

Cytochrom P-450- und Lipidperoxid-vermittelte Aldrin-Epoxidation in hepatischen und extrahepatischen Geweben, frisch isolierten und kultivierten Zellen der Ratte

Doctoral Thesis

Author(s):

Gantner, Jean Jacques Daniel

Publication date:

1991

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000627392>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH Nr. 9592

**Cytochrom P-450- und Lipidperoxid-vermittelte
Aldrin-Epoxidation in hepatischen und
extrahepatischen Geweben, frisch isolierten und
kultivierten Zellen der Ratte**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
JEAN JACQUES DANIEL GANTNER
Dipl. Biochem. Universität Zürich
geboren am 27. Mai 1957
von Aarau und Grabs (SG)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. F. E. Würigler, Referent
Prof. Dr. G. Zbinden, Korreferent

Zürich 1991

ZUSAMMENFASSUNG

Die Oxidation von lipophilen Chemikalien ist ein wichtiger Schritt bei der Bildung von toxischen, mutagenen und karzinogenen Metaboliten bei Mensch und Tier. Zur Risikoabschätzung dieser Substanzen sollte auch die mutagene / karzinogene Wirkung in extrahepatischen Geweben bekannt sein. Mit dem "Granuloma Pouch Assay" (Maier, 1984), einem extrahepatischen *in vivo* Modell bei der Ratte kann dieser Nachweis in einem subkutanen Granulationsgewebe erbracht werden.

Für die Bildung reaktiver Metabolite sind oft die Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen verantwortlich. Die Aktivität dieser Enzyme ist in der Leber sehr hoch, während sie in den extrahepatischen Organen niedrig oder nicht nachweisbar ist. Für die Metabolisierung von Fremdstoffen in diesen Organen kommt als Alternative eine Kooxidation durch Peroxidasen in Frage. Die Prostaglandin H Synthetase und die Lipoxygenasen, Enzyme des Arachidonsäure-Metabolismus, sind in Säugergeweben ubiquitär verteilt. Diese Enzyme bilden aus Arachidonsäure Peroxide. Bei der Reduktion dieser Produkte durch Peroxidasen können Fremdstoffe über einen freien Radikalmechanismus oxidiert werden.

Die Epoxidation von Aldrin zu Dieldrin wurde zur Charakterisierung der metabolischen Oxidationskapazitäten in den extrahepatischen Geweben verwendet. Die tiefe Nachweisgrenze und die Möglichkeit sowohl Cytochrom P-450- als auch kooxidationsabhängige Epoxidation zu messen zeichnen diese Methode aus.

Zur Bestimmung der metabolischen Oxidationskapazitäten, wie sie in intakten Zellen vorherrschen, wurden anstelle von Organhomogenaten oder Mikrosomen frisch isolierte Zellen und Gewebestücke verwendet.

Beim Vergleich von Gewebestücken entsprach die Aldrin-Epoxidation in der Lunge 3.5%, in der Blase 0.6% und im subkutanen Granulationsgewebe 0.4% der Leberaktivität (100%). Im Vor- und im Drüsenmagen war keine Aktivität messbar. Die Beteiligung der Cytochrom P-450- und der kooxidationsabhängigen Aldrin-Epoxidation wurde durch Zugabe von Indomethacin und Arachidonsäure preferentiell unterschieden. In der Leber war die Aktivität vom Cytochrom P-450 abhängig. In der Blase, im Vor- und Drüsenmagen stimulierte Arachidonsäure die Dieldrinbildung. Dies ist ein Hinweis, dass die ungesättigte Fettsäure in diesen Geweben zu Peroxidradikalen metabolisiert wird.

Mit frisch isolierten Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass Zellen gegenüber Organstücken eine höhere Aldrin-Epoxidationsaktivität aufwiesen. Die Hepatozyten reagierten auf eine *in vivo* Enzym-Induktion mit Phenobarbital (1 Woche im Trinkwasser 1g/l). Der Cytochrom P-450 Gehalt in den Hepatozyten war verdreifacht, während die Aldrin-Epoxidationsrate nicht beeinflusst wurde. Die Cytochrom P-450 Konzentration in Hepatozyten von 5, 7 und 10 Wochen alten Tieren unterschieden sich nicht. Die Dieldrin-Bildungsrate in den Hepatozyten des 10 Wochen alten Tieres war

hingegen verdoppelt. Die Versuche zeigten auf, dass in den Hepatozyten Cytochrom P-450 Gehalt und Enzym-Aktivität nicht korrelieren müssen.

Beim Vergleich von Zellen betrug die Aldrin-Epoxidationsaktivität in der Lunge 0.004% und im subkutanen Granulationsgewebe 0.017% gegenüber Hepatozyten (100%). In Knochenmarkszellen war keine Aktivität nachweisbar. Mit Indomethacin konnte in den Zellen der Lunge und des subkutanen Granulationsgewebes eine kooxidative Aktivität gefunden werden. In den Zellen aller drei extrahepatischen Gewebe stimulierte Arachidonsäure die Epoxidationsrate. Dieser Effekt liess sich durch das Antioxidans BHA, den Lipoxygenase Inhibitor NDGA und das Serumprotein Albumin hemmen, jedoch nicht durch den Prostaglandin H Synthetase Inhibitor Indomethacin. Dies deutete auf die Beteiligung eines peroxidradikal-abhängigen Mechanismus an der Epoxidation des Aldrin in diesen extrahepatischen Zellen hin.

Aus diesem Grund wurde die Malondialdehyd-Bildung, als Marker der Lipidperoxidation untersucht. In den Zellen der Lunge und des subkutanen Granulationsgewebes korrelierten die Werte mit der Aldrin-Epoxidationsaktivität.

Mit der Messung der Lactatdehydrogenase (LDH) Freisetzung wurde geprüft, wieweit die Aldrin-Epoxidation von der Membranintegrität abhängig ist. 75µM und 100µM Arachidonsäure erhöhten die LDH-Freisetzung signifikant in Zellen der extrahepatischen Gewebe (subkutanen Granulationsgewebe, Lunge, Knochenmark). Durch die kombinierte Verwendung der Arachidonsäure mit den Inhibitoren der Arachidonsäure-Kaskade wurde gezeigt, dass diese Membranstörung direkt durch die Arachidonsäure verursacht werden konnte und deren Metabolisierung nicht nötig war. Diese erhöhte LDH-Freisetzung wurde durch Albumin (Konzentration 0.5%) gehemmt, ein Effekt der mit den Resultaten der Aldrin-Epoxidation korrelierte. Die kooxidative Dieldrinbildung ist deshalb von membranspezifischen Prozessen abhängig.

Die Kultivierung von Zellen erlaubte einzelne Parameter der *in vivo* Situation zu simulieren und deren Einfluss auf die oxidativen metabolischen Aktivitäten zu untersuchen. Hepatozyten in Kultur vermindern rasch den Cytochrom P-450 Gehalt. Die Kultivierung bei perivenösem Sauerstoff-Gehalt (4% O₂ in der Inkubatoratmosphäre) verbesserte die Erhaltung gegenüber periportalem (13% O₂ in der Inkubatoratmosphäre). Die Aldrin-Epoxidationsaktivität hingegen war bei beiden Inkubationsbedingungen gleich.

Serum (10% FCS) im Kulturmedium verminderte den Cytochrom P-450 Verlust in Hepatozyten, weshalb dessen Einfluss in extrahepatischen Zellen geprüft wurde. Nach drei Stunden Kulturdauer ohne FCS wurde in Zellen aus dem subkutanen Granulationsgewebe keine Aldrin-Epoxidationsaktivität mehr nachgewiesen, während die Kultur mit FCS keinen Aktivitätsabfall zeigte. Selbst nach einer Zellpassage befand sich die Aktivität noch im selben Bereich.

SUMMARY

The oxidation of lipophilic chemicals is an important step in the formation of toxic, mutagenic and carcinogenic metabolites in animals and man. For risk evaluation of such substances the mutagenic / carcinogenic effects in extrahepatic tissues should be known. With the "*Granuloma Pouch Assay*" (Maier, 1984), an extrahepatic *in vivo* model in the rat, this can be proven in a subcutaneous granulation tissue.

The formation of reactive metabolites is often attributed to cytochrome P-450-dependent monooxygenases. The content of this enzyme system is very high in the liver, whereas it is low or not detectable in extrahepatic organs. An alternative for the metabolism of xenobiotics in these organs is a cooxidation pathway mediated by peroxidases. Prostaglandin H synthetase and the lipoxygenases, enzymes of the arachidonic acid metabolism are ubiquitous in mammalian tissues. These enzymes form peroxides out of arachidonic acid. The reduction of these products by peroxidases allows the oxidation of xenobiotics through a free radical pathway.

The epoxidation of aldrin to dieldrin was used for the characterization of the metabolic oxidation capacity in extrahepatic tissues. The very low product recovery and the possibility to measure cytochrome P-450- as well as cooxidation-dependent epoxidation are the advantages of this method.

Investigations were carried out with freshly isolated cells and tissue pieces. This to mimic much better than with organ homogenate or microsomes the metabolic oxidation capacity of intact cells.

The comparison of tissue pieces by the aldrin epoxidation activity in reference to the liver (100%) were 3.5% in the lung, 0.6% in the urinary bladder and 0.4% in subcutaneous granulation tissue. In the fore- and glandular stomach the activity was below the detection level. The attribution of the cytochrome P-450- and the cooxidation-dependent aldrin epoxidation was distinguished by addition of indomethacin and arachidonic acid. The activity was dependent on cytochrome P-450 in the liver. In the bladder, in fore- and glandular stomach arachidonic acid stimulated the dieldrin formation. This demonstrated the metabolism of this unsaturated fatty acid to peroxy radicals in these tissues.

With freshly isolated hepatocytes it could be shown that cells in contrast to organ pieces had the higher aldrin epoxidation activity. The cells responded to an *in vivo* enzyme-induction with phenobarbital (1 week in drinking water 1g/l). The cytochrome P-450 content of the hepatocytes was threefold, whereas the aldrin epoxidation rate was not influenced. The cytochrome P-450 concentration in hepatocytes of 5, 7 and 10 weeks old animals showed no differences. The dieldrin formation of the hepatocytes from the 10 week old animal was doubled. The experiments show that in the hepatocytes cytochrome P-450 content and enzyme activity do not need to correlate.

In the extrahepatic cells of lung and subcutaneous granulation tissue the aldrin epoxidation activity was 0.004% and 0.017%, respectively, compared to hepatocytes (100%). In bone marrow cells the activity was not detectable. With indomethacin in the cells of the lung and the subcutaneous granulation tissue, a cooxidation-dependent activity could be demonstrated. In the cells of all three extrahepatic tissues, arachidonic acid stimulated the epoxidation rate. This effect was inhibited by the antioxidant BHA, the lipoxygenase inhibitor NDGA and the serum protein albumin, but not by the prostaglandin H inhibitor indomethacin. This demonstrates that a peroxy radical-dependent mechanism is involved in the epoxidation of aldrin in these extrahepatic cells.

For that reason malondialdehyde (MDA) formation as a marker of the lipidperoxidation was investigated. In the cells of the lung and the subcutaneous granulation tissue the MDA production correlated well with the aldrin epoxidation.

To clarify if the aldrin epoxidation is dependent of the membrane integrity, the lactat dehydrogenase (LDH) release from cells was measured. 75 μ M and 100 μ M arachidonic acid increased significantly the LDH-release in the cells of the extrahepatic tissues (subcutaneous granulation tissue, lung, bone marrow). The addition of both arachidonic acid and inhibitors of the arachidonic acid cascade proved that the membrane perturbation was directly induced by arachidonic acid and that their metabolism was not required. This increased LDH-release was inhibited by albumin (concentration 0.5%), an effect which correlated with the aldrin epoxidation. The cooxidation-dependent dieldrin formation is therefore dependent of membrane specific processes.

The cultivation of cells allows to simulate some parameters of the *in vivo* situation and to examine their influence on the oxidative metabolic activation. In culture, hepatocytes lose quickly the cytochrome P-450 enzymes. The cultivation at pericentral oxygen tension (4% O₂ in the incubator atmosphere) improved the cytochrome P-450 content in contrast to periportal (13% O₂ in the incubator atmosphere). Whereas the aldrin epoxidation activity showed no difference between these two oxygen tensions.

Serum (10% FCS) in culture medium reduced significantly the loss of cytochrome P-450 in hepatocytes. Because of that, the influence of FCS in extrahepatic cells was tested. After a culture time of 3 hours without FCS, in the cells of the subcutaneous granulation tissue no epoxidation activity was detectable, whereas in culture with FCS, the cells showed no reduction of the initial activity. Even after one cell passage the activity was in the same range.