

Musk xylene (MX)

Bioaccumulation, enzyme induction and developmental toxicity

Doctoral Thesis

Author(s):

Suter-Eichenberger, Regina

Publication date:

1999

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003836664>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH No. 13183

**Musk xylene (MX):
Bioaccumulation, enzyme induction
and developmental toxicity**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Regina Suter-Eichenberger

eidg. dipl. pharm.
born september 3rd, 1965
citizen of Beinwil am See (AG)
and Beromünster (LU)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner
PD. Dr. M. Schlumpf, co-examiner
Prof. Dr. W. Lichtensteiger, co-examiner

1999

1 SUMMARY

The use of scents is very old. Animal secrets, glands and other parts of organs with strong odor characteristics were first utilized for religious intentions and since antiquity also as remedies and fragrance ingredients. The odor of musk represents one of them. It mainly derives from glandular secrets of the musk deer which inhabits the Himalayas. Due to the enormous demand on natural musk, the number of animals was decreasing and finally had to be protected and replaced by other substances. Today synthetic musks are circulating, having just one property in common with the deer gland: the musky odor. There are neither similarities in chemical structure between natural and synthetic musk odorants nor between different synthetic musk groups. Musk compounds produced particularly by the industry belong to the groups of nitro musks (musk xylene (MX) and musk ketone (MK)), polycyclic musks (Galaxolide[®], Tonalide[®] and Celestolide[®]) and to a smaller extent to macrocyclic musks. In 1987 the worldwide production of synthetic musks amounted to about 7000 tons per year. From 1987 up to 1996 the demand for nitro musks was decreasing by 23 % to 12 %. At the same time the amount of polycyclic musks was increasing by up to 85 %. The decline in nitro musk production is mainly based on restrictions in the use of musk ambrette and on critical discussions about some environmental and toxicological characteristics of the nitro musks. In 1981, the occurrence of MX and MK was first reported in fish and mussels from the Tama river in Japan. In 1993, these two nitro musks were also detected in human breast milk and adipose tissue samples from Germany. Similar to some polyhalogenated compounds (pesticides, PCBs), nitro musks tend to bioaccumulate in fatty tissues, due to their lipophilic character and insignificant biodegradability. In contrast to the main human exposure route for polyhalogenated compounds which is oral uptake, nitro musks are absorbed percutaneously from perfumes and other cosmetics. Nitro musks deriving from detergents, reach the environment via waste water and sewage treatment plants and bioaccumulate in aquatic organisms. This second ecotoxicological route of exposure is oral and involuntary.

From studies investigating toxicity and carcinogenicity of MX in adult B6C3F1 mice and in adult Albino rats at rather high doses it was known that MX was inducing hepatic microsomal phase I (CYP1A2) and phase II enzymes in adult rats and CYP2B proteins

in adult mice. At that time nothing was known about possible effects on the offspring of exposed animals. Based on the lipophilicity of the compound one could assume that MX would reach the developing organism via placenta and milk. For this reason, we designed a developmental long term Long Evans rat model exposing the parent generation during at least 10 weeks according to OECD guideline for testing of chemicals in „one-generation reproduction toxicity study“ to relatively low MX concentrations, reflecting the more the naturally occurring situation.

In a first part (Suter-Eichenberger et al., 1998) we measured tissue concentrations of MX by GC-ECD in adult and developing Long Evans rats. 5-6 week old males and females were fed with MX-containing chow (0.001 g, 0.01 g, 0.03 g, 0.1 g MX/kg food pellets) for 10 weeks before mating. Treatment continued during pregnancy, birth and lactation. At 0.1 g MX/kg food, offspring at postnatal days 1 and 14 exhibited dose-dependent MX accumulations with 1/2-3/4 of adult female and 3-4 times adult male MX body fat levels. With a 0.1 g MX/kg diet the average MX intake is 7-8 mg/kg body weight per day. Milk levels were comparable to adult female adipose tissue values. Data indicate significant transplacental passage and exposure via maternal milk. In rats of both sexes fed with MX in adulthood, levels were highest in adipose tissue, in adrenal glands and ovary. Female tissue levels were 3.7-6.8 times higher as compared to male rats. This unexplained sex difference was absent in 14 day old offspring.

In a second part (Suter-Eichenberger et al., in press), 5-6 week old rats of both sexes were fed with MX containing chow (0.001 g, 0.01 g, 0.03 g, 0.1 g and 1.0 g MX/kg food pellets) corresponding to a daily intake of 0.07-0.08 mg MX/kg up to 70-80 mg MX/kg body weight. We found effects of MX on CYP1A1/1A2 enzyme and on CYP1A, CYP2B and CYP3A protein concentrations. MX induced CYP1A1/1A2 enzymes and proteins dose-dependently in adult and developing rats at postnatal day 1 and 14. The lowest effective maternal dose was 2-3 mg MX/kg/day. Western blot data of CYP2B and CYP3A proteins indicated the induction of both P450 enzyme proteins in developing rats at postnatal day 14 at the higher dose of 70-80 mg/kg/day. In contrast, CYP3A was found not to be induced in adult rats, indicating differential sensitivity to MX in development.

In a third part dealing with reproduction and reproductive outcome, the highest dose of 70-80 mg MX/kg, corresponding to 1.0 g MX/kg food pellets showed maternal toxicity and increased mortality of 14 day old rats by 48 % as compared to control group.

Additionally, 2 up to 14 day old rats had a decreased body weight, whereby male animals had been more affected. Dams exposed to 70-80 mg MX/kg in contrast, remained without any visible signs of health damage and toxicity, unless in pregnancy.

Our results in comparison with other studies showed, that depending on treatment period, developmental state, dose and application of MX, considerable qualitative and quantitative differences of a defined toxic response can result. Thus, our choice of study design becomes more important since it rather reflects the naturally occurring situation.

Recent studies demonstrated that an amine metabolite, produced by nitroreductases in the intestinal flora, and not MX itself was accountable for the induction of hepatic liver enzymes in mice. If this is also true for other investigated toxic effects must be further examined.

No data on amine metabolites in human tissues are available so far. Until now studies focused on photosensitivity and dermal reactions. Due to the lack of other appropriate toxicological data, it is not yet possible to fully assess human health risk. Therefore, also a recently published study on environmental risk assessment is deficient, since possible effects of MX metabolites measured in waste water have not been considered.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Die Verwendung von Duftstoffen ist uralt. Animalische Sekrete, Drüsen und andere Teile mit starken Geruchseigenschaften wurden zuerst für religiöse Zeremonielle und seit dem Altertum auch in Arzneimitteln und als Parfümstoffe verwendet. Einer dieser Stoffe ist Moschus. Es stammt hauptsächlich aus dem Drüsensekret des in den Hochtälern des Himalaya lebenden hirschartigen Moschustieres. Durch die grosse Nachfrage wurde sein Bestand stark dezimiert, und das Tier wurde unter Schutz gestellt, sodass ein Ersatz für das wohlriechende Drüsensekret gesucht werden musste. Heute werden synthetisch hergestellte Substanzen in Parfümen verwendet, die nur eine einzige gemeinsame Eigenschaft besitzen, nämlich ihren moschusartigen Geruch. Zwischen dem natürlichen und den synthetisch hergestellten Moschusduftstoffen, aber auch unter den verschiedenen chemischen Gruppen synthetischer Verbindungen bestehen chemisch keine strukturellen Ähnlichkeiten. Die von der Industrie heute verwendeten Moschusduftstoffe gehören zur Gruppe der sogenannten "Nitromoschuse" (Moschus-Xylool (MX) und Moschus-Keton (MK)) und zu den polyzyklischen Moschusstoffen (Galaxolide[®], Tonalide[®] und Celestolide[®]). In kleineren Mengen werden auch makrozyklische Moschusstoffe verwendet. 1987 wurden weltweit ungefähr 7000 Tonnen synthetischer Moschusverbindungen produziert. Von 1987 bis 1996 hat der Verbrauch von Nitromoschusduftstoffen um ungefähr 23 % auf 12 % abgenommen. Gleichzeitig erhöhte sich aber die Menge verbrauchter polyzyklischer Verbindungen um den gleichen Prozentsatz auf 85 %. Die Abnahme der Nitromoschusproduktion lässt sich einerseits auf ein Anwendungsverbot von Moschus-Ambrette zurückführen, andererseits stellten sich immer mehr Fragen zum toxikologischen Verhalten und der Umweltverträglichkeit der übrigen Nitromoschusstoffe. 1981 wurden MX und MK zum ersten Mal in Fischen und Muscheln aus dem Tama Fluss in Japan nachgewiesen. 1993 erfolgte auch der Nachweis in Muttermilch und Fettgewebeproben aus Deutschland. Es zeigte sich, dass sich Nitromoschusverbindungen aufgrund ihres lipophilen Charakters und ihrer schlechten Abbaubarkeit in lipidreichen Geweben anreichern. Auf die gleiche Weise akkumulieren auch polychlorierte Kohlenwasserstoffe (Pestizide, PCBs). Im Gegensatz zu diesen Verbindungen, die vor allem über die Nahrungskette aufgenommen werden, gilt für Nitromoschusduftstoffe die dermale Absorption nach

Gebrauch von Parfümen und anderen Kosmetika als Hauptkontaminationsweg. Nitromoschusduftstoffe enthaltende Wasch- und Reinigungsmittel erreichen die Umwelt über Abwässer und Kläranlagen und reichern sich in aquatischen Organismen an. Diese zweite ökotoxikologische wichtige Art der Exposition erfolgt peroral und ist vom betroffenen Individuum nicht gewollt.

Von Studien über akute und chronische Toxizität und Karzinogenität von hochdosiertem MX in adulten B6C3F1 Mäusen und Albino Ratten war bekannt, dass MX hepatische Phase I (CYP1A2) und Phase II Enzyme in adulten Ratten und CYP2B Proteinkonzentrationen in adulten Mäusen zu induzieren vermag. Zu diesem Zeitpunkt lagen keine Untersuchungen zu möglichen Effekten in Nachkommen von behandelten Tieren vor. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften wäre es jedoch möglich, dass MX via Plazenta und Muttermilch in den sich entwickelnden Organismus gelangt. Aus diesem Grund exponierten wir gemäss einer OECD Richtlinie für das Testen von Chemikalien in einer „1-Generationen Reproduktionstoxizitätsstudie“ Long Evans (LE) Ratten während mindestens 10 Wochen relativ tiefen MX-Konzentrationen.

In einem ersten Teil wurden MX Gewebekonzentrationen in adulten Ratten und ihren Nachkommen mittels GC-ECD Analyseverfahren gemessen. 5-6 Wochen alte weibliche und männliche Ratten erhielten MX enthaltende Futterwürfel (0.001 g, 0.01 g, 0.03 g, 0.1 g MX/kg Futter) während mindestens 10 Wochen vor der Verpaarung, während der Schwangerschaft, Geburt und Laktation. 1 Tag und 14 Tage alte Nachkommen zeigten eine dosisabhängige Anreicherung im Fettgewebe (Suter-Eichenberger et al., 1998), wobei Konzentrationen erreicht wurden, welche 1/2-3/4 so hoch wie in adulten weiblichen, und 3-4 mal so hoch wie in adulten männlichen Ratten waren. Milchwerte waren vergleichbar mit Fettgewebekonzentrationen von weiblichen adulten Tieren. MX überwindet problemlos die Plazentarschranke und wird auch in die Milch sezerniert. Nach chronischer Fütterung mit 0.1 g MX/kg, entsprechend einer täglichen Aufnahme von 7-8 mg MX/kg, wurden in adulten weiblichen und männlichen Ratten höchste Konzentrationen im Fettgewebe, in der Nebenniere und im Ovar gefunden, wobei Gewebekonzentrationen von Weibchen 3.7-6.8 mal höher waren als diejenigen von männlichen Tieren. Diese Sexdifferenz in der Fett und Gewebeakkumulation von MX war in 14 Tage alten Nachkommen (noch) nicht vorhanden.

In einem zweiten Teil der Studie wurden 5-6 Wochen alte Ratten beiderlei Geschlechts wiederum über die gleiche Zeitspanne mit MX enthaltendem Futter (0.001 g, 0.01 g,

0.03 g, 0.1 g und 1.0 g/kg Futter) behandelt, was einer täglichen MX Aufnahme von 0.07-0.08 mg MX/kg bis 70-80 mg MX/kg entspricht. MX induzierte CYP1A1/1A2 Enzyme und Proteine dosisabhängig in adulten Tieren und in deren 1 Tag und 14 Tage alten Nachkommen. Die tiefste noch effektive mütterliche Dosis betrug 2-3 mg/kg/Tag. Western Blots zeigten eine Induktion von CYP2B und CYP3A Proteinen in 14 Tage alten Ratten nach einer mütterlichen Dosis von 70-80 mg/kg/Tag, dagegen wurde in adulten Tieren bei der gleichen MX Dosierung nur eine Induktion von CYP2B Proteinen gefunden. In der Entwicklung stehende Ratten zeigen gegenüber MX eine im Vergleich zu erwachsenen Tieren unterschiedliche Sensitivität.

In einem dritten Teil wurde gezeigt, dass eine tägliche Dosis von 70-80mg MX/kg, entsprechend 1.0 g MX/kg Futter, die Mortalität von 14 Tage alten Ratten um 48 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte. 2 bis 14 Tage alte Ratten wiesen auch ein vermindertes Körpergewicht auf, wobei männliche Tiere stärker davon betroffen waren. Die Muttertiere dagegen zeigten bei dieser MX Konzentration keine sichtbaren Gesundheitsprobleme. Die beobachteten Gewichtsunterschiede bei den MX exponierten Tieren lassen jedoch eindeutig auf eine maternale Toxizität schliessen.

Vergleiche mit Resultaten anderer Studien zeigen, dass durch die Behandlungsdauer und den Entwicklungszustand des Tieres, wie durch die Konzentration der Fremdsubstanz und ihre Applikationsart beträchtliche qualitative und quantitative Unterschiede bezüglich definierter toxischer Effekte entstehen. Wir wollten ein Entwicklungsstudien-Modell, welches die Umweltsituation am besten widerspiegelt und somit aussagekräftigere Resultate erzielt.

Kürzlich durchgeführte Studien zeigten, dass nicht MX, sondern ein Aminmetabolit, welcher durch Nitroreduktasen in der Darmflora gebildet wird, für die Induktion von hepatischen Leberenzymen in Mäusen verantwortlich ist. Inwiefern dies auch für andere nachgewiesene Effekte und für andere Spezies zutrifft, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Bis anhin wurden keine Metabolitenmessungen im Menschen durchgeführt. Studien im Menschen konzentrierten sich bis anhin auf dermale Phototoxizitätseffekte und andere Hautreaktionen. Da weitere, aufschlussreiche toxikologische Studien fehlen, oder keinen Bezug auf MX Metaboliten nehmen, wie eine kürzlich zu MX publizierte Umweltrisikoaabschätzung zeigt, ist es im Moment nicht möglich eine abschliessende Risikoabschätzung für den Menschen vorzunehmen.