. De BROD activiteit was niet significant geïnduceerd. Uit de correlaties tussen de verschillende activiteiten (zie tabel 3.3 en fig. 3.3), blijkt dat 67% van de variatie in PROD volgens een lineair model verklaard wordt uit MROD. De BROD activiteit wordt voor 39% uit MROD verklaard. Dit suggereert dat in de huisspitsmuis voor zowel PROD als BROD andere enzymen dan het aan MROD geassocieerde CYP1A2 medeverantwoordelijk zijn voor de omzettingen. Ook blijkt de PROD activiteit niet eenduidig verklarend voor de BROD activiteit ($r^2 = 25\%$). De verzamelde resultaten suggereren dat wanneer enzymactiviteiten gemeten worden om het effect van een blootstelling aan BaP te meten MROD het meest gevoelig en differentiërend reageert. Wanneer monitoring studies in het veld uitgevoerd worden, wordt echter aanbevolen om de eventuele effecten op de verschillende dealkylases te meten omdat deze op verschillende manieren reageren.

Wanneer de absolute testosteronhydroxylase activiteiten beschouwd worden blijkt geen enkele specifieke TH significant veranderd te worden bij de toegepaste

doseringen van BaP (zie fig. 3.4). In een overzicht gemaakt door Wortelboer (1991) wordt gesteld dat CYP1A1 en CYP1A2 medeverantwoordelijk zijn voor de 6 β -TH activiteit. CYP2B1/2 zou medeverantwoordelijk zijn voor de 16 α - en 16 β -TH activiteit in de rat. Uit de door ons verzamelde resultaten blijkt echter geen significant ($p>0.2$) verband tussen EROD of MROD en 6 β -TH (zie tabel 3.4). Wel is het opmerkelijk dat 6 β -TH en 17-T (testosteron \rightarrow androsteendion) een positieve correlatie vertoont met EROD. Alle andere TH activiteiten vertonen een negatieve correlatie.

Wanneer de aan CYP2B1/2 geassocieerde BROD activiteit en de 16 β -TH activiteit beschouwd worden blijkt wel een verband aanwezig, wat echter maar door één waarneming (BROD ca 34 pmol/min.mg; zie figuur 3.6) veroorzaakt wordt. Voor beiden werd echter geen significante toename in de BaP blootgestelde dieren gevonden.

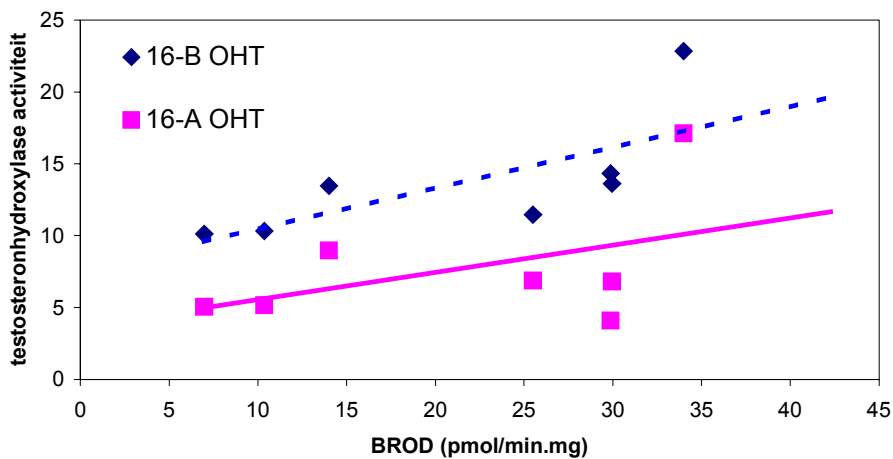


Fig. 3.6. Relatie tussen BROD en 16 α -TH ($y=0.19x + 3.64$; $r^2=0.215$) en 16 β -TH ($y=0.286x + 7.59$; $r^2=0.508$).

De vorming van androsteendion was als enige van de testosteron omzettingsreacties significant ($p=0.016$) verhoogd in de hoogst blootgestelde groep. Behalve de 6 β -TH activiteit (en in mindere mate 2 α -TH) vertoonden verder alle testosteron hydroxylase activiteiten een dalende trend bij een toenemende blootstelling aan BaP. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de effecten van TCDD zoals in hoofdstuk 2 beschreven. Eén van de daarvoor aangevoerde verklaringen is dat de hydroxyleringsactiviteiten van de verschillende betrokken enzymen competitief geremd worden door het in de microsomen aanwezige TCDD. Dit zou mogelijk eveneens gelden bij de hoogste BaP concentratie.

De waargenomen verstoring van de testosteron omzettingen in de BaP blootgestelde spitsmuizen beïnvloeden mogelijk processen in het lichaam die onder controle van testosteron of een van zijn metabolieten staan. Dit zou bijvoorbeeld kunnen leiden tot een afwijking in de ontwikkeling van geslachtscellen of andere geslachtskenmerken. In de onderhavige studie is echter geen aandacht besteed aan

dergelijke effectparameters waardoor een relatie tussen een gewijzigde TH activiteit en effecten op de reproductie niet aangetoond kan worden.

3.5 Conclusies

Een blootstelling aan 0.1 mg BaP per dag (overeenkomend met ca. 11 mg/kg lichaamsgewicht per dag en 6.6 mg/kg in het voer) resulteerde in een significant effect op de EROD en MROD activiteit, waarbij de MROD activiteit vier keer verhoogd was en de EROD activiteit twee keer. Het effect op MROD was het meest gevoelig en het meest gedifferentieerd naar blootstelling. Blootstelling aan 1 mg BaP per dag (overeenkomend met ca. 110 mg/kg lichaamsgewicht per dag en 66 mg/kg in het voer) resulteerde naast een verdere toename van verschillende AROD activiteiten ook in een significante toename van de androsteendion vorming. Geen andere omzettingproducten van testosteron werden in significant gewijzigde hoeveelheden gevormd. Naast effecten op cytochroom P450 enzymen resulteerde een blootstelling aan 1 mg BaP per dag in een significante reductie in lichaamsgewicht bij huisspitsmuizen.