

Effekt af strøelse på leverens Cytochrom P-450 system i mus

Af Jesper B. Nielsen¹), Ole Andersen²) & Per Svendsen¹)

INTRODUKTION

I Danmark har der hidtil primært været anvendt strøelse fremstillet af bøgetræ til underlag for mindre gnavnere. En ny strøelsestype fremstillet af en blanding af fyr og gran er imidlertid blevet introduceret på markedet.

Under rutinemæssig anæstesi af mus observerede laboranter på Biomedicinsk Laboratorium, at der skulle anvendes en større dosis pentobarbital end tidligere for at opnå anæstesi. Den eneste sandsynlige forklaring på denne observation var, at man i dyreafdelingen var begyndt at anvende den ny type strøelse i stedet for strøelse fremstillet af bøgetræ.

Tidligere er det vist, at den pentobarbital inducerede søvntid hos mus og rotter nedsættes, når strøelse fremstillet af majskolber eller bøgetræ erstattes med cedertræsstrøelse (Ferguson 1966, Vesell 1967). Denne ændring skyldes induktion af leverens cytochrom P-450 enzymer (Wade et al. 1968, Sabine 1975). Det inducerende stof er for cedertræsstrøelsens vedkommende cedren (Wade et al. 1968), og det er vist, at inhalation af cedren medfører induktion af cytochrom P-450 systemet (Hashimoto et al. 1972). Fjernelse af det inducerende stof fra strøelsen ved autoclave-

ring er ikke mulig (Cunliffe-Beamer et al. 1981).

Effekten af de nye strøelsestyper fremstillet af fyr og gran på aktiviteten af leverens cytochrom P-450 enzymer er undersøgt i udavlede Bom:NMRI mus.

MATERIALER OG METODER

Forsøgsdyr og miljø

Alle eksperimenter er udført med 7-8 uger gamle udavlede SPF mus (Bom:NMRI) holdt i velventilerede dyrerum (20 luftskift pr. time). Temperaturen var $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ og den relative fugtighed $55\% \pm 5\%$. Lysforholdene var 12 timers alternerende lys/mørke perioder med $1/2$ times skumring. Musene fik føde ad libitum (Rostock mixture, K.F.K., Viby J., Danmark) og havde permanent adgang til vand. Dyrene blev holdt i standard type III bure (max. 12 dyr) eller i standard type II bure (max. 6 dyr). Bure og strøelse blev skiftet 2 gange om ugen.

Strøelsesmaterialer

Musene er født og opvokset i bure med bøgetræsstrøelse (Mørkøv Savværk, 4440 Mørkøv, Danmark). Nogle mus er imidlertid født og opvokset i bure med vasket, tørret og autoklaveret strandsand. To strøelsesfabrikater, begge fremstillet af en blanding af fyrretræ og grantræ, blev undersøgt. Det ene produkt (Hahn & Co., Kronsburg, 2371 Brendebek, Vesttyskland) var varme-

¹) Biomedicinsk Laboratorium, Odense Universitet, DK-5230 Odense M., Danmark.

²) Afdelingen for Miljømedicin, Odense Universitet, DK-5230 Odense M., Danmark.

tørret og derefter gennemblæst med luft. Den anden type (Spanvall A/S, 4534 Hørve, Danmark) var kun tørret. Bure med forskelligt strøelsesmateriale var placeret i forskellige dyrerum. Alle strøelsesprodukterne inkluderende et tredje fyr/gran produkt (Rettenmeier, D-7091 Holzmühle, Vesttyskland) og et majs-kolbeprodukt (The Andersons, Maumee, Ohio 43537, U.S.A.) blev analyseret for indhold af flygtige organiske forbindelser.

Analysemetoder

Enzymaktiviteten i museleverne blev bestemt ved måling af deethyleringen af p-nitrophenetol (modificeret efter Konat & Clausen 1971). Total protein blev bestemt ved brug af Lowry's metode (Lowry et al. 1951) under anvendelse af bovint serum albumin som standard. Enzymaktiviteterne er udtrykt i $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ mikrosomalt protein.

Ekstraktion fra strøelsesmaterialerne blev udført med diethylæter. De afvejede prøver (4–5 g) ekstraheredes i 1 time i 20 ml diethylæter. De inddampede æterekstrakter blev analyseret og identificeret ved anvendelse af gaschromatografi og massespektrometri.

Eksposering af mus med det i strøelsen identificerede stof skete i et inhalationskammer. Eksposeringen pågik i 4 døgn ved gennemblæsning af kammeret med en luft/inducerblanding (10 l/min).

Søvntiden som følge af en intraperitoneal injektion af 60 mg/kg pentobarbital blev defineret som tiden fra injektionen til det tidspunkt, hvor musen kunne udføre koordinerede gangbevægelser.

RESULTATER

Bøgetræsstrøelses induktive effekt

Enzymaktiviteterne i leveren hos mus holdt på henholdsvis bøgetræsstrøelse og rensset, autoklaveret strandsand er sammenlignet. Resultaterne ses i Tabel I og viser ingen signifikant forskel (Student's t-test) imellem grupperne. Det konkluderes,

Table I. Activity of cytochrome P-450 enzymes of Bom:NMRI mice kept on either sand or beechwood bedding.

	Enzyme activity \pm n	
	1 s.e.m.	
	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$	%
Beechwood	0.943 ± 0.042	104 21
Sand (control)	0.907 ± 0.035	100 31

$$t = 0.5$$

$$p < 0.7$$

at strøelse fremstillet af bøgetræ ikke virker inducerende på leverens cytochrom P-450 enzymer. Derfor anvendes dette strøelsesmateriale som kontrolstrøelse i følgende eksperimenter.

Nåletræsstrøelses induktive effekt

Enzymaktiviteten i leveren hos mus holdt på henholdsvis bøgetræsstrøelse og nåletræsstrøelse er sammenlignet. Eftersom ingen kønsforskel i enzymaktiviteterne kunne observeres, samles resultater fra hanmus og hunmus under ét.

Alle mus blev født og holdt på bøgetræsstrøelse. I en alder af 7 uger blev en gruppe flyttet til bure indeholdende nåletræsstrøelse. I den eksperimentelle periode på 60 dage blev grupper på 10 mus (5 hanner og 5 hunner) undersøgt på dag 1, 2, 3, 4,

ENZYME ACTIVITY (% OF CONTROLS)

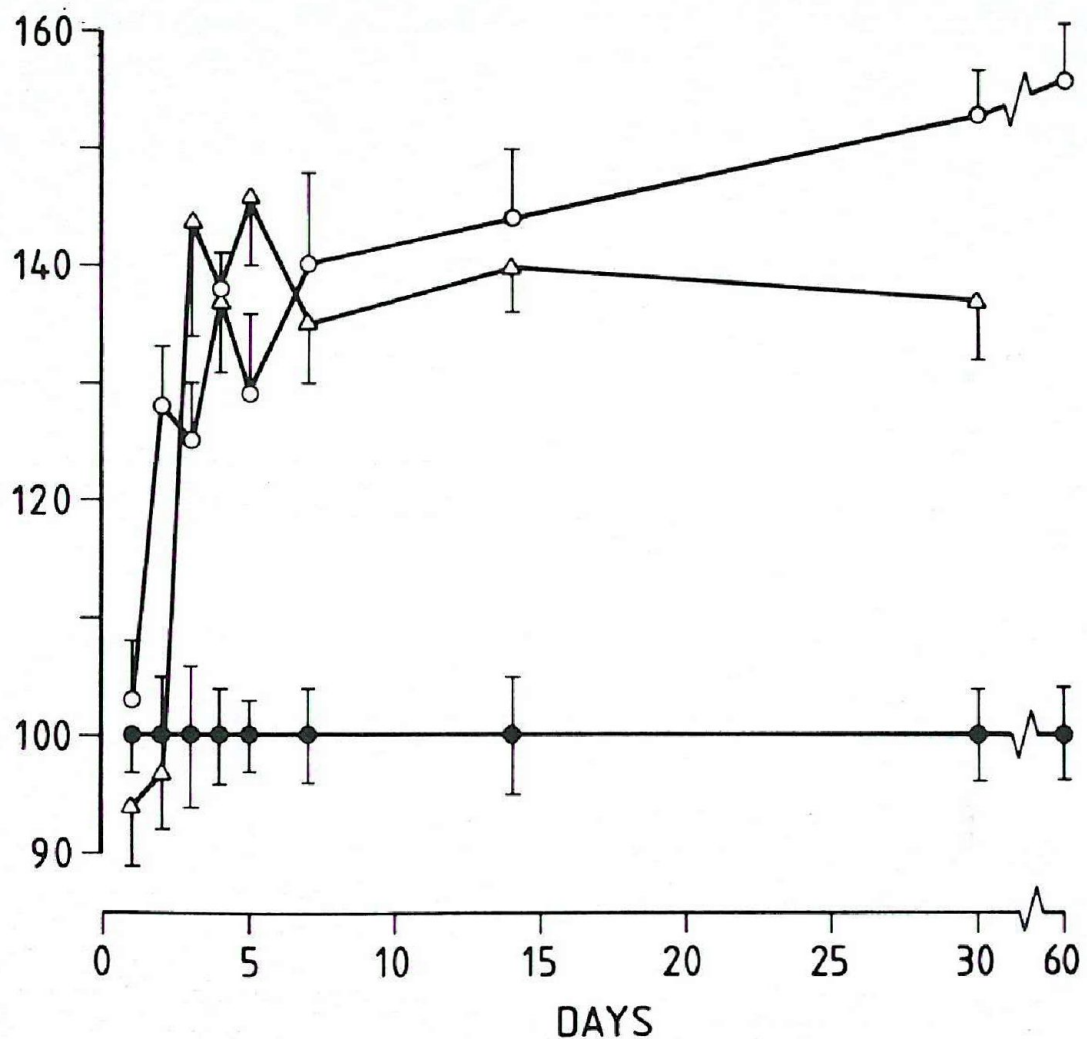


Figure 1. Degree of induction as a function of period (days) for outbred mice (Bom:NMRI) with softwood bedding (type A and B) as inducers. Enzyme activities are expressed in percent of enzyme activities of mice which have lived on beechwood bedding and stated as mean \pm 1 s.e.m.

- : softwood induced mice (type B bedding)
- △: softwood induced mice (type B bedding)
- : controls (beechwood bedding type D)).

5, 7, 14, 30 og 60. Kontrolgruppen forblev på bøgetræsstrøelse igennem hele den eksperimentelle periode, og 6 mus (3 hanner og 3 hunner) blev undersøgt samtidig med de tilsvarende mus fra den eksperimentelle gruppe.

Resultaterne ses i Figur 1. De viser, at begge strøelsesfabrikater fremstillet af nåletræ inducerer enzymerne

til et niveau på omkring 140 % af kontrolniveauet. Ingen signifikant forskel i enzyminduktionen mellem de to nåletræsprodukter kunne observeres.

Analyse af strøelsesprodukter

Monoterpenen α -pinén blev identificeret i 3 nåletræsprodukter, me-

Table II. α -pinene content in 5 bedding products determined by gaschromatography and mass-spectrometry after diethylether extraction.

Product	Bedding material	Conc. p.p.m.
Type A (batch 1)	spruce/pine	11.9
Type A (batch 2)	— —	3.8
Type B	— —	4.8
Type C	— —	3.6
Type D	beechwood	< 0.02
Type E	corncob	< 0.02

Type A: Hahn & Co., Kronsburg 2371 Bredenbek, West-Germany
 Type B: Spanvall A/S, 4534 Hørve, Denmark
 Type C: Rettenmeier, D-7091 Holzmühle, Vesttyskland
 Type D: Mørkøv Savværk, 4440 Mørkøv, Danmark
 Type E: The Andersson, Maumee, Ohio 43537, USA.

dens den ikke kunne detekteres i strøelse fremstillet af bøgetræ eller majskolber (Tabel II).

Eksposering af mus med α -pinén

Resultatet i Tabel III viser en signifikant forøgelse af cytochrom P-450 enzym aktiviteten (Student's t-test) i leveren hos mus eksponeret med α -pinén via det respiratoriske system i forhold til cytochrom P-450 enzymaktiviteten hos mus holdt på bøgetræsstrøelse.

Table III. Activity of cytochrome P-450 enzymes of mice (Bom: NMRI) either exposed to α -pinene through an inhalation chamber for 4 days or permanently kept on beechwood bedding.

	Enzyme activity \pm 1 s.e.m.		p (beechwood)	n
	μ mol/min/g protein	%		
α -pinene	1.895 \pm 0.112	201	0.001	4
Beechwood	0.943 \pm 0.042	100		21

Pentobarbital induceret søvntid

Den pentobarbital inducerede søvntid blev bestemt hos mus eksponeret 2 uger med nåletræsstrøelse og sammenlignet med søvntiden hos mus holdt permanent på bøgetræsstrøelse. Resultaterne i Tabel IV viser en sig-

Table IV. Sleeping times after treatment with pentobarbital (60 mg/kg i.p.) for mice kept on softwood and beechwood beddings respectively.

	Sleeping times \pm 1 s.e.m. (min)	n
Softwood	50 \pm 5	12
Beechwood	80 \pm 10	12

t = 2.0
 p < 0.05

nifikant kortere søvntid (Student's t-test) for mus eksponeret for nåletræ i forhold til mus holdt på bøgetræsstrøelse.

DISKUSSION

Metaboliseringen og udskillelsen af mange fremmedstoffer i organismen sker via leverens cytochrom P-450 enzymer. Effekten (toxiciteten) af disse stoffer er derfor afhængig af P-450 enzymernes aktivitet. Af samme grund kan resultater opnået med inducerede dyr ikke direkte sammenholdes med resultater fra ikke-inducerede dyr.

Det naturligt forekommende stof, α -pinén, er i denne undersøgelse isoleret fra strøelse fremstillet af nåletræ, hvorimod det ikke kunne identificeres i strøelse fremstillet af bøgetræ eller majscolber. Det er vist, at α -pinén gennem det respiratoriske system virker inducerende på leverens cytochrom P-450 enzymer.

Induktion af leverens cytochrom P-450 enzymer på grund af nåletræsstrøelse resulterer i en 40–60 % forøgelse i 0-deethylase aktiviteten hos mus. Det betyder, at alle stoffer, der undergår en 0-deethylering, vil blive metaboliseret med en højere hastighed end normalt. Da substratspecificiteten af cytochrom P-450 enzymerne er bred, vil metaboliserings-hastigheden via andre reaktioner sandsynligvis også være forhøjet.

Den toksikologiske betydning af enzyminduktionen er illustreret gennem den 40 % nedsatte søvntid i mus som følge af intraperitoneal administrering af 60 mg/kg pentobarbital.

Som afslutning på undersøgelsen må det konkluderes, at strøelse indeholdende α -pinén ikke bør anvendes i eksperimenter involverende metabolisering via leverens cytochrom P-450 enzymer.

References

Cunliffe-Beamer, T. L., L. C. Freeman & D. D. Myers: Barbiturate sleep-time in mice exposed to autoclaved or unautoclaved wood beddings. *Lab. Animal. Sci.* 1981, 31, 6: 672–675.

Ferguson, H. C.: Effect of red cedar chip bedding on hexabarbital and

pentobarbital sleeptime. *J. Pharmacol. Sci.* 1966, 55, 1142–1143.

Hashimoto, M., D. C. Davis & J. R. Gillette: Effect of different routes of administration of cedrene on hepatic drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 1972, 21, 1514–1517.

Konat, G. & J. Clausen: The activity of cytochrome P-450 complex in multiple intoxications of the mouse. *Environment. Physiol.* 1971, 1, 72–76.

Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr & R. J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265–275.

Sabine, J. R.: Exposure to an environment containing the aromatic red cedar, *juniperus virginiana*: Procarcinogenic enzyme-inducing and insecticidal effects. *Toxicol.* 1975, 5, 221–235.

Vesell, E. S.: Induction of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of mice and rats by softwood bedding. *Sci.* 1967, 157, 1057–1058.

Wade, A. E., J. E. Holl, C. C. Hillard, E. Molton & F. E. Greene: Alterations of drug metabolism in rats and mice by an environment of cedarwood. *Pharmacol.* 1968, 1, 317–328.

Summary

The effect of softwood bedding (mixture of spruce and pine chippings) on the cytochrome P-450 enzymes in outbred Bom:NMRI mice has been examined. Following three days of exposure to softwood bedding the enzyme activity increases to approximately 140% of the activity of mice exposed to pure sand or beechwood bedding. The enzyme activity remains at this level during long-term exposure. The active substance found to be α -pinene is unacceptable in all experiments involving enzymatic detoxification.