

## 5 Effecten van chronische blootstelling (negen maanden) aan een mengsel van PAK's met of zonder voorafgaande in utero blootstelling

*A.T.C. Bosveld, P.A.F. de Bie, E. Dekkers, J. Immerzeel, H.A.H. Jansman, & J.B.F. de Jongh*

### 5.1 Inleiding

In de voorgaande hoofdstukken zijn de effecten beschreven van PAK's bij adulte spitsmuizen. Uit diverse onderzoeken blijkt echter dat juist blootstellingen in de vroege levensfasen van groot belang kunnen zijn voor het induceren van effecten (Janssen et al., 1998). Vooral de hormoon gestuurde neonatale imprinting van in het latere leven benodigde cytochroom P450 expressie kan door blootstelling aan diverse organische microverontreinigingen verstoord worden (Bagley & Hayes 1983, 1985, Waxman et al., 1985). Naast effecten op enzymfuncties kan blootstelling *in utero* of middels lactatie ook de functionaliteit van geslachtsorganen en het gedrag in het adulte levensstadium beïnvloeden (Mably et al., 1992a, 1992b). Om de effecten van een vroegtijdige blootstelling aan PAK's in huisspitsmuizen te onderzoeken is een studie uitgevoerd waarin dieren vanaf de conceptie óf vanaf het einde van de lactatieperiode blootgesteld zijn aan een mengsel van PAK's. De effecten op enzymfuncties zijn vervolgens onderzocht en indicatief onderzoek is verricht naar histologische afwijkingen in de geslachtsorganen.

### 5.2 Materiaal en Methode

#### 5.2.1 Dieren & blootstelling

Zes jongen op 7-7-96 geboren uit een vrouwtje dat in zwangere toestand is gevangen aan de noord-oost rand van Arnhem (A'foorste coördinaten 189-447) zijn verdeeld over twee groepen: een controle groep (n=3) en een groep (n=3) waarvan de dieren direct na de speenperiode middels het voer blootgesteld zijn aan PAK's. Na de speenperiode is de moeder eveneens blootgesteld aan een dieet met PAK's en gekruisd met een mannetje dat in die periode hetzelfde dieet ontvangen heeft. De hieruit op 28-7-96 geboren nakomelingen (n=3) zijn gezoogd door de aan PAK's blootgestelde moeder en na de zoogperiode gehouden op een dieet met PAK's. Het dieet van de blootgestelde groepen bevatte een mengsel van anthraceen, benzo[a]anthraceen, benzo[a]pyreen, chryseen, fluoranthreen, fluoreen, phenanthreen, peryleen en pyreen. Van deze stoffen is een stockoplossing in arachidesolie gemaakt waarin de concentraties van de afzonderlijke componenten 1 mg/ml bedroegen. Voor het dieet werd 10 ml PAK oplossing vermengd met 1 kg Felix hart/lever kattenvoer. De uiteindelijke somconcentratie in het met PAK verontreinigde voer bedroeg 90 mg PAK/kg. De concentraties van de individuele

componenten bedroegen 10 mg/kg voer. De controle groep kreeg voer bijgemengd met arachides olie (10 ml/kg).

### **5.2.2 Sectie**

Het experiment is na negen maanden blootstelling op 26-3-97 beëindigd. De dieren zijn verdoofd met ether en ventraal geopend waarna de lever uitgenomen is. De linker- en rechterlob zijn apart gewogen en bewaard. De rechterlob is ingevroren in vloeibaar stikstof voor latere bepaling van de microsomale enzymactiviteiten. De linkerlob is gefixeerd in formaline en opgeslagen voor eventueel histopathologisch onderzoek. Daarnaast zijn ook de schildklier, thymus, milt, nieren, hersenen en de gonaden uitgenomen, gewogen en gefixeerd in formaline voor eventueel histopathologisch onderzoek.

### **5.2.3 Enzymactiviteitsmetingen**

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 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. Alle gebruikte methoden zijn gedetailleerd beschreven in §2.2.5, §2.2.6 en §3.2.3.

### **5.2.4 Histopathologie**

Uitgeprepareerde organen zijn opgenomen in een Bouinoplossing (Klinipath b.v.). Na fixatie en dehydratatie zijn de organen ingebed in parafine en gesneden m.b.v. een Anglia scientific 300 microtoom. De gesneden preparaten zijn na rehydratatie gekleurd met een eosine-haematoxylyne oplossing (Klinipath b.v.). Na dehydratatie zijn de preparaten ingesloten en beoordeeld. Van de testes is de gemiddelde diameter van de tubuli seminiferi bepaald, de dikte van het tubulus epitheel, het aantal cellagen in het tubulusepitheel, het aantal ronde spermatiden en het aantal spermatozoën in het lumen. De gemiddelden van de verschillende parameters zijn bepaald op basis van drie preparaten per testis waarvan elk tien aselekt gekozen tubuli geanalyseerd zijn. De standaard deviaties zijn aangegeven op basis van de variatie tussen de drie preparaten van één dier. Van het tubulus epitheel is de dikte bepaald met een oculairlineaal. Daarnaast is het aantal cellagen waaruit het epitheel bestaat geteld en zijn het aantal gaten en necrotische cellen in het epitheel bepaald. Een cel wordt als necrotisch beschouwd wanneer geen duidelijke celkern te zien is, de cel donkerder dan de omgeving is en er een vervloeiing met de omliggende cellen optreedt (Junqueira et al., 1996).

Van het ovarium is het oppervlakte bepaald en is het aantal van de daarin voorkomende primordiale -, groeiende - en artretische follikels bepaald. Daarnaast is het oppervlakte (absoluut en procentueel t.o.v. gehele ovarium) van de follikels bepaald. Follikels bestaande uit een oöcyt met enkele afgeplatte follikelcellen zijn als primordiale follikel aangemerkt. Follikels met een stratum granulosum van ten minste één laag kubische cellen zijn als groeiend geclassificeerd (Junqueira et al., 1996). De begrenzing van deze follikels wordt aangegeven door de grens tussen de theca en het stratum granulosum. Follikels met optredende necrose in het stratum granulosum (lichte wazige rand rond de follikel) zijn als artretisch geclassificeerd (Junqueira et al., 1996). De histologische ovarium index (HOI) is bepaald en gedefinieerd als de verhouding tussen het aantal artretische follikels en het totaal aantal follikels (artretisch en groeiend). Verder is de mate van doorbloeding van het ovarium bepaald aan de hand van het aantal daarin aanwezige bloedvaten groter dan drie oculair-eenheden.

### **5.2.5 Statistiek**

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

## **5.3 Resultaten**

### **5.3.1 Lichaamsgewicht**

Het lichaamsgewicht van de controle dieren fluctueerde over de behandelingsperiode van 10 tot 12 g. In de dieren die vanaf de lactatie blootgesteld zijn, fluctueerde het gewicht van 10 tot 15 g. In de dieren die vanaf de conceptie blootgestelde zijn, fluctueerde het gewicht van 10 tot 13 g. Gedurende de behandelingsperiode zijn geen significante verschillen in lichaamsgewicht waargenomen tussen de aan PAK blootgestelde dieren en de controle dieren (zie fig. 5.1). Ook wanneer de individuele lichaamsgewichttoename beschouwd wordt, blijkt op geen enkel tijdstip gedurende de behandelingsperiode een significant verschil tussen de behandelingsgroepen op te treden.

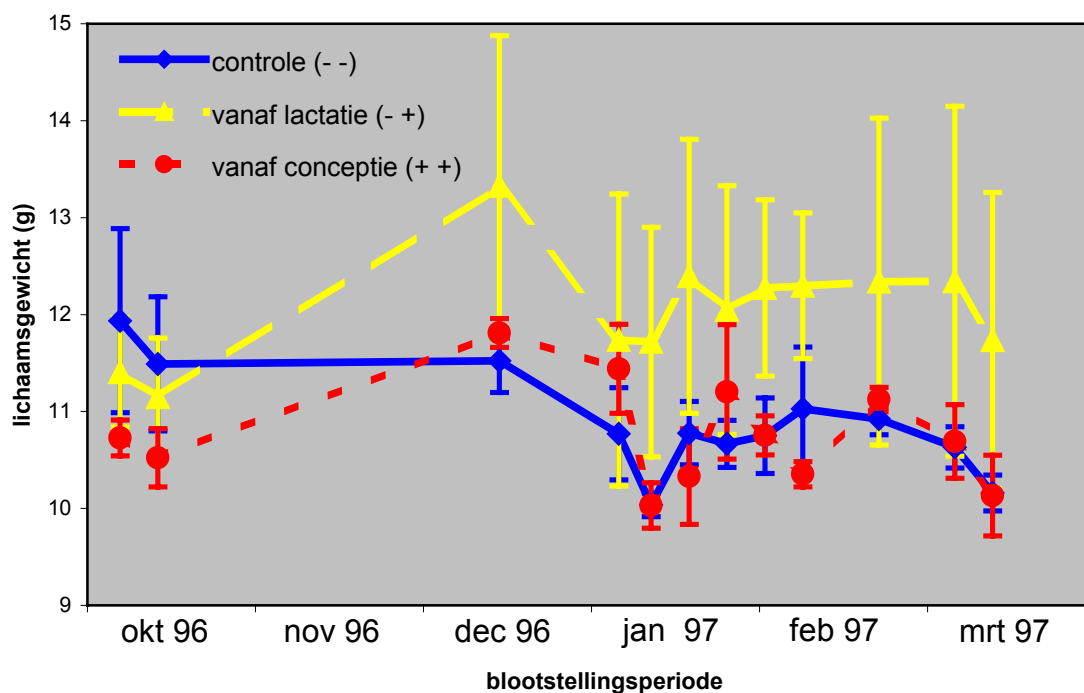


Fig. 5.1 Effecten van blootstelling aan PAK's (90 mg/kg in het voer) op het gemiddeld lichaamsgewicht gedurende negen maanden blootstelling.

### 5.3.2 Orgaangewichten

Tussen de verschillende behandelingsgroepen zijn geen significante verschillen waargenomen voor thymus-, milt-, lever-, testes- of ovariumgewichten. Wel bleek een significant verschil in hersengewicht dat toegenomen was in de aan PAK's blootgestelde dieren (zie tabel 5.1).

Tabel 5.1. Gemiddelde orgaangewichten van huisspitsmuizen uit de verschillende behandelingsgroepen.

	thymus	milt	nieren	hersenen	lever	testes	ovarium
controle	9.7±4.6	180±57	96±3	167±5	449±63	13±4	11
vanaf lactatie	15.3±8.5	155±8	113±12	186±12 <sup>^</sup>	569±92	-	8.3±1.2
vanaf conceptie	7.7±2.1	132±27	94±3	199±5 <sup>^</sup>	444±22	12±3	8.5±0.7

nb. <sup>^</sup> significant verschillend van de controlegroep (p<0.05)

### 5.3.3 AROD

Beide aan PAK's blootgestelde groepen gaven voor zowel EROD, MROD als PROD overeenkomende activiteiten te zien. Ten opzichte van de controlegroep was in deze blootgestelde groepen de EROD, MROD en PROD activiteit ca. 2x verhoogd.

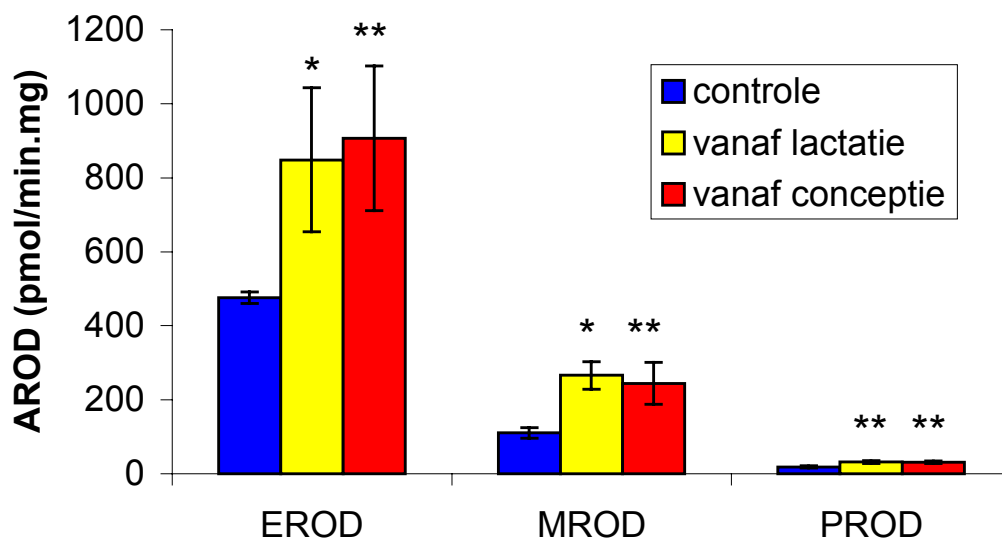


Fig. 5.2. Microsomale EROD, MROD en PROD activiteit in lever van huisspitsmuizen uit de verschillende behandelingsgroepen. Significantie van verschillen tussen aan PAK blootgestelde groepen en controlegroep is aangegeven met \* ( $p < 0.05$ ) of \*\* ( $p < 0.01$ ).

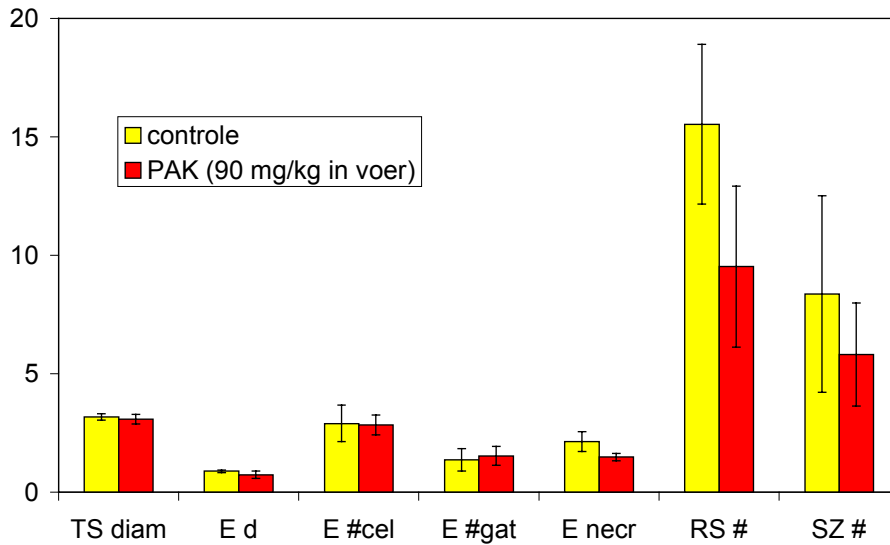
### 5.3.4 Histologie

#### 5.3.4.1 De testes.

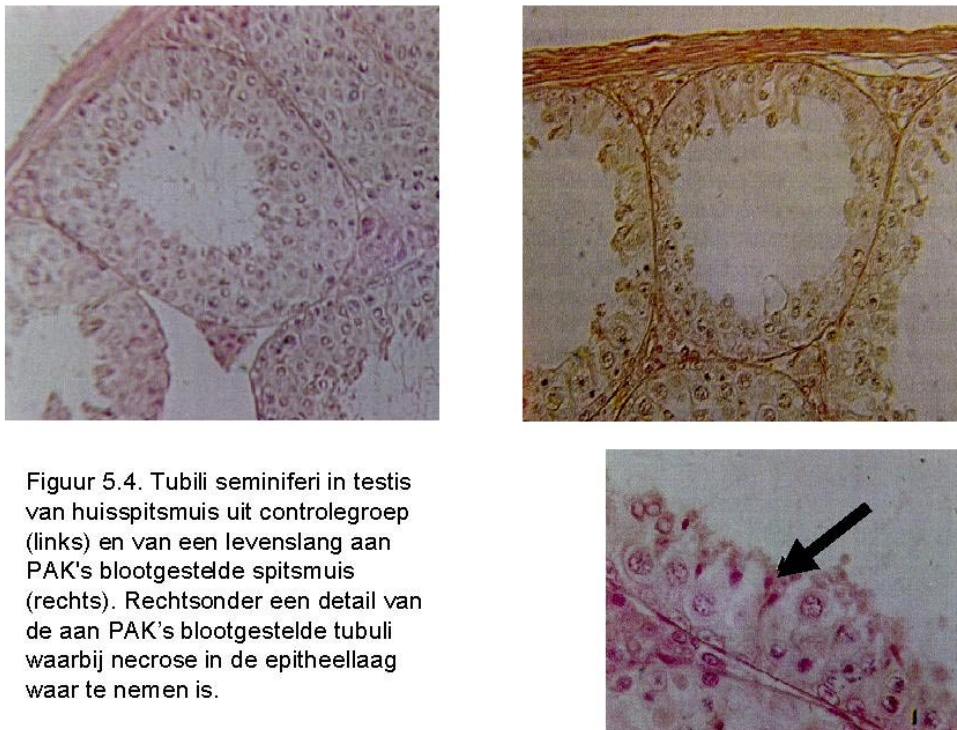
Indicatief onderzoek aan de testes kon uitgevoerd worden door de vergelijking van één dier uit de controlegroep met één dier uit de groep die levenslang (*in utero*, via lactatie en vervolgens via het voer) blootgesteld is aan PAK's.

De diameter van de tubuli seminiferi in de testes van beide dieren waren overeenkomend. De epitheeldikte (in  $\mu\text{m}$ ) van de tubuli seminiferi in de aan PAK's blootgestelde spitsmuis was kleiner. Het aantal epitheliale cellagen verschilde niet tussen de twee dieren.

Verder is waargenomen dat in de aan PAK's blootgestelde huisspitsmuis necrose in de epitheellaag dichter bij de basale membraan optreedt dan in het controledier. Bovendien is het aantal ronde spermatiden in het lumen in het aan PAK's blootgestelde dier geringer dan in het controledier (zie figuur 5.3 & 5.4).



*Figuur 5.3. Vergelijking van histologische effectparameters in de testes van één controle mannetje en één levenslang aan PAK's blootgesteld mannetje. De gemiddelden en standaarddeviaties zijn gebaseerd op drie coupes van één dier voor zowel de controle als de belaste groep. Hierbij is voor iedere coupe het gemiddelde van 10 aselect gekozen tubuli als waarde is ingegeven. TS diam = diameter van tubuli seminiferi; E d = dikte van epitheellaag; E # cel = aantal cellen in epitheel; E # gat = aantal gaten in epitheel; E necr = Epitheellaag vanaf waar necrose waargenomen is; RS # = aantal ronde spermatiden; SZ # = aantal spermatozoën.*



**Figuur 5.4. Tubuli seminiferi in testis van huisspitsmuis uit controlegroep (links) en van een levenslang aan PAK's blootgestelde spitsmuis (rechts). Rechtsonder een detail van de aan PAK's blootgestelde tubuli waarbij necrose in de epitheellaag waar te nemen is.**

### 5.3.4.2 Het ovarium.

Indicatief onderzoek aan de ovaria kon uitgevoerd worden door de vergelijking van één dier uit de controlegroep met drie dieren uit de groep die vanaf het eind van de lactatieperiode levenslang via het voer blootgesteld zijn aan PAK's en twee dieren die vanaf de conceptie levenslang (*in utero*, via lactatie en vervolgens via het voer) blootgesteld zijn aan PAK's.

Het gemiddelde oppervlakte van het ovarium was overeenkomend voor de verschillende groepen. Het gemiddeld aanwezige aantal of oppervlakte van groeiende follicels of atretische follicels in de blootgestelde groepen was lager dan in de controlegroep. Het aantal primordiale follicels daarentegen bleek echter in beide blootgestelde groepen gemiddeld hoger te zijn dan in de controlegroep. Ook bleek de doorbloeding afhankelijk van de periode van blootstelling toe te nemen, waarbij het aantal bloedvaten het hoogst was in de dieren die via het voer maar ook reeds via het moederdier (*in utero* en via lactatie) blootgesteld zijn aan PAK's. In deze laatste groep bleek de histologische ovarium index (HOI) kleiner dan in de andere behandelingsgroepen.

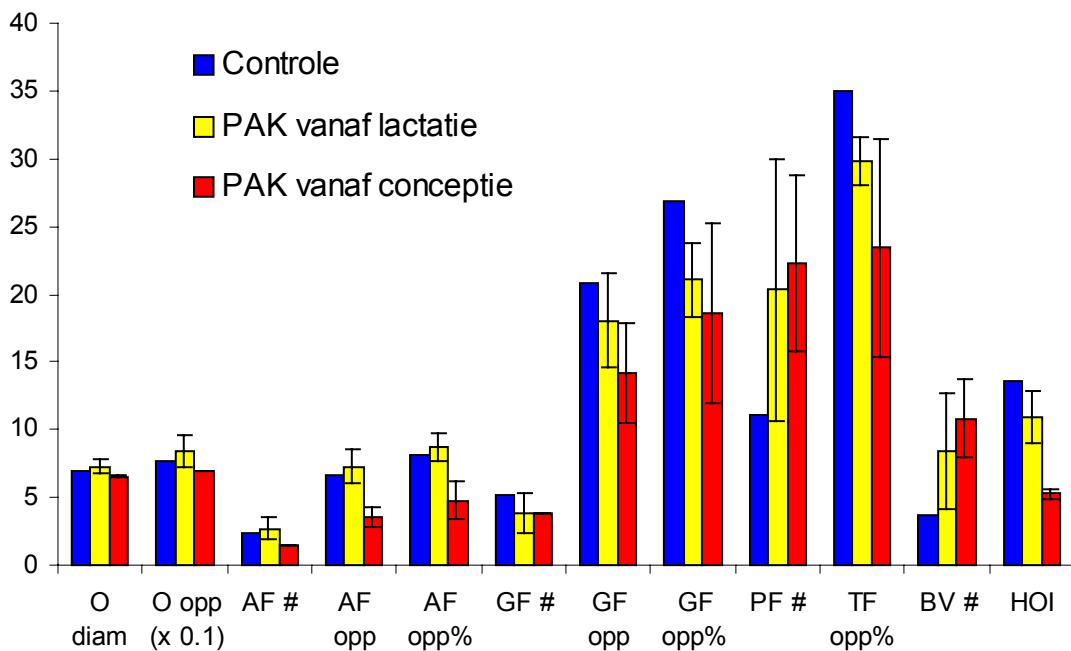


Fig. 5.5. Vergelijking van effectparameters in ovaria uit controlegroep (meting aan één dier), vanaf het eind van de lactatie levenslang via het voer blootgestelde vrouwtjes (gemiddelde van drie dieren), en vanaf de conceptie levenslang blootgestelde vrouwtjes huisspitsmuizen (gemiddelde van twee dieren).

NB: O = ovarium; AF = atretische follicels; GF = groeiende follicels; PF primordiale follicels; TF = totaal aantal follicels; BV = bloedvaten; HOI = histologische ovarium index (aantal atretische follicels / totaal aantal follicels); diam = diameter; opp = oppervlakte; # = aantal.

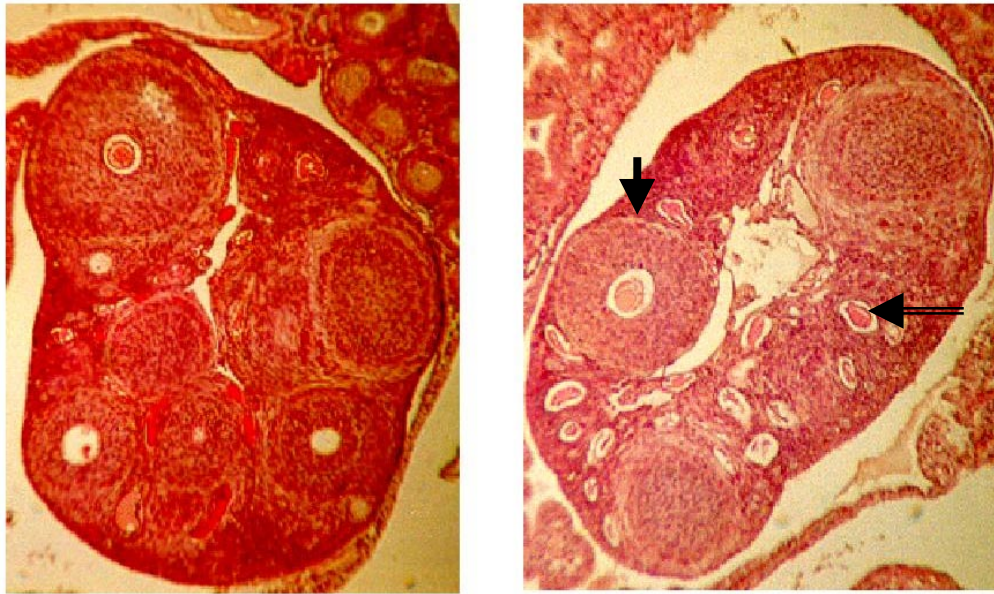


Fig. 5.6. Ovarium van huisspitsmuis uit controlegroep (links) en uit levenslang via het voer aan PAK's blootgestelde groep (rechts). In het rechts afgebeelde ovarium zijn meer bloedvaten ( $\longleftrightarrow$ ), en minder atretische en groeiende follikels ( $\rightarrow$ ).

#### 5.4 Discussie

Levenslange blootstelling aan een mengsel van PAK's in een concentratie van 90 mg/kg in het voer lijkt geen effect op het lichaamsgewicht of de wekelijkse lichaamsgewicht toename te hebben. Ook wanneer de blootstelling al in de eerste levensstadia is aangevangen middels blootstelling van het moederdier en mogelijke doorgifte aan het embryo via de uterus en aan de pasgeborene via de moedermelk. Deze resultaten komen overeen met het uitblijven van effecten op de lichaamsgewichttoename na een 21 dagen durende blootstelling in het adulte levensstadium. Blootstelling aan 90 mg/kg PAKs in het voer lijkt dus niet nadelig voor de lichaamsgroei te zijn. Ook worden de gewichten van lever, milt en thymus niet nadelig beïnvloed door een acute of chronische blootstelling aan deze hoeveelheden PAK's.

In de beide levenslang aan PAK's blootgestelde groepen bleek echter het hersengewicht significant 11% en 19% verhoogd te zijn in respectievelijk de alleen via het voer blootgestelde dieren en de via de moeder én via het voer blootgestelde dieren. Beide blootgestelde groepen gaven onderling echter geen significant verschil te zien. Ook ten aanzien van de verschillende enzymactiviteiten bleek geen significant verschil tussen de beide aan PAK's blootgestelde groepen. Wel gaven deze groepen voor de diverse activiteiten ten opzichte van de controle een verhoging te zien van gemiddeld 1.7 tot 2.3 keer. Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat blootstelling via de moeder gedurende de embryonale ontwikkeling en de lactatieperiode voor de beschouwde effectparameters niet leidt tot een afwijkende



reactie op een voortdurende blootstelling in het (sub)adulte levensstadium. De absolute activiteiten in de controlegroep zoals gemeten in de huidige studie liggen voor de diverse AROD activiteiten twee tot vier keer hoger dan in de in hoofdstuk 4 besproken 21 dagen durende blootstellingsstudie. De mate van inductie ten gevolge van blootstelling aan PAK's in de huidige chronische blootstellingsstudie is echter geringer (EROD 1.8x t.o.v. 3.1x en MROD 2.3x t.o.v. 5.8x in 21 dagen blootstellingsstudie met overeenkomende concentraties in het voer). Deze verschillen zijn mogelijk deels te wijten aan de relatief hoge AROD activiteiten zoals waargenomen in de controlegroep. Daarnaast kunnen de verschillen in leeftijden van de huisspitsmuizen in de twee studies een rol spelen. De leeftijd van de dieren bij terminatie was in de onderhavige chronische studie negen maanden. In de 21 dagen studie was de leeftijd 10 tot 14 maanden.

Uit het indicatief histologisch onderzoek is gebleken dat in de aan PAK's blootgestelde mannelijke spitsmuis necrose in het tubulusepitheel vanaf een eerder stadium optreedt dan in het controledier. Daarnaast bleek een geringer aantal ronde spermatiden aanwezig in de tubuli van de aan PAK's blootgesteld huisspitsmuis. Daar deze resultaten gebaseerd zijn op de vergelijking van twee dieren kunnen hier geen harde conclusies aan verbonden worden betreffende de effecten van PAK's op deze effectparameters, daar individuele variaties onbekend zijn.

Bij beschouwing van de effecten van PAK's op histologische afwijkingen in het ovarium blijkt een effect op de afname van de HOI in de dieren die blootgesteld zijn vanaf de conceptie. Dit effect wordt echter niet waargenomen in de dieren die vanaf de lactatie blootgesteld zijn. Deze waarnemingen suggereren een beïnvloeding van de aanleg van follikels in het neonatale stadium. Een dergelijk effect wordt echter niet bevestigd door de waargenomen effecten op de aantallen van de follikels in de verschillende stadia wanneer deze apart beschouwd worden. Kristensen et al. (1995) vond wel een verminderd aantal follicels in nakomelingen van muizen die tijdens de zwangerschap 10 mg/kg BaP toegedient hebben gekregen. Uit de resultaten van de huidige studie kunnen geen conclusies verbonden worden aangaande de effecten van PAK's op huisspitsmuizen, daar de controlegroep slechts uit één exemplaar bestond.

## 5.5 Conclusies

Een levenslange blootstelling aan 90 mg/kg PAK in het voer resulteert niet in effecten op het lichaamsgewicht of lichaamsgewicht-toename of in atrofie van interne organen zoals thymus, milt, lever of gonaden. De microsomale EROD, MROD en PROD activiteiten werden respectievelijk 1.8, 2.3 en 1.7 keer verhoogd t.g.v. blootstelling aan PAK's. Blootstelling vanaf het embryonale of juveniele stadium geeft hierbij geen significant verschil in het uiteindelijk effect te zien. Histologische analyse van de geslachtsorganen suggereert effecten van PAK's op het voorkomen van necrose en het aantal ronde spermatiden in de testes. Door onvoldoende aantallen te analyseren dieren kunnen hier echter geen conclusies aan verbonden worden.

