

# Biological effects in human erythrocytes in vitro exposed to xenobiotics : influences by metabolizing systems from rat liver

Citation for published version (APA):

Palmen, N. G. M. (1995). *Biological effects in human erythrocytes in vitro exposed to xenobiotics : influences by metabolizing systems from rat liver*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19950421np>

## Document status and date:

Published: 01/01/1995

## DOI:

[10.26481/dis.19950421np](https://doi.org/10.26481/dis.19950421np)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Chapter 8

### Summary

Blood plays an important role in the body because of its transport function. The transport of oxygen to the tissues and of carbon dioxide to the lungs is confined to erythrocytes. Because of their central role, erythrocytes come in close contact with organs that may absorb foreign compounds (xenobiotics) and with organs that may transform non-toxic compounds into reactive metabolites. Erythrocytes also have metabolic activity themselves. The cells contain several mechanisms of protection, usually of biochemical origin, against toxic compounds or their metabolites. Cell damage may occur when the balance between the stress erythrocytes are exposed to and the capacity of detoxification is disturbed.

In the liver erythrocytes come in close contact with the metabolically very active hepatocytes. Non-toxic compounds may be metabolised by hepatocytes into toxic metabolites that may affect the erythrocytes. In this thesis main attention is directed to the interplay between erythrocytes and hepatocytes with special emphasis to the bioactivation and inactivation capacity of liver and blood.

Glutathione plays a role in the protection of erythrocytes against electrophilic and oxidative stress. *Chapters 2 and 3* show that strong electrophilic compounds that are able to pass the erythrocyte membrane (iodoacetamide, N-ethylmaleimide and diethyl maleate) were able to deplete the concentration of reduced glutathione (GSH) in erythrocytes. Since the test compounds also depleted GSH in incubations with GSH dissolved in buffer (GSH solution), this means that they are able to deplete GSH without prior metabolic activation. From the experiments with hemolysate we conclude that 3-hydroxyacetanilide (3-HAA) and 2-methylfurane (2-MF) are metabolized by hemolysate into GSH-reactive compounds. The total glutathione concentration ((GT) which is the sum of both GSH and oxidized glutathione) in hemolysate decreased with the concentration of the test compound while the GT concentration was not affected in incubations with GSH solution. Both 3-HAA and 2-MF did not affect erythrocyte GT which may be explained by a low intracellular substrate concentration. Since hemolysate is not the same as erythrocytes without a cellular membrane, the difference in effect between incubations with erythrocytes and hemolysate cannot be explained only by these

cellular membranes. Compounds that cannot deplete erythrocyte GT may be able to do so after extracellular metabolic activation. Both cyclophosphamide (CP), 3-HAA and 2-MF were able to deplete erythrocyte GT after metabolic activation by means of rat liver microsomal activating system (MAS) indicating that the metabolites were able to cross the erythrocyte membrane. The GT depletion in erythrocytes was higher when microsomes of rats that were pretreated with phenobarbitone were tested. This means that phenobarbitone inducible enzymes play a role in the metabolization of these test compounds. Two pesticides that are able to form hemoglobin adducts *in vivo* were not able to affect the GT concentration in incubations with GSH solution, hemolysate or erythrocytes irrespective of the addition of MAS to the incubations. Hepatocytes imitate the *in vivo* situation more closely than MAS. For this reason, co-incubations of erythrocytes and hepatocytes were performed. Hepatocytes were able to metabolize CP and 3-HAA into GSH-reactive metabolites. Moreover, GSH-reactive metabolites of CP and 3-HAA were also excreted by the hepatocytes. However, erythrocyte GT was not affected in co-incubations of erythrocytes and hepatocytes testing 3-HAA, which may be explained by a minor diffusion uptake rate of metabolites into the erythrocytes.

In chapters 4 and 5 the *in vivo* situation was approached more closely by perfusion of an isolated rat liver with medium and substrate. Liver cell viability was affected when no oxygen carriers were added to the medium. However, despite the lack of oxygen carriers in the medium, dimethylacetamide (DMAc) was eliminated from the medium (elimination rate constant =  $0.019 \pm 0.008 \text{ min}^{-1}$ ). The addition of human erythrocytes to the perfusion medium had a positive effect on liver cell viability, which might lead to an increase of DMAc metabolism. However, no significant increase in the elimination rate constant of DMAc was detected.

The techniques which were developed in the preceding experimental chapters were applied to hydroxylamine (HYAM) and three oximes (cyclohexanone oxime (CHO), acetaldoxime (AAO) and methyl-ethyl ketoxime (MEKO)) in chapter 6. HYAM is a strong oxidative compound and oxidizes hemoglobin, causes the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), inactivates glutathione S-transferase (GST) and lowers the GT concentration in erythrocytes. Oximes were less reactive compared to HYAM both in incubations with erythrocytes and hemolysate. In incubations with hemolysate, all three oximes caused oxidation of hemoglobin and inactivation of GST. These effects were also found in incubations with erythrocytes with exception of inactivation of GST caused by MEKO. However, the effects were less pronounced which may be explained by a low intracellular substrate concentration. AAO was the only oxime that caused TBARS both in incubations with erythrocytes and hemolysate. GT depletion was the least sensitive parameter tested since only MEKO was able to deplete GT in a concentration dependent way and this was only true for experiments with

hemolysate. Because oximes cause oxidative effects in blood *in vivo* and oximes are suggested to be metabolized into HYAM, rat liver preparations were added to the incubations with erythrocytes. However, the effects found in erythrocytes after co-incubation of erythrocytes and microsomal activating system (MAS) or hepatocytes were not higher compared to incubations with erythrocytes alone. This was also true when erythrocytes and oximes were perfused through an isolated rat liver. It is concluded that liver metabolism is not of major importance for the hematotoxic effects of oximes.

Based on the results obtained in this thesis it can be concluded that erythrocyte parameters were affected by several compounds. Which biochemical parameter(s) was/were affected depended on the compound tested. The effects found were higher in incubations with hemolysate compared to incubations with erythrocytes. Hemolysate had metabolic activity since GSH-reactive metabolites were formed out of several test substrates. The same substrates did not affect the GT concentration in erythrocytes. GSH or GT depletion was a proper effect parameter when electrophilic or strong oxidative compounds had to be detected. Hemoglobin oxidation or GST activity changes were better parameters in case of weak oxidative compounds. Some compounds had to be metabolized by MAS before they affected erythrocyte parameters. Co-incubation of erythrocytes with liver preparations that matched the *in vivo* situation more closely than MAS (hepatocytes or a total liver), did not enlarge the effects found in erythrocytes compared to incubations with erythrocytes alone. This can be explained by detoxification of reactive metabolites in the hepatocyte and by limited excretion of reactive metabolites from the hepatocyte. Although perfusion of erythrocytes through a isolated liver did not increase the effects found in incubations with erythrocytes alone, erythrocytes on their turn played an important role in the maintenance of liver cell viability. In the incubations in which erythrocytes were co-incubated with liver tissue, only MAS affected erythrocyte parameters. Because of this it can be said that the sensitivity of the test systems decreased when the *in vivo* situation was approached more closely. This may be explained by the capacity of hepatocytes and the total liver to adapt to changing circumstances.



## Hoofdstuk 9

### Samenvatting

Bloed speelt een centrale rol in het lichaam vanwege zijn transportfunctie. Daarbij verzorgen de erythrocyten het vervoer van zuurstof naar de weefsels en van kooldioxide terug naar de longen. Als gevolg van hun centrale rol komen erythrocyten in nauw contact met zowel organen die kunnen dienen als porte d'entrée voor lichaamsvreemde stoffen (xenobiotica) als met organen die deze xenobiotica kunnen transformeren. Bovendien is de erythrocyt zelf in staat metabolieten te genereren. Om zich tegen toxische verbindingen of hun metabolieten te beschermen bevat de erythrocyt diverse beschermingsmechanismen die vaak zijn gebaseerd op biochemische reacties. Wanneer de stress waaraan een cel wordt blootgesteld zo groot is dat de toxische verbinding niet wordt gedetoxificeerd kan dat leiden tot schade aan de cel.

In de lever komen erythrocyten in nauw contact met de metabool zeer actieve hepatocyten. Niet toxische stoffen kunnen na metabolisering door de lever worden omgevormd in stoffen die toxisch zijn voor de erythrocyten. In dit proefschrift wordt voornamelijk aandacht besteed aan het samenspel tussen erythrocyten en hepatocyten waarbij met name aandacht wordt besteed aan de bioaktiverende en inaktiverende capaciteit van zowel het bloed als de lever. Om deze vraagstelling te kunnen onderzoeken werden een aantal *in vitro* methodieken ontwikkeld.

Glutathion speelt een rol bij de bescherming van erythrocyten tegen elektrofile en oxidatieve stress. Uit de *hoofdstukken 2 en 3* kunnen we afleiden dat de concentratie gereduceerd glutathion (GSH) in erythrocyten daalde wanneer de cellen werden blootgesteld aan sterk elektrofile verbindingen (joodacetamide, N-ethylmaleimide en diethyl maleaat) die in staat zijn de erythrocyt membraan te passeren. Genoemde verbindingen waren ook in staat GSH te depletieren in incubaties met GSH opgelost in buffer (GSH oplossing), hetgeen betekent dat ze in staat zijn GSH te depletieren zonder voorafgaande metabolisering. Uit de experimenten met hemolysaat kunnen we afleiden dat 3-hydroxyacetanilide (3-HAA) en 2-methylfuraan (2-MF) door het hemolysaat worden gemetaboliseerd tot GSH-reaktieve verbindingen. De concentratie totaal glutathion ((GT) dit is de som van de GSH en de geoxideerde glutathion (GSSG) concentratie) in het hemo-

lysaat daalde concentratieafhankelijk terwijl de GT concentratie in inkubaties met GSH oplossing niet werd beïnvloed. 3-HAA en 2-MF hadden geen effect op het GT gehalte in erythrocyten, mogelijk als gevolg van een te lage intracellulaire substraat concentratie. Omdat hemolysaat niet gelijk mag worden gesteld aan erythrocyten zonder celmembraan, mag het verschil in effect tussen inkubaties met hemolysaat en erythrocyten niet alleen worden verklaard uit de afwezigheid van de celmembraan.

Stoffen die niet in staat zijn GT in erythrocyten te depletieren kunnen dit mogelijk wel na extracellulaire metabole aktivering. Zowel cyclophosphamide (CP) als 3-HAA als 2-MF waren in staat de GT concentratie in erythrocyten te depletieren na metabole aktivering door middel van microsomaal aktiverend systeem (MAS). De GT depletie werd nog versterkt wanneer in de inkubaties gebruik werd gemaakt van MAS van ratten die waren voorbehandeld met fenobarbital. Dit wijst op de betrokkenheid van fenobarbital induceerbare enzymen bij het metabolisme van bovenstaande verbindingen. Omdat de metabolieten in staat waren de GT concentratie in erythrocyten te depletieren, mag hieruit worden afgeleid dat ze de celmembraan kunnen passeren. Twee pesticiden waarvan bekend is dat ze *in vivo* hemoglobine addukten vormen hadden geen effect op de GT concentratie in inkubaties met GSH oplossing, hemolysaat of erythrocyten. Toevoeging van MAS aan de inkubaten had geen effect. Hepatocyten benaderen de *in vivo* situatie meer dan MAS. Om deze reden werden tevens co-inkubaties van erythrocyten met hepatocyten uitgevoerd. Hepatocyten waren in staat GSH-reaktieve verbindingen te genereren uit CP en 3-HAA. Tevens werden er GSH-reaktieve CP en 3-HAA metabolieten door de hepatocyt uitgescheiden. In co-inkubaties van erythrocyten en hepatocyten met 3-HAA als teststof kon echter geen GT depletie in erythrocyten worden waargenomen, hetgeen mogelijk verklaard kan worden door een te geringe opnamesnelheid van de metabolieten in de erythrocyt.

In de hoofdstukken 4 en 5 werd de *in vivo* situatie nog meer benaderd door een totale geïsoleerde lever te perfunderen met medium waaraan de teststof is toegevoegd. Perfusiemedium zonder zuurstofcarriers bleek de levensvatbaarheid van de levercellen ernstig aan te tasten. Dimethylacetamide (DMAc) werd ondanks het gebrek aan zuurstofcarriers in het perfusiemedium toch geëlimineerd met een eliminatiesnelheidskonstante van  $0,019 \pm 0,008 \text{ min}^{-1}$ . Toevoeging van humane erythrocyten aan het medium had een positieve invloed op de levensvatbaarheid van de levercellen, hetgeen tot een verhoogde biotransformatie van DMAc zou kunnen leiden. Een significante verhoging van de eliminatiesnelheidskonstante van DMAc kon echter niet worden aangetoond.

In hoofdstuk 6 werden de technieken die in de voorgaande experimentele hoofdstukken werden gebruikt toegepast op hydroxylamine (HYAM) en een drietal oximen (cyclohexanonoxime (CHO), acetaldoxime (AAO) en methyl-ethyl ketoxime (MEKO)). HYAM staat bekend als een sterk oxidatieve verbinding en

oxideert hemoglobine, induceert lipide peroxidatie (LP), inaktiveert glutathion S-transferase (GST) en verlaagt de GT concentratie in erythrocyten. De oximes bleken veel minder reactief te zijn dan HYAM zowel in inkubaties met erythrocyten als met hemolysaat. In inkubaties met hemolysaat veroorzaakten alle geteste oximen oxidatie van hemoglobine en inaktivering van GST. De effecten waren, met uitzondering van GST inaktivering door MEKO, ook zichtbaar in erythrocyten hoewel ze minder sterk waren. Dit kan het gevolg zijn van een te lage intracellulaire substraat concentratie. Alleen AAO veroorzaakte LP, zowel in inkubaties met erythrocyten als met hemolysaat. GT depletie bleek de minst gevoelige parameter te zijn omdat alleen MEKO een duidelijke concentratieafhankelijke GT depletie veroorzaakte, en dan nog alleen in inkubaties met hemolysaat. Omdat oximes *in vivo* oxidatieve effecten in bloed veroorzaken en omdat oximes mogelijk worden gemetaboliseerd tot HYAM, werden rattelever preparaten toegevoegd aan de inkubaties met erythrocyten. De grootte van de effecten die in inkubaties met alleen erythrocyten konden worden aangetoond, nam echter niet toe na co-inkubatie van erythrocyten met MAS of hepatocyten. Hetzelfde gold voor perfusie van een geïsoleerde rattelever met medium waaraan oximen en erythrocyten waren toegevoegd. Op basis van deze resultaten kan worden gesteld dat metabole omzetting van oximen door de lever geen belangrijke rol speelt in de hematotoxische effecten van oximen.

Op basis van de resultaten verkregen in dit proefschrift kan worden gesteld dat verschillende xenobiotica in staat zijn biochemische parameters in erythrocyten te beïnvloeden. Welke biochemische parameters veranderden als gevolg van expositie aan xenobiotica, was afhankelijk van de geteste stof. Vergeleken bij inkubaties met erythrocyten waren de effecten in inkubaties met hemolysaat groter. Hemolysaat beschikt tevens over metabole capaciteit omdat een aantal substraten werden gemetaboliseerd tot GSH-reaktieve verbindingen. Dezelfde substraten hadden geen effect op de GT concentratie in erythrocyten. GSH en GT depletie waren goede effect parameters wanneer het elektrofile of sterk oxidatieve verbindingen betrof. Zwak oxidatieve verbindingen konden beter worden aangetoond door middel van hemoglobine oxidatie of aktiviteitsverandering van GST. Sommige verbindingen beïnvloedden de erythrocyt parameters pas na metabole aktivering met behulp van MAS. Gebruik van aktiverende leverpreparaten die de *in vivo* situatie beter benaderden dan MAS (hepatocyten of de geïsoleerde rattelever), vergrootten de effecten die werden gevonden in inkubaten met alleen erythrocyten niet. Dit kan worden verklaard door ontgiftiging van reaktieve metabolieten in de hepatocyt en door een geringe uitscheiding door de hepatocyt van reaktieve metabolieten. Ofschoon perfusie van erythrocyten door een geïsoleerde lever geen effect had op de gemeten parameters in de erythrocyten, hadden erythrocyten wel een positieve invloed op de levensvatbaarheid van de levercellen. Omdat van alle testsystemen waarin gebruik werd gemaakt van co-inkubaties van erythrocyten met leverweefsel alleen MAS effect had op de gemeten parameters in de erythrocyten, kan worden



gesteld dat de gevoeligheid van de testsystemen afneemt naarmate ze de *in vivo* situatie beter benaderen. Dit kan mogelijk verklaard worden door het vermogen tot adaptatie van hepatocyten en de totale lever.