

Toxicological stress indicators in human red blood cells : changes in glutathione and glutathione S-transferase as biological markers for electrophilic and oxidative stress

Citation for published version (APA):

Evelo, C. T. A. (1994). *Toxicological stress indicators in human red blood cells : changes in glutathione and glutathione S-transferase as biological markers for electrophilic and oxidative stress*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19950119ce>

Document status and date:

Published: 01/01/1994

DOI:

[10.26481/dis.19950119ce](https://doi.org/10.26481/dis.19950119ce)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 31 Mar. 2023

Hoofdstuk 11

Samenvatting en Discussie

Chemische factoren die een risicobron vormen voor beschadigingen van belangrijke biologische macromoleculen, waaronder het genetisch materiaal, laten zich ruwweg in twee groepen verdelen. Enerzijds zijn er de electrofiele verbindingen, en stoffen die tot dergelijke verbindingen kunnen worden gemetaboliseerd. Deze stoffen zijn direct in staat biologische macromoleculen te beschadigen. Daarbij treedt dan veelal adductvorming op. Anderzijds zijn er omstandigheden die leiden tot de vorming van vrije radicalen. Dergelijke vrije radicalen kunnen eveneens tot beschadiging van biologische materialen leiden, zij kunnen echter ook aanleiding geven tot aantasting van de lipide structuur van membranen via lipide-peroxidatie. Bij deze lipide-peroxidatie ontstaan opnieuw reactieve verbindingen, die op hun beurt weer elders schade kunnen aanrichten. Het in dit proefschrift besproken glutathion – glutathion S-transferase systeem vormt een bijzondere factor doordat het zowel een bijdrage levert aan de bescherming tegen electrofiele als aan het verminderen van oxidatieve stress.

Bescherming tegen electrofiele verbindingen komt tot stand door koppeling van de nucleofiele thiolgroep van het glutathion aan het electrofiele reagens. In veel gevallen verloopt deze reactie spontaan, zij kan echter ook door het glutathion S-transferase worden gekatalyseerd. De zo gevormde thioether-producten worden in het algemeen uit de cel afgevoerd, en verder gemetaboliseerd. In principe kan dit leiden tot een vermindering van het in de cel aanwezige glutathion. Bovendien is reeds langere tijd bekend dat in sommige gevallen reactieve verbindingen niet alleen via de S-transferase reactie worden gekoppeld, maar ook via een soort zelfmoordreactie aanleiding geven tot een beschadiging van het glutathion-S-transferase zelf.

De bescherming tegen oxidatieve stress is complexer van aard. Glutathion kan bijdragen aan de enzymatische reductie van vitamine E, zowel direct als indirect via de reductie van vitamine C. Het goed vetoplosbare, gereduceerde vitamine E beschermt effectief tegen lipide-peroxidatie processen. Als gevolg van oxidatieve stress treedt ook oxidatie van eiwit-sulfydrylgroepen op. Dit kan leiden tot crosslinking van eiwitten. Hierdoor kunnen enerzijds enzymactiviteiten verloren gaan, en kunnen anderzijds, door crosslinking van structureiwitten,

vormveranderingen van cellen zonder cytoskelet optreden. Van rode bloedcellen, die voor hun mobiliteit door perifere weefsels in sterke mate afhankelijk zijn van de vervormbaarheid van hun celmembraan, is bekend dat zij vatbaar zijn voor dit soort oxidatie processen. Glutathion kan via thioltransferase activiteit gebruikt worden om geoxideerde sulfhydrylgroepen te reduceren. Ook kan als gevolg van de oxidatieve stress crosslinking van de glutathion-sulfhydrylgroep met eiwit-sulfhydrylgroepen optreden. Met name in rode bloedcellen is gereduceerd glutathion ook een algemene buffer voor reducerend vermogen. In deze cellen zijn namelijk geen mitochondriën aanwezig, die in andere celtypes voor de snelle levering van grotere hoeveelheden energie en reductie-equivalenten kunnen zorgen. Homeostase van de glutathion redox status wordt, bij voldoende aanlevering van glucose, gegarandeerd via regulatie van de glutathion reductase en de glucose 6-fosfaat dehydrogenase activiteit.

Bovendien is glutathion van belang in de glutathion-peroxidase reactie. Gekatalyseerd door het selenium afhankelijke enzym glutathion-peroxidase ontgift het zowel waterstofperoxide als de bij lipide-peroxidatie gevormde organische peroxiden. De ontgifting van de laatste categorie peroxiden kan ook worden gekatalyseerd door glutathion S-transferases. Deze activiteit van glutathion S-transferase wordt ook wel aangeduid met selenium onafhankelijke glutathion-peroxidase activiteit. De genoemde beschermende reacties leiden in alle gevallen tot de oxidatie van glutathion. In principe kan dit geoxideerde glutathion vervolgens door glutathion-reductase weer worden gereduceerd. Geoxideerd glutathion is echter giftig voor rode bloedcellen, en wordt hieruit actief verwijderd. De oxidatieve vorming van glutathion-eiwitbruggen, ook wel aangeduid met mixed disulfides, leidt bovendien direct tot een verlies van beschikbaar glutathion. Dit betekent dat, net als bij electrofiële stress, ook als gevolg van oxidatieve stress een afname van de beschikbare hoeveelheid glutathion kan optreden. De analogie in effecten van beide stress-factoren gaat echter nog verder. Het is bekend dat het glutathion S-transferase iso-enzym dat aanwezig is in de rode bloedcel, en dat behoort tot de zogenaamde π klasse, zelf gedeeltelijk geïnactiveerd kan worden als gevolg van oxidatieve stress.

Het bovenstaande, grotendeels gebaseerd op in de literatuur beschreven in vitro experimenten, geeft aan dat het a priori denkbaar was dat als gevolg van een belasting met electrofiële of oxidatieve xenobiotica of als gevolg van een op andere wijze tot stand gekomen oxidatieve stress, veranderingen in het glutathion-gehalte of in de glutathion S-transferase activiteit van rode bloedcellen zouden optreden. De studies beschreven in dit proefschrift waren er op gericht de praktische bruikbaarheid van dit idee voor experimenteel toxicologisch onderzoek en voor biologisch effect monitoring te onderzoeken. Het eerste deel (hoofdstuk 3-5) bevat in vitro studies met humaan bloed. In het tweede deel (hoofdstuk 6-9) wordt een aantal in vivo biologisch effect monitoring studies beschreven.

Direct reactieve electrofiële verbindingen zoals iodoacetamide, diethylma-

leaat en N-ethylmaleimide zullen, ongeacht de aanwezigheid van al dan niet intacte bloedcellen, in sterke mate met glutathion reageren. De aanwezigheid van glutathion in de rode bloedcel werkt daardoor in feite beschermend t.o.v. andere biologische effecten. Uit hoofdstuk 3 blijkt dat voor deze zeer reactieve verbindingen de vorming van hemoglobine-adducten sterk toeneemt nadat het glutathion volledig is verbruikt. Beïnvloeding van de effectiviteit van de glutathion bescherming *in vivo* zal ook consequenties hebben voor de mate van hemoglobine-adduct vorming. Dit is mogelijk van belang omdat hemoglobine-adduct nivo's zelf soms gehanteerd worden als biologisch effect parameter voor expositie aan electrofiële genotoxische agentia.

Uit hoofdstuk 4 blijkt dat ook het direct alkylerende cytostaticum cisplatina *in vitro* depletie van glutathion veroorzaakt in geïsoleerd cytosol van humane rode bloedcellen en in al dan niet intacte rattelever-cellen. In intacte rode bloedcellen vertoont cisplatina dit effect niet, waarschijnlijk doordat het celmembraan van dit type cellen opname effectief voorkomt. Cisplatina veroorzaakte naast glutathion-depletie ook een inhibitie van glutathion S-transferase. Deze inhibitie werd na belasting van rattelever-fracties zowel gevonden voor de enzymactiviteit in microsomen als voor die in cytosol. In overeenstemming met wat werd gevonden voor de glutathion-gehaltenes veroorzaakte cisplatina in intacte humane rode bloedcellen geen effect op glutathion S-transferase en werd wel een inhibitie gevonden wanneer cisplatina aan hemolysaten of aan al dan niet intacte hepatocyten werd toegevoegd. De inhibitie van glutathion S-transferase door cisplatina blijkt dus niet iso-enzym specifiek te zijn, en is waarschijnlijk een direct gevolg van de hoge alkylerende activiteit van dit cytostaticum.

Een tweede alkylierend cytostaticum, cyclophosphamide, werd eveneens getest. Van cyclophosphamide is bekend dat het moet worden gemetaboliseerd alvorens het zijn biologische activiteit kan uitoefenen. In overeenstemming hiermee bleek cyclophosphamide zelf slechts geringe effecten te hebben op het glutathion-gehalte van rode bloedcellen. Dit geringe, maar significante effect zelf is interessant omdat het aangeeft dat cyclophosphamide metabolisme ook kan optreden in de rode bloedcel. In aanwezigheid van metabole systemen op basis van rattelever-microsomen geeft cyclophosphamide een sterke depletie van het glutathion in rode bloedcellen. Deze depletie gaat gepaard met een activatie van het glutathion S-transferase in deze cellen. In aanwezigheid van een metabool systeem op basis van rattelever-microsomen veroorzaakt cyclophosphamide, zoals verwacht, ook een depletie van het glutathion in rattelever-cytosol. Hier voorkomt glutathion echter effectief een effect op het glutathion S-transferase: slechts bij gebruik van verdund cytosol werd een verhoging van deze enzym activiteit gevonden. De activiteit van het microsomale glutathion S-transferase werd, mits een NADPH regenererend systeem aanwezig was, wel verhoogd door cyclophosphamide. In dit testsysteem waren echter geen aantoonbare hoeveelheden glutathion aanwezig, zodat een bescherming door glutathion was uitgesloten. De interpretatie van de glutathion S-transferase activeringen in rode bloedcellen en rattelever-cytosol

wordt bemoeilijkt doordat het microsomale systeem zelf, doordat vrije radicalen gevormd worden, een inactiverend effect op de glutathion S-transferase activiteit heeft. Het is mogelijk dat er feitelijk geen activatie, maar een verminderde inactivatie plaats vindt. Aanvullende experimenten gaven daarbij echter wel aan dat dit dan niet gepaard gaat met een verminderde radicaal vorming zoals die valt te detecteren in de vorm van verbindingen die reactief zijn t.o.v. thiobarbituurzuur of die aanleiding geven tot methemoglobine vorming.

Drie andere cytostatica, allen zogenaamde anti-metaboliëten, werden eveneens getest. 5-Fluoruracil en cytosine-arabinoside hadden geen enkel effect op de glutathion-gehalten en de glutathion S-transferase activiteiten in de diverse geteste systemen. Methotrexate veroorzaakte uitsluitend een inhibitie van het microsomale glutathion S-transferase. Dit bevestigt dat de voor cisplatina en cyclophosphamide metaboliëten gevonden glutathion depletende eigenschappen niet een algemeen effect van cytostatica zijn, maar eerder een gevolg zijn van het alkylerend karakter van deze verbindingen. Ook suggereren de resultaten van de experimenten met cyclophosphamide en cisplatina dat voor electrofiële verbindingen het relatieve effect op glutathion groter, en meer eenduidig is dan dat op glutathion S-transferase. Dit te meer omdat glutathion zelf ook het transferase lijkt te beschermen tegen lage concentraties aan electrofielen zoals die bijvoorbeeld via de metabole activatie van cyclophosphamide ontstaan.

In een derde *in vitro* studie werden de effecten van een drietal industriële chemicaliën die behoren tot de zogenaamde hydroxylamines (HO-N-derivaten) bestudeerd. Van de moederverbinding, hydroxylamine, was reeds bekend dat zij hematotoxisch is en ondermeer methemoglobine veroorzaakt. Sterke methemoglobine-vormende eigenschappen werden ook gevonden voor het O-ethylhydroxylamine. Beide verbindingen gaven, waarschijnlijk als gevolg van de vrije radicalen die ontstaan bij de methemoglobine-vorming, bovendien lipide-peroxidatie. Zoals verwacht werd onder deze oxidatieve omstandigheden ook een vermindering van het beschikbare glutathion in de rode bloedcellen gevonden. Dit effect was echter beduidend minder sterk dan de methemoglobine-vorming en de lipide-peroxidatie zelf. Opvallend was dat het verdwenen glutathion slecht voor een klein deel in geoxideerde vorm in het plasma werd teruggevonden. Kennelijk is veel glutathion gebonden aan eiwitten. *In vivo* kunnen dergelijke mixed disulfides na vermindering van de oxidatieve stress weer gereduceerd worden, hetgeen de bruikbaarheid van glutathion-depletie voor biologisch effect monitoring zou kunnen beperken. Parallel aan de methemoglobine-vorming en lipide-peroxidatie werd een sterke vermindering van de glutathion S-transferase activiteit in de rode bloedcellen gevonden. Hetzelfde gold overigens voor de activiteit van een ander enzym, het NADPH-methemoglobine-reductase. Op basis van deze bevindingen lijkt het interessant deze beide parameters te testen in biologisch effect monitoring studies met oxidatieve verbindingen. Een derde hydroxylamine verbinding, het N,O-dimethylhydroxylamine, bleek aanzienlijk minder oxidatieve capaciteit te hebben. Er werd aanzienlijk minder methemoglobine-vorming, nau-

welijks lipide-peroxidatie, en in het geheel geen glutathion S-transferase remming gevonden. Wel bleek ook deze verbinding aanleiding te geven tot milde glutathion-depletie in rode bloedcellen, waarbij zelfs een wat sterkere toename van de hoeveelheid glutathion in plasma werd gevonden. Bovendien bleken N,O-dimethylhydroxylamine behandelde bloedcellen een duidelijk verminderde weerstand tegen door waterstofperoxide geïnduceerde lipide-peroxidatie te hebben. Een waarschijnlijke verklaring voor deze fenomenen werd gevonden in de inhibitie van glucose-6-fosfaat-dehydrogenase door N,O-dimethylhydroxylamine. Verlies van deze enzymactiviteit maakt dat de cel niet meer kan beschikken over NADPH dat nodig is voor reducerende reacties. Daardoor zou ondermeer het glutathion reductase niet meer kunnen functioneren. Het glutathion reductase werd daarnaast ook zelf geremd door N,O-dimethylhydroxylamine. Maar deze inhibitie was minder sterk. De verminderde weerstand tegen oxidatieve stress, zoals veroorzaakt door het zelf minder sterk oxidatieve N,O-dimethylhydroxylamine, zou van praktische betekenis kunnen zijn omdat bij gecombineerde blootstelling aan N,O-dimethylhydroxylamine en bijvoorbeeld O-ethylhydroxylamine potentiëring van de toxiciteit van die laatste het gevolg zou kunnen zijn.

In tegenstelling tot de hierboven beschreven conclusies voor electrofiële verbindingen geven de hydroxylamine-studies aan dat bij oxidatieve belasting de activiteit van glutathion S-transferase (en mogelijk ook die van het NADPH-methemoglobine-reductase) een gevoeliger parameter is dan de glutathion-depletie. Dit is extra interessant omdat glutathion-depletie via oxidatie voor een belangrijk deel blijkt te bestaan uit de vorming van eiwit-glutathion disulfiden. Deze gemengde disulfiden zullen bij voldoende beschikbaarheid van NADPH-reductie-equivalenten opnieuw gereduceerd worden via een gecombineerde activiteit van thioltransferase en glutathion-reductase. Het valt te verwachten dat een dergelijk compensatoir mechanisme de relatieve betekenis van glutathion oxidatie *in vivo* nog zal verminderen.

In het eerste hoofdstuk van het tweede deel (hoofdstuk 6) wordt een overzicht gegeven van een aantal biologisch effect monitoring studies. In een pilot studie met rokers en niet-rokers werd geen aantoonbaar effect van roken op de glutathion S-transferase activiteit gevonden. Uit immunochemische bepalingen kwam echter naar voren dat de totale hoeveel glutathion S-transferase eiwit wel was verhoogd. Kennelijk is er bij de rokers extra glutathion S-transferase gesynthetiseerd, zonder dat de enzymactiviteit is toegenomen. Een mogelijke verklaring is dat als een gevolg van de zowel oxidatieve als electrofiële stress die door het roken wordt veroorzaakt in eerste instantie de enzymactiviteit afneemt, waarbij vanwege de chronische belasting ter compensatie tijdens de erythropoïese extra glutathion S-transferase wordt aangemaakt. Een tweede studie had betrekking op een tweetal werknemers betrokken bij de houtconservering m.b.v. koolteer houdende creosoot-olie. Bij deze werknemers werden aan het eind van de werkweek verlaagde glutathion-gehalten en verlaagde glutathion S-transferases activiteiten

in rode bloedcellen aangetoond. Na het weekend waren deze waarden weer hersteld. Ondanks de zeer kleine groepsomvang is deze bevinding interessant omdat gevonden effecten op de beide hier bestudeerde parameters goed bleken te correleren met biologische monitoring waarden voor koolteerbelasting (gemeten als hydroxypyreen in urine) en met genotoxische effecten (vastgesteld via bepaling van DNA-adducten in witte bloedcellen).

Hoofdstuk 7 beschrijft een studie bij een veertiental grondontsmetters afkomstig uit de Bollenstreek, die tijdens de onderzoeksperiode werkten met dichloorpropeen. Deze studie werd gezamenlijk met diverse andere instituten uitgevoerd. Na afloop van het seizoen bleek zowel de glutathion als de glutathion S-transferase waarde bij de twaalf op deze parameters onderzochte grondontsmetters duidelijk verlaagd te zijn. In aan de universiteiten van Leiden en Amsterdam uitgevoerde klinisch chemische studies werden indicaties gevonden voor een geringe leverenzym-inductie en voor een subklinisch toxisch effect op de nier. Opvallend was dat de effecten op glutathion en glutathion S-transferase aanzienlijk eenduidiger waren dan de resultaten van deze klinisch chemische studies. Dichloorpropeen is een zogenaamde allesdoder met een zeer hoge reactiviteit. Van deze stof bekend is dat zij gedeeltelijk via de mercaptuurzuur-route wordt gemetaboliseerd. In aan de Vrije Universiteit uitgevoerde biologische monitoring studies bij deze zelfde werknemers, werden in urine ook inderdaad verhoogde gehalten aan mercaptuurzuur-metabolieten van dichloorpropeen aangetoond. Het glutathion-verbruik tijdens dit metabolisme is waarschijnlijk primair verantwoordelijk voor de optredende glutathion-depletie. De afname van de glutathion S-transferase activiteit valt waarschijnlijk toe te schrijven aan de gevormde reactieve metabolieten en/of cel-afbraakproducten.

In hoofdstuk 8 wordt een biologisch effect monitoring studie bij een op het eerste gezicht wat bijzondere populatie beschreven. Het betreft hier geen beroepsmatig blootgestelden, maar 23 mannelijke en 18 vrouwelijke sporters. Ongetrainde individuen werden gedurende een langere periode intensief getraind. Na 20 weken namen zij deel aan een 15 km hardloop wedstrijd, en na 40 weken aan een halve marathon. Aan het begin van de studie, voor en na de beide wedstrijden, en ook enkele dagen daarna werden bloedmonsters afgenomen. Tijdens de eerste 20 weken trainingsperiode nam zowel het glutathion-gehalte als de glutathion-reductase activiteit in de rode bloedcellen toe. Mogelijk zijn deze beide toenames het gevolg van een behoefte aan extra bescherming tegen de hogere zuurstof-turnover en daarmee gepaard gaande oxidatieve stress. In overeenstemming hiermee werd direct na de 15 km wedstrijd een tendens richting lagere glutathion-waarden waargenomen. Na de halve marathon was het glutathion-gehalte overigens, om niet geheel duidelijke redenen, verhoogd. Het glutathion-reductase was direct na de beide wedstrijden actiever dan daarvoor, iets wat op zijn minst gedeeltelijk werd veroorzaakt door de beschikbaarheid van extra riboflavine. Glutathion S-transferase was na beide wedstrijden in activiteit verlaagd. Dit is in overeenstemming met de verwachting. Immers het transferase is gevoelig voor de extra oxidatieve stress,

zoals die tijdens inspanning zal optreden. Na de tweede trainingsperiode was het glutathion-reductase volgens verwachting nog altijd verhoogd. Dit gold echter niet voor het glutathion. Het is daarbij op zichzelf niet duidelijk of dit een gevolg is van verminderde behoefte als gevolg van andere aanpassingen (zoals de toegenomen reductase activiteit) of van gebrek aan synthese capaciteit. Een indicatie in deze laatste richting wordt wel gegeven door de bevinding dat de glutathion S-transferase activiteit na deze tweede trainingsperiode was gestegen. Waarschijnlijk is dit een reactie op de voortdurende oxidatieve stress, en de daarmee waarschijnlijk gepaard gaande lipide-peroxidatie. Dit wijst er op dat vanuit het oogpunt van oxidatieve belasting de tweede, intensievere trainingsfase minder positief is dan de eerste.

In hoofdstuk 9 tenslotte worden verschillen beschreven tussen diverse groepen Belgische ex-mijnwerkers met ($n = 33$) en zonder ($n = 58$) mijnwerkers pneumoconiose. Het blijkt dat tijdens de vroege stadia van de inflammatoire ziekte zowel het glutathion als het glutathion S-transferase verlaagd zijn. Een oorzakelijk verband is waarschijnlijk omdat het hier gaat om mensen met actieve stadia van deze ziekte. Tijdens de voortdurende inflammatoire activiteit worden door de alveolaire macrofagen grote hoeveelheden reactieve zuurstofspecies gevormd. Het is waarschijnlijk dat die uiteindelijk verantwoordelijk zijn voor de beschreven effecten. Ook bij de sporters kan een als gevolg van spierbeschadigingen optredende meer diffuse vorm van inflammatie een rol hebben gespeeld.

Geconcludeerd kan worden dat de beide belangrijkste beschreven parameters, het glutathion en de glutathion S-transferase activiteit in rode bloedcellen, interessante gereedschappen vormen voor mechanistisch onderzoek en voor biologisch effect monitoring. Glutathion lijkt daarbij het meest relevant in die gevallen waarin het gaat om electrofiële belastingen. Glutathion S-transferase daarentegen is vooral van betekenis wanneer het gaat om oxidatieve belastingen. Het kan daarbij een bruikbare aanvulling vormen op de, op zichzelf nog altijd problematische, detectie van in vivo lipide-peroxidatie.