

4 Effecten van een 21 dagen durende blootstelling aan een mengsel van negen PAK's op gewichtsveranderingen en cytochroom P450 enzymen in de huisspitsmuis (*Crocidura russula*)

A.T.C. Bosveld, P.A.F. de Bie & J. Weggemans

4.1 Inleiding

In de voorgaande hoofdstukken is aangetoond dat BaP in staat is om een reductie in de lichaamsgewichttoename te veroorzaken en verschillende cytochroom P450 enzymen zoals EROD, MROD en PROD, en de omzetting van testosteron tot androsteendion te induceren. In de natuur staan kleine zoogdieren zoals spitsmuizen echter bloot aan een groot aantal verschillende PAK's. Grote verschillen in potenties om effecten te veroorzaken of wisselwerkingen tussen de verschillende stoffen kunnen daarbij het totale effect beïnvloeden. Om het effect van een complex mengsel van PAK's te kunnen beoordelen is een studie uitgevoerd waarbij adulte spitsmuizen blootgesteld zijn aan een mengsel van negen veel in het milieu voorkomende PAK's.

4.2 Materiaal en methoden

4.2.1 Dieren en blootstelling

Tien adulte mannetjes huisspitsmuizen (*Crocidura russula*) voortgekomen uit in gevangenschap bevruchte vrouwtjes, zijn opgevoed en in juni 1996, op een leeftijd variërend van 10 tot 14 maanden, verdeeld over drie verschillende behandelingsgroepen. De drie groepen bestonden uit een controlegroep (n=3), een laag belaste groep die voer toegediend kreeg met 9 mg PAK/kg en een hoog belaste groep die voer toegediend kreeg met 90 mg PAK/kg. Alle dieren zijn individueel gehuisvest en kregen dagelijks een afgewogen hoeveelheid (ca. 15 g) voer toegediend. Iedere dag is eveneens het resterende voer gewogen voor de bepaling van de dagelijkse voedselconsumptie. De blootstellingsduur bedroeg 21 dagen. Voor bijmenging van PAK's in het voer zijn twee verschillende PAK oplossingen in arachidesolie gemaakt met concentraties van 0.9 en 9 mg PAK/ml. Het PAKmengsel bestond uit gelijke gewichtshoeveelheden anthraceen, benzo[a]anthraceen, benzo[a]pyreen, chryseen, fluoranthreen, fluoreen, phenanthreen, peryleen en pyreen (elk respectievelijk 0.1 en 1 mg/ml in de verschillende oplossingen). Voor de verschillende dieten werd 10 ml PAK oplossing vermengd met 1 kg Felix hart/lever kattenvoer. De controle groep kreeg voer bijgemengd met arachides olie (10 ml/kg). De uiteindelijke concentraties in het voer voor de drie groepen bedroegen 0, 9 en 90

mg PAK/kg. De concentraties van de individuele componenten bedroegen 0, 1 en 10 mg/kg voer.

4.2.2 Sectie

In juli 1996 zijn de dieren na 21 dagen blootstelling verdoofd met ether en gedood middels cervicale dislocatie. Na de bepaling van het lichaamsgewicht is de lever uitgerepareerd, gewogen en direct ingevroren in vloeibaar stikstof en bewaard bij -80 °C voor latere enzymactiviteitsmetingen. De milt en thymus zijn eveneens verwijderd en gewogen.

4.2.3 Enzymactiviteitsmetingen

De activiteit van verschillende microsomale cytochroom P450 enzymen in de lever is bepaald. De microsomale fracties zijn middels gedifferentieerde centrifuge 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. Naast de AROD activiteiten is eveneens het microsomale testosteronmetabolisme bestudeerd. Hiertoe zijn microsomen geïncubeerd met testosteron en zijn de omzettingsproducten bepaald met behulp van HPLC. Alle gebruikte methoden zijn gedetailleerd beschreven in §2.2.5, §2.2.6 en §3.2.3.

4.2.4 Statistiek

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

4.3 Resultaten

4.3.1 Lichaamsgewicht verandering

Het gemiddelde lichaamsgewicht bij einde van de 21 dagen durende blootstelling is respectievelijk 10.5, 9.9 en 9.9 g in de controle-, laag- en hoog blootgestelde groep. Wanneer de lichaamsgewichten bij aanvang en bij beëindiging van de behandeling beschouwd worden, blijken geen significante verschillen ten gevolge van de blootstelling aan PAK's op te treden. Ook de gemiddelde lichaamsgewichtstoename wordt niet significant beïnvloed door PAK's (zie fig. 4.1).

4.3.2 Voedselconsumptie

Gedurende de behandeling bedroeg de dagelijkse voedselconsumptie gemiddelde over alle dieren 10.3 g. De gemiddelde voedselconsumptie in de hoogst blootgestelde groep bedroeg 9.1 g/dag en was significant lager dan in de controlegroep (zie Fig. 4.2).

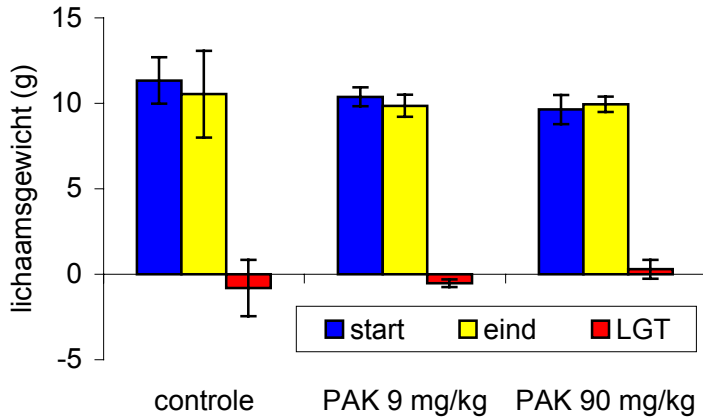


Fig. 4.1. Gemiddeld lichaamsgewicht bij aanvang en bij beëindiging van de behandeling en de gemiddelde lichaamsgewicht-toename (LGT) over de behandelingsperiode in relatie tot de blootstelling.

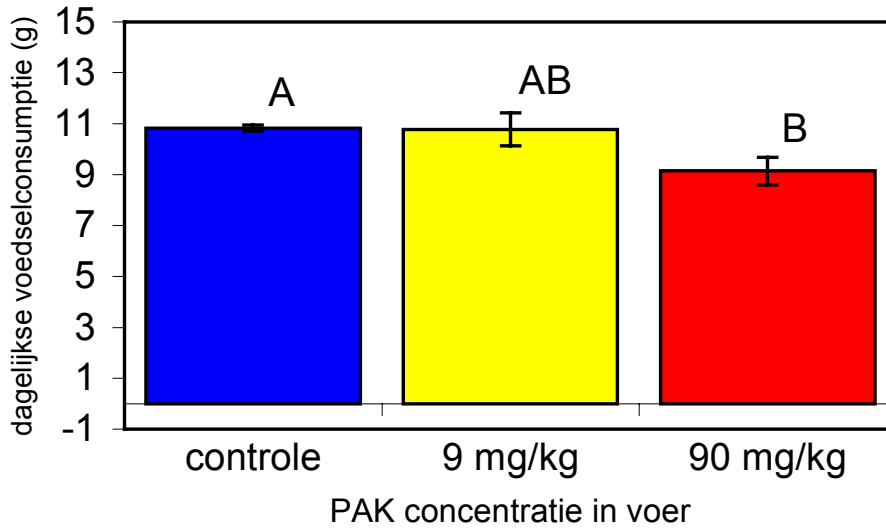


Fig. 4.2. Effecten van PAK's op de gemiddelde dagelijkse voedselconsumptie gedurende de 21 daagse behandelingsperiode (Groepen met verschillende letters zijn significant ($p < 0.05$) verschillend van elkaar).

4.3.3 Orgaangewichten

In tabel 4.1 zijn de orgaangewichten bij beëindiging van de blootstelling weergegeven. Wanneer deze beschouwd worden, blijkt geen significant verschil tussen de groepen aangaande het lever- milt- en thymusgewicht.

Tabel 4.1. Orgaangewichten bij sectie. Gemiddelden en standaarddeviaties ($n=3$) in mg.

	controle	9 mg PAK/kg	90 mg PAK/kg
Lever	768 ± 284	541 ± 64	548 ± 24
Milt	304 ± 123	212 ± 63	154 ± 11
Thymus	71 ± 16	43 ± 28	50 ± 14

N.B. met ANOVA geen significante verschillen tussen de dosisgroepen aangetoond.

4.3.4 AROD.

Bij beschouwing van de microsomale AROD activiteiten blijkt alleen in de hoogst gedoseerde groep (90 mg PAK/kg voer) een inductie op te treden die significant is voor EROD, MROD en PROD (zie fig. 4.3). De EROD activiteit in de controle groep en de laagst blootgestelde groep (9 mg PAK/kg voer) is vergelijkbaar en bedraagt respectievelijk 117 ± 65 en 122 ± 53 pmol/min.mg. In de hoogst gedoseerde groep is de gemiddelde activiteit ongeveer 3x hoger dan in de controlegroep. De MROD activiteiten zijn lager dan de EROD activiteiten, maar er treedt een grotere differentiatie op tussen de verschillende blootstellingsgroepen. De controle activiteit bedraagt 31 ± 18 pmol/min.mg. In de laag en hoog blootgestelde groepen is de gemiddelde activiteit respectievelijk ca. 2x en 6x hoger. Alleen de verhoging in de hoogst blootgestelde groep is significant verschillend van de controlegroep. Een vergelijkbare trend is waar te nemen in de PROD activiteit welke ca 2x en 3x verhoogd is in de opeenvolgende doseringsgroepen en ook alleen in de hoogst blootgestelde groep significant verschillend is van de controlegroep. De BROD activiteit in de hoogst gedoseerde groep is gemiddeld ca. 2x verhoogd. Door de spreiding in de activiteiten gemeten in de controledieren zijn deze verschillen echter niet significant.

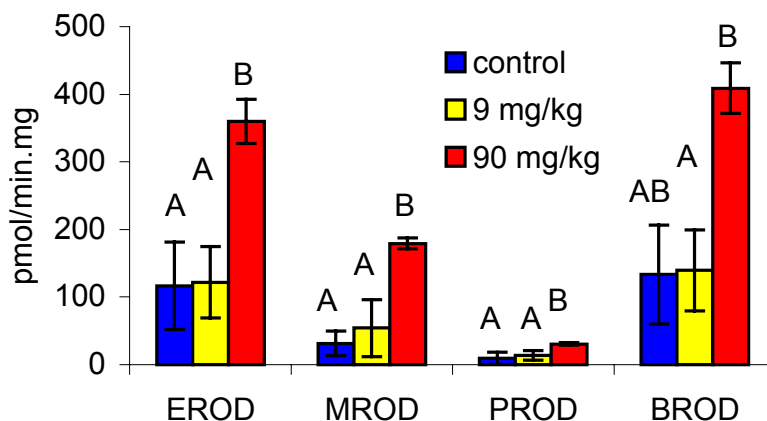


Fig. 4.3. Effecten van PAK's op de microsomale ethoxy-, methoxy-, pentoxy- en benzyloxyresorufine O-dealkylase activiteiten.

4.3.5 Testosteron hydroxylase

In figuur 4.4 zijn de activiteiten van de specifieke testosteron hydroxylases weergegeven. In de microsomale fracties kon testosteron gehydroxyleerd worden op de 2 α -, 2 β -, 7 α -, 11 α -, 12 β -, 15 α -, 15 β -, 16 α -, 16 β -posities of kon de 17 α -OH groep geoxideerd worden waarbij androsteendion gevormd wordt. Voor geen van de gedetecteerde metabolieten zijn significante verschillen aangetoond tussen de groepen. In bijna alle gevallen was echter de gemiddelde activiteit van de laagst gedoseerde groep lager (niet significant) dan de activiteit in de controle en in de hoogst gedoseerde groep. Ook de relatieve bijdragen van de verschillende specifieke TH's aan de totale respons zijn niet significant afwijkend in de aan PAK's blootgestelde dieren. Wel is er een trend waar te nemen die suggereert dat er een dosis-afhankelijke afname is van de mate waarin 6 β -TH bijdraagt aan de totale TH respons. Deze afname wordt gecompenseerd door een toename van de respons van 2 β -, 11 α -, 15 α - en 15 β -HT.

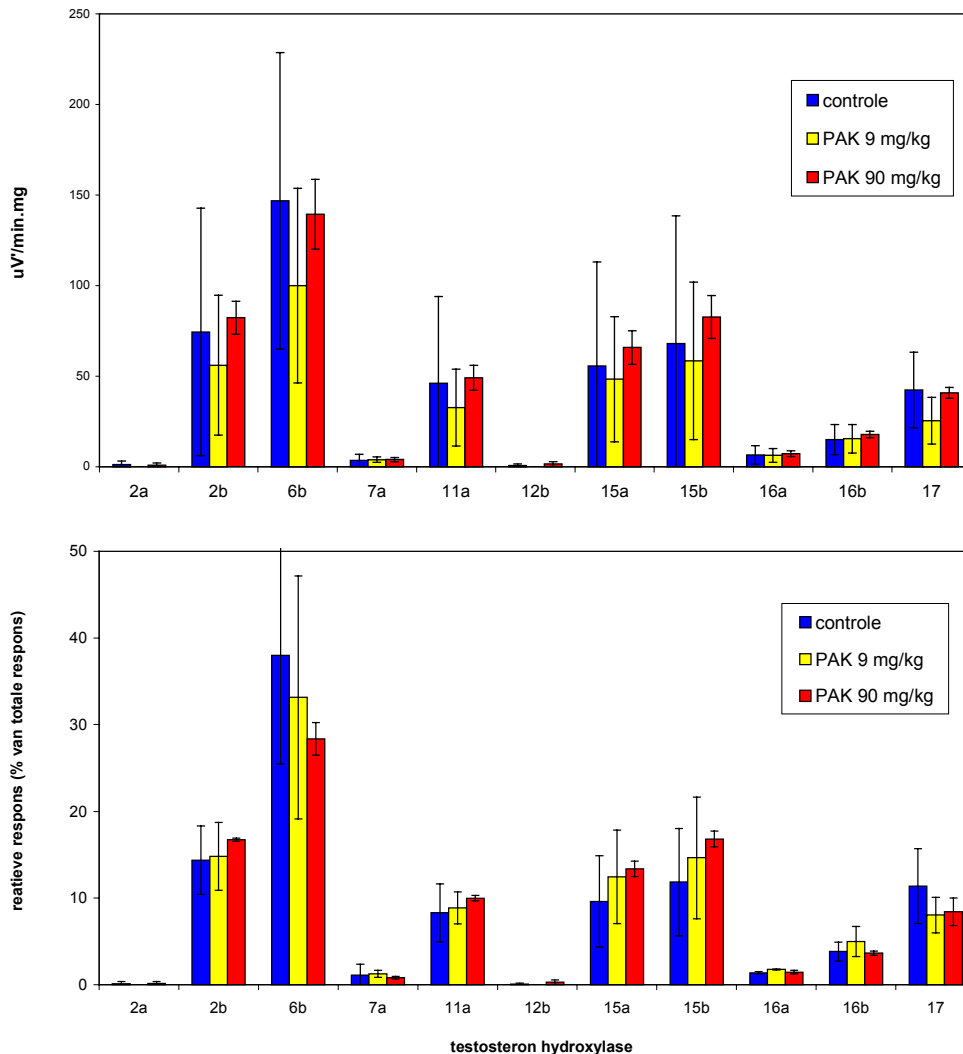


Fig. 4.4. Effecten van PAK's op de absolute (boven) en relatieve (onder) microsomale testosteronhydroxylerings activiteit.

4.3.6 Relatie tussen AROD en Testosteronhydroxylering

Bij beschouwing van de relaties tussen de diverse alkoxyresorufine O-dealkylasen en de specifieke testosteronhydroxylase-activiteiten (zie tabel 4.2), en toepassing van de Bonferroni correctie (Rice, 1989) voor $n = 11$ op de grenswaarden voor significantie ($p' = 0.05 / 11 = 0.0045$), blijkt dat 2β -, 11α - en 15β -TH significant gerelateerd zijn aan BROD. Verder is geen enkele relatie tussen EROD, MROD of PROD met een van de verschillende TH activiteiten significant.

Tabel 4.2. Regressieparameters voor relaties tussen de verschillende AROD activiteiten en specifieke TOH activiteiten.

	ER OD		MR OD		PR OD		BR OD	
	r^2	p	r^2	p	r^2	p	r^2	p
2α	0.11	0.4	0.01	0.8	0.12	0.4	0.36	0.09
2β	0.25	0.18	0.15	0.3	0.38	0.08	0.72	0.004
6β	0.18	0.3	0.11	0.4	0.29	0.14	0.61	0.01
7α	0.13	0.3	0.06	0.5	0.27	0.16	0.44	0.05
11α	0.22	0.2	0.11	0.4	0.34	0.10	0.72	0.004
12β	0.49	0.04	0.29	0.14	0.46	0.04	0.49	0.04
15α	0.23	0.19	0.14	0.3	0.37	0.08	0.68	0.006
15β	0.26	0.16	0.17	0.3	0.41	0.06	0.71	0.004
16α	0.21	0.2	0.14	0.3	0.37	0.08	0.58	0.02
16β	0.27	0.15	0.25	0.17	0.47	0.04	0.63	0.01
$17T$	0.22	0.2	0.14	0.3	0.28	0.15	0.63	0.01

4.4 Discussie

Een dieet met 90 mg PAK/kg resulteerde niet in een significant verminderde groei van de mannelijke spitsmuizen. In een eerdere studie waarin vrouwelijke spitsmuizen blootgesteld zijn aan BaP resulteerde een blootstelling van 0.1 mg/dag (ca. 6.6 mg/kg voer) ook niet in effect op de groei. Tien keer hoger blootgestelde dieren (ca. 66 mg/kg voer) vertoonden een afname van het lichaamsgewicht over de blootstellingsperiode (zie hoofdstuk 3). Het voer in de huidige studie bevatte een mengsel van 9 verschillende PAK's, allen in gelijke concentraties aanwezig. De BaP concentratie in het voer voor de twee blootgestelde groepen bedroeg dus respectievelijk 1 en 10 mg/kg. Deze resultaten duiden erop dat de overige PAK's die in de huidige studie toegedient zijn (naast benzo[a]pyreen ook anthraceen, benzo[a]anthraceen, chryseen, fluoranthreen, fluoreen, phenanthreen, peryleen en pyreen) gemiddeld minder potent zijn ten aanzien van het veroorzaken van een groeivertraging. Wanneer alle PAK's een vergelijkbare toxiciteit zouden hebben, zou het toegediende voer in de twee doseringsgroepen respectievelijk 9 en 90 mg BaP equivalenten per kg bevatten en zouden bij de hoogst gedoseerde groep, overeenkomstig de resultaten in hoofdstuk 3, effecten verwacht worden.

Wanneer de AROD activiteiten beschouwd worden blijkt dat alleen de hoogst blootgestelde groep (90 mg PAK/kg in het voer) een significante verhoging van de

activiteit vertoond. De enzymactiviteiten in deze groep zijn vergelijkbaar met de enzymactiviteiten zoals die voor de verschillende AROD activiteiten gevonden zijn na blootstelling aan 0.1 mg BaP per dag (ca. 6.6 mg/kg voer, zie hoofdstuk 3). De activiteiten in de controlegroepen uit beide studies waren vergelijkbaar. Deze resultaten duiden erop dat 90 mg PAKmengsel een vergelijkbaar effect teweegbrengt als ca. 6.6 mg/kg BaP in het voer. De EROD inducerende potenties van een aantal PAK's zijn gemeten in een *in vitro* testsysteem (Bosveld et al., in voorbereiding). Wanneer de hierin bepaalde BaP equivalentiefactoren (BEF's) gebruikt worden voor een berekening van de hoeveelheid BaP equivalenten (BEQ's) in het PAK mengsel, blijken de gebruikte doseringen overeen te komen met resp. 4.5 en 45 mg BEQ/kg voer. Op basis van deze omrekeningen ligt de laagste dosering dicht bij de concentratie waarbij eerder een effect op EROD waargenomen is (6.6 mg/kg; zie hoofdstuk 3). De gezamenlijke resultaten suggereren dat de LEC voor EROD inductie inderdaad ca 6 mg BEQ/kg bedraagt.

De gegeven blootstelling aan PAK's resulteerde niet in een significant effect op één van de waargenomen testosteron hydroxylase activiteiten. Naar analogie van de discussie over de AROD activiteit zijn de resultaten vergeleken met de effecten van BaP op het testosteronmetabolisme, zoals in hoofdstuk 3 beschreven. Het uitblijven van effecten in de huidige studie toont aan dat ook ten aanzien van een deregulatie van het testosteronmetabolisme de overige PAK's die tot het toegediende mengsel behoorden niet extreem potenter zijn dan BaP.

Wanneer de relaties tussen de verschillende TH en AROD activiteiten beschouwd worden blijken de sterkste verbanden aanwezig met BROD. BROD wordt echter net als de verschillende TH's niet significant geïnduceerd door de toegediende PAK's. Dit in tegenstelling tot de andere AROD activiteiten die wel een dosisafhankelijke toename laten zien. Deze resultaten suggereren dat er voor alle enzymen een basale enzymactiviteit aanwezig is die varieert per individu. Hierbij vertonen sommige individuen een relatief hoge basisactiviteit voor een scala van enzymen (o.a. BROD en de diverse TH's), terwijl andere individuen juist een relatief lage activiteit vertonen. Een dergelijk onderscheid tussen metabool actieve en minder actieve individuen verklaart de onderlinge relaties tussen de diverse enzymactiviteiten. Deze relaties worden echter verstoord wanneer een van de enzymen reageert op een blootstelling aan inducerende stoffen (zoals EROD of MROD inductie na blootstelling aan PAK's), terwijl andere enzymen (zoals TH's) daar niet op reageren.

4.5 Conclusies

Een chronische blootstelling aan een dieet met 9 mg PAK/kg leidt niet tot een verminderde groei of reductie in het gewicht van lever, thymus of milt en leidt niet tot effecten op AROD of TH activiteiten in de lever. 90 mg PAK/kg in het dieet leidt tot een significant effect op de microsomale EROD, MROD en PROD activiteit. EROD geeft het grootste absolute effect op de activiteit te zien. De verschillende TH activiteiten reageren niet dosis-afhankelijk op een blootstelling aan PAK's en worden daarom niet geschikt geacht als parameter om eventuele effecten

van PAK's bij natuurlijk blootgestelde populaties op te sporen. Een blootstelling aan 90 mg PAK/kg in het voer veroorzaakt een significante afname van de voedselconsumptie. Dit leidt echter niet tot een meetbare groeivertraging.

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).