

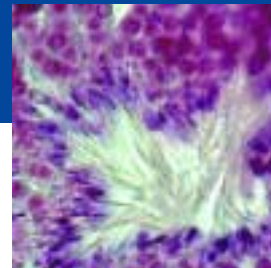


ALTErra

Validatie van biomarkers voor de bepaling van effecten van doorvergiftiging in terrestrische fauna

Effecten van TCDD en PAK in de
Huisspitsmuis (*Crocidura russula*)

A.T.C. Bosveld & P.A.F. de Bie



Alterra-rapport 154, ISSN 1566-7197

Validatie van biomarkers voor de bepaling van effecten van doorvergiftiging in terrestrische fauna

Dit onderzoek is uitgevoerd in het kader van de DWK-LNV onderzoeksprogramma's "natuurgerichte normstelling" (programma 221) en "systeemgerichte ecotoxicologie van de natuurlijke omgeving" (programma 321).

Validatie van biomarkers voor de bepaling van effecten van doorvergiftiging in terrestrische fauna

Effecten van TCDD en PAK in de Huisspitsmuis (*Crocidura russula*)

**A.T.C. Bosveld
P.A.F. de Bie**

Met bijdragen van:

E. Dekkers, J. Immerzeel, H.A.H. Jansman, J.B.F. de Jongh, A.J. Murk en J. Weggemans

Alterra-rapport 154

Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Wageningen, 2001

REFERAAT

Bosveld, A.T.C. en P.A.F. de Bie, 2001. *Validatie van biomarkers voor de bepaling van effecten van doorvergiftiging in terrestrische fauna. Effecten van TCDD en PAK in de Huisspitsmuis (Crocidura russula)* Wageningen, Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte. Alterra-rapport 154. 74 blz., 27 fig.; 11 tab.; 53 ref.

Om eventuele effecten van PAK's bij kleine zoogdieren uit de wilde fauna te kunnen herkennen is in een viertal blootstellingstudies onderzocht wat de effecten zijn van benzo[a]pyreen (BaP) of een mengsel van negen verschillende polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK). Daarnaast is het effect onderzocht van tetrachloordibenzo-*p*-dioxine (TCDD), als modelstof voor de veroorzakers van Ah receptor gemedieerde effecten. Het onderzoek is verricht aan de huisspitsmuis (*Crocidura russula*), een algemeen in het wild voorkomend klein zoogdier. In de verschillende studies zijn het verloop van het lichaamsgewicht en verschillen in orgaangewichten beschouwd naast de effecten op cytochroom P450 enzymen (EROD, MROD, PROD, BROD en specifieke testosteronhydroxylases) en de histopathologie van de geslachtsorganen.

Trefwoorden: benzo[a]pyreen, BROD, EROD, gonaden, groei, histologie, huisspitsmuis, MROD, polycyclische aromatische koolwaterstoffen, PROD, testosteronhydroxylase, tetrachloordibenzo-*p*-dioxine

ISSN 1566-7197

Dit rapport kunt u bestellen door NLG 40,00 (€ 18,-) over te maken op banknummer 36 70 54 612 ten name van Alterra, Wageningen, onder vermelding van Alterra-rapport 154. Dit bedrag is inclusief BTW en verzendkosten.

© 2001 Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte,
Postbus 47, NL-6700 AA Wageningen.
Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: postkamer@alterra.wag-ur.nl

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Alterra.

Alterra aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Alterra is de fusie tussen het Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek (IBN) en het Staring Centrum, Instituut voor Onderzoek van het Landelijk Gebied (SC). De fusie is ingegaan op 1 januari 2000.

Inhoud

Woord vooraf	9
Samenvatting	11
1 Algemene inleiding	13
1.1 Bodemverontreiniging en doorvergiftiging	13
1.2 Dioxinen en PCB's	14
1.3 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen	16
1.4 Biomarkers	18
1.5 De huisspitsmuis	20
1.6 Vraagstelling en plan van aanpak	21
2 Effecten van een vijf dagen durende blootstelling aan 2,3,7,8-TCDD of Benzo[a]pyreen op gewichtsveranderingen en cytochroom P450 enzymen in de huisspitsmuis (<i>Crocidura russula</i>)	23
2.1 Inleiding	23
2.2 Materiaal en methode	23
2.2.1 Dieren	23
2.2.2 Blootstelling	24
2.2.3 Sectie	25
2.2.4 Microsomale fracties	25
2.2.5 EROD	25
2.2.6 Testosteron hydroxylase	25
2.2.7 Eiwit bepaling	26
2.2.8 Statistiek	27
2.3 Resultaten	27
2.3.1 Lichaamsgewichttoename	27
2.3.2 Orgaangewichten	28
2.3.3 EROD	29
2.3.4 Testosteron hydroxylase	30
2.3.5 Correlaties met EROD	30
2.4 Discussie.	31
2.5 Conclusies	33
3 Dosisafhankelijke effecten van een negen dagen durende blootstelling aan Benzo[a]pyreen op gewichtsveranderingen en cytochroom P450 enzymen in de huisspitsmuis (<i>Crocidura russula</i>)	35
3.1 Inleiding	35
3.2 Materiaal en Methode	35
3.2.1 Dieren & Blootstelling	35
3.2.2 Sectie	36
3.2.3 Enzymactiviteit	36
3.2.4 Statistiek	37
3.3 Resultaten	37
3.3.1 Lichaamsgewicht	37

3.3.2	Orgaangewichten	37
3.3.3	AROD	38
3.3.4	Testosteronhydroxylase	39
3.4	Discussie	41
3.5	Conclusies	44
4	Effecten van een 21 dagen durende blootstelling aan een mengsel van negen PAK's op gewichtsveranderingen en cytochroom P450 enzymen in de huisspitsmuis (<i>Crocidura russula</i>)	45
4.1	Inleiding	45
4.2	Materiaal en methoden	45
4.2.1	Dieren en blootstelling	45
4.2.2	Sectie	46
4.2.3	Enzymactiviteitsmetingen	46
4.2.4	Statistiek	46
4.3	Resultaten	46
4.3.1	Lichaamsgewicht verandering	46
4.3.2	Voedselconsumptie	47
4.3.3	Orgaangewichten	48
4.3.4	AROD.	48
4.3.5	Testosteron hydroxylase	49
4.3.6	Relatie tussen AROD en Testosteronhydroxylering	50
4.4	Discussie	50
4.5	Conclusies	51
5	Effecten van chronische blootstelling (negen maanden) aan een mengsel van PAK's met of zonder voorafgaande in utero blootstelling	53
5.1	Inleiding	53
5.2	Materiaal en Methode	53
5.2.1	Dieren & blootstelling	53
5.2.2	Sectie	54
5.2.3	Enzymactiviteitsmetingen	54
5.2.4	Histopathologie	54
5.2.5	Statistiek	55
5.3	Resultaten	55
5.3.1	Lichaamsgewicht	55
5.3.2	Orgaangewichten	56
5.3.3	AROD	56
5.3.4	Histologie	57
5.3.4.1	De testes.	57
5.3.4.2	Het ovarium.	59
5.4	Discussie	60
5.5	Conclusies	61
6	Algemene discussie en conclusies	63
6.1	Inleiding	63
6.2	Bepaling van gevoeligheid van de huisspitsmuis voor TCDD	63
6.3	Lichaamsgewicht	63
6.4	AROD	64

6.5 Testosteron hydroxylase	66
6.6 Voortplantingsorganen	67
6.7 LOEC's en extrapolatie's naar natuurlijke populaties	68
6.8 Conclusies	68
Literatuur	69
Afkortingen	75

Woord vooraf

In zoogdieren is reeds veel onderzoek uitgevoerd naar biomarker responsen ten gevolge van blootstelling aan organische microverontreinigingen en de mate waarin deze biomarkers als "early warning" gelden voor schadelijke effecten op bijvoorbeeld groei, voortplanting of overleving. Een van de meest toegepaste biomarkers voor blootstelling aan organische microverontreinigingen zoals dioxinen en PCB's, is de inductie van cytochroom P450 enzymen. Van deze enzymen geldt ethoxyresorufine O-dealkylase (EROD) als maat voor de aanschakeling van een keten van reacties, welke begint met de binding van een lichaamsvreemde stof aan de Ah-receptor en uiteindelijk kan leiden tot effecten zoals groeivertraging, reproductiestoringen of zelfs sterfte. Naast EROD zijn er nog verschillende andere cytochroom P450 enzymen die door milieuvreemde stoffen geïnduceerd worden. Behalve methoxy-, pentoxy- en benzyloxyresorufine O-dealkylase (respectievelijk MROD, PROD en BROD) behoren ook verschillende testosteron hydroxylases (TH) hiertoe. Deze laatste groep van enzymen speelt een rol bij de afbraak van het mannelijk geslachtshormoon testosteron in het lichaam en draagt daarmee bij aan de handhaving van de vereiste hormoonspiegels in het lichaam om een succesvolle voortplanting te waarborgen. Het meeste onderzoek op dit gebied is uitgevoerd met dioxinen als inducerende stoffen. Gezien het feit dat in de natuur veel soorten bloot staan aan een mengsel van stoffen waarin naast dioxinen en de daaraan verwante PCB's ook PAK's voorkomen, is het de vraag in hoeverre deze stoffen bijdragen aan het totale effect van stoffen die de cytochroom P450 enzymen beïnvloeden bij zoogdieren uit de wilde fauna. Hierbij willen we met name weten hoe kleine zoogdieren reageren die een grote verspreiding binnen Nederland hebben en vanwege hun plaats in de voedselketen blootstaan aan relatief hoge concentraties van organische microverontreinigingen. Dergelijke soorten kunnen goed als uitgangspunt dienen voor monitoringprogramma's waarin de effecten van organische microverontreinigingen voor de wilde fauna in Nederland in kaart gebracht worden. De huisspitsmuis (*Crocidura russula*) is een soort die aan de bovengenoemde criteria voldoet en gebruikt is voor het hier gepresenteerde experimenteel onderzoek om dosis-effect relaties vast te stellen. De resultaten van deze experimenten moeten duidelijkheid verschaffen over de mate waarin blootstelling aan PAK's *in vivo* verschillende cytochroom P450 enzymen induceren en hoe deze effecten zich verhouden tot het effect van TCDD als modelstof voor de dioxine-achtige verbindingen.

Het onderzoek is in de periode 1994-1998 uitgevoerd in het kader van LNV-DWK onderzoeksprogramma's "natuurgerichte normstelling" (programma 221) en "systeemgerichte ecotoxicologie van de natuurlijke omgeving" (programma 321) welke uitgevoerd zijn op het DLO Instituut voor bos-en natuuronderzoek en het daaruit voortgekomen onderzoeksinstituut voor de groene ruimte *Alterra* (Wageningen UR). Het eerste onderzoek (hoofdstuk 2) is tot stand gekomen in samenwerking met de leerstoelgroep Toxicologie, Wageningen Universiteit.

Samenvatting

Het ons omringende milieu bevat op diverse locaties een groot aantal verontreinigende stoffen die mogelijk schadelijke effecten kunnen veroorzaken bij de aanwezige fauna. Een van de groepen van stoffen die van belang zijn in dit verband bestaat uit de polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's). Deze stoffen kunnen deels hun schadelijke werking uitoefenen door binding aan de zogenaamde Ah receptor en de daaraan gekoppelde inductie van bepaalde cytochroom P450 enzymen, welke o.a. een functie hebben bij het metabolisme van geslachtshormonen. Hiermee lijken PAK's in hun werking op dioxinen, welke hun effecten ook middels deze Ah receptor veroorzaken. Onderzocht is in welke mate PAK's specifieke cytochroom P450 enzymen induceren bij inheemse diersoorten. Hiervoor is de huisspitsmuis (*Crocidura russula*) als modelsoort gekozen. Naast enzyminductie zijn ook de effecten op lichaamsgewichttoename, orgaangewichten en weefselstructuur onderzocht.

Er zijn vier studies uitgevoerd waarin huisspitsmuizen blootgesteld zijn aan benzo[a]pyreen (BaP) als modelstof voor de PAK's, aan een mengsel van negen PAK's, of aan TCDD als een positieve referentie voor Ah receptor gemedieerde effecten. In vergelijking met bijv. de gewone "laboratoriummuis" bleek de huisspitsmuis niet extreem gevoelig voor TCDD. Een blootstelling aan 14 µg/kg.dag resulteerde niet in een reductie in de lichaamsgewichttoename of effecten op de orgaangewichten. Wel veroorzaakte deze dosering een inductie van de cytochroom P450 1A1 afhankelijke ethoxyresorufine O-dealkylase (EROD) activiteit tot 8x het controle niveau.

In de meeste studies bleek de methoxyresorufine O-dealkylase (MROD) activiteit beter dan EROD differentiërend te zijn voor de mate van blootstelling. Zowel de BROD als de PROD activiteit bleek minder hoog en minder differentiërend voor de blootstelling te zijn dan de EROD of MROD activiteit. Voor MROD is een LOEC_{BaP} vastgesteld van 6.6 mg/kg BaP in het voer. Vergelijking van deze LOEC met PAK concentraties in regenwormen (belangrijk bestanddeel van voedsel voor spitsmuizen) uit verontreinigde uiterwaarden wijst uit dat de aldaar voorkomende concentraties geen effecten op AROD zullen bewerkstelligen en dus waarschijnlijk geen Ah receptor gemedieerde toxiciteit veroorzaken bij spitsmuizen.

Ook bleek dat in geen van de blootstellingsexperimenten BaP alleen of in combinatie met andere PAK's een significant effect heeft op een van de specifieke testosteronhydroxylase activiteiten. Wanneer echter de specifieke hydroxylases in relatie tot de totale activiteit beschouwd worden, blijkt in enkele gevallen een geslachtsafhankelijk effect van BaP op 6β-TH. TCDD daarentegen bleek een significant negatief effect op de totale testosteronhydroxylaseactiviteit te hebben zonder dat er sprake is van een verandering van het patroon van specifieke hydroxylases. Het ontbreken van eenduidige effecten op de testosteronhydroxylase activiteit maakt dit effect

ongeschikt als biomarker om effecten van verontreinigingen bij kleine zoogdieren in het veld vast te stellen.

In beide blootstellingsstudies met BaP werd een groeivertraging waargenomen. De LOEC voor groeivertraging is vastgesteld op 14 mg BaP/kg lichaamsgewicht (ca. 10 mg/kg in het voer). Wanneer BaP in combinatie met acht andere PAK's gegeven werd, resulteerde dit niet in een groeivertraging maar wel in een significant verminderde voedselconsumptie bij 90 mg PAK/kg voer.

In één van de studies, waarin het effect van een levenslange blootstelling aan een mengsel van PAK's onderzocht is, is indicatief histopathologisch onderzoek uitgevoerd. Hieruit bleek een mogelijk effect van PAK's op het tubulis epitheel (necrose) en op het aantal spermatiden/spermatozoën. Bij vrouwelijke dieren bleek een mogelijk effect op de follikels in het ovarium (afname van de histologische ovariumindex). Deze effecten zijn waargenomen bij een blootstelling aan 90 mg/kg PAK in het voer.

Wanneer effecten van doorvergiftiging van PAK en dioxinen in de terrestrische wilde fauna onderzocht moeten worden, zijn vooral EROD en MROD geschikte effectparameters waarmee een indruk verkregen kan worden van de mate waarin PAK of gechloreerde koolwaterstoffen doorgegeven worden naar hogere schakels in de voedselketen en daar daadwerkelijk effecten veroorzaken. Voor het vaststellen van eventuele effecten op het reproductievermogen bij deze soort kunnen de gonaden onderzocht worden op histologische afwijkingen. Eenduidige dosis-effect relaties op weefsel nivo zijn echter minder goed vast te stellen dan op biochemisch nivo.

1 Algemene inleiding

1.1 Bodemverontreiniging en doorvergiftiging

Op diverse locaties in Nederland is de bodem verontreinigd met stoffen die door toedoen van de mens daar terecht zijn gekomen. Voorbeelden van dergelijke gebieden zijn: de Biesbosch en de Gelderse Poort waar sedimentatie van verontreinigd slib door grote rivieren plaatsvindt (Bosveld et al., in voorbereiding; Hendriks et al., 1995); de Venen en de Krimpenerwaard waar in het verleden met afval landverbetering heeft plaatsgevonden (Bosveld et al., 1990, 2000; Pilotproject Krimpenerwaard 1998), de Broekpolder waar een depot voor verontreinigd havenslib is aangelegd (Chemilinc 1995; Ma et al., 2001), en de Volgermeer waar storting van fabrieksafval heeft plaatsgevonden (Heida and Olie, 1985). De aard en herkomst van deze stoffen zijn divers, maar in veel gevallen zijn polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en gechlloreerde aromatische koolwaterstoffen waaronder de polychloordibenzo-*p*-dioxinen (PCDD's), polychloordibenzofuranen (PCDF's), en polychloorbinylen (PCB's) belangrijke componenten van het totale pakket van verontreinigingen. Een groot aantal van vooral de laatst genoemde PCDD's, PCDF's en PCB's zijn moeilijk afbreekbaar. Samen met het sterk lipofiele karakter van deze stoffen zorgt dit ervoor dat deze zich op kunnen hopen in de vetreserves van dieren en zo doorgegeven kunnen worden naar de opeenvolgende schakels in de voedselketen (Canters & de Snoo, 1993; Hendriks et al., 1995; Bosveld et al., 1995). Vanuit de bodem komen de stoffen zo via detritivoren en herbivoren bij carnivore soorten terecht waar zij zodanige concentraties kunnen bereiken dat schadelijke effecten veroorzaakt kunnen worden. 2,3,7,8-Tetrachloor dibenzo-*p*-dioxine (TCDD), is een van de bekendste van de gechlloreerde aromatische koolwaterstoffen en wordt vaak gebruikt als modelstof bij onderzoek naar de werking van deze stoffen. TCDD bindt, net als veel andere PCDD's en PCDF's en de zgn. planaire PCB's¹ in lichaamcellen aan de Ah receptor. Binding aan deze receptor zet een reeks van effecten in gang die uiteindelijk kunnen leiden tot groeivertraging, reproductiestoringen en zelfs sterfte (Safe 1991). Vanwege het gemeenschappelijke werkingsmechanisme van de drie bevestigde groepen van stoffen worden ze vaak tesamen aangeduidt onder de noemer "dioxinen".

Naast PCDD's, PCDF's en PCB's zijn ook de ongechlloreerde polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) wijd verspreid in het milieu als verontreiniging aanwezig. PAK's stapelen zich in beperkte mate op in de voedselketen. Vooral in lagere detrivore dieren zoals pissebedden en regenwormen treedt accumulatie op van deze stoffen (van Brummelen, 1995). Langs deze weg worden deze stoffen wel

¹ Planaire PCB's zijn PCB's die door de wijze waarop chlooratomen over de ringstructuren verdeeld zijn een overwegend platte structuur aannemen. Hierbij liggen dus alle atomen die deel uitmaken van het molecuul in één vlak. Deze ruimtelijke structuur treedt op bij non- en mono-ortho gesubstitueerde PCB's (zie ook fig. 1.1). Wanneer meer dan één chlooratoom aanwezig is op een orthopositie draaien de twee ringstructuren ten opzichte van elkaar en liggen de samenstellende atomen niet meer in één vlak.

doorgegeven naar primaire carnivoren zoals spitsmuizen. Doorvergiftiging naar toppredatoren zoals bijvoorbeeld de torenvalk blijft veelal achterwege doordat PAK's in kleine zoogdieren bijna volledig afgebroken en uitgescheiden worden, wat blijkt uit het feit dat deze verbindingen niet detecteerbaar zijn in bijvoorbeeld spitsmuizen (Bosveld et al., in voorbereiding). PAK's grijpen deels aan op dezelfde Ah-receptor als waarop de dioxinen en aanverwante gechlloreerde verbindingen hechten (Piskorska-Pliszczynska et al., 1986). Langs deze weg kunnen PAK's dus gelijksoortige effecten veroorzaken als de dioxinen. Mede door de relatief hoge concentraties waarin PAK's op verscheidene locaties voorkomen in het milieu (Sloof et al., 1989), vormen ook deze verbindingen, naast dioxinen en de daaraan verwante furanen en PCB's, een mogelijke bedreiging voor de gezondheid van natuurlijke populaties van primaire carnivoren zoals de spitsmuis.

1.2 Dioxinen en PCB's

Dioxinen is de populaire verzamelnaam voor een grote groep van stoffen bestaande uit PCDD's en PCDF's. Daarnaast worden veelal ook de planaire PCB's tot de dioxine-achtige stoffen gerekend vanwege hun overeenkomend werkingsmechanisme. PCB's zijn in het verleden op grote schaal geproduceerd en werden onder andere toegepast als industriële vloeistof (o.a. snijolie en hydrolytische vloeistof), diëlectrische vloeistof (in transformatoren), organisch oplosmiddel, vlamvertrager, weekmaker, en coating (Safe 1991). De totale productie wordt geschat op 1.5 miljoen metrische ton (De Voogt & Brinkman 1989). Na 1970 is de toepassing van PCB's in open systemen verboden. PCDD's en PCDF's daarentegen zijn nooit opzettelijk geproduceerd maar komen vrij als ongewenste bijproducten in de chemische industrie bij de productie van bijvoorbeeld herbiciden, fungiciden en PCB's. Daarnaast komen PCDD's en PCDF's vrij bij de verbranding van organisch materiaal in aanwezigheid van chloorhoudende verbindingen, zoals bijvoorbeeld bij vuilverbranding.

PCDD's bestaan uit twee koolstofringen die middels O atomen star aan elkaar verbonden zijn. PCDF's hebben een soortgelijke structuur maar hier zijn de koolstofringen middels één rechtstreekse verbinding en één O-atoomverbinding gekoppeld. PCB's bestaan uit twee koolstofringen welke middels een enkele verbinding vrij draaibaar aan elkaar verbonden zijn (zie fig. 1.1). Afhankelijk van de wijze van chloorsubstitue op het molecuul kunnen 75 verschillende PCDD's, 135 verschillende PCDF's en 209 verschillende PCB's ontstaan. PCB's zijn wat betreft structuur en daaraan verbonden werkingsmechanisme globaal in drie groepen te verdelen. De zogenaamde planaire PCB's, de niet planaire PCB's en een overgangsgroep (Boon et al., 1987; Bosveld 1995). Bij de planaire PCB's liggen de twee koolstofringen in hetzelfde platte vlak doordat chlooratomen op de *ortho*positie ontbreken. Wanneer twee of meer chlooratomen op de *ortho*posities voorkomen is een dergelijke platte structuur door ladingafstoting niet meer goed mogelijk. Deze multi-*ortho* PCB's vormen de niet planaire PCB's. De mono-*ortho* PCB's vormen een overgangsgroep. Door de aanwezigheid van één chlooratoom op een van de *ortho*posities is een platte structuur nog wel enigszins mogelijk. Een platte structuur is

van wezenlijk belang voor de mogelijkheid tot binding aan de Ah-receptor (Safe 1990). Middels deze receptor veroorzaken dioxinen en de daaraan verwante stoffen het merendeel van hun schadelijke effecten.

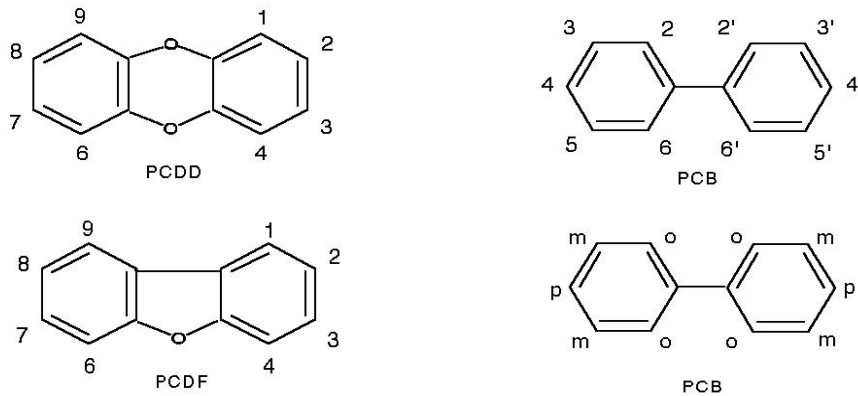


Fig. 1.1. Moleculaire structuur van PCDD's, PCDF's en PCB's en de nummering van de posities waarop chloorsubstituering mogelijk is. De posities in PCB's kunnen ook weergegeven worden als ortho (o), meta (m) en para (p).

Van PCDD's, PCDF's en PCB's zijn in zoogdieren effecten op de reproductie aangetoond. Deze effecten omvatten o.a. het verlies van mannelijke gedragskenmerken (demasculinisatie) en het vertonen van vrouwelijke gedragskenmerken (feminisatie), aantasting van hoeveelheid en kwaliteit van sperma, verlate indaling van de testes, afname van de grootte van de mannelijke geslachtsorganen, en inductie van cytochroom P450 enzymen waaronder enkele specifieke isoenzymen die betrokken zijn bij het metabolisme van geslachtshormonen (Janssen et al., 1999; Drenth et al., 1996; Gray jr. et al., 1995; Bjerke & Peterson 1994; Mably et al., 1992a,b,c). Veel effecten die geïnduceerd worden door PCB's of dioxinen, worden veroorzaakt door tussenkomst van een receptor, de zogenaamde arylhydrocarbon receptor (AhR, zie fig. 1.2). Stoffen met een structurele verwantschap aan TCDD kunnen met hoge affiniteit binden aan deze receptor (Parkinson and Safe, 1981; Safe, 1990). Het aldus gevormde complex kan in de celkern afgebakende stukken DNA aanzetten tot een verhoogde transcriptie van boodschapper RNA (mRNA) dat op zijn beurt weer codeert voor de aanmaak van specifieke eiwitten. Een van deze eiwitten is het enzym cytochroom P450 (CYP) 1A1 (Safe, 1986). Dit enzym is betrokken bij de afbraak van lichaamsvreemde verbindingen zoals PCB's en PAK's, maar speelt eveneens een rol bij het metabolisme van endogene verbindingen zoals steroidhormonen (Janssen et al., 1998). Effecten op het metabolisme van steroidhormonen komen ook tot uitdrukking in een gewijzigde testosteronhydroxylase activiteit die gemeten wordt na blootstelling (Waxman et al., 1983; Wood et al., 1983).

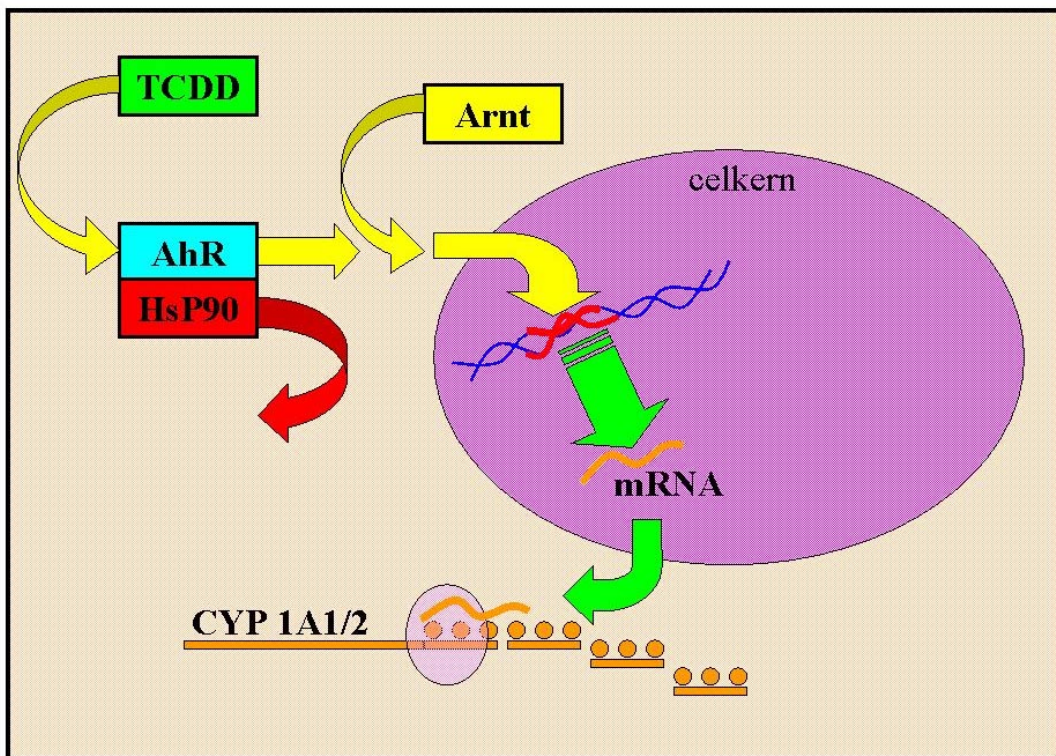


Fig. 1.2. Ah receptor mechanism. Na binding van TCDD of een structuurverwant molecuul aan de arylhydrocarbon receptor (AhR) wordt het complex, na afstoting van een heatschock proteïne (HsP90) en gefaciliteerd door een Ah receptor nucleus transport proteïne (Arnt) naar de kern getransporteerd waar het een interactie met het DNA aangaat. Deze interactie resulteert in een verhoogde transcriptie van mRNA dat codeert voor verschillende eiwitten waaronder Cytochroom P450 1A1 en 1A2 (CYP1A1/2).

1.3 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) zijn algemeen voorkomende milieuverontreinigingen die bestaan uit twee of meer gefuseerde ringstructuren (zie fig. 1.3). Vorming van deze stoffen vindt met name plaats bij verbranding van organische verbindingen. Als zodanig zijn bosbranden en vulkaanuitbarstingen belangrijke natuurlijke bronnen. Daarnaast speelt biosynthese ook een rol. Deze bronnen zijn echter niet van belang voor de Nederlandse situatie. Kunstmatige en in Nederland van belang zijnde bronnen voor emissies naar de lucht zijn verkeer (246 ton/jaar), industrie (86 ton/jaar; o.a. aluminium- en staal industrie, cokes productie, kabel branden), houtverduurzaming (629 ton/jaar), en verbranding en verwarming (135 ton/jaar). Rechtstreekse emissies naar de bodem hebben een totale geschatte omvang van 64 ton/jaar (Sloof et al., 1989). Bij de berekening van deze hoeveelheden is uitgegaan van de concentraties van 10 PAK's zoals door VROM voorgesteld voor gebruik in monitoringprogramma's en risicoanalyses. Deze PAK's zijn naftaleen, anthraceen, fenantreen, fluorantheen, chryseen, benzo[a]anthraceen, benzo[k]fluorantheen, benzo[a]pyreen, benzo[g,h,i]peryleen, en indeno[1,2,3-cd]pyreen (zie fig. 1.3)

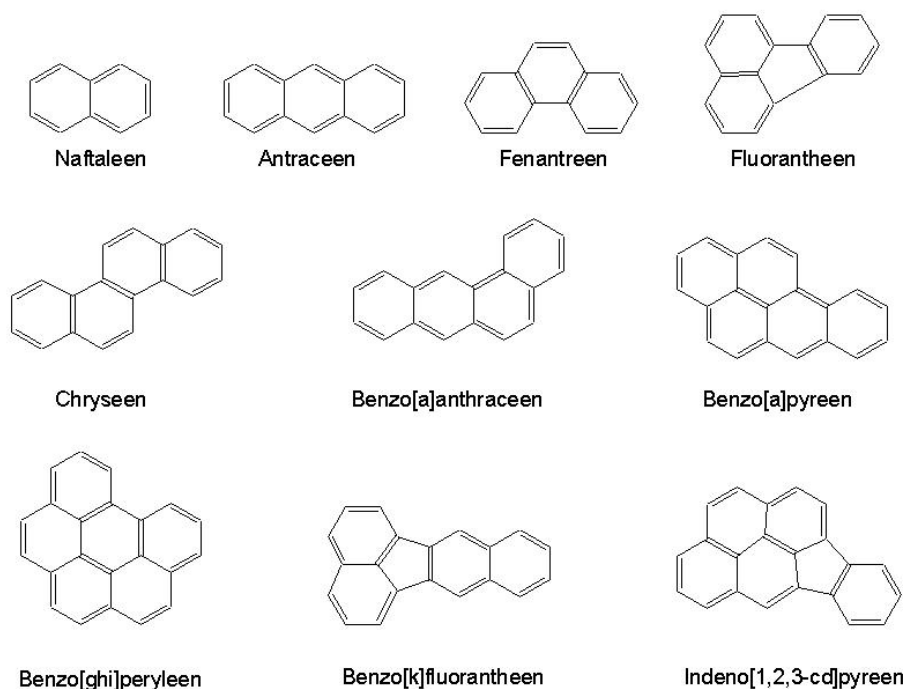


fig. 1.3. Structuren van de 10 door VROM voor risicoschattingdoeleinden geselecteerde PAK's.

In grond van vervuilde locaties zoals bijvoorbeeld de Biesbosch en in de uiterwaarden zijn concentraties tot ca. 100 mg/kg ds gemeten (dataset Alterra ongepubliceerd). Via het bladafval en de bodem komen PAK's terecht in bodemevertebraten zoals pissebedden en wormen. De capaciteit van deze dieren om PAK's te metaboliseren is beperkt, waardoor de verbindingen kunnen ophopen in het lichaam (Lu et al., 1977). Op locaties waar $\Sigma 10$ PAK concentraties in de bodem ca 1 mg/kg bedragen zijn in de isopoda soorten *Porcellio scaber*, *Oniscus asellus* en *Philoscia muscorum* concentraties van 15 tot 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ versgewicht gemeten (Van Brummelen et al., 1996). In de regenworm *Lumbricus rubellus* zijn $\Sigma 10$ PAK concentraties van 27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gemeten (Van Brummelen, 1995). Op locaties nabij de hoogovens (IJmuiden) waar de bodemconcentraties 2 tot 4 mg/kg ds bedragen, zijn in Isopoda $\Sigma 10$ PAK concentraties van 40 tot 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en in regenwormen (*Lumbricus rubellus*) tot 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ versgewicht gemeten (Van Brummelen, 1995). PAK concentraties in bodemfauna uit uiterwaarden variëren, afhankelijk van de soort van 2 tot 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ versgewicht (Faber & Heijmans, ongepubliceerde data). Via bodemevertebraten zoals regenwormen kunnen PAK's doorgegeven worden aan een volgende schakel in de voedselketen en zo in bijvoorbeeld carnivore spitsmuizen eventueel effecten veroorzaken.

Onderzoek naar effecten van PAKs in zoogdieren heeft zich met name gericht op mutageniteit en carcinogeniteit. Uit ecotoxicologisch oogpunt zijn naast deze ook andere effecten van belang. Zo kan de verstoring van de normale groei en reproductie van invloed zijn op de ontwikkeling en omvang van de natuurlijke populatie van een soort. Bij ratten die *in utero* blootgesteld zijn aan verschillende

PAK's is bijvoorbeeld een verminderde gevoeligheid van moederdieren voor oestrogenen en een verminderde vruchtbaarheid van de nakomelingen waargenomen (Kristensen et al., 1995, Sloof et al., 1989). Een dosis van 10 mg BaP/kg, resulteerde bij zwangere muizen in een verminderd aantal follikels in het ovarium van vrouwelijke nakomelingen (Kristensen et al., 1995). Csaba et al. (1993) hebben bovendien gevonden dat wanneer zwangere vrouwtjes ratten benzo[a]pyreen (BaP) toegediend kregen, de seksuele activiteit van de nakomelingen afnam. Deze effecten duiden op een mogelijke verstoring van hormoonbalansen in het lichaam t.g.v. blootstelling aan PAK's. In dit verband hebben Csaba & Inczefi-Gonda (1993) gevonden dat bij ratten die vlak na de geboorte, in de periode waarin steroidreceptoren tot ontwikkeling komen, blootgesteld zijn aan BaP de ontwikkeling van deze receptoren aangetast werd. In een ander onderzoek veronderstelde Schneider et al. (1976) dat benzo(a)anthraceen (BaA) na metabolisatie tot 3,9-dihydroxy-BaA een overeenkomende structuur vertoont met het vrouwelijke hormoon oestradiol. Aangetoond werd dat de aanwezigheid van deze metaboliet de binding van oestrogeen aan specifieke bindingsplaatsen in de uterus remt.

Een andere route waarlangs een verstoring van de hormoonregulatie op kan treden is door Lu (1979) gesuggereerd en betreft de omzetting van geslachtshormonen door enzymen die eveneens PAK's omzetten. Wanneer ten gevolge van een verhoogde blootstelling aan PAK's dergelijke enzymen geïnduceerd worden, leidt dit mogelijk tot een verhoogd geslachtshormoonmetabolisme.

1.4 Biomarkers

Voor de beoordeling van de mate waarin organische microverontreinigingen (OM) in het milieu bij zoogdieren leiden tot effecten, is een aantal biomarkers ontwikkeld. Biomarkers zijn karakteristieke veranderingen die in het lichaam van een dier optreden en vast zijn te stellen aan de hand van liefst eenvoudig en snel onderzoek. Biomarkers duiden erop dat er een blootstelling aan een bepaalde stofgroep heeft plaats gevonden en dat dit heeft geleid tot effecten in het organisme. In het kader van het in dit rapport gepresenteerde onderzoek zijn de cytochroom P450 biomarkers van belang, waarvan de alkoxy resorufine de-alkylase activiteiten EROD, MROD, PROD en BROD en verschillende locatiespecifieke testosteron hydroxylases beschouwd zijn.

Ethoxyresorufine O-dealkylase (EROD) activiteit is een veel gebruikte biomarker voor blootstelling aan dioxine-achtige stoffen die aangrijpen op de Ah-receptor en daarmee een reeks van effecten in gang zetten die uiteindelijk kunnen leiden tot schadelijke effecten zoals verstoring van de hormoonregulatie, groeivertraging, reproductiestoringen, afweerziekten, en zelfs sterfte (samengevat in Bosveld & Van Kleunen, 1998). Uit experimenteel onderzoek aan in kweek gebrachte zoogdiercellen is gebleken dat een aantal PAK's net als dioxinen een inductie van de EROD activiteit kunnen veroorzaken (Till et al., 1999, Willett et al.; 1997, Bosveld et al., in voorbereiding). Naast CYP1A1, dat verantwoordelijk is voor de waargenomen EROD activiteit, worden na blootstelling aan dioxine-achtige verbindingen ook

andere cytochroom P450 enzymen zoals CYP1A2 geïnduceerd. De CYP1A2 activiteit wordt veelal gemeten aan de hand van de methoxyresorufine O-dealkylase (MROD) activiteit.

Naast de door dioxines geïnduceerde EROD en MROD activiteit is ook de pentoxyresorufine O-dealkylase (PROD) en benzyloxyresorufine O-dealkylase (BROD) activiteit gemeten. Deze twee de-alkylases worden specifiek door phenobarbital en verschillende niet planaire PCB's geïnduceerd.

Naast de verschillende alkoxyresorufine O-dealkylases (AROD) worden ook specifieke testosteron(de)hydroxylases (TH) geactiveerd (of geremd) door blootstelling aan milieuverontreinigende stoffen. Zo induceert TCDD de 6 β -TH in ratten (Schenkman, 1992) en de 6 β - en 15 α -TH activiteit in reigers (Sanderson et al., 1996).

Mengsels van organische microverontreinigingen zoals die in het milieu voorkomen bevatten naast dioxinen en structuurverwante stoffen zoals de furanen en de planaire PCB's ook vaak PCB's die afwijkend van structuur zijn en niet middels de Ah-receptor een effect veroorzaken. Veel van dergelijke PCB's induceren CYP2B1/2 hetgeen gemeten kan worden aan de hand van de pentoxyresorufine- of benzyloxyresorufine O-dealkylase (respectievelijk PROD en BROD) activiteit. Deze verbindingen hebben eveneens een effect op het geslachtshormoonmetabolisme (zie tabel 1.1).

Tabel 1.1. Cytochroom P450 biomarkers en de daarmee geassocieerde cytochroom P450 enzymen en hun specifieke inductoren.

Biomarker	CYP	Specifieke inductor	ref
EROD	1A1	3MC, A1254	1
ECOD	1A1	3MC, A1254	2
MROD	1A2	3MC	1
A4OH	1A2, 2E1	3MC	2
PROD	2B1/2	Fb	1
BROD	2B1/2	Fb	1
AHH	1A1	3MC	1
2 α -TH	2C11		1, 2
2 β -TH	3A2	3MC, Fb	1
6 β -TH	1A1/2, 2A2, 2C13, 2D1/2, 3A1/2	3MC, A1254, Fb, Dex, P16 α C,	1, 2
7 α -TH	2A1/2	3MC, A1254	1, 2
15 α -TH	2A2, 2C12/13	Fb, A1254	1
15 β -TH	2A2	A1254	1
16 α -TH	2B1/2, 2C6/11/13	Fb	1, 2
16 β -TH	2B1/2	Fb	1
17-T	2Bb1/2, 2Cc11	Fb	1

referenties: 1 = Schenkman 1992; 2= Wortelboer 1991.

afkortingen: TH = testosteronhydroxylase; 17-T = testosteron 17-dehydroxylase; 3MC = 3-methylcholanthrene; A1254 = Arochlor 1254; Fb = fenobarbital; Dex = dexamethasone; P16 α C = pregnenolone 16 α -carbonitriol.

Naast de biochemische markers zoals hierboven beschreven kunnen ook de weefselstructuur en de orgaangewichten veranderen ten gevolge van blootstelling aan

milieucontaminanten. Dergelijke veranderingen zijn veelal minder duidelijk aan de blootstelling aan een bepaalde stofgroep toe te schrijven. Wel zijn deze veranderingen van groot belang voor de extrapolatie van biomarkerresponsen naar effecten die zich op een hoger niveau manifesteren zoals groei, reproductie of overleving van het individu. Dit zijn essentiële grootheden die de groei van een populatie kunnen beschrijven en dus van belang zijn voor ecotoxicologische risicoanalyses.

1.5 De huisspitsmuis

De huisspitsmuis is als modelsoort gekozen voor de carnivore kleine zoogdieren. De huisspitsmuis is algemeen voorkomend in Nederland. Binnen Europa ligt het verspreidingsgebied op het vaste land zuidwestelijk van de lijn Dresden (Du) - Bergenz - Genua (It) (Broekhuizen et al., 1992). Het dieet bestaat voor een belangrijk deel uit invertebraten zoals pissebedden (isopoda), spinnen (araneae), insectenlarven (lepidoptera), slakken (gastropoda) en regenwormen (lumbricidae) (Broekhuizen et al., 1992). Op een leeftijd van 40 tot 60 dagen is het subadulte stadium bereikt waarin het gewicht min of meer constant ca. 10 g blijft. De duur van de subadulte fase is in de natuur afhankelijk van het tijdstip van geboorte. Vroeg in het jaar geboren dieren bereiken het adulte, geslachtsrijpe stadium al aan het eind van de zomer. In het najaar geboren dieren bereiken dit stadium pas het volgend voorjaar. Het gewicht neemt verder toe in het voorjaar waarin het adulte stadium bereikt wordt. Het gewicht van een volwassen huisspitsmuis bedraagt 6 tot 14 g. In gevangenschap kan de seksuele ontwikkeling al op een leeftijd van ca. twee maanden beginnen. Huisspitsmuizen worden één à twee jaar oud (de Bie et al., 2001).



Fig. 1.4. De huisspitsmuis, *Crocidura russula*.

1.6 Vraagstelling en plan van aanpak

Vanwege de globale structuurverwantschap tussen PAK's, dioxinen en PCB's zijn na blootstelling aan deze stoffen deels gelijksoortige effecten te verwachten. De vraag is of de alkoxyresorufine O-dealkylases EROD, MROD, PROD, en BROD en de specifieke TH activiteiten in spitsmuizen eenduidige responsen geven na blootstelling aan TCDD of PAK's en in welke blootstellingrange deze effecten voor de verschillende verbindingen optreden. Daarnaast is het de vraag hoe deze biomarkerresponsen zich verhouden tot effecten op de groei, de reproductiecapaciteit en de ontwikkeling van het dier. Om deze vragen te kunnen beantwoorden is een aantal laboratorium experimenten ontworpen waarin dosis-effect relaties bestudeerd zijn. Hierbij is de spitsmuis als model gekozen voor carnivore zoogdieren uit de wilde fauna.

In hoofdstuk 2 wordt een studie besproken waarin huisspitsmuizen gedurende vijf dagen blootgesteld zijn aan benzo[a]pyreen (BaP) of TCDD. Hierin is onderzocht in welke mate responsen van TCDD in spitsmuizen afwijken van de responsen die gemeten worden in de meer uitvoerig onderzochte laboratorium proefdieren zoals de muis en de rat. In hoofdstuk 3 wordt een studie besproken waarin huisspitsmuizen gedurende negen dagen blootgesteld zijn aan BaP. BaP is toegepast als modelstof voor de PAK's welke in *in vitro* experimenten een affiniteit voor de Ah-receptor vertonen (Willett et al., 1997). Aan de hand van de resultaten van deze en de voorgaande studie kan het effect van BaP vergeleken worden met het effect van TCDD en kan een eerste indruk verkregen worden van de mate waarin PAK's bijdragen aan de totale dioxine-achtige toxiciteit, wanneer spitsmuizen blootstaan aan mengsels van contaminanten zoals in het milieu aanwezig. In hoofdstuk 4 wordt een studie besproken waarin spitsmuizen gedurende 21 dagen blootgesteld zijn aan een mengsel van 9 PAK's. De resultaten van deze studie geven een idee van de effecten van een complex PAK mengsel zoals in de natuur aanwezig. In hoofdstuk 5 wordt het effect onderzocht van een levenslange blootstelling, beginnend in het embryonale stadium via de zwangere moeder. In deze studie zijn naast de effecten op enzymfuncties ook de effecten op de histologie van de geslachtsorganen onderzocht. In hoofdstuk 6 tenslotte worden de verzamelde resultaten bediscussieerd en worden enkele conclusies getrokken ten aanzien van de te verwachten effecten van natuurlijke blootstellingen aan PAK's bij carnivore zoogdieren zoals de spitsmuis.

2 Effecten van een vijf dagen durende blootstelling aan 2,3,7,8-TCDD of Benzo[a]pyreen op gewichtsveranderingen en cytochroom P450 enzymen in de huisspitsmuis (*Crocidura russula*)

A.T.C. Bosveld¹, P.A.F. de Bie¹, J. Immerzeel², H.A.H. Jansman¹, A.J. Murk³

2.1 Inleiding

Ah receptor gemedieerde effecten op enzymfuncties en biometrie zijn reeds uitgebreid beschreven als het effect van gechloreerde polycyclische aromatische koolwaterstoffen in verschillende diersoorten (bij zoogdieren o.a in rat, muis en cavia). 2,3,7,8-Tetrachloordibenzo-*p*-dioxine (TCDD) is in dit verband een van de meest uitgebreid onderzochte modelstoffen (Safe 1986, 1990, 1991, 1994).

Bij risicobeoordelingen in situaties waar de wilde fauna blootgesteld wordt aan dergelijke verbindingen vindt extrapolatie plaats van deze onderzoeksresultaten naar de in het wild voorkomende zoogdieren. De vraag is echter of wilde carnivore faunasoorten op gelijke wijze reageren op blootstelling aan dergelijke stoffen als de reeds onderzochte proefdieren met een vegetarisch dieet en een mogelijk afwijkende fysiologie. Het effect van TCDD op de microsomale alkoxyresorufine O-dealkylase (AROD) en testosteronhydroxylase (TH) activiteit en enkele algemene biometrische parameters is onderzocht in de huisspitsmuis om een vergelijk te kunnen maken met veel onderzochte laboratoriumproefdieren. Tevens zijn de effecten van benzo[a]pyreen (BaP) als modelstof voor de polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) onderzocht. Doordat deze stoffen deels langs eenzelfde mechanisme als TCDD een effect kunnen veroorzaken dragen zij mogelijk bij aan het totale Ah-receptor gemedieerde effect in de natuurlijk blootgestelde fauna.

2.2 Materiaal en methode

2.2.1 Dieren

In het voorjaar van 1995 zijn 18 adulte huisspitsmuizen (*Crocidura russula*) gevangen in een ruderaal gebied aan de Noordoost rand van Arnhem (Amersfoortse coördinaten 189-447). Hiertoe zijn Longworth lifetraps verspreid in het gebied geplaatst. Na een twee dagen durende periode van "pre-bating" waarbij de vallen gefixeerd in geopende toestand in het gebied gestaan hebben, zijn gedurende drie vangnachten de vallen van zonsopgang tot zonsopgang om de twee uur gecontroleerd. Gevangen

¹ Alterra

¹ RIKILT

¹ Leerstoelgroep Toxicologie, Wageningen Universiteit

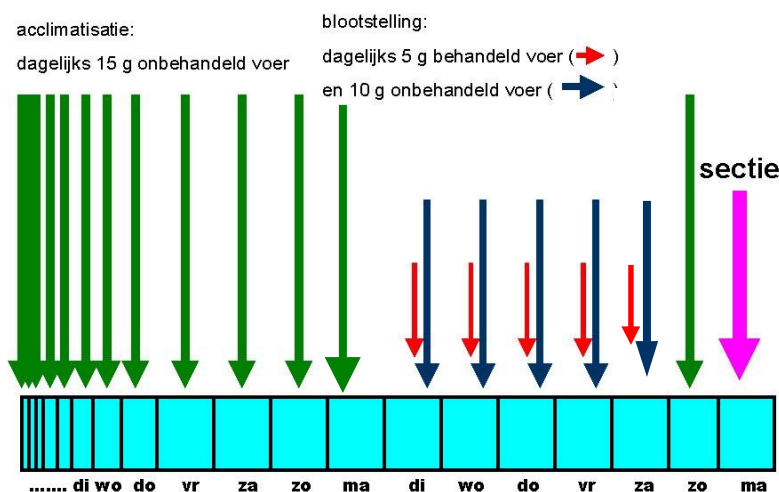


Fig. 2.1. Behandelingschema.

spitsmuizen zijn vervoerd naar het laboratorium waar deze individueel gehuisvest zijn in plastic bakken (60x30x30 cm). De bodem van de bakken was bedekt met zaagsel. Een nestlocatie is aangeboden in de vorm van een afdakje (diameter ca 15 cm.; hoogte 4 cm). In elke bak was een tredmolen geplaatst. De dieren zijn een maand in het laboratorium gehouden om te acclimatiseren alvorens de blootstellingstudie gestart is. Gedurende de acclimatisatie- en blootstellingperiode is dagelijks het lichaamsgewicht van de dieren gemeten.

2.2.2 Blootstelling

Drie groepen van ieder zes adulte dieren zijn gedurende 5 dagen blootgesteld. Een groep bestaande uit 4 mannetjes en 2 vrouwtjes is middels het voer blootgesteld aan 0.15 μg TCDD per dag (overeenkomend met ca. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in totaal voer en ca. 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht). Eén groep bestaande uit 3 mannetjes en 3 vrouwtjes is blootgesteld aan 0.15 mg BaP per dag (overeenkomend met ca. 10 mg/kg in totaal voer en 14 mg/kg lichaamsgewicht). Daarnaast is een groep van 4 mannetjes en twee vrouwtjes op een controle dieet (alleen olie toegevoegd) gehouden. Voor de toediening is TCDD opgelost in olie (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en BaP opgelost in DMSO (126 mg/ml). Deze oplossingen zijn vermengd met kattenvoer (FELIX lever/rund) tot een concentratie van respectievelijk 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TCDD) en 30 mg/kg (BaP) in het voer. Hiervan werd 's middags 5 g aangeboden. Daarnaast is iedere avond, wanneer het voorbehandelde voer geconsumeerd was, een extra hoeveelheid (ca. 10 g) ongecontamineerd voer aangeboden (zie fig. 2.1).

2.2.3 Sectie

Ca. 36 uur na de laatste blootstelling zijn de dieren gedood door decapitatie. Na doding is de buikwand geopend en zijn de lever, galblaas, longen, milt, maag en nieren verwijderd en gewogen. De lever is direct ingevroren in vloeibaar stikstof en bewaard bij -80 °C voor latere enzymactiviteitmetingen.

2.2.4 Microsomale fracties

Ten behoeve van enzymactiviteitmetingen zijn de levers ontdooid en opgewerkt, waarbij de microsomale fractie geïsoleerd is. Cytochroom P450 enzymen zijn gebonden aan de in de cel aanwezige membranen die deze fractie bevat. Levers zijn met TRIS buffer opgenomen in 10 ml potterbuizen en afzonderlijk gehomogeniseerd m.b.v. een potter S homogenator van B.Braun Biotech International GmbH (Meisungen, Duitsland). Het homogenaat is gecentrifugeerd gedurende 9 min. bij 15.000 g in een Beckman L-60 ultracentrifuge met 50.2 TI rotor (11.000 rpm). Het supernatant is overgebracht in een schone centrifugebuis en vervolgens gecentrifugeerd bij 100.000 g. Het hierdoor verkregen supernatant is verwijderd en de overgebleven pellet is opgenomen in TRIS buffer met glycerol (gewichtsverhouding 1:2) en gesuspenseerd met een homogenator van Kinematica GmbH (Kriens-Luzern, Zwitserland). De verkregen microsomale suspensie is ingevroren bij -80 °C voor later uit te voeren enzymactiviteitmetingen.

2.2.5 EROD

De CYP1A1 geassocieerde ethoxyresorufine *O*-deethylase (EROD) activiteit is gemeten aan de hand van de omzetting van ethoxyresorufine (ER) in resorufine (RR), dat fluorimetrisch gekwantificeerd kan worden. 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, 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 “platerader” bij een excitatie golflengte van 530 nm en een emissie van 590 nm. Resorufine (Sigma R-3257) is gebruikt als standaard.

2.2.6 Testosteron hydroxylase

Microsomale isomeerspecifieke testosteronhydroxylase (TH) activiteiten zijn gemeten aan de hand van de vorming van de verschillende hydroxytestosteron verbindingen uit testosteron. De verschillende hydroxytestosteron (HT) verbindingen (2α-, 2β-, 6β-, 7α-, 11α-, 12β-, 15α-, 15β-, 16α-, 16β-HT) zijn geanalyseerd m.b.v. HPLC. Naast deze hydroxyleringsreacties treedt ook een dehydroxylering op (testosteron →

androstenedion) waarbij onder invloed van het enzym 17-OH SDH de hydroxygroep op de 17 positie geoxideerd wordt tot een dubbel gebonden zuurstof (keto) op deze positie. In de verdere bespreking van de testosteron(de)hydroxylases zal deze uitzondering niet steeds apart benoemt worden en ook onder de hydroxylases vermeld worden.

Een reactiemengsel bestaande uit 75 μ l microsomen, 75 μ l NADPH (4.8 mM in milliQ), 10 μ l testosteronoplossing (3.61 g/ml in methanol) en 340 μ l fosfaatbuffer (50 mM KH_2PO_4 , 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.9 mM EDTA; pH 7.4) is al schuddend geïncubeerd bij 37°C. De reactie is na exact 15 min. gestopt door toevoeging van 1 ml dichloormethaan. Na beëindiging van de reactie is 10 μ l interne standaard oplossing toegevoegd (11 β -hydroxytestosteron 400 μ g/ml in methanol). Het mengsel is 5 min. geschud en vervolgens gedurende 10 min. gecentrifugeerd bij 5000 g. De dichloormethaan-fase met de testosteron metabolieten is afgescheiden, ingedampt en opgenomen in 130 μ l 50% methanol. De hydroxytestosteron (HT) isomeren zijn geanalyseerd m.b.v. een Spectra Physics (Spectra System) HPLC met een Chrompak C18, 200x3 mm kolom (5 μ m deeltjes) gekoppeld aan een LKB 2151 UV detector (254 nm) en een PE Nelson chromatograaf. 20 μ l van het extract in 50% methanol is geïnjecteerd. Als mobiele fase is een gradiënt van 25% methanol in milliQ (vloeistof A) naar 64% methanol en 6% acetonitril in milliQ (vloeistof B) gebruikt. Mengverhoudingen van beide loopvloeistoffen waren: 0-7 min: 100% A, 7-42 min: lineaire gradiënt van 100% A naar 42% A en 58% B, 42-47 min: 42% A en 58% B, 47-48 min: lineaire gradiënt naar 100% B, 48-52 min: 100% B, 52-53 min: lineaire gradiënt naar 100% A, 53-60 min: 100% A. De doorloopsnelheid van de mobiele fase bedroeg 0.8 ml/min. De kolomtemperatuur bedroeg 60 °C.

De piekhoogten voor de afzonderlijke metabolieten zoals weergegeven op het chromatogram zijn gestandaardiseerd naar een 1000 mV respons voor de interne standaard (11 β -HT). De locatiespecifieke hydroxyleringactiviteit is berekend als de aldus gemeten respons (in mV per 1000 mV IS) per hoeveelheid microsomaal eiwit in het reactiemengsel per min. incubatietijd (mV/min.mg).

Als standaard is een mengsel van de verschillende HT verbindingen gebruikt, waarin de componenten niet afzonderlijk gekwantificeerd aanwezig zijn. De standaard is gebruikt voor de bepaling van de retentietijden. Kwantificering van de activiteit naar hoeveelheid gevormd product is op basis van deze standaard echter niet mogelijk. Sommatie van de verschillende activiteiten en beschouwing van de relatieve activiteiten (respons van specifieke TH ten opzichte van gesommeerde respons van alle TH's) dient slechts ter algemene duiding van eventuele veranderingen zonder dat daar kwantitatieve uitspraken over gedaan kunnen worden.

2.2.7 Eiwit bepaling

Het eiwitgehalte van de microsomale fractie is bepaald volgens de methode van Lorenzen & Kennedy (1993). Deze methode berust op de toevoeging van

fluorescamine aan de in NaOH en fosfaatbuffer opgenomen microsomale suspensie en een daarop volgende fluorescentie meting. Hiertoe is 25 µl microsomale suspensie opgenomen in 300 µl fosfaatbuffer (tetranatriumdifisfaat 10-Hydroxy (Merck 6591) 22.3 g/l; pH 8) en 100 µl NaOH 0.1 N. Na sonificeren is al schuddend 100 µl fluorescamine oplossing (sigma F-9015; 1.08 mM in aceton) toegevoegd. Na 5 min incubatie is de fluorescentie gemeten op een Cytofluor I fluorescentie “platereader” bij een excitatie/emissie van 390/425 nm. Bovine Serum Albumine (Sigma A-7888) is gebruikt als standaard.

2.2.8 Statistiek

Verschillen tussen behandelingen zijn getest met ANOVA. Relaties tussen effectparameters zijn getoetst met lineaire regressie modellen met StatGraphics plus (Statistical Graphics Corporation, USA).

2.3 Resultaten

2.3.1 Lichaamsgewichttoename

Het gemiddelde lichaamsgewicht bij aanvang van de blootstelling was niet significant verschillend tussen de groepen en bedroeg gemiddeld 10.5 ± 0.9 g in de controlegroep. In de TCDD en BaP belaste groepen bedroeg het gemiddelde gewicht respectievelijk 11.0 ± 1.2 en 10.9 ± 1.1 g. Bij beëindiging van het blootstelling-experiment waren de gemiddelde gewichten van de dieren uit de verschillende behandelingsgroepen eveneens niet significant afwijkend (zie fig. 2.2). In de BaP blootgestelde groep werd echter wel een significant lagere toename van het lichaamsgewicht over de blootstellingperiode gemeten dan in de controlegroep (zie fig. 2.3). In de acclimatisatieperiode (week 1 tot en met week 4) waarin geen blootstelling heeft plaatsgevonden zijn geen significante verschillen tussen de verschillende behandelingsgroepen waargenomen.

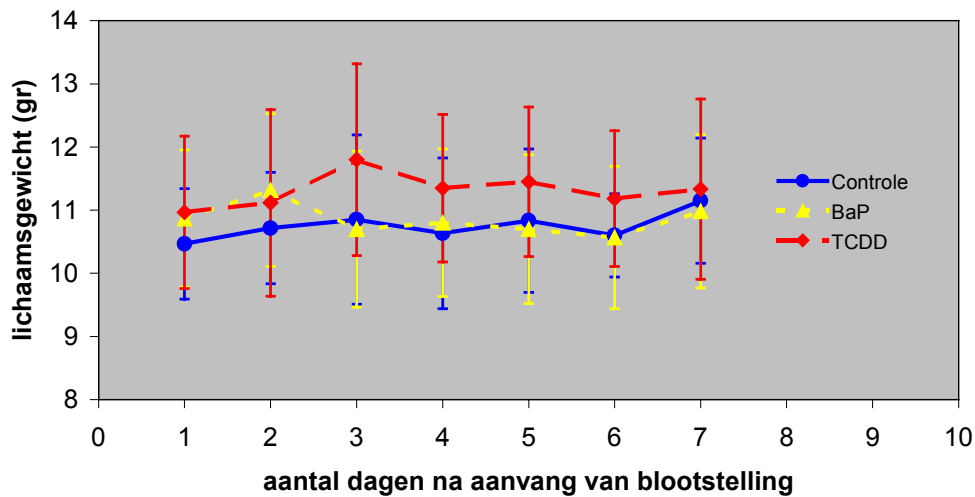


Fig. 2.2. Verloop van het gemiddeld (\pm standaarddeviatie) lichaamsgewicht voor de verschillende behandelingsgroepen over de blootstellingperiode.

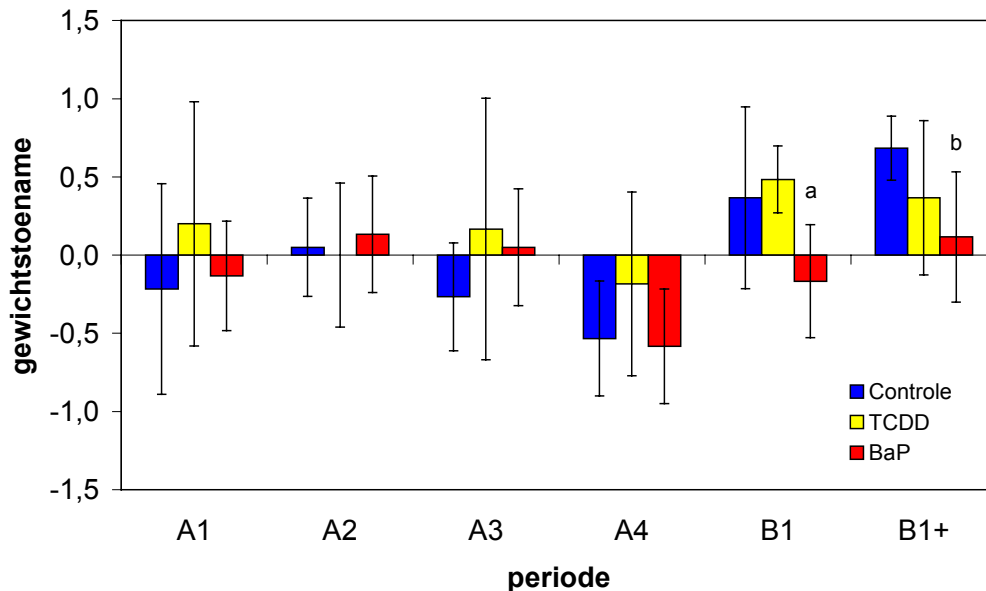


Fig. 2.3. Gemiddelde (\pm standaarddeviatie) lichaamsgewichtverandering over week 1-4 van de acclimatisatieperiode (A), en over de daarop volgende blootstellingperiode (B1 en B1+). Weergegeven is het verschil in lichaamsgewicht gemeten op maandag en de daaropvolgende vrijdag. Bij B1+ is het verschil weergegeven tussen het gewicht op maandag en de daaropvolgende maandag, dus inclusief de zondag waarop geen blootstelling heeft plaatsgevonden. Groepen die afwijkend zijn van de gekoppelde controlegroep zijn weergegeven met een letter (a: $p=0.09$; b: $p=0.01$).

2.3.2 Orgaangewichten

Zowel de controlegroep als de TCDD groep bestonden uit zes dieren waarvan vier mannetjes en twee vrouwtjes. De BaP blootgestelde groep bestond uit drie mannetjes en drie vrouwtjes. Er zijn geen significante verschillen in orgaangewichten waargenomen tussen de geslachten binnen de verschillende blootstellinggroepen. Om deze reden is bij

de verdere statistische beoordeling van de effecten van de verschillende behandelingen geen onderscheid gemaakt tussen de verschillende geslachten. Bij deze nadere analyse zijn geen effecten aantoonbaar gebleken (zie tabel 2.1).

Tabel 2.1. Effecten van TCDD en BaP op orgaangewichten. Weergegeven zijn de gemiddelden en standaarddeviaties (n=6).

Absolute gewichten (mg)

	Controle	TCDD	BaP
lever	669 ± 58	669 ± 183	696 ± 139
longen	106 ± 41	107 ± 23	108 ± 16
milt	127 ± 27	134 ± 31	125 ± 73
nieren	189 ± 54	212 ± 24	195 ± 33

Relatieve gewichten (% van lichaamsgewicht)

	Controle	TCDD	BaP
lever	6.0 ± 0.3	5.9 ± 1.3	6.4 ± 1.3
longen	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2
milt	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.7
nieren	1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.2

2.3.3 EROD

Tussen de verschillende geslachten binnen de respectievelijke behandelingsgroepen bleken geen significante verschillen op te treden (zie fig. 2.4). Om deze reden is bij de verdere beoordeling van de effecten geen onderscheid gemaakt tussen de geslachten. De EROD activiteit in de TCDD blootgestelde groep bleek significant ($p < 0.00001$) ca. 8 keer verhoogd ten opzichte van de controle groep (respectievelijk 3036 ± 752 en 391 ± 125 pmol/min.mg). De BaP blootgestelde dieren vertoonden geen verhoogde EROD activiteit (387 ± 56 pmol/min.mg).

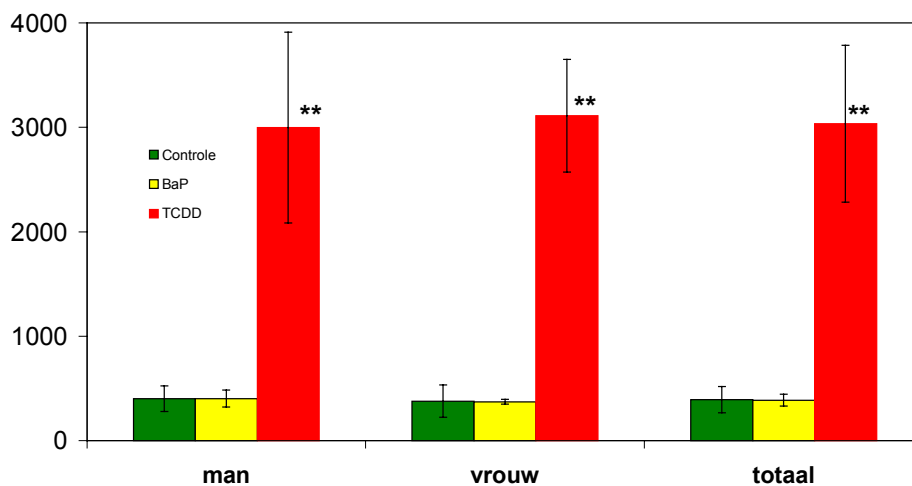


Fig. 2.4. Effecten van TCDD en BaP op de microsomale EROD activiteit. Significantie van verschil met de controlegroep is aangegeven met ** ($p < 0.00001$).

2.3.4 Testosteron hydroxylase

Bij de vergelijking van de verschillende geslachten binnen een groep zijn geen significante verschillen in de TH activiteiten waargenomen. Om deze reden is bij de verdere analyse geen onderscheid gemaakt tussen de geslachten. De totale TH activiteit in de aan TCDD blootgestelde groep bleek significant ($p=0.014$) tot ca. de helft gereduceerd te zijn ten opzichte van de controles. Deze afname is vergelijkbaar voor alle verschillende specifieke testosteron (de)hydroxylases (zie fig. 2.5A). Wanneer de relatieve TH respons beschouwd wordt (ratio tussen specifieke TH respons en totale TH respons), blijkt dat er geen significante verandering in het hydroxylasepatroon optreedt.

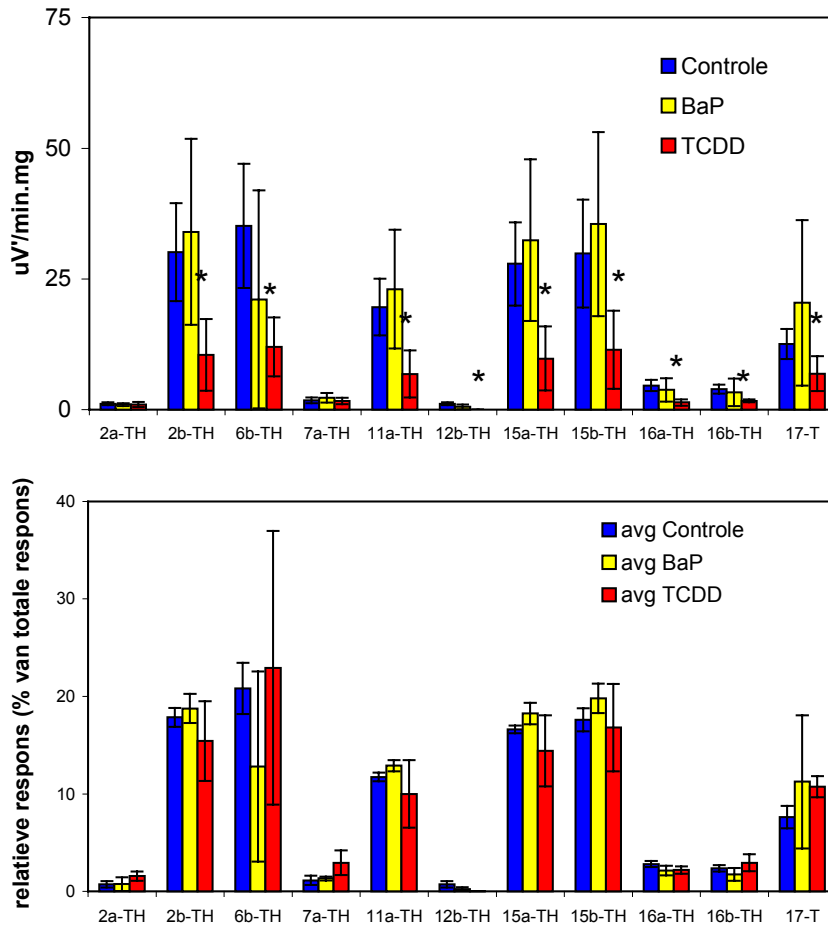


Fig. 2.5. Effect van BaP en TCDD op de absolute (boven) en relatieve (onder) testosteron hydroxylaseactiviteit in huisspitsmuizen (groepen van gemengd geslacht, $n=6$). Significantie van verschil met de controlegroep is aangegeven met * ($p < 0.05$).

2.3.5 Correlaties met EROD

Wanneer op individueel niveau de relatie tussen EROD en de verschillende TH activiteiten beschouwd wordt, blijkt in geen enkel geval een significante relatie te

bestaan tussen EROD en de verschillende TH activiteiten. In tabel 2.3 zijn de regressiefactoren voor deze relatie weergegeven.

Tabel 2.3. Regressiefactoren (r^2) voor de relatie tussen EROD en specifieke TH activiteiten.

TH	r^2
2 α	0.047
2 β	0.293
6 β	0.019
7 α	0.086
11 α	0.315
12 β	0.148
15 α	0.346
15 β	0.270
16 α	0.275
16 β	0.126
17	0.120

2.4 Discussie.

In de aan TCDD blootgestelde dieren zijn geen effecten op lichaamsgewicht of orgaangewicht waargenomen. In verschillende laboratoriumproefdieren varieert de LD50 (enkelvoudige dosis) van ca. 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht (cavia) tot $>1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht (hamster). De muis neemt een intermediaire positie in met een LD50 van 100-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lichaamsgewicht (Kociba & Schwetz, 1982). In de huisspitsmuizen welke blootgestaan hebben aan ca. 14 μg TCDD/kg lichaamsgewicht per dag (150 ng per dag) is geen sterfte opgetreden. Ook is er geen groeivertraging of reductie van orgaangewichten opgetreden. Dit duidt erop dat de spitsmuis niet extreem gevoelig is voor dioxine-achtige stoffen.

De EROD activiteit in de lever van de TCDD blootgestelde spitsmuizen (3 nmol/min.mg) is ca. 8x geïnduceerd t.o.v. de controle activiteit. Door de Jongh et al., (1995) is een vergelijkbare EROD inductie gevonden (controle en TCDD respectievelijk 0.13 en 1.54 nmol/min.mg) in eenmalig aan 0.3 μg TCDD/kg blootgestelde muizen. Deze resultaten suggereren dat bij de huisspitsmuis een vergelijkbare activatie van het Ah-receptor mechanisme optreedt als in de muis na een ca. 40 keer hogere blootstelling aan TCDD. Uit het feit dat de EROD activiteit sterk geïnduceerd kan worden in spitsmuizen, kan geconcludeerd worden dat EROD metingen aangewend kunnen worden om de mate van interne verstoring door dioxine-achtige verbindingen in deze soort in een veldsituatie vast te stellen.

Wanneer de effecten op de testosteronhydroxylase activiteit beschouwd worden, blijkt dat TCDD de TH activiteit significant verlaagd. Dit in tegenstelling tot het effect zoals waargenomen in een studie door Sanderson et al. (1996), waarin TCDD verschillende specifieke hydroxylase activiteiten induceerde. Uit de verhoudingen tussen de verschillende specifieke activiteiten (fig. 2.4b), blijkt echter dat deze niet

veranderen onder invloed van TCDD. De meetresultaten duiden erop dat blootstelling aan TCDD resulteert in een specifieke reductie van alle verschillende hydroxylase activiteiten. In het licht van resultaten van andere onderzoeken waarin TCDD specifieke hydroxylases induceert, is dit niet verklaarbaar.

Verondersteld kan worden dat de sterk geïnduceerde synthese van CYP1A1 (EROD) ten koste gaat van de synthese van andere cytochroom P450 enzymen die betrokken zijn bij de hydroxylering van testosteron. De bevinding dat er geen significante negatieve relatie tussen EROD en de verschillende TH activiteiten bestaat weersprekt deze verklaring echter. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat de hydroxylase activiteiten van de verschillende betrokken enzymen competitief geremd worden door het in de microsomen aanwezige TCDD. Een experiment waarin tijdens de incubatie TCDD toegevoegd wordt zou deze hypothese mogelijk kunnen bevestigen. De specifieke halvering van de activiteit bij alle hydroxylases kan echter ook duiden op een methodologische fout, waarbij de eiwit concentratie in de microsomen van de TCDD blootgestelde dieren evenredig lager is dan verondersteld.

Een verlaging van de TH activiteiten beïnvloedt mogelijk de natuurlijke regulatie van de hormoonspiegels in het lichaam. Een dergelijke deregulatie zou kunnen leiden tot een afwijking in testosteron gestuurde processen zoals de ontwikkeling van geslachtscellen en tal van secundaire geslachtskenmerken. In de onderhavige studie is echter geen aandacht besteed aan dergelijke effectparameters. Hierdoor is de hypothese dat een gewijzigde TH activiteit een effect heeft op de reproductiecapaciteit niet te verifiëren.

In de aan BaP blootgestelde dieren is een significante reductie van de lichaamsgewichttoename waargenomen. De EROD activiteit was, in tegenstelling tot de activiteit in de aan TCDD blootgestelde dieren, niet geïnduceerd. Het feit dat in de TCDD blootgestelde dieren géén reductie in lichaamsgewichttoename is waargenomen, suggereert dat BaP via een mechanisme anders dan binding aan de Ah receptor dit effect veroorzaakt.

Dat de EROD activiteit niet geïnduceerd is in de aan BaP blootgestelde dieren is mogelijk het gevolg van de periode van ca. 36 uur tussen de laatste blootstelling en de sectie. In deze periode is de in het lichaam aanwezige hoeveelheid BaP mogelijk grotendeels afgebroken en niet meer in staat om de EROD activiteit blijvend te induceren. Het moeilijk afbreekbare TCDD is na 36 uur nog wel aanwezig en kan dan nog steeds middels binding aan de Ah-receptor de EROD activiteit in verhoogde staat houden. In dit verband is door van der Weiden (1993) aangetoond dat bij karpers die blootgesteld zijn aan BaP (eenmalig 25 mg/kg lichaamsgewicht) de EROD activiteit gedurende 36 uur in verhoogde mate aanwezig was. In de daaropvolgende meting (vijf dagen na blootstelling) bleek de EROD activiteit weer gedaald. Gezien de relatief hoge stofwisselingsactiviteit van de huisspitsmuis, mag verondersteld worden dat de periode waarin de EROD activiteit verhoogd aanwezig is na een blootstelling aan BaP bij deze dieren korter is.

2.5 Conclusies

De resultaten van het onderzoek suggereren dat de huisspitsmuis niet extreem gevoelig is voor TCDD. Een blootstelling van ca. 14 µg/kg resulteerde niet in een reductie in de lichaamsgewichttoename of orgaangewichten. TCDD (ca. 10 µg/kg in het voer) induceert de EROD activiteit in de huisspitsmuis in een vergelijkbare mate als waargenomen in laboratorium muizen na een éénmalige blootstelling aan een ca. 40 keer lagere dosis. EROD wordt gesuggereerd als een geschikte biomarker om de mate van interne verstoring door dioxine-achtige verbindingen in deze soort in een veldsituatie vast te stellen.

Een vijf dagen durende blootstelling aan BaP (ca. 10 mg/kg in het voer) veroorzaakte een significante reductie in de lichaamsgewichttoename. Dit effect werd niet waargenomen bij de TCDD blootgestelde dieren.

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).

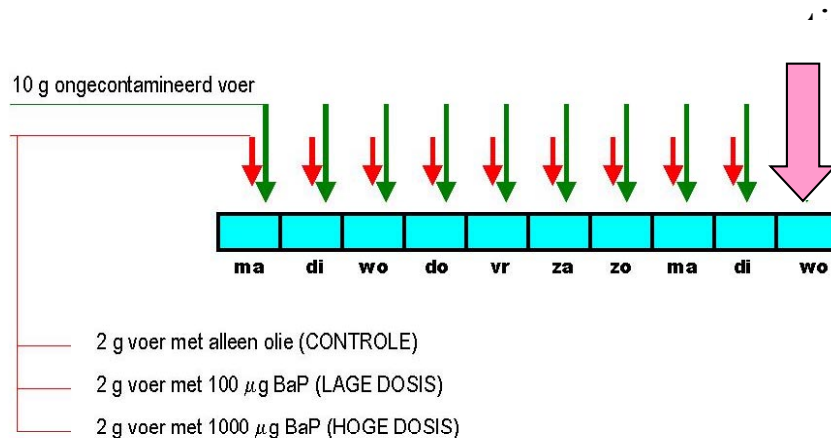


Fig. 3.1. Behandelingschema.

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 “platerader” 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 omzettingen producten 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).

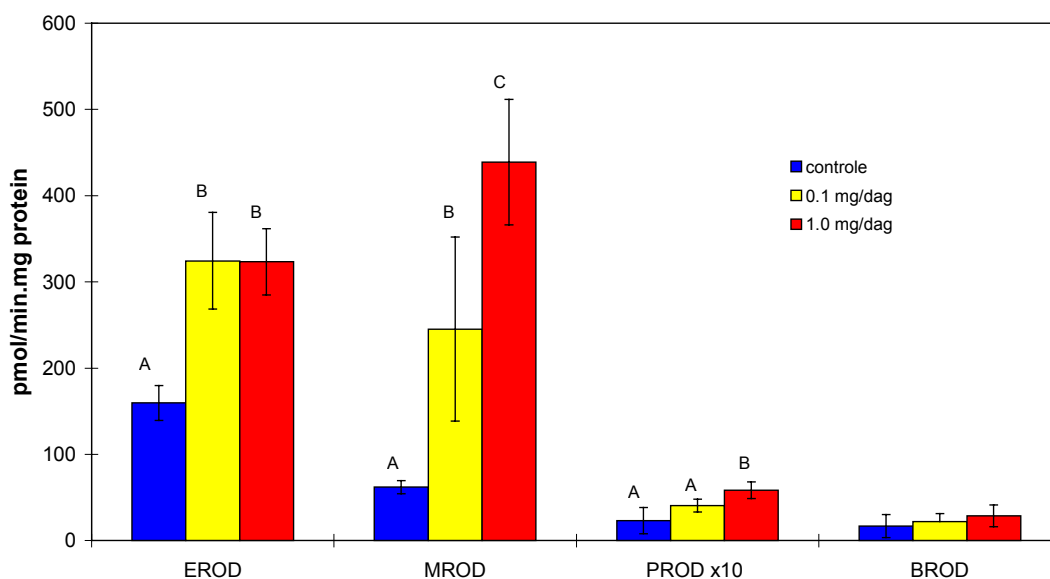


Fig. 3.2. AROD activiteiten in BaP blootgestelde huisspitsmuizen.

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

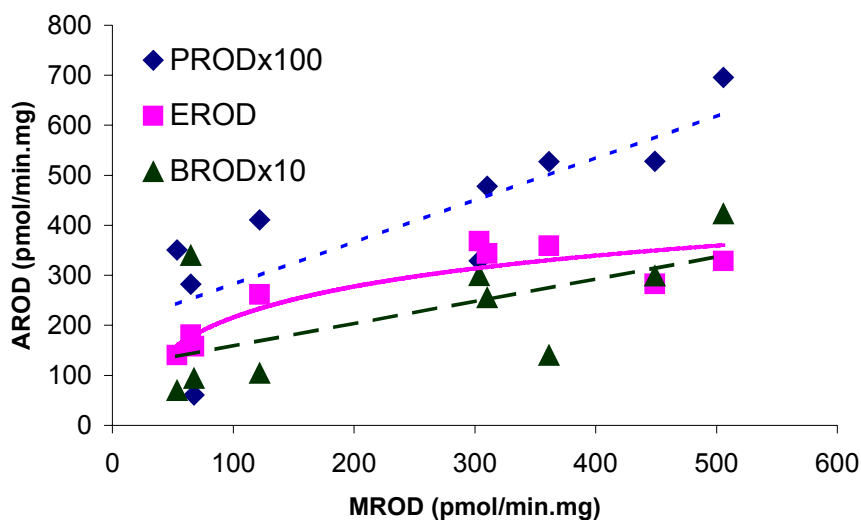


Fig. 3.3. Relatie tussen MROD en de overige AROD activiteiten. $PROD = 8.446 \times 10^{-3} \times MROD + 1.97$ ($r^2 = 0.671$), $EROD = 89.22 \times \ln(MROD) - 195.3$ ($r^2 = 0.818$), $BROD = 4.47 \times 10^{-2} \times MROD + 11.36$ ($r^2 = 0.387$).

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).

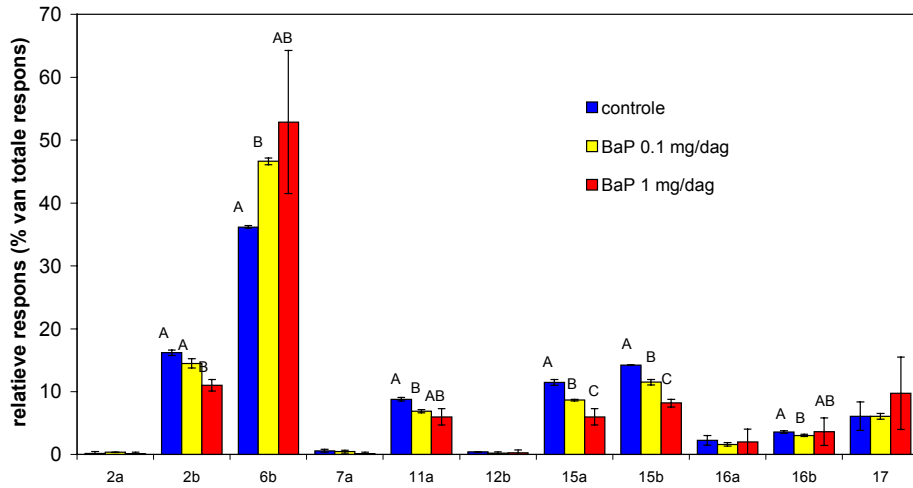
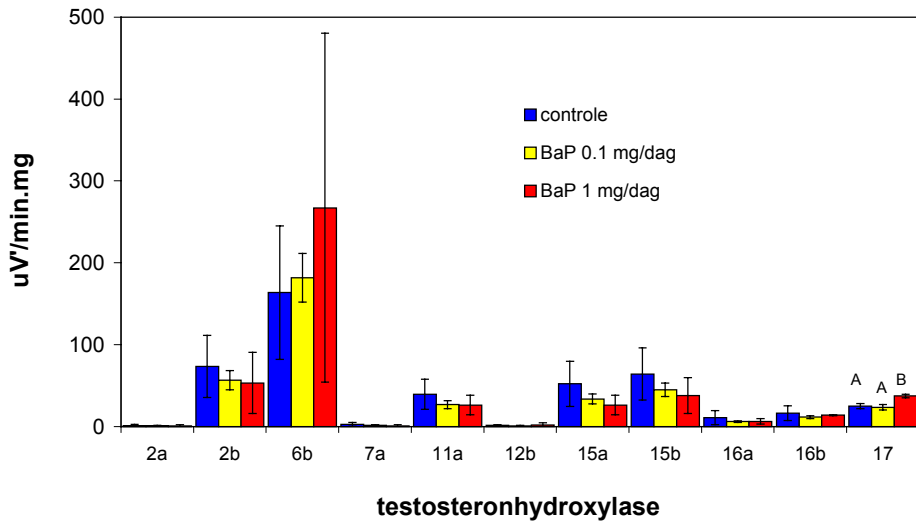


Fig. 3.4. Effecten van BaP op de absolute (boven) en relatieve (onder) testosteronhydroxylaseactiviteiten in huisspitsmuisen. Groepen met verschillende letters zijn significant ($p<0.05$) verschillend van elkaar.

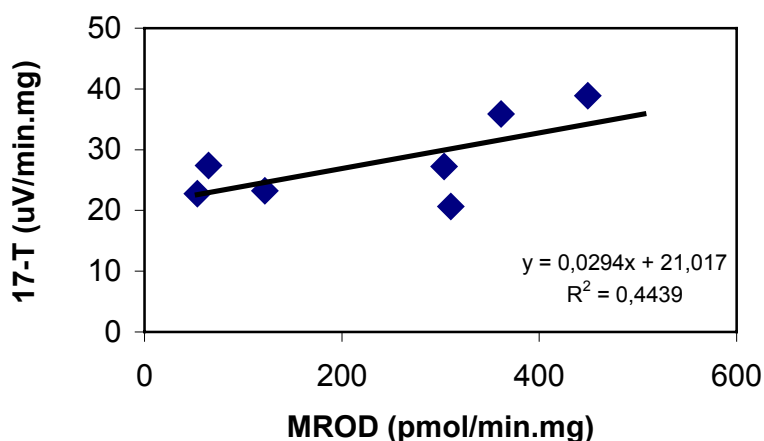


Fig. 3.5. Relatie tussen MROD en androsteendionformatie.

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.

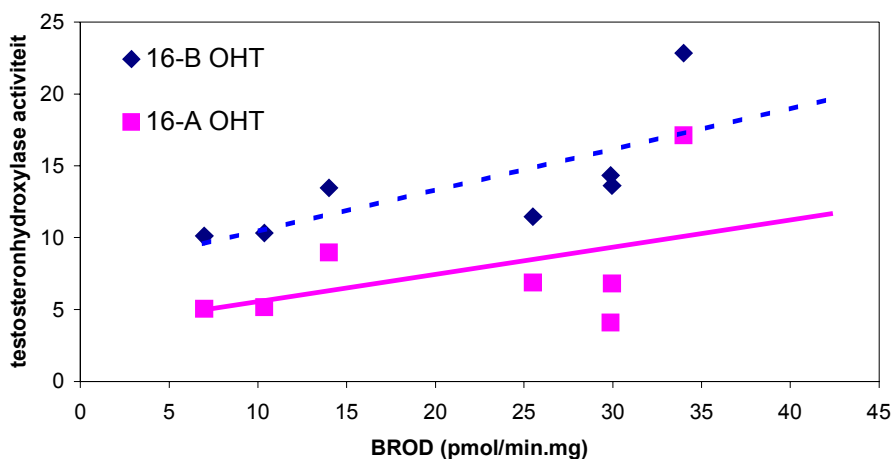


Fig. 3.6. Relatie tussen BROD en 16 α -TH ($y=0.19x + 3.64$; $r^2=0.215$) en 16 β -TH ($y=0.286x + 7.59$; $r^2=0.508$).

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 omzettingenproducten 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.

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).

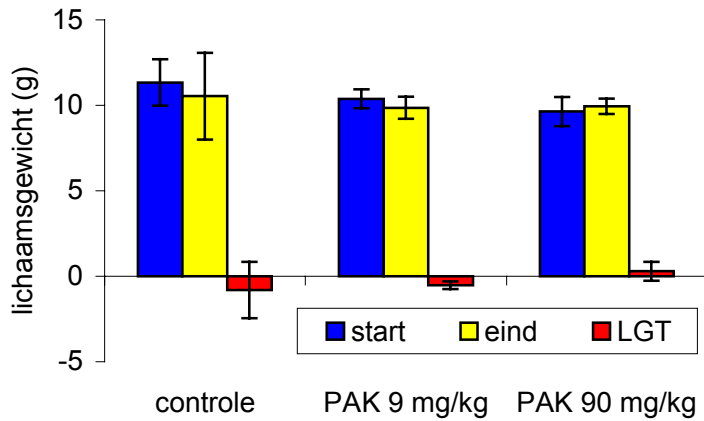


Fig. 4.1. Gemiddeld lichaamsgewicht bij aanvang en bij beëindiging van de behandeling en de gemiddelde lichaamsgewicht-toename (LGT) over de behandelingsperiode in relatie tot de blootstelling.

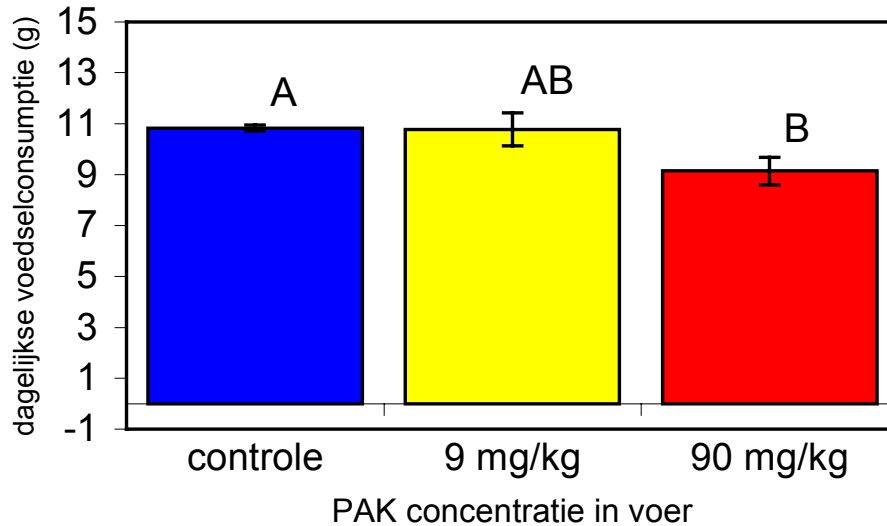


Fig. 4.2. Effecten van PAK's op de gemiddelde dagelijkse voedselconsumptie gedurende de 21 daagse behandelingsperiode (Groepen met verschillende letters zijn significant ($p < 0.05$) verschillend van elkaar).

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.

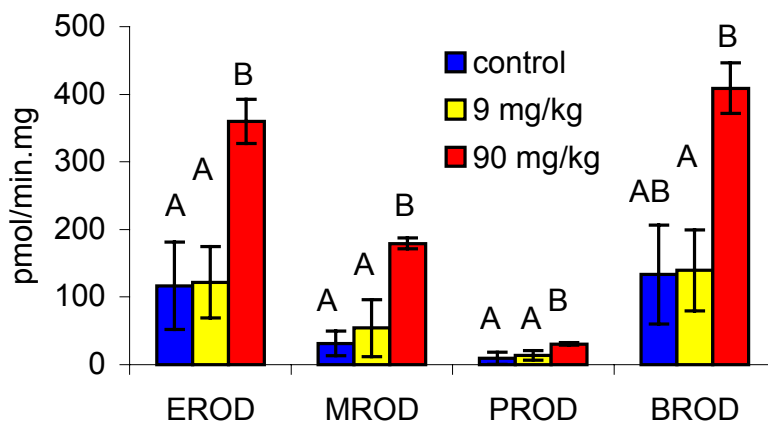


Fig. 4.3. Effecten van PAK's op de microsomale ethoxy-, methoxy-, pentoxy- en benzyloxyresorufine O-dealkylase activiteiten.

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.

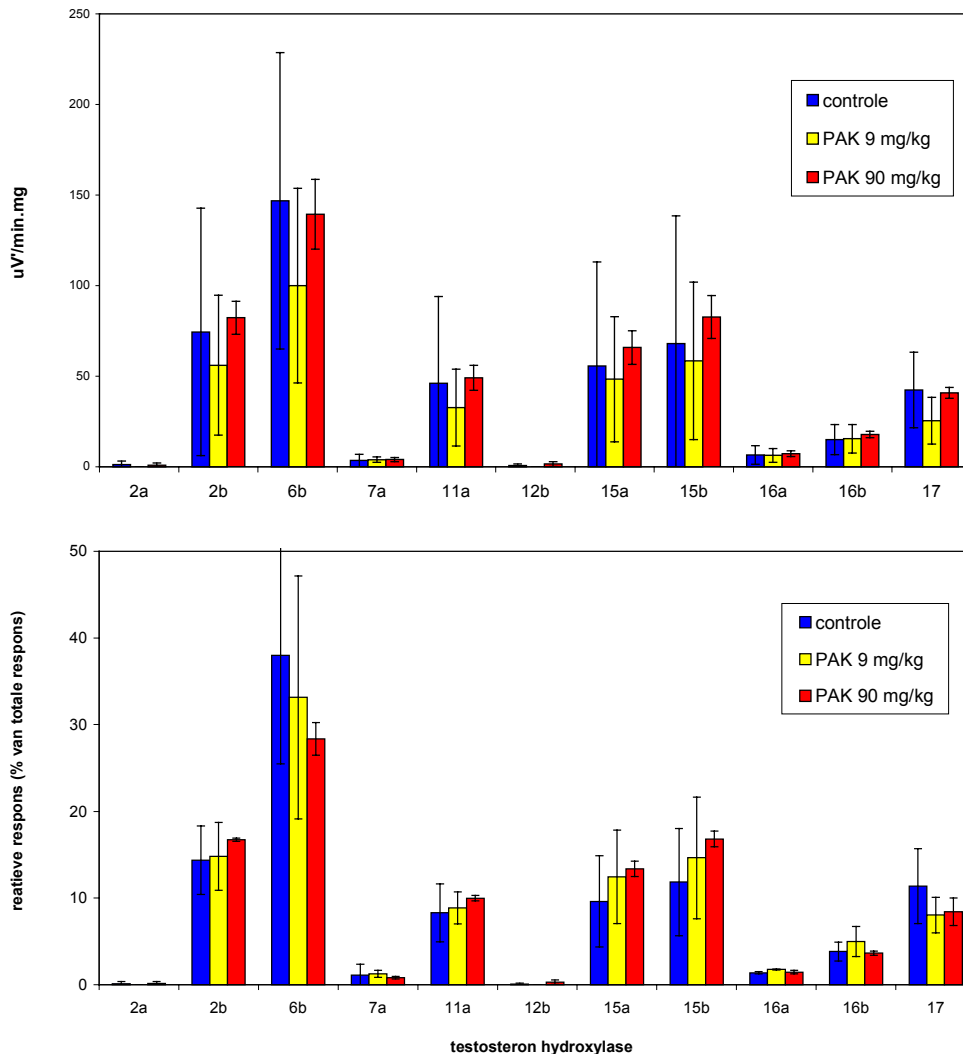


Fig. 4.4. Effecten van PAK's op de absolute (boven) en relatieve (onder) microsomale testosteronhydroxylerings activiteit.

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 2 β -, 11 α - en 15 β -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
2 α	0.11	0.4	0.01	0.8	0.12	0.4	0.36	0.09
2 β	0.25	0.18	0.15	0.3	0.38	0.08	0.72	0.004
6 β	0.18	0.3	0.11	0.4	0.29	0.14	0.61	0.01
7 α	0.13	0.3	0.06	0.5	0.27	0.16	0.44	0.05
11 α	0.22	0.2	0.11	0.4	0.34	0.10	0.72	0.004
12 β	0.49	0.04	0.29	0.14	0.46	0.04	0.49	0.04
15 α	0.23	0.19	0.14	0.3	0.37	0.08	0.68	0.006
15 β	0.26	0.16	0.17	0.3	0.41	0.06	0.71	0.004
16 α	0.21	0.2	0.14	0.3	0.37	0.08	0.58	0.02
16 β	0.27	0.15	0.25	0.17	0.47	0.04	0.63	0.01
17 T	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).

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.

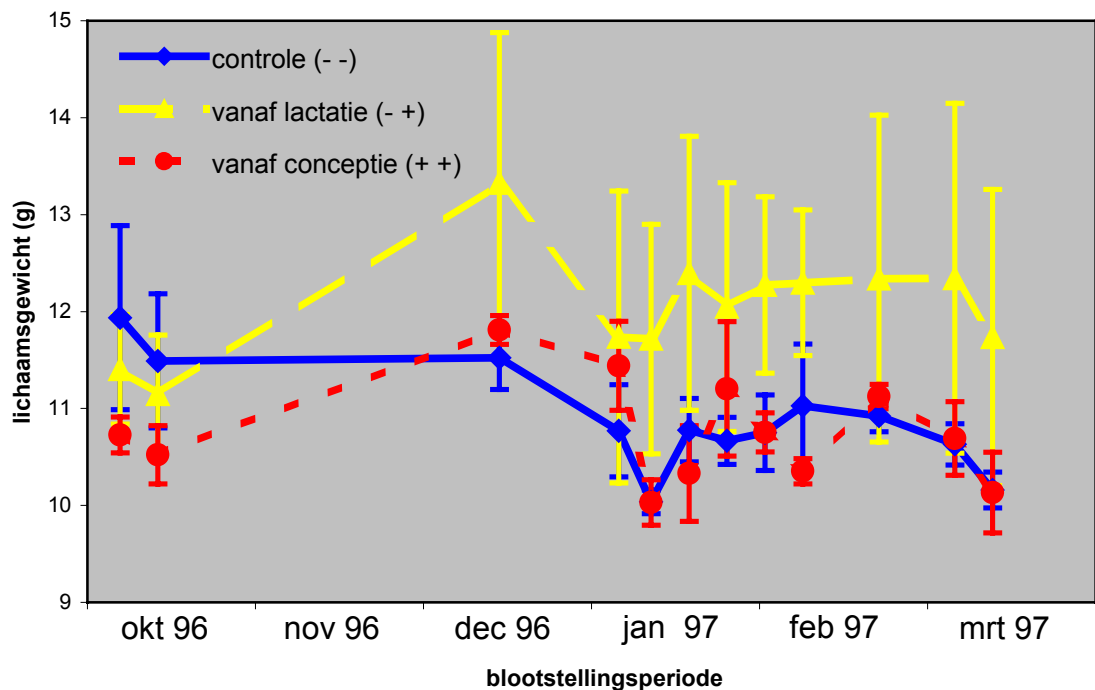


Fig. 5.1 Effecten van blootstelling aan PAK's (90 mg/kg in het voer) op het gemiddeld lichaamsgewicht gedurende negen maanden blootstelling.

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 [^]	569±92	-	8.3±1.2
vanaf conceptie	7.7±2.1	132±27	94±3	199±5 [^]	444±22	12±3	8.5±0.7

nb. [^] 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.

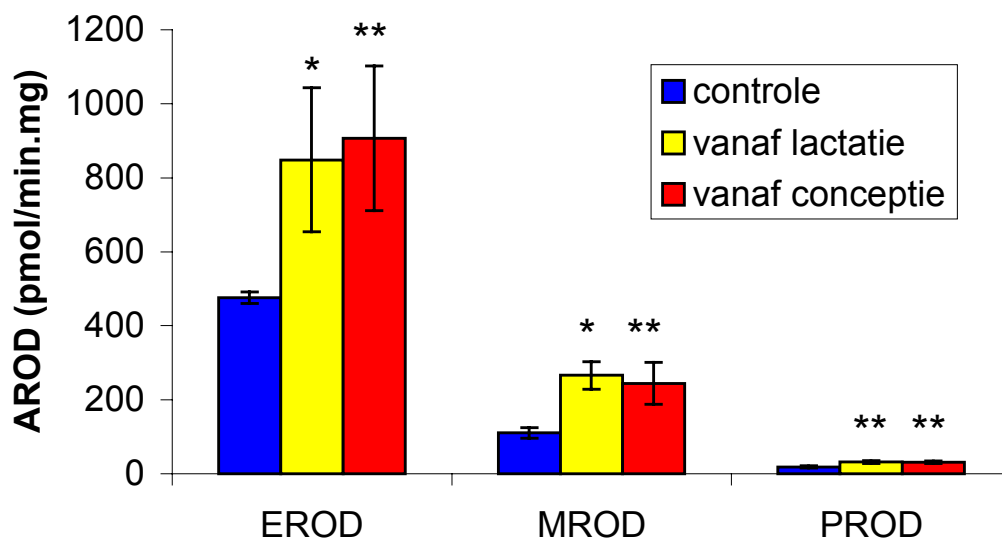


Fig. 5.2. Microsomale EROD, MROD en PROD activiteit in lever van huisspitsmuisen uit de verschillende behandelingsgroepen. Significantie van verschillen tussen aan PAK blootgestelde groepen en controlegroep is aangegeven met * ($p < 0.05$) of ** ($p < 0.01$).

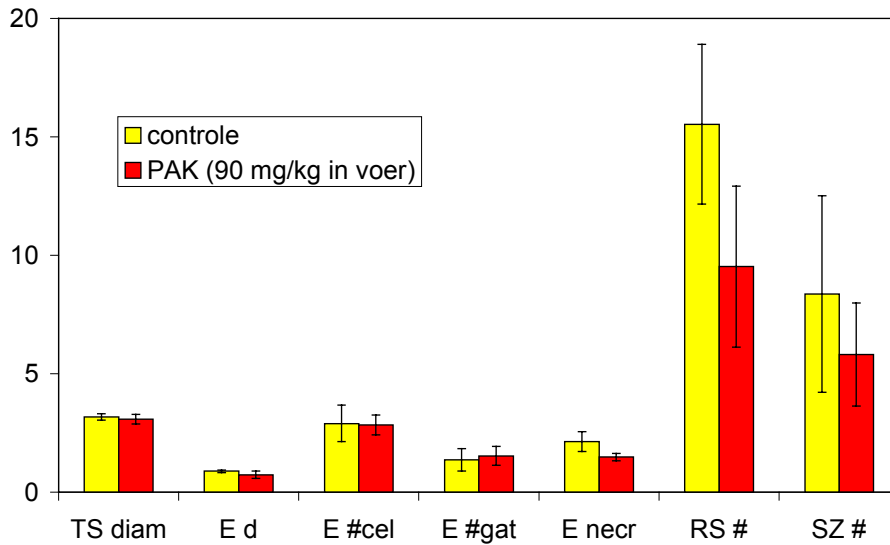
5.3.4 Histologie

5.3.4.1 De testes.

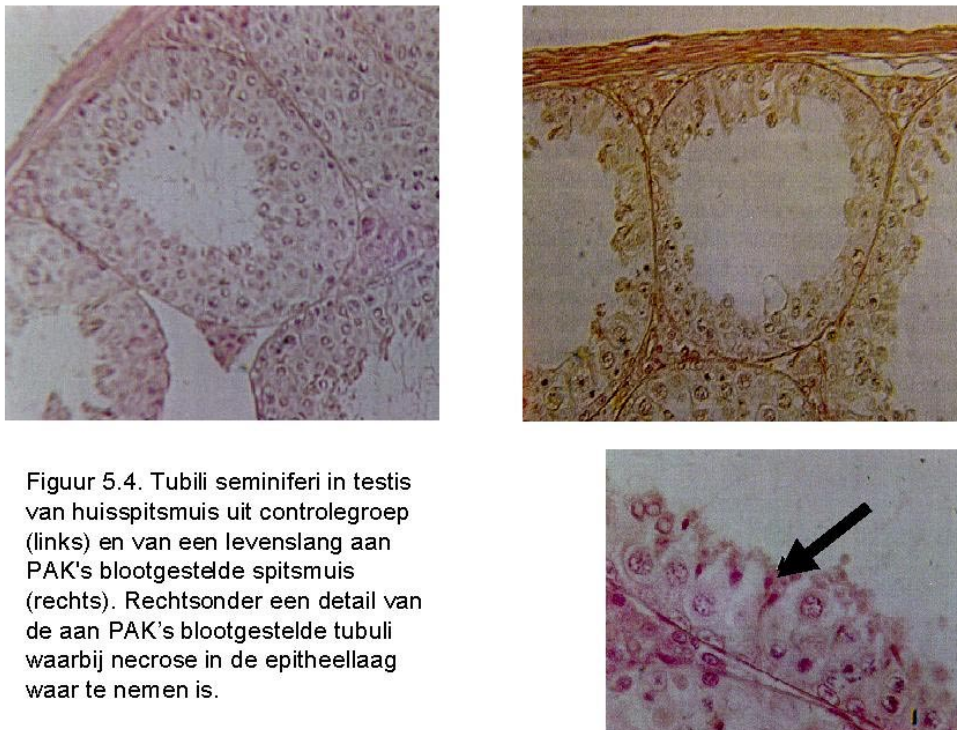
Indicatief onderzoek aan de testes kon uitgevoerd worden door de vergelijking van één dier uit de controlegroep met één dier uit de groep die levenslang (*in utero*, via lactatie en vervolgens via het voer) blootgesteld is aan PAK's.

De diameter van de tubuli seminiferi in de testes van beide dieren waren overeenkomend. De epitheeldikte (in μm) 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.

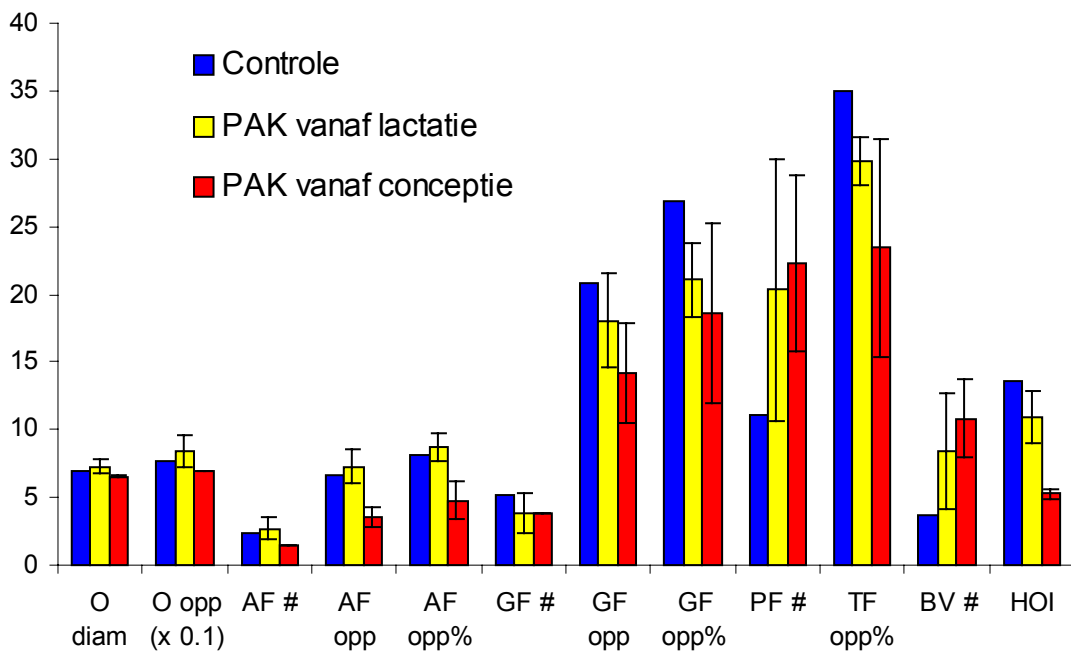


Fig. 5.5. Vergelijking van effectparameters in ovaria uit controlegroep (meting aan één dier), vanaf het eind van de lactatie levenslang via het voer blootgestelde vrouwtjes (gemiddelde van drie dieren), en vanaf de conceptie levenslang blootgestelde vrouwtjes huisspitsmuizen (gemiddelde van twee dieren).

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.

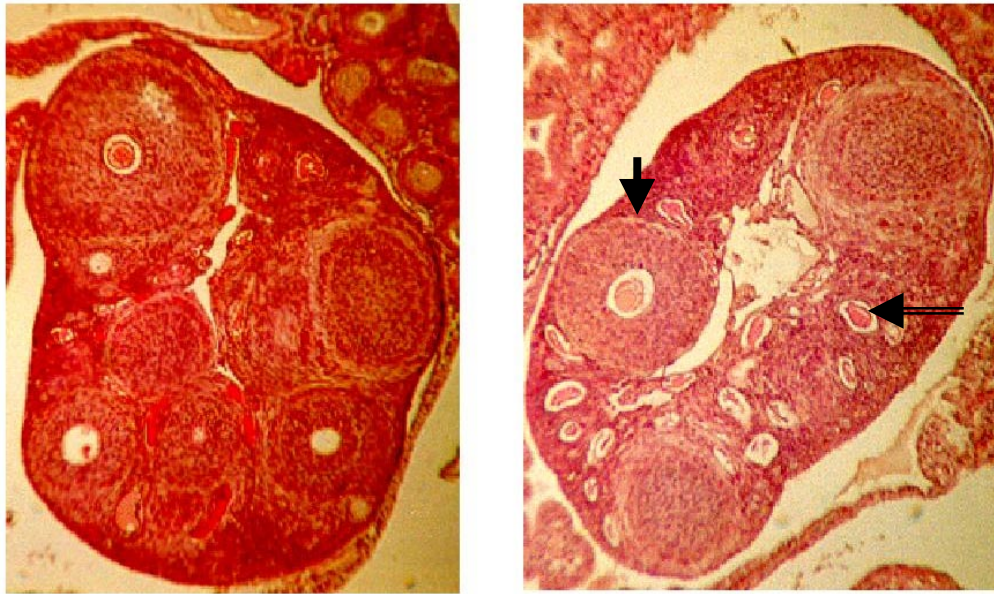


Fig. 5.6. Ovarium van huisspitsmuis uit controlegroep (links) en uit levenslang via het voer aan PAK's blootgestelde groep (rechts). In het rechts afgebeelde ovarium zijn meer bloedvaten (\longleftrightarrow), en minder atretische en groeiende follikels (\rightarrow).

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.

6 Algemene discussie en conclusies

6.1 Inleiding

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen zijn op veel plaatsen in Nederland aanwezig als verontreinigende stoffen in de bodem. Ter bepaling van mogelijke effecten die deze stoffen middels doorvergiftiging via bodemmacrofauna hebben op kleine predatore zoogdieren in de wilde fauna is een viertal studies uitgevoerd waarin huisspitsmuizen blootgesteld zijn aan PAK's. Ter vergelijking is een studie uitgevoerd naar de effecten van TCDD op deze diersoort. De effecten hiervan op lichaamsgewicht toename en orgaangewichten zijn bepaald. Ook zijn de effecten van blootstelling op verschillende specifieke resorufine O-dealkylases en testosteronhydroxylases gemeten. Dit is gebeurd met het oog op de selectie van een gevoelige biochemische effect parameter welke bepaald kan worden bij dieren uit de wilde fauna om eventuele effecten van blootstelling aan PAK's vast te stellen.

6.2 Bepaling van gevoeligheid van de huisspitsmuis voor TCDD

Ter vergelijking van de effecten van PAK's en TCDD is in één van de studies het effect van TCDD op de huisspitsmuis bepaald. Hieruit bleek dat de huisspitsmuis niet extreem gevoelig is voor TCDD. Een blootstelling (via het voer) aan 14 µg/kg lichaamsgewicht resulteerde niet in een reductie in de lichaamsgewichttoename of een reductie van de (relatieve) orgaangewichten. TCDD resulteerde in een ca. 7x inductie van de EROD activiteit. Dit komt overeen met de EROD inductie die in laboratoriummuizen waargenomen is na een éénmalige blootstelling aan een ca. 40 x lagere dosis.

6.3 Lichaamsgewicht

Blootstelling aan TCDD (5 dagen, 10 µg/kg in het voer) resulteerde niet in een significante afname van de groei. Een vijf dagen durende blootstelling aan 10 mg/kg BaP in het voer resulteerde wel in een significante reductie in de lichaamsgewicht toename over de periode van blootstelling (0.2 ± 0.4 g *afname* van lichaamsgewicht t.o.v. 0.4 ± 0.6 g *toename* in de controle groep). In een daarop volgende studie resulteerde een negen dagen durende blootstelling aan 6.6 mg/kg in het voer niet tot een significant effect op de lichaamsgewichttoename, terwijl een tien keer hogere blootstelling (ca. 66 mg/kg in het voer) wel resulteerde in een reductie van de lichaamsgewichttoename (0.9 ± 0.7 g *afname* van lichaamsgewicht bij 66 mg/kg en 0.3 ± 0.7 g *toename* in de controle groep).

Blootstelling aan een mengsel van negen PAK's (gedurende 21 dagen 9 of 90 mg/kg PAK in het voer; gelijke gewichtshoeveelheden -in beide blootstellingsgroepen

respectievelijk 1 en 10 mg/kg- van anthraceen, benzo[a]anthraceen, benzo[a]pyreen, chryseen, fluoranthreen, fluoreen, phenanthreen, peryleen en pyreen) resulteerde niet in een effect op de lichaamsgewichttoename. Ook een chronische (levenslange) blootstelling aan 90 mg/kg PAK in het voer resulteerde niet in een effect op de lichaamsgewichttoename. Uitgaande van de resultaten uit de eerste blootstellingstudie (hoofdstuk 2) waarin een blootstelling aan 10 mg/kg BaP in het voer wel resulteerde in een significante reductie van de lichaamsgewichttoename, zou een dergelijk effect ook verwacht worden in de dieren die blootgesteld zijn aan een mengsel van PAK's waarbij in de hoogste doseringsgroep de BaP concentratie in het voer eveneens 10 mg/kg bedroeg. Wel resulteerde een 21 dagen durende blootstelling aan 90 mg/kg PAK in het voer in een significante 15% afname van de dagelijkse voedselconsumptie (9.1 ± 0.5 g/dag t.o.v. 10.8 ± 0.1 g/dag in de controle groep). Deze verminderde voedselconsumptie resulteerde echter niet in een verminderde lichaamsgewichttoename. De gezamenlijke resultaten suggereren dat de LOAEC (lowest observed adverse effect concentration) voor reductie in lichaamsgewichttoename voor BaP 10 mg/kg in het voer bedraagt en dat er mogelijk een antagonistische werking uitgaat van andere PAK's op het effect van BaP op de lichaamsgewicht toename².

6.4 AROD

Uit de gezamenlijke resultaten van de studies waarin zowel EROD, MROD, PROD en/of BROD gemeten zijn blijkt dat in alle gevallen EROD de hoogste absolute activiteit vertoont. De gemiddelde controle activiteiten varieerden van 117 ± 65 (hfdst 4) tot 391 ± 125 pmol/min.mg (hfdst 2). Blootstelling aan TCDD (ca 10 µg/kg in het voer) resulteerde in een gemiddelde EROD activiteit van 3036 ± 752 pmol/min.mg.

Blootstelling aan PAK's resulteerde in een gemiddelde EROD activiteit die afhankelijk van de concentratie in het voer varieerde van 122 ± 53 (9 mg PAK/kg in voer) tot 907 ± 195 pmol/min.mg (90 mg PAK/kg in voer). MROD activiteiten in de controle groepen varieerden van 62 ± 8 tot 110 ± 14 pmol/min.mg. Blootstelling aan PAK's resulteerde, afhankelijk van de hoogte van de concentratie in het voer tot een gemiddelde MROD activiteit van 54 ± 42 tot 439 ± 73 pmol/min.mg (zie Fig. 6.1). De gemiddelde BROD activiteiten in de controle groepen bedroegen 17 ± 13 en 79 ± 94 pmol/min.mg. De gemiddelde PROD activiteiten lagen beduidend lager en bedroegen 2 ± 2 en 18 ± 3 pmol/min.mg.

Wanneer de mate van inductie beschouwd wordt, blijkt de MROD activiteit in alle studies het sterkst geïnduceerd te worden. Dit betekent dat MROD de meest reagerende parameter is om effecten van blootstelling aan PAK's te kunnen meten.

² De verschillen tussen de effecten van BaP in beide studies kunnen ook veroorzaakt zijn door verschillen in toediening. In de eerste studie waarin BaP alleen toegediend is, gebeurde dit in een deel van het voedsel dat dagelijks aangeboden werd. Het overige deel van het aangeboden voedsel was onbehandeld. In de studies waarin een mengsel van PAK's toegediend is, zijn de verontreinigingen opgenomen in de totale dagelijkse voedselhoeveelheid.

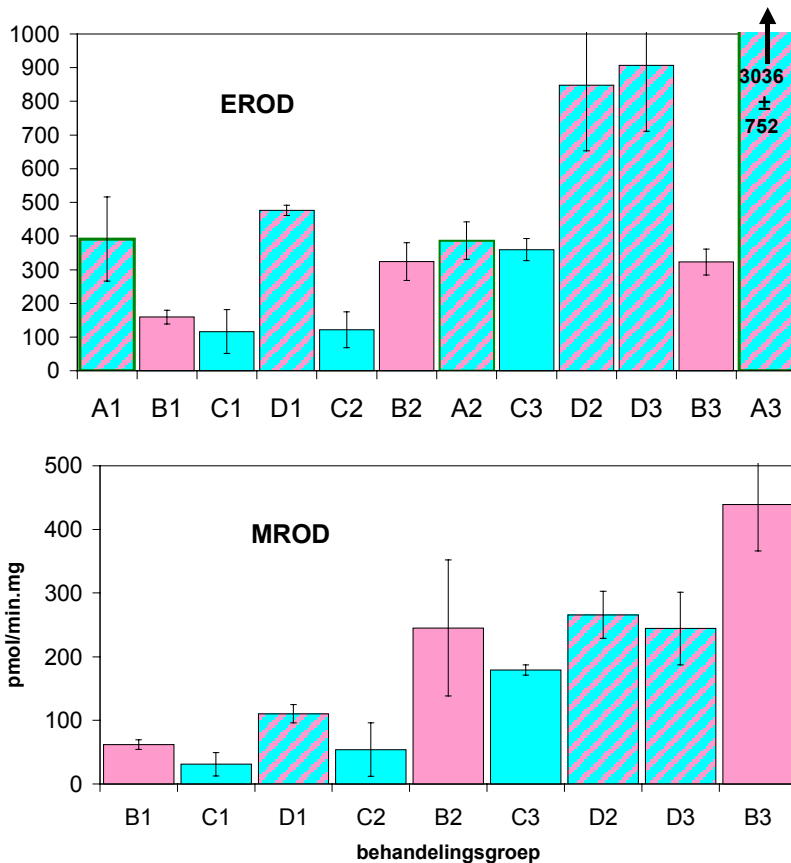


Fig. 6.1. Overzicht van de gemiddelde EROD (boven) en MROD (onder) activiteiten in de diverse studies. De behandelingsgroepen zijn geplaatst in volgorde van toenemende concentratie BaP equivalenten in het voer. Verklaring van de groepsaanduidingen: **A**: Adulten uit veld, m/v, n=6, 5 dagen; **1**=controle, **2**=BaP 10 mg/kg voer, **3**=TCDD 10 µg/kg voer. **B**: Adulten uit lab, v, n=3, 9 dagen; **1/2/3**=0, 6.6, 66 mg/kg voer. **C**: Adulten uit lab, m, n=3, 21 d; **1/2/3**=0, 9, 90 mg/kg voer. **D**: Adulten uit lab, m/v, n=3, 9 maanden; **1/2/3**=0, 90mg/kg vanaf lactatie, 90 mg/kg vanaf conceptie.

MROD gaf als enige van de geanalyseerde resosrufine O-dealkylases een significante dosis-effect relatie te zien wanneer alle blootstellingen uitgedrukt worden in benzo[a]pyreen equivalenten (BEQ). BEQ zijn uitgerekend op basis van benzo[a]pyreen EROD inductie equivalentie factoren (BEF) zoals beschreven in Bosveld et al. (in voorbereiding) (zie fig. 6.2 A). Wanneer deze omrekenfactoren toegepast worden op het mengsel van negen PAK's dat in de verschillende studies is toegedient, komt een blootstelling aan 9 of 90 mg/kg PAK in het voer overeen met respectievelijk 4.5 en 45 mg/kg BEQ in het voer. Analyse van de gezamenlijke resultaten van de verschillende studies laten voor EROD, PROD en BROD geen significante dosis-effect relatie zien. Voor deze drie dealkylases is een relatief lage activiteit gemeten in de groep die blootgesteld is aan aan 66 mg/kg BaP in het voer. Hierdoor wordt de aanvankelijke stijging van de activiteit niet doorgezet, zodat een lineaire regressie geen significante relatie oplevert (zie fig. 6.2 B). De gezamenlijke resultaten suggereren dat van de geanalyseerde resosrufine dealkylases MROD de meest geschikte biomarker is om eventuele effecten van blootstelling aan PAK's bij spitsmuizen uit de wilde fauna te detecteren. Het kan echter niet uitgesloten worden

dat de lage EROD, PROD en BROD activiteit bij een blootstelling aan 66 mg/kg in het voer veroorzaakt is door handelingen bij de bepaling van de enzymactiviteiten (bijvoorbeeld minder eiwit in reactiemengsel dan verondersteld). In dat geval berust de waargenomen daling op een artefact en is het onderscheid met MROD minder overtuigend

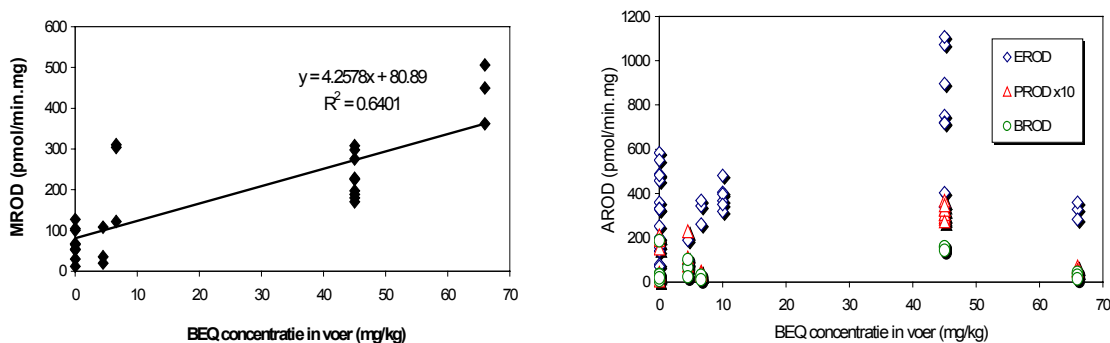


Fig. 6.2. Concentratie benzo[a]pyreen equivalenten in het voer in relatie met de microsomale MROD activiteit (grafiek A) of EROD, PROD en BROD activiteit (grafiek B) in aan BaP of een mengsel van PAK's blootgestelde huisspitsmuizen van verschillend geslacht en leeftijd.

6.5 Testosteron hydroxylase

Wanneer de absolute TH activiteiten in de verschillende behandelingsgroepen van de diverse studies beschouwd worden blijkt een zeer grote variatie in de microsomale TH activiteiten binnen de verschillende behandelingsgroepen aanwezig. Uit de gezamenlijke resultaten komt geen eenduidig beeld naar voren dat wijst op een consistente beïnvloeding van het testosteron metabolisme door PAK's. Wanneer de effecten van BaP op mannelijke huisspitsmuizen beschouwd worden (hfdst 3) blijkt wel een trend aanwezig waarbij een dosis afhankelijke inductie van de 6β -TH activiteit optreedt, ten koste van een reductie van de 2β -, 11α -, 15α - en 15β -TH activiteit. Door de grote spreidingen binnen de groepen zijn deze effecten echter niet significant. Een dergelijke trend is niet waar te nemen in de studie waarin vrouwelijke huisspitsmuizen blootgesteld zijn aan een mengsel van PAK's.

Beschouwing van de relatieve activiteiten (ratio tussen respons van specifieke HT en de gesommeerde responsen van alle HT's) geeft een geheel ander beeld te zien dan de absolute activiteiten. Blootstelling aan TCDD resulteert niet in een significante verschuiving in het hydroxyleringspatroon. De waargenomen daling in de absolute TH activiteiten zou mogelijk het specifieke gevolg kunnen zijn van de sterke inductie van EROD hetgeen ten koste gaat van de synthese van andere cytochroom P450 enzymen in deze dieren. Meer waarschijnlijk heeft de waargenomen daling een methodologische oorzaak. Blootstelling aan BaP in dezelfde studie resulteert niet in enig significant effect op EROD en resulteert ook niet in een verlaging van TH. In de studie waarin vrouwelijke huisspitsmuizen blootgesteld zijn aan BaP (hoofdstuk 3) resulteert dit wel in een significante dosis-afhankelijke wijziging in het testosteron

hydroxylerings patroon, waarbij het aandeel van de 6β -HT respons toeneemt en de responsen van 2β -, 11α -, 15α - en 15β -HT afnemen. Blootstelling van mannelijke huisspitsmuizen aan een mengsel van PAK's geeft een tegengestelde trend te zien waarbij het gemiddelde aandeel van de respons van 6β -HT afneemt en de respons van 2β -, 11α -, 15α - en 15β -HT toeneemt. Deze verschillen suggereren een geslachtsafhankelijke verschuiving van de TH patronen na blootstelling aan PAK's. De verschuiving in het hydroxylerings patroon zoals dat in de aan BaP blootgestelde vrouwelijke dieren optreedt, is eveneens waar te nemen in de vrouwelijke dieren die aan TCDD blootgesteld zijn. De mannelijke dieren uit deze blootstellingsstudie gaven geen significante verschuivingen van de patronen te zien. De trends waren echter vergelijkbaar met de veranderingen die bij de vrouwelijke dieren waargenomen zijn en bevestigen dus niet de waarnemingen uit de andere studies die een geslachtsafhankelijke verandering in het TH patroon suggereren.

Uit de gezamenlijke resultaten blijkt dat er geen eenduidige significante veranderingen in de absolute testosteron hydroxylase activiteit optreden na blootstelling aan de in de verschillende studies toegepaste doseringen van PAK. Testosteron hydroxylase activiteit lijkt geen geschikte biomarker om eenduidig effecten van blootstelling aan PAK's vast te stellen bij dieren uit de wilde fauna.

6.6 Voortplantingsorganen

In één van de studies is de histologie van de geslachtsorganen bestudeerd bij levenslang aan PAK (90 mg/kg in voer) blootgestelde en controle dieren. Door de geringe aantallen individuen van de beide geslachten zijn de resultaten van deze studie slechts indicatief. In het aan PAK's blootgestelde mannelijke dier werd een verhoogde mate van necrose in het tubulus epitheel aangetroffen en werden minder ronde spermatiden in de tubuli seminiferi aangetroffen. Het gemiddelde aantal spermatozoën dat in het lumen van de tubuli aanwezig was, was lager in het blootgestelde dier dan in het controle dier. De waargenomen effecten zouden kunnen duiden op een mogelijk verminderde vruchtbaarheid van het aan PAK's blootgestelde mannetje. Doordat slechts één individu uit de blootgestelde en de controle groep bestudeerd is, is het echter goed mogelijk dat de waargenomen verschillen te wijten zijn aan de normaal optredende interindividuele variatie binnen de soort en niet aan de blootstelling aan PAK's.

Bij de vrouwelijke dieren bleek alleen de histologische ovarium index (HOI = aantal artretische follikels / totaal aantal follikels) van het vanaf de conceptie tot negen maanden ouderdom blootgestelde dier significant verlaagd te zijn. Een dergelijke verlaging valt echter niet in verband te brengen met een nadelig effect op de voortplanting. Ook hier geldt echter dat de waargenomen effecten het gevolg van de interindividuele variatie kunnen zijn en niet het gevolg van de blootstelling aan PAK's.

6.7 LOEC's en extrapolatie's naar natuurlijke populaties

Uit de verschillende studies blijkt de inductie van MROD de sterkst reagerende van de beschouwde effectparameters. Bij een BaP concentratie in het voer van 6.6 mg/kg wordt een significant hogere activiteit waargenomen dan in ieder van de controlegroepen uit de verschillende studies. Wanneer PAK concentraties in bodemmacrofauna uit de uiterwaarden (Ma et al., 1998) omgerekend worden naar BaP equivalenten, worden concentraties tot ca. 0.3 mg BaP equivalenten/kg versgewicht aangetroffen. Hieruit blijkt dat de concentraties PAK zoals die in bodemmacrofauna in de uiterwaarden voorkomen lager zijn dan de LOEC voor inductie van MROD. Wanneer aangenomen wordt dat de onderzochte soort, de huisspitsmuis, model staat voor andere carnivore spitsmuissoorten (bijvoorbeeld de bosspitsmuis) en op een gelijkwaardige manier reageert op deze stoffen, suggereren de resultaten dat de PAK concentraties zoals die overwegend aanwezig zijn in uiterwaarden of vergelijkbare verontreinigde terreinen, geen effecten via het Ah receptor mechanisme veroorzaken. Hierbij dient echter rekening gehouden te worden met het feit dat naast PAK's nog tal van andere stoffen als verontreiniging aanwezig zijn en dergelijke effecten kunnen veroorzaken. Ook vallen effecten die veroorzaakt worden via een mechanisme anders dan langs de Ah receptor, niet uit te sluiten.

6.8 Conclusies

BaP (14 µg/kg lichaamsgewicht per dag) veroorzaakt bij huisspitsmuizen een afname van het lichaamsgewicht. Eenzelfde hoeveelheid BaP in combinatie met acht andere PAK's in gelijke hoeveelheden resulteert niet in een lichaamsgewicht afname, maar wel in een afname van de voedselopname.

Zowel BaP alleen als BaP in combinatie met acht andere PAK's is in staat de EROD, MROD, BROD en PROD activiteit in de lever te induceren. Van deze cytochroom P450 enzymen geeft EROD de hoogste absolute respons, en geeft MROD over het algemeen de hoogste mate van inductie te zien. De LOEC voor MROD inductie is 6.6 mg/kg voor BaP in het voer.

Blootstelling aan PAK's resulteert niet in een eenduidige respons op de TH activiteit. TH activiteit lijkt ongeschikt als biomarker voor de bepaling van effecten van PAK's in het veld.

Indicatief onderzoek naar de histologie van geslachtsorganen suggereert dat PAK's (ΣPAK 90 mg/kg in het voer) een effect kunnen hebben op de weefselstructuur in de testes en in de ovaria van spitsmuizen. De onderzochte aantallen dieren zijn echter te gering om hier definitieve uitspraken over te doen.

Literatuur

- Bagley, D.M. en J.R. Hayes, 1985. Neonatal phenobarbital imprinting of hepatic microsomal enzymes in adult rats: Modulation by neonatal testosterone presence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 79: 277.
- Bie, P.A.F. de, N.W. van den Brink, A.T.C. Bosveld. De ontwikkeling van de huisspitsmuis *Crocidura russula* in gevangenschap. Alterra intern rapport. Alterra Wageningen.
- Bjerke, D.L. en R.E. Peterson, 1994. Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male rats: Different effects of *in utero* versus lactational exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127: 241-249.
- Boon, J.P., P.J.H. Reijnders, J. Dols, P. Wensvoort and M.T.J. Hillebrand, 1987. The kinetics of individual polychlorinated biphenyl congeners in female harbour seals (*Phoca vitulina*), with evidence for structure-related metabolism. *Aquat. Toxicol.* 10:307-324.
- Bosveld, A.T.C., 1995. Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons on piscivorous avian wildlife. Ph.D. Thesis, Utrecht University, faculty of veterinarian sciences, Utrecht, The Netherlands. ISBN 90-393-0647-8
- Bosveld, A.T.C., P.A.F. de Bie, E. Jongepier, A. Klomp, N.W. van den Brink (*in voorbereiding*). In vitro EROD induction equivalency factors for PAHs and the derivation of TEFs for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands.
- Bosveld, A.T.C. en P.A.F. de Bie (*in voorbereiding*). Effecten van microverontreinigingen bij kleine zoogdieren in de Biesbosch. Alterra, Wageningen.
- Bosveld, A.T.C., C. Klok, J.M. Bodt en M. Rutgers, 2000. Ecologische Risico's van bodemverontreinigingen in toemaakdek in de gemeente De Ronde Venen. Alterra rapport nr 151. 94 p. Wageningen 2000.
- Bosveld, A.T.C. en A. van Kleunen, 1998. Biomarkers als graadmeters voor actuele ecologische risico's. . *IBN-DLO rapport* nr. 388, Wageningen. 71 p.
- Bosveld, A.T.C. en J. de Poorte, 1999. Risico's van bodemverontreinigingen in toemaakdek in de gemeente De Ronde Venen. Deel 1: Risico's voor de volksgezondheid en de landbouw. *IBN-DLO rapport 454*. 57 p.
- Broekhuizen, S., B. Hoekstra, V. van Laar, C. Smeenk en J.B.M. Thissen, 1992. Atlas van de Nederlandse zoogdieren. Sticht Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, Utrecht.

Brummelen, T.C. van, 1995. Distribution and ecotoxicity of PAHs in forest soil. proefschrift Vrije Universiteit, Amsterdam.

Brummelen, T.C. van, R.A. Verweij, S.A. Wedzinga en C.A.M. van Gestel, 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons in earthworms and isopods from contaminated forest soils. *Chemosphere*. 1996; 32 (2) 315-341.

Canters, K.F. and G.R. de Snoo, 1993. Chemical Threat to Birds and Mammals in The Netherlands. *Rev. Environ Contam Toxicol*. 130: 1-29.

Chemielinco, 1995. Nader bodemonderzoek baggerspecielokatie "Broekpolder" te Vlaarding. Tussentijds concept rapport Blok I; Inventarisatie en kartering.

Csaba, G., C. Karabelyos & J. Dallo, 1993b. Fetal and neonatal action of a polycyclic hydrocarbon (benzopyrene) or a synthetic steroid hormone (allylestrenol) as reflected by the sexual behaviour of adult rats. *Journal of Developmental Physiology* 19: 67-70.

Csaba, G. & A. Inczefti-Gonda, 1993a. Uterus estrogen receptors' binding capacity is reduced in rat if exposed by benzopyrene neonatally. *Journal of Developmental Physiology* 19: 217-219.

Drenth, H.J., W. Seinen & M. van den Berg, 1996. Effects of TCDD and PCB#126 on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. DIOXIN96, 16th Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, Amsterdam, The Netherlands, August 12-16, 1996. *Organohalogen Compounds* 29: 204-208.

Faber, J.H. & G.J.S.M. Heijmans, 1995. Ongepubliceerde gegevens IBN-DLO, Wageningen.

Gray Jr. L.E., W.R. Kelce, E. Monosson, J.S. Ostby & L.S. Birnbaum, 1995. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology* 131: 108-118.

Heida, H., K. Olie, 1985. TCDD and chlorinated dibenzofurans in top soil and biological samples from a contaminated refuse dump. *Chemosphere* 14: 919-924.

Hendriks A.J., W.C. Ma, J.J. Brouns, E.M. de Ruiter-Dijkman, R. Gast, 1995. Modelling and monitoring Organochlorine and Heavy Metal Accumulation in Soils, Earthworms, and Shrews in Rhine-Delta Floodplains. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 29: 115-127.

Janssen P.A.H., J.H. Faber & A.T.C. Bosveld, 1998. (Fe)male? How contaminants can disrupt the balance of sex hormones and affect reproduction in terrestrial wildlife species. IBN Scientific Contributions 13. 150 p. IBN-DLO, Wageningen.

Jongh J. de, M. de Vito, R. Nieboer, L. Birnbaum & M. van den Berg, 1995. Induction of cytochrome P450 isoenzymes after toxicokinetic interactions between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (HxCB) in the liver of the mouse. *In: de Jongh J.; Some toxicokinetic aspects of mixture interactions between polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and biphenyls (PCBs) in rodents. PhD thesis. Utrecht University. 1994.*

Junqueira, L.C., J. Carneiro & R.O. Kelley, 1996. Functionele histologie. 7^e druk. ISBN 90 6348 379 1. Elsevier/Bunge, Maarssen.

Kociba, R.J. & B.A. Schwetz, 1982. A review of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) with a comparison of the toxicity of other chlorinated dioxin isomers. Assoc. Food Drug Officials Quart. Bull. 46: 168.

Kociba, R.J., D.G. Keyes, J.E. Beyer, R.M. Carreon & C.E. Wade, 1978. Results of a two year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Chemosphere* 14: 649.

Kristensen, P., E. Eilertsen, E. Einarsdóttir, A. Haugen, V. Skaug & S. Øvrebø, 1995. Fertility in mice after prenatal exposure to benzo[a]pyrene and inorganic lead. *Environmental Health Perspectives* 103: 588-590.

Lorenzen, A., Kennedy, S.W., 1993. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* 214:346-348.

Lu, A.Y.H., 1979. Multiplicity of liver drug metabolizing enzymes. *Drug metabolism reviews* 10: 187-208.

Lu, P.Y., R.L. Metcalf, N. Plummer and D. Mandell, 1977. The environmental fate of three carcinogens: benzo[a]pyrene, benzidine and vinylchloride. Evaluated in laboratory model ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 6: 192-242

Ma, W.C., A.T.C. Bosveld, D.B. van den Brink, 2001. Schotse Hooglanders in de Broekpolder ? Analyse van de toxicologische risico's van de aanwezige bodemverontreiniging voor grote grazers. Alterra rapport nr. 260. Alterra Wageningen.

Ma, W.C., A. van Kleunen, J. Immerzeel & G.J. de Maagd, 1998. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: assessment of equilibrium partitioning theory in *in situ* studies and water experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(9): 1730-1737.

- Mabley, T.A., D.L. Bjerke, R.W. Moore, A. Gendron-Fitzpatrick & R.E. Peterson, 1992a. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114: 97-107.
- Mabley, T.A., R.W. Moore, R.W. Goy & R.E. Peterson, 1992b. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Effects on sexual behaviour and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114: 118.
- Mably, T.A., R.W. Moore & R.E. Peterson, 1992c. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Effects on androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114: 97-107.
- Parkinson, A. and S. Safe, 1981. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction and its relationship to the toxicity of halogenated aryl hydrocarbons. *Toxicol. Environ. Chem. Rev.* 4:1- (review).
- Pilotproject Krimpenerwaard, 1998. provincie Zuid Holland.
- Piskorska-Pliszczynska, J., B. Keys, S. Safe, M.S. Newman, 1986. The ytosolic receptor binding affinities and AHH induction potencies of 29 polynuclear aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.* 34:67-74.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43** (1):223-225.
- Safe, S., 1986. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26:371-399.
- Safe, S., 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *CRC Critical Reviews in Toxicology* 21: 51-88.
- Safe, S., 1991. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds: sources, environmental distribution and risk assessment. *Environ. Carcino. Ecotox. Revs.* c9:261-302.
- Safe, S., 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 24:87-149.
- Sanderson, J.T., D.M. Janz, G.D. Bellward & J.P. Giesy, 1996. Effects of embryonic and adult exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on hepatic microsomal testosterone hydroxylase activities in great blue herons (*Ardea herodias*). *DIOXIN96, 16th Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, Amsterdam, The Netherlands, August 12-16, 1996. Organohalogen Compounds* 29: 178-183.

- Schenkman, J.B., 1992. Steroid metabolism by constitutive cytochromes P450. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43: 1023-1030.
- Schneider, S.L., V. Alks, C.E. Morreal, D.K. Sinha & T.L. Dao, 1976. Estrogenic properties of 3,9-dihydroxybenz[a]anthracene, a potential metabolite of benz[a]anthracene. *Journal of the National Cancer Institute* 57: 1351-1354.
- Sloof, W., J.A. Janus, A.J.C.M. Matthijsen, G.K. Montizaan en J.P.M. Ros, 1989. Basisdocument PAK. RIVM rapport nr 758474007.
- Sloof, W., J.A. Janus, A.J.C.M. Matthijsen, G.K. Montizaan, J.P.M. Ros (eds), 1989. Basisdocument PAK. RIVM Rapport nr. 758474007. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven.
- Voogt, P. de & U.A.Th. Brinkman, 1989. Production properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: *Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphtalenes, Dibenzodioxins, and Related Products*, 2nd ed., R.D. Kimbrough and A.A. Jensen, Eds., Elsevier/North Holland, Amsterdam, The Netherlands.
- Waxman, D.J., A. Ko & C. Walsh, 1983. Regio selectivity and stereo selectivity of androgen hydroxylation catalyzed by cytochrome P450 isozymes purified from phenobarbital-induced rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 258: 11937-11947.
- Waxman, D.J., G.A. Dannan & F.P. Guengerich, 1985. Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: Age dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochem.* 24: 4409.
- Weiden, M.E.J. van der, F.H.M. Hanegraaf, M.L. Eggens, M. Celander, W. Seinen & M. van den Berg, 1994. Temporal induction of cytochrome P450 1A in the mirror carp (*Cyprinus carpio*) after administration of several polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 13(5): 797-802.
- Willet, K.L., P.R. Gardinali, J.L. Sericano, T.L. Wade, S.H. Safe, 1997. Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay for evaluation of environmental samples containing polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Arch. Environ Contam Toxicol* 32:442-448.
- Wood, A.W., D.E. Ryan, P.E. Thomas & W. Levin, 1983. Regio- and stereoselective metabolism of two C19 steroids by five highly purified and reconstituted rat hepatic cytochrome P-450 isoenzymes. *Journal of Biological Chemistry* 258: 8839-8847.

Afkortingen

3MC	3-methylcholanthrene
A1254	Arochlor 1254
AhR	Arylhydrocarbon receptor
AROD	Alkoxyresorufine O-dealkylase
BaA	Benzo[a]anthraceen
BaP	Benzo[a]pyreen
BROD	Alkoxyresorufine O-dealkylase
CYP	Cytochroom P450
Dex	Dexamethasone
DNA	Desoxyribo Nucleotide Acid
ECOD	Ethoxycoumarin O-dealkylase
EROD	Alkoxyresorufine O-dealkylase
Fb	Fenobarbital
HPLC	High performance liquid chromatography
HT	Hydroxytestosteron
in utero	in de baarmoeder
MROD	Alkoxyresorufine O-dealkylase
OM	Organische microverontreinigingen
P16 α C	Pregnenolone 16 α -carbonitril
PCB	Polychloorbiphenyl
PCDD	Polychloordibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDF	Polychloordibenzifuraan
PROD	Alkoxyresorufine O-dealkylase
RNA	Ribo Nucleotide Acid
TCDD	Tetrachloordibenzo- <i>p</i> -dioxine
TH	Testosteronhydroxylase
TRIS	tris[hydroxymethyl]aminmetaan

