

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

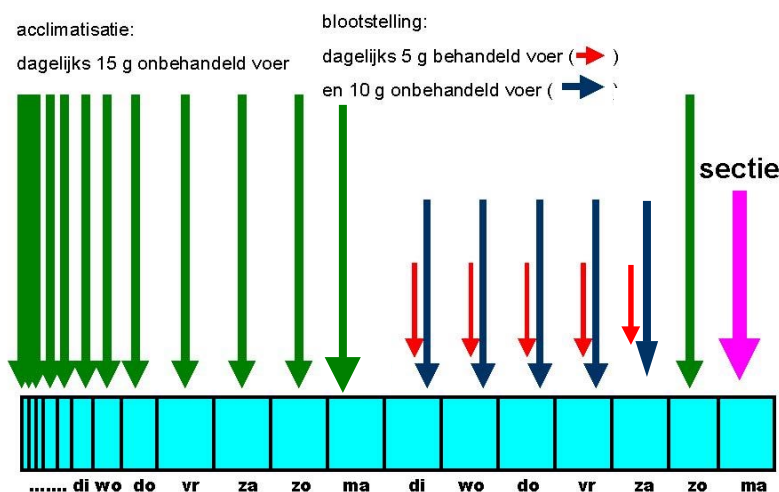


Fig. 2.1. Behandelingschema.

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 (gewicht-verhouding 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 µl microsomen, 75 µl NADPH (4.8 mM in milliQ), 10 µl testosteronoplossing (3.61 g/ml in methanol) en 340 µl fosfaatbuffer (50 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 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 µl interne standaard oplossing toegevoegd (11β-hydroxytestosteron 400 µg/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 µl 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 µm deeltjes) gekoppeld aan een LKB 2151 UV detector (254 nm) en een PE Nelson chromatograaf. 20 µl 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 (11β-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.

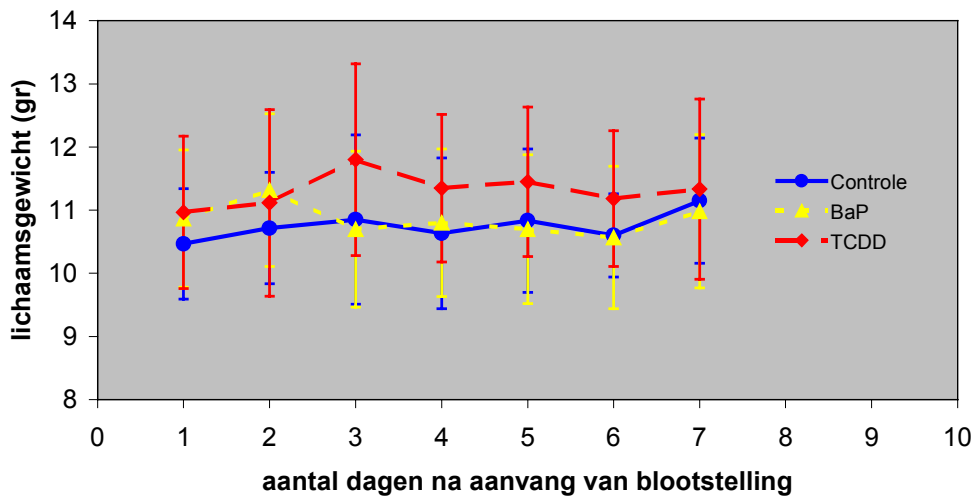


Fig. 2.2. Verloop van het gemiddeld (\pm standaarddeviatie) lichaamsgewicht voor de verschillende behandelingsgroepen over de blootstellingperiode.

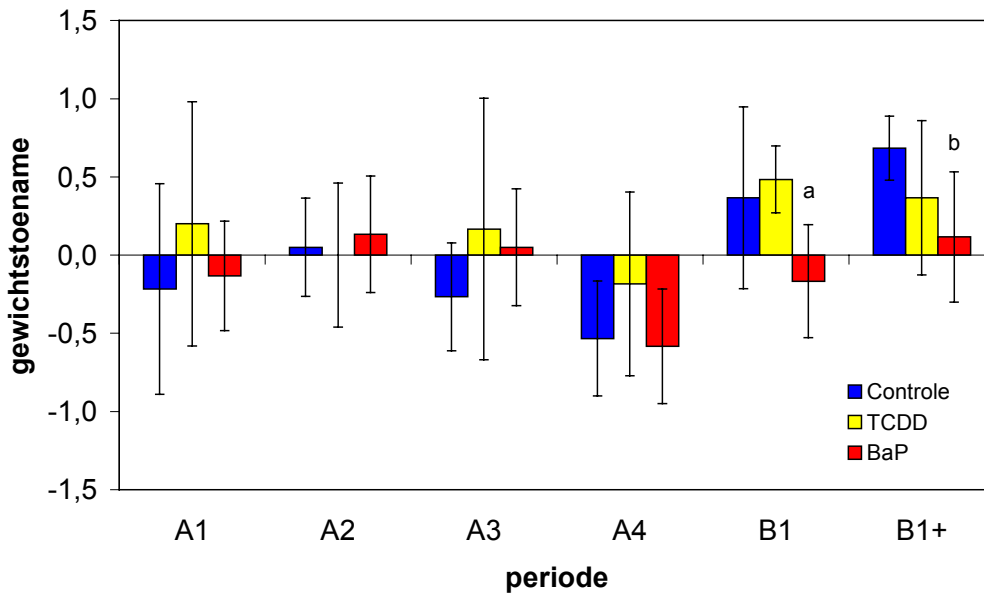


Fig. 2.3. Gemiddelde (\pm standaarddeviatie) lichaamsgewichtverandering over week 1-4 van de acclimatisatieperiode (A), en over de daarop volgende blootstellingperiode (B1 en B1+). Weergegeven is het verschil in lichaamsgewicht gemeten op maandag en de daaropvolgende vrijdag. Bij B1+ is het verschil 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).

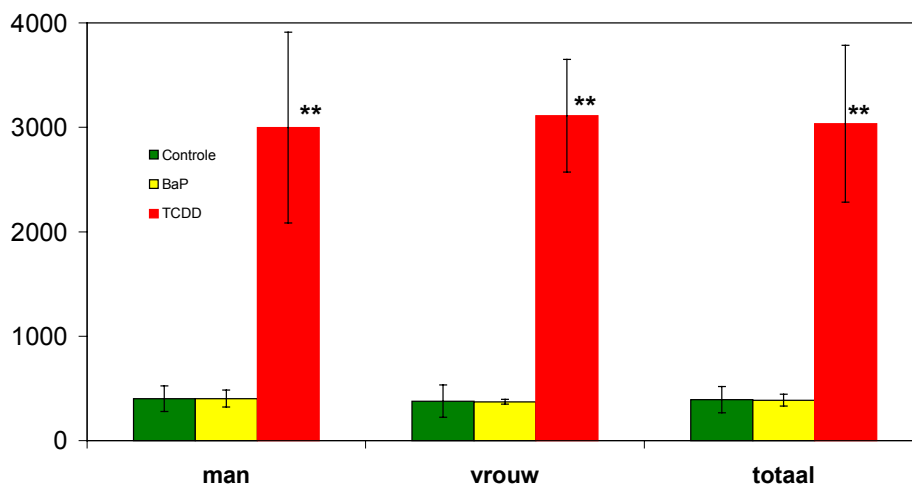


Fig. 2.4. Effecten van TCDD en BaP op de microsomale EROD activiteit. Significantie van verschil met de controlegroep is aangegeven met ** ($p < 0.00001$).

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.

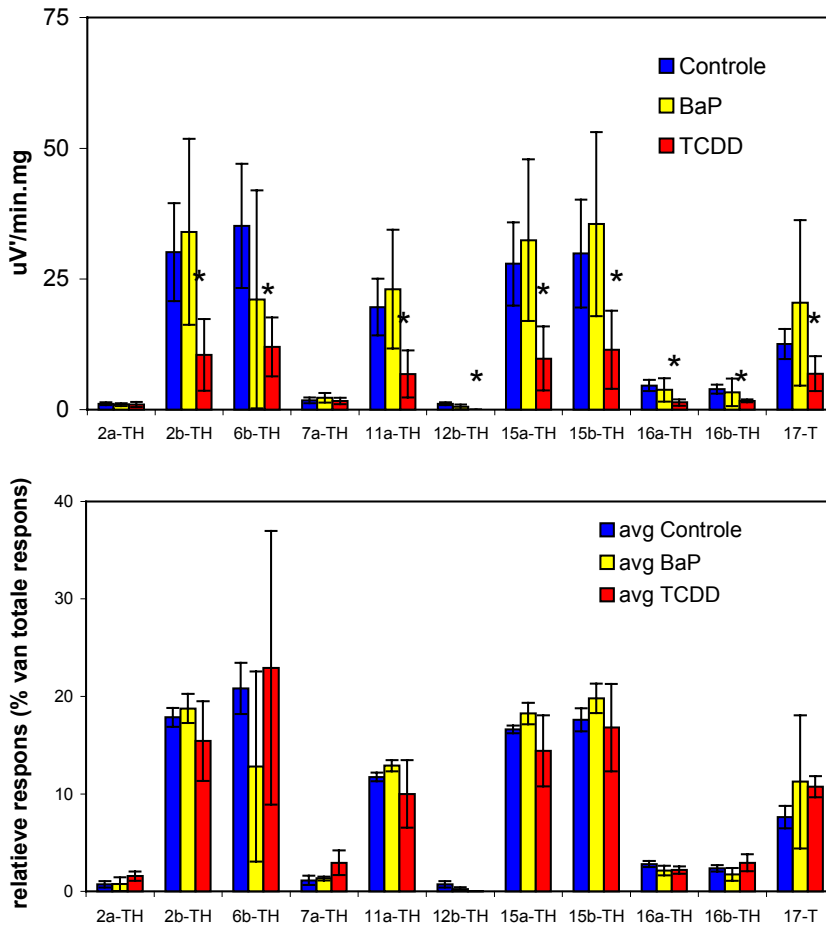


Fig. 2.5. Effect van BaP en TCDD op de absolute (boven) en relatieve (onder) testosteron hydroxylaseactiviteit in huisspitsmuizen (groepen van gemengd geslacht, $n=6$). Significantie van verschil met de controlegroep is aangegeven met * ($p < 0.05$).

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.