

# *De parentale effecten van roken op de genetische integriteit van het nageslacht*

**Rick van Haastert**

promotor :  
dr. R. Godschalk

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad  
Master in de biomedische wetenschappen  
klinische en moleculaire wetenschappen



# De parentale effecten van roken op de genetische integriteit van het nageslacht.

Rick van Haastert

0219722

Biomedische Wetenschappen

Universiteit Hasselt

05-10-2006

Master Klinische Moleculaire Wetenschappen

Promotor: R. Godschalk

Tweede Promotor: F-J. van Schooten

Health Risk Analysis & Toxicology

Universiteit Maastricht

## Inhoudsopgave

Inhoudsopgave .....	1
Lijst met afkortingen .....	2
Dankwoord .....	3
Samenvatting .....	4
1 Inleiding .....	5
1.1 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen .....	5
1.2 Metabolisatie in het lichaam .....	5
1.3 DNA beschadiging .....	6
1.4 Polymorfismen .....	6
1.5 Paternale effecten van roken .....	7
1.6 Maternale effecten van roken .....	7
1.7 Onderzoeksopzet paternale effecten roken .....	8
1.8 Onderzoeksopzet maternale effecten roken .....	8
2 Materialen en methode .....	9
2.1 Celkweek .....	10
2.2 MTT cytotoxiciteits test .....	10
2.3 Clonogenic survival test .....	11
2.4 <sup>32</sup> P-postlabeling .....	11
2.5 Genotypering Single Nucleotide Polymorphisms .....	12
3 Resultaten .....	15
3.1 Cytotoxiciteits test .....	15
3.2 Clonogenic survival assay .....	16
3.3 <sup>32</sup> P-Postlabeling .....	17
3.4 Genotypering Single Nucleotide Polymorphisms .....	19
4 Discussie .....	23
4.1 Paternale effecten van roken .....	23
4.2 Maternale effecten van roken .....	25
4.3 Conclusie .....	26
Referenties .....	27

## **Lijst met afkortingen**

B[a]P: benzo[a]pyreen

B[e]P: benzo[e]pyreen

BPDE: benzo[a]pyreen diolepoxide

CYP1A2: cytochrom p4501A2

ddNTP: dideoxyribonucleotide triphosphate

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

dNTP: deoxynucleotide triphosphate

GST: glutathione-S-transferase

Hgprt: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

Hprt: hypoxanthine phosphoribosyltransferase

MMS: methylmethaan sulfonaat

MNU: N-methyl-N-nitrosourea

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAT2: N-acetyltransferase 2

OD: optical density

PAKs: polycyclische aromatische koolwaterstoffen

PCR: polymerase chain reaction

SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase

SBE: Single Base Extension

SNP: single nucleotide polymorphism

## **Dankwoord**

Voor het tot stand komen van dit afstudeeronderzoek en scriptie wil ik graag de afdeling Health Risk Analysis & Toxicology van de universiteit Maastricht bedanken voor het verlenen van de stageplek, alsmede de promotor R. Godschalk, de tweede promotor F-J. van Schooten, PhD student N. Verhofstad en de medewerkers R. Gottschalk en L. Maas.

## Samenvatting

Smoking is a major cause of death, because of an increased risk of cardiovascular disease and cancer. Smoking doesn't only affect the smoker him or herself, but also their unborn children. Cigarette smoke contains polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), of which benzo[a]pyrene (B[a]P) is the most researched. The body will metabolize xenobiotics in an effort to excrete them. Phase 1 metabolic enzymes, such as the cytochrome p450 family, depend on oxidation to make xenobiotics more excretable. Phase 2 enzymes such as glutathione-S-transferases and N-acetyltransferases detoxify xenobiotics with redox reactions. B[a]P is metabolized by members of the cytochrome p450 enzyme family to B[a]P diol-epoxide (BPDE), which is highly cytotoxic, carcinogenic and mutagenic. BPDE binds covalent to DNA, forming DNA adducts which can cause mutations and chromosome aberrations. The rate at which the body activates or detoxifies xenobiotics differs between individuals, due to small differences in the genetic code for the metabolic enzymes, called polymorphisms.

Male smoking has a negative effect on the sperm quality. To investigate if spermatogonial cells are capable of metabolizing B[a]P, if they are sensitive to exposure to B[a]P and BPDE and if they form DNA adducts after exposure and are able to repair them, a cytotoxic and clonogenic assay and <sup>32</sup>P-postlabeling was performed on mouse spermatogonia CG-1 spg cells. CG-1 spg cells have a sharp decrease in viability and reproducibility after exposure to more than 1 μM BPDE. CG-1 spg cells are capable of metabolizing B[a]P, resulting in an increase in DNA adducts. CG-1 spg cells are not fully capable in repairing these DNA adducts. Pregnant women who smoke have a higher risk of premature births and prenatal deaths. To investigate the effects of female smoking on their offspring and the role of polymorphisms in metabolic genes, 65 smoking and non smoking mother-child pairs were selected and genotyping was performed. Smoking mothers and their children have a significantly higher level of DNA adducts compared to non smoking mothers and their children. A higher level of risk polymorphisms is related to a higher level of DNA adducts in smoking mothers and child. The effects of single polymorphisms couldn't be investigated due to the small number of subjects.

Male and female smoking adversely affects the child, either by a decrease in sperm quality or by affecting the pregnancy. Spermatogonial cells are sensitive to the damaging effects of cigarette smoke constituents such as B[a]P and its metabolite BPDE. A higher level of risk polymorphisms in the genetic code of metabolic genes are related to a higher level DNA adducts in smokers. The role of DNA repair mechanisms needs to be further investigated.

## 1 Inleiding

Dat roken slecht is voor de gezondheid zal niemand meer ontkennen. Het is onomstotelijk bewezen dat roken leidt tot een vroegtijdige dood in vergelijking met niet-rokers door een verhoogd risico op kanker en cardiovasculaire ziekten (1). Sigarettenrook bevat duizenden stoffen, waarvan er vele carcinogeen zijn. De componenten van sigarettenrook hebben niet alleen effect op de gezondheid van de roker zelf, maar kunnen ook de gezondheid van het ongeboren kind beïnvloeden, zowel via de vader als de moeder.

### *1.1 Polycyclische aromatische koolwaterstoffen*

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) is een verzamelnaam voor stoffen die ontstaan na onvolledige verbranding van koolstofhoudende producten, zoals kolen, diesel en tabak. PAKs worden gezien als de voornaamste carcinogenen component van sigarettenrook (2). Een van de meest bestudeerde PAKs is de stof benzo[a]pyreen (B[a]P). Deze mutagenen en carcinogenen stof werd in 1930 geïsoleerd uit teer en is het eerste chemische carcinogeen dat werd ontdekt. B[a]P en andere synthetische PAKs bleken tumoren te veroorzaken na herhaaldelijke toediening op muizenhuid. De concentraties van PAKs in sigarettenrook is echter te laag om direct tumoren te veroorzaken en hun carcinogenen effect is afhankelijk van promotoren en co-carcinogenen. Deze zijn echter allemaal in sigarettenrook aangetroffen (2).

### *1.2 Metabolisatie in het lichaam*

Wanneer lichaamsvreemde stoffen het lichaam binnen komen worden zij gemetaboliseerd in een poging deze uit te scheiden en wanneer nodig te detoxificeren. De enzymen die zorgen voor metabolisatie van lichaamsvreemde stoffen kunnen worden ingedeeld in twee soorten enzymen op basis van hun metabolisatie wijze, fase 1 en fase 2 enzymen. Fase 1 enzymen bestaan uit verschillende enzym families die belast zijn met de detoxificatie van lichaamsvreemde stoffen door hen te oxideren tot meer polaire en daardoor beter uit te scheiden metabolieten (3). Fase 2 enzymen zoals glutathione-S-transferases en N-acetyltransferases zorgen voor detoxificatie van lichaamsvreemde stoffen door middel van redox reacties (4). Tijdens de metabolisatie van lichaamsvreemde stoffen kan oxidatie van deze stoffen echter zorgen voor giftigere of meer reactieven vormen, een proces bekend als metabolische activatie of bioactivatie.

Veel van de bekende carcinogenen zijn zogenaamde pro-carcinogenen (3). Dit zijn organische stoffen die pas carcinogeen zijn na metabolisatie in het lichaam, waarbij zij door

biotransformatie actief worden. Metabole activatie tijdens fase 1 reacties gebeurt voornamelijk door subfamilies van het cytochroom P450 enzym. B[a]P wordt in het lichaam gemetaboliseerd door onder andere leden van de cytochroom P450 familie tot verschillende diol-epoxides, waarvan B[a]P diol-epoxide-2 (BPDE-2) het meest carcinogeen is en BPDE-1 zeer mutageen is. Daarbij is BPDE-2 bovendien zeer cytotoxisch bij lage concentraties.

### *1.3 DNA beschadiging*

Carcinogenen stoffen kunnen op verschillende manieren schadelijk zijn voor het lichaam. Genotoxische carcinogenen produceren vrije radicalen, die het DNA beschadigen, of binden covalent met DNA, waardoor er DNA addukten ontstaan. (3, 5, 6). Als de DNA reparatie mechanismen van de cel niet in staat zijn deze beschadigingen te herkennen en/of te herstellen, kunnen er mutaties of chromosoom beschadigingen ontstaan. Deze mutaties en/of chromosoom beschadigingen kunnen zich opstapelen, waardoor een gezonde cel kan veranderen in een tumorcel (7).

Van de metabole derivaten van PAKs in sigarettenrook is bekend dat zij genotoxisch zijn en DNA addukten en mutaties in menselijke cellen kunnen veroorzaken (2, 3, 5-7). Het genotoxische effect van deze componenten is afhankelijk van metabole activatie of detoxificatie reacties. De DNA addukten gevormd als gevolg van blootstelling aan PAKs in sigarettenrook spelen een belangrijke rol in het ontstaan van kanker. Er zijn bewijzen voor een dosis respons verhouding tussen DNA addukten en de prevalentie van kanker (3). BPDE-2 wordt gezien als het ultieme carcinogeen door het DNA bindingsvermogen, waardoor DNA addukten ontstaan, en de mate van mutageniciteit en carcinogeniteit (2).

### *1.4 Polymorfismen*

Slechts 11% van de rokers ontwikkelen uiteindelijk longkanker, wat suggereert dat een genetische component een rol speelt (8). De activiteit en de hoeveelheid van de genoemde en andere biotransformatie enzymen verschilt tussen individuen door polymorfismen in de coderende genen en dit kan bijdragen aan de individuele verschillen die gevonden worden na blootstelling aan lichaamsvreemde stoffen (4). Een andere factor is de mate en functionaliteit van de DNA herstel mechanismen waar het lichaam van een individu beschikking over heeft, wat mede wordt bepaald door polymorfismen in de genen die betrokken zijn bij DNA herstel (4).



### *1.5 Paternale effecten van roken.*

Het rookgedrag van de vader beïnvloedt de gezondheid van het ongeboren kind. Roken heeft namelijk nadelige effecten op de kwaliteit van het sperma. Roken door mannen zorgt voor een hogere DNA addukt niveau in hun sperma nuclei, de hoeveelheid spermacellen die worden gevormd door spermatogoniale cellen neemt af evenals de mobiliteit van spermacellen (9). Daarnaast zijn er aanwijzingen dat er aneuploïde chromosoomafwijkingen voor bijvoorbeeld het X en Y chromosoom in de spermacellen ontstaan. (9, 10). Aneuploïde afwijkingen zijn afwijkingen in het chromosoom aantal en vallen onder de meest voorkomende en ernstige chromosomale afwijkingen voor embryo's en kinderen. Daarbij is het een van de grootste categorieën van genetische afwijkingen die kan worden doorgegeven via sperma (9). Roken zorgt eveneens voor een verhoogde aanwezigheid van DNA fragmentatie in spermacellen (11).

Paternaal roken heeft een duidelijk negatief effect op de gezondheid van het kind (9-11). De afname van de sperma kwaliteit en de toename van DNA mutaties in spermacellen kan ertoe leiden dat er nadelige effecten optreden bij het nageslacht van de rokende man. Zijn spermatogoniale cellen in staat B[a]P te metaboliseren tot genotoxische stoffen zoals BPDE? Zijn ze gevoelig voor blootstelling aan B[a]P of BPDE en verliezen zij hierdoor het vermogen zich te delen? Is er bij spermatogoniale cellen na blootstelling aan carcinogenen een verhoogde mate van DNA addukten of is er sprake van DNA reparatie?

### *1.6 Maternale effecten van roken.*

In de Verenigde Staten rookt 15 tot 20% van de vrouwen gedurende de zwangerschap en is maar liefst 5% van de perinatale sterfte te wijten aan roken tijdens de zwangerschap (12). Er is een sterke associatie tussen vroegtijdige geboortes en het rookgedrag van de moeder, waarbij er is een doses respons verhouding is geconstateerd. Daarbij is er een duidelijk verband tussen roken en verschillende afwijkingen in de placenta en tussen roken en groei achterstand bij de foetus, wat resulteert in een verminderd geboortegewicht (12).

Het rookgedrag van de moeder is dus niet alleen voor haar zelf nadelig, maar kan ook nadelig zijn voor haar kind, zelfs tijdens de zwangerschap. De foetus wordt via de placenta blootgesteld aan PAKs en hun metaboliëten die de moeder binnen krijgt door te roken (13). De PAKs en hun metaboliëten zouden in de foetus voor DNA addukten kunnen zorgen en de kans op mutaties kunnen vergroten. Hierbij is de rol die de verschillende bioactivatie en detoxificatie enzymen spelen nog onduidelijk. De effecten van de verscheidene polymorfismen in de genetische opmaak van deze bioactivatie en detoxificatie enzymen in

moeder en kind zijn moeilijk te onderzoeken door de verschillende interacties die zij mogelijk met elkaar hebben. Welke bijdrage hebben deze polymorfismen in de verschillen in geboortegewicht, zwangerschapsduur en DNA addukt nivo in moeder en kind waargenomen tussen rokende en niet-rokende moeders? Bieden bepaalde genotypen extra bescherming tegen de negatieve effecten van roken of versterken zij elkaar in de nadelige gevolgen van roken?

#### *1.7 Onderzoeksopzet paternale effecten roken*

Om te onderzoeken wat de effecten zijn van het blootstellen van spermatogoniale cellen aan B[a]P en BPDE-2 werd de spermatogoniale muizen cellijn GC-1 spg aangekocht van ATCC (Manassas, Amerika). Deze cellen werden blootgesteld aan B[a]P, BPDE-2, Benzo[e]pyreen (B[e]P), methylmethaan sulfonaat (MMS) en N-methyl-N-nitrosourea (MNU). B[e]P is een isomeer van B[a]P en heeft geen vastgestelde carcinogenen of mutagenen effecten en dient als negatieve controle. MNU is een vastgesteld carcinogeen en dient als positieve controle. De cytotoxiciteit van deze stoffen werd onderzocht, als mede de effecten op de celdeling, het B[a]P metabolisatie vermogen, de inductie van DNA addukten en het DNA addukt herstel vermogen.

#### *1.8 Onderzoeksopzet maternale effecten roken*

Om te onderzoeken wat de invloed is van polymorfismen in de genen die coderen voor verschillende bioactivatie en detoxificatie enzymen zal er genotypering plaats vinden op 65 DNA stalen van moeder en kind verstrekt door de vakgroep. Deze stalen zijn genomen van proefpersonen die verdeelt zijn op rookgedrag (roker, voormalig roker (gestopt in de eerste trimester van de zwangerschap) en niet-roker). De genotypering zal gedaan worden door middel van multiplex *polymerase chain reaction (PCR)* amplificatie en *Single Base Extension (SBE)*. De polymorfismen zijn in een eerdere studie geselecteerd op hun associatie met kanker ontwikkeling, de mogelijke invloed op DNA addukt formatie en op een minimale frequentie in de populatie van 5% (4).

**Tabel 1.** Effecten van de polymorfismen op enzym functie en DNA addukt niveau (4)

Polymorfisme	Effect op enzym activiteit	Effect op DNA addukt niveau	Referentie
CYP1A2 *1F	Hogere inducibiliteit	Verhoogde bioactivatie, hoger addukt niveau	4, 14
GSTM1 *0 (deletie)	Geen enzym activiteit	Verminderde detoxificatie, hoger addukt niveau	4, 15
GSTP1 *2	Verminderd enzym activiteit	Verminderde detoxificatie, hoger addukt niveau	4, 15
GSTT1 *3			4, 15
GSTT1 *0 (deletie)	Geen enzym activiteit	Verminderde detoxificatie, hoger addukt niveau	4, 15
NAT2 *5	Verminderd enzym activiteit	Verminderde detoxificatie, hoger addukt niveau	4
*6			4
*7			4

De polymorfismen waarop getest zal worden komen voor in de genen die coderen voor de enzymen cytochroom p4501A2 (CYP1A2), N-acetyltransferase 2 (NAT2) en Glutathione-S-transferase (GST) (zie Tabel 1). CYP1A2 speelt een rol in de bioactivatie van carcinogenen in sigarettenrook (4, 14). N-acetyltransferase 2 is een enzym dat zorgt voor detoxificatie van lichaamsvreemde stoffen door middel van acetylatie en GST is een familie van enzymen die onder andere betrokken zijn bij de detoxificatie van lichaamsvreemde stoffen (4, 15). De verkregen genotypering zal worden toegevoegd aan door de vakgroep eerder verzamelde data van de proefpersonen, waarna een statistische analyse zal worden uitgevoerd.

## 2 Materialen en methode

Om de paternale effecten van roken te onderzoeken, werden spermatogoniale cellen blootgesteld aan carcinogenen stoffen. Hierbij werd gekeken naar mogelijke cytotoxische en genotoxische effecten van B[a]P en BPDE en het vermogen van de spermatogoniale cellen om B[a]P te metaboliseren in BPDE en om BPDE geïnduceerde DNA addukten te herstellen. Voor het onderzoek naar de maternale effecten van roken werd genotypering uitgevoerd op moeder en kind, waarna de resultaten werden toegevoegd aan eerdere data en statistisch getoetst.

## 2.1 Celkweek

Om de effecten van carcinogenen stoffen in mannelijke geslachtscellen in vitro te onderzoeken, werd de spermatogoniale muizen cellijn GC-1spg (ATCC, Manassas, Amerika) gebruikt. De cellen werden gekweekt in kweekflessen van 25 cm<sup>2</sup> (T25) of 75 cm<sup>2</sup> (T75), in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bevattend 10% Fetal Bovine Serum (Sigma, St. Louis, Amerika), en werden geïncubeerd in een stoof bij 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>. Aan het begin werden de cellen uit vloeibare stikstof gehaald en zo snel mogelijk ontdooid in een 37 °C waterbad. Vervolgens werden de cellen toegevoegd aan vers, warm medium en voor 5 minuten bij 125xg gecentrifugeerd. De celpellet werd opgelost in medium en uitgezaaid in een kweekfles. Wanneer de cellen confluente hadden bereikt werden ze gewassen en getrypsineerd met 0.25% trypsine (bevattend 0.53 mM EDTA, Sigma) en 1 op 8 overgezet naar een nieuwe kweekfles.

## 2.2 MTT cytotoxiciteits test

De cytotoxiciteit van B[a]P, BPDE en B[e]P werd getest met behulp van de zogenaamde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)-test. MTT wordt gemetaboliseerd door mitochondriale dehydrogenases naar formazan. Formazan is een blauwe stof dat niet door het celmembraan kan en ophoopt in gezonde cellen. Door het toevoegen van een lysis reagens, zoals dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma), komt het formazan vrij, waarna het kan worden gemeten met behulp van een spectrofotometer. Doordat alleen vitale cellen MTT kunnen omzetten is de levensvatbaarheid van de cellen en dus de cytotoxiciteit proportioneel aan de absorptie.

Om de cytotoxiciteit te bepalen werden de GC-1 spg cellen tot confluente gekweekt en getrypsineerd. De cellen van verschillende kweekflessen werden geoogst en samengevoegd, waarna de cellen werden geteld met behulp van een Bürker telkamer. Van een 96-wells plaat werden de wellletjes gevuld met  $1 \times 10^3$  cellen. De cellen werden gekweekt tot confluente (ongeveer  $4 \times 10^4$  cellen), waarna ze overnacht werden blootgesteld aan 0.01, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20 en 40 µM B[a]P, BPDE of B[e]P. De blanco's (DMSO en MTT, zonder cellen) en controles (niet blootgestelde cellen) hadden hetzelfde DMSO gehalte.

Door overnacht te incuberen kregen de cellen gelegenheid de stoffen te metaboliseren. Vervolgens werd 25 µL MTT (2 mg/ml in PBS) toegevoegd en gedurende een uur geïncubeerd bij 37 °C. De oplossing werd uit de wellletjes verwijderd, waarna 100 µL DMSO werd toegevoegd om met behulp van vortexen de formazan kristallen op te lossen. Na 5 minuten werd de *optical density* (OD) bij 540 nm gemeten met een Microplate Reader (Bio-

rad, Amerika) en de levensvatbaarheid van de cellen werd berekend met de formule:  $(OD_{\text{teststof}})/(OD_{\text{blanco}}) \times 100\%$ . Het experiment werd in duplo uitgevoerd, zodat de gemiddelde levensvatbaarheid van de cellen en de standaardfout kon worden berekend.

### *2.3 Clonogenic survival test*

Aan de hand van de MTT cytotoxiciteits test werden concentraties gevonden waarbij de meeste cellen levensvatbaar zijn. De MTT cytotoxiciteits test meet echter niet of de cellen na blootstelling nog in staat zijn te delen. Om dit te onderzoeken werd gekozen voor de *clonogenic survival* test. Deze test toont op eenvoudige wijze de proliferatie capaciteit van cellen na blootstelling. Cellen werden blootgesteld, gezaaid en gefixeerd, waarna de kolonies werden geteld. De test werd in triplo uitgevoerd.

GC-1 spg cellen werden tot confluentie gekweekt en vervolgens geogst. De cellen werden gezaaid in 60mm kweekschaaltjes of T75 kweekflessen en tot 70% confluentie gekweekt, waarna ze gedurende 30 minuten bij 37 °C werden blootgesteld aan MNU (0.1, 1 en 20 µM) of BPDE (0.1 en 1 µM). Na blootstelling werden de cellen gewassen en getrypsineerd. De cellen werden met behulp van een Coulter counter (Beckman Coulter, Fullerton, Amerika) of Bürker telkamer geteld en in triplo gezaaid in 60mm of 100mm kweekschaaltjes. Na 12 tot 14 dagen werden de kolonies, na fixatie en aankleuring met 2% bromophenolblauw (Sigma) in 70% ethanol, geteld. Een kolonie werd geteld wanneer zij uit meer dan 50 cellen bestond. Overlappende kolonies werden waar mogelijk als meerdere kolonies geteld. Het aantal gevormde kolonies werd vergeleken met het aantal kolonies gevormd van niet-blootgestelde cellen door de fractie te berekenen. De fracties van triplo's werden gemiddeld, waarna de standaard fout kon worden berekend.

### *2.4 <sup>32</sup>P-postlabeling*

Spermatogoniale cellen die worden blootgesteld aan B[a]P kunnen schade oplopen, wanneer zij in staat zijn B[a]P te metaboliseren tot genotoxische metabolieten, zoals BPDE. BPDE bindt covalent met DNA en kan DNA addukten induceren. Als de cel deze DNA addukten niet voldoende kan repareren, neemt het DNA addukt niveau toe en kunnen mutaties ontstaan. Om te onderzoeken of B[a]P door CG-1 spg kan worden gemetaboliseerd en of CG-1 spg cellen in staat zijn BPDE geïnduceerde DNA addukten te herstellen werd <sup>32</sup>P-postlabeling gebruikt. <sup>32</sup>P-Postlabeling gaat uit van het principe dat DNA addukten zichtbaar kunnen worden gemaakt, door hen te labelen met een radio isotoop van fosfor (16).

Voor het onderzoek naar de metabolisatie van B[a]P werden CG-1 spg cellen overnacht (18 uur) blootgesteld aan 0.1, 1, 10 en 20  $\mu\text{M}$  B[a]P. Vervolgens werden de cellen geogst, het DNA geïsoleerd en ingevroren bij  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Voor het onderzoek naar het herstelvermogen van BPDE geïnduceerde DNA addukten werden CG-1 spg cellen voor een half uur blootgesteld aan 0.1  $\mu\text{M}$  BPDE en vervolgens na 1, 4, 8 en 24 uur in de stoof geogst. Het DNA werd geïsoleerd en eveneens ingevroren.

De  $^{32}\text{P}$ -*postlabeling* werd uitgevoerd door een bevoegd persoon binnen de vakgroep in verband met werken met radio actief materiaal.  $^{32}\text{P}$ -*Postlabeling* gaat uit van het volgende principe (16). Allereerst wordt het te onderzoeken DNA enzymatisch afgebroken tot normale nucleotiden en nucleotiden met addukten. De hoeveelheid nucleotiden werd bepaald en vervolgens werd het mengsel gezuiverd door de normale nucleotiden af te breken tot nucleosiden en fosforgroepen door middel van de *nuclease P1* methode. De *nuclease P1* methode gaat uit van het principe dat bepaalde DNA addukten, zoals geïnduceerd door BPDE, resistent zijn tegen 3'-defosforisatie en gewone nucleotiden niet (16). De addukt nucleotiden werden vervolgens gelabeld door middel van polynucleotide kinase en  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en gescheiden met *thin-layer chromatography* (TLC), waarna ze werden gedetecteerd en gekwantificeerd.

### 2.5 Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms

Om te onderzoeken of polymorfismen in genen die voor metabole eiwitten coderen, bijdragen aan de effecten van roken tijdens de zwangerschap op de foetus, werden de genotypen van de enzymen CYP1A2, GSTM1, GSTP1, GSTT1 en NAT2 geïnventariseerd. Er werd gekeken naar 10 *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) die gelijktijdig werden geamplificeerd met behulp van multiplex *PCR* en vervolgens individueel werden gelabeld met een *Single Base Extension* (SBE) met behulp van SnapShot<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Nieuwekerk a.d. IJssel, Nederland) zoals eerder beschreven (17).

DNA stalen (100 ng/ml) van onderzochte proefpersonen (moeder en kind) werden door de vakgroep beschikbaar gesteld. Allereerst werd de concentratie gecontroleerd door middel van spectrofotometrie bij een golflengte van 260 en 320 nm. Voor de multiplex *PCR* waren de primers al ontworpen en beschreven (4). Een *PCR* mastermix van 10  $\mu\text{L}$  per staal werd bereid met een primer concentratie van 0.16  $\mu\text{M}$  voor GSTP1\*2, 0.21  $\mu\text{M}$  voor GSTM1\*0 en NAT2\*7, 0.22  $\mu\text{M}$  voor GSTP1\*3, GSTT1\*0 en NAT2\*6 en 0.45  $\mu\text{M}$  voor CYP1A2\*1F en NAT2\*5, *PCR* buffer, 0.2 mM *deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs), 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.25 U *Platinum Taq Polymerase* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Amerika) en 200 ng *template*

DNA. Het *PCR* programma werd uitgevoerd met een deksel temperatuur van 100 °C, een denaturatie stap van 3 minuten bij 94 °C, een 30 maal herhaalde cyclus van 30 seconden bij 94 °C, 56 °C en 72 °C en een laatste extensie stap van 5 minuten bij 72 °C.

Om de ongebruikte *dNTPs* en primers die zouden kunnen interfereren in de *SBE* reactie te verwijderen, werd aan elk staal 4 µL *ExoSAP-IT* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Engeland) toegevoegd. Vervolgens werd elk staal geïncubeerd bij 37 °C gedurende 45 minuten, waarna de *ExoSAP-IT* enzymen werden gedeactiveerd bij 75 °C.

Voor de *SBE* reactie waren de primers eveneens al ontworpen en beschreven (4). Er werd een *PCR* mastermix van 10 µL per staal bereid met een *SBE* primer concentratie van 0.04 µM voor NAT2\*6\_Left, 0.2 µM voor GSTT1\*0\_Left, CYP1A2\*1F\_Left, GSTP1\*2\_Left en NAT2\*7\_Left, 0.4µM voor GSTM1\*0\_Left, 0.8µM voor NAT2\*5\_Left en 1 µM voor GSTP1\*3\_Left, 2.5 µL *SNaPSHOT Multiplex Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems) en 3 µL opgeschoond multiplex *PCR* product verkregen na de *ExoSAP-IT* reactie. Het *PCR* programma bestond uit 25 cycli van 10 seconden bij 96 °C en 30 seconden bij 60 °C.

Om te voorkomen dat de fluorescerende *dideoxyribonucleotide triphosphates* (*[F]ddNTPs*) op dezelfde wijze migreren als de stalen tijdens de elektroforese werd 1 U *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, GE Healthcare) toegevoegd en voor 1 uur geïncubeerd bij 37 °C. Hierna werd het enzym gedeactiveerd bij 75 °C.

Voor de elektroforese werd een mastermix gemaakt, bestaande uit 13 µL gedeïoniseerd formamide en 0.4 µL *Genescan-120 LIZTM size standard* (Applied Biosystems) per staal. De elektroforese werd door een derde partij uitgevoerd (Fig. 1).

De resultaten van de elektroforese werden verwerkt en het genotype werd als categorische variabele (wildtype homozygote, heterozygote en homozygote mutant) toegevoegd aan eerdere data van de vakgroep over de proefpersonen. Deze data bevatten het rookgedrag van de moeder (roker, niet roker, voormalige roker), de hoeveelheid sigaretten per dag, de zwangerschapsduur in dagen, het geboortegewicht van het kind in dagen, de *Hprt*-mutatie frequentie per  $1 \times 10^6$  cellen van de moeder en het DNA addukt niveau per  $10^8$  nucleotiden van moeder en kind. Deze data werd vervolgens geanalyseerd met behulp van het programma SPSS versie 13.0 voor Windows.

Om te bepalen of de polymorfismen bijdragen in de schadelijke effecten van roken op moeder en kind werd allereerst getoets of er significante verschillen waren tussen de verschillende rookgedrag categorieën voor de variabelen. Allereerst werden de varianties van de variabelen getoetst op gelijkheid tussen de verschillende rookgedragingen. Voor de variabelen waarbij de varianties gelijk waren werd de Anova One Way toets gebruikt. Om te toetsen tussen welke

specifieke rookgedragingen een significant verschil bestaat, werd er een post-hoc Scheffe toets uitgevoerd. Voor de variabelen waarbij de varianties niet gelijk waren werd de Kruskal-Wallis toets gebruikt. Om de verschillen tussen de specifieke rookgedragingen te toetsen werd de Mann-Whitney toets gebruikt.

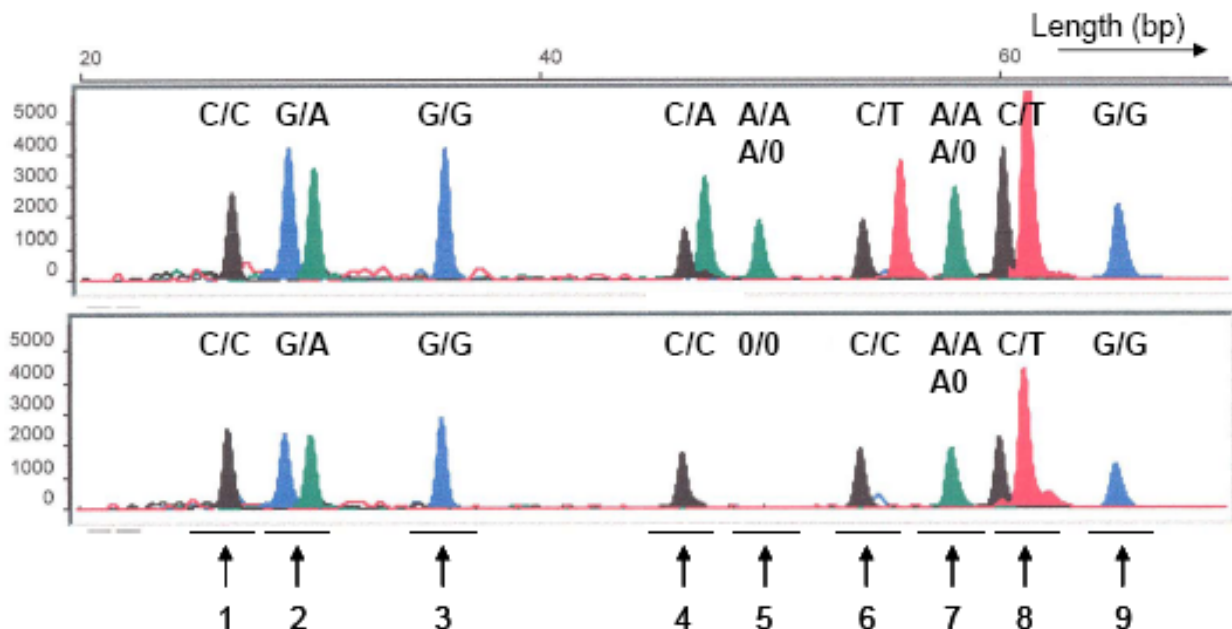


Fig. 1. Multiplex genotyping van polymorfismen in metabolisatie genen (17).

Representatieve weergave van de verkregen data na SBE genotyping van twee verschillende individuen. De afwezigheid van een piek duidt op homozygote deletie. Piek 1, n.v.t.; piek 2, GSTP1\*2; piek 3, NAT2\*6; piek 4, CYP1A2\*1F; piek 5, GSTM1; piek 6, GSTP1\*3; piek 7, GSTT1; piek 8, NAT2\*5; piek 9, NAT2\*7 (17).

Om te toetsen of polymorfismen een significante bijdrage hadden in de waargenomen verschillen werd elk genotype in categorieën ingedeeld. Wildtype homozygoten werden als 0 genoteerd, heterozygoten met 1 risico allel als 1 en mutant homozygoten met 2 risico allelen als 2. Deleties werden eveneens als 2 genoteerd. Voor elk proefpersoon werd het cumulatieve risico bepaald door de numerieke waarden voor elk polymorfisme bij elkaar op te tellen. De rookgedrag categorieën niet rokers en voormalige rokers werden samengevoegd, zodat alleen het directe effect van roken werd onderzocht. De twee rookgedrag categorieën (niet/voormalig rokers en rokers) werd vervolgens ingedeeld op laag cumulatief risico (0-2 risico allelen), gemiddeld cumulatief risico (3-5 risico allelen) en hoog cumulatief risico (>5 risico allelen). Voor het DNA addukt niveau van moeder en kind werd bepaald of het aantal risico allelen bijdragen in de effecten van roken.



### 3 Resultaten

Om de paternale effecten van roken te onderzoeken, werd gebruik gemaakt van een cytotoxiciteits test, een *clonogenic survival assay* en  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. Voor het onderzoek naar de maternale effecten van roken werd een genotypering uitgevoerd op moeder en kind en werd de verkregen data statistisch getoetst.

#### 3.1 Cytotoxiciteits test

Door middel van de MTT cytotoxiciteits test werd onderzocht welke doses B[a]P, BPDE en B[e]P cytotoxisch zijn voor GC-1 spg cellen.

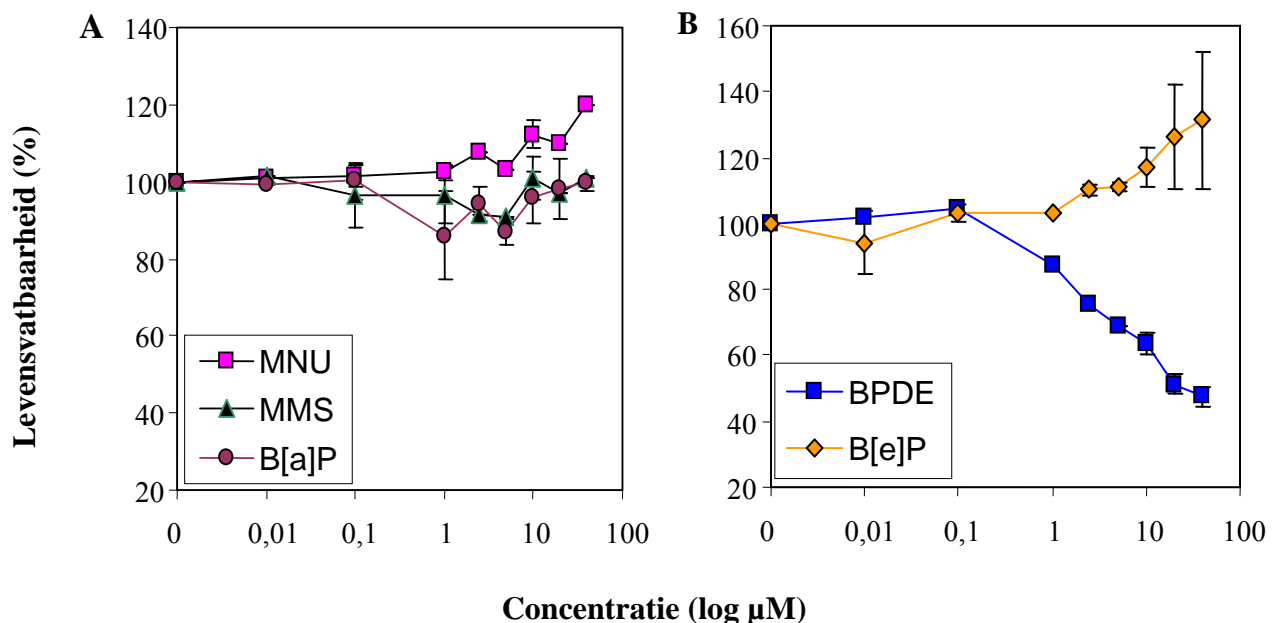


Fig. 2. MTT cytotoxiciteits test.

**A,B:** Levensvatbaarheid dosis respons curve van GC-1 spg cellen blootgesteld aan MNU, MMS, B[a]P, B[e]P en BPDE: de levensvatbaarheid van cellen werd getest door metabolisatie van MTT tot formazan kristallen. De kristallen werden opgelost en gemeten met een spectrofotometer. Per concentratie zijn de gemiddelden en de standaard fout weergegeven.

MNU heeft geen effect op de levensvatbaarheid bij concentraties tot 5 μM en geeft een licht stijgende mitochondriale activiteit bij hogere concentraties (Figuur 2A). MMS en B[a]P geven met elkaar vergelijkbare resultaten en blijven voor alle geteste concentraties rond de 100% levensvatbaarheid van GC-1 spg cellen. B[e]P geeft voor concentraties hoger dan 1 μM een stijgende levensvatbaarheid, maar heeft bij deze concentraties een hoge standaardfout (Figuur 2B). BPDE heeft geen effect op de levensvatbaarheid bij de concentraties 0.01 en 0.1 μM,

maar geeft een sterke daling van levensvatbaarheid vanaf 1  $\mu\text{M}$  tot 48% bij de hoogst geteste concentratie van 40  $\mu\text{M}$ .

De MTT test toont aan dat de stoffen B[a]P, B[e]P, MMS en MNU geen overtuigend negatief effect hebben op de mitochondriale activiteit en daarmee de levensvatbaarheid van GC-1 spg cellen bij concentraties tot 40  $\mu\text{M}$ . BPDE heeft echter wel een sterk schadelijk effect bij concentraties hoger dan 1  $\mu\text{M}$ .

### 3.2 Clonogenic survival assay

Om het vermogen tot delen van GC-1 spg cellen na blootstelling aan BPDE vast te stellen, werden cellen na blootstelling gezaaid om ze gelegenheid te geven kolonies te vormen.

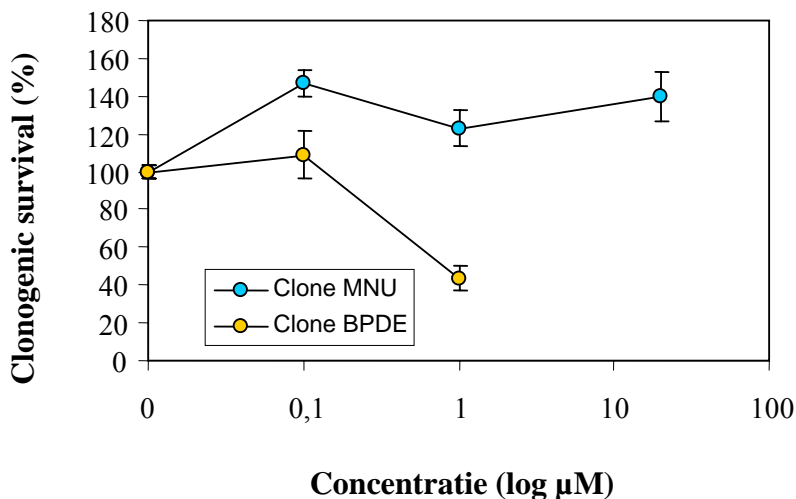


Fig. 3. *Clonogenic survival assay.*

*Clonogenic survival* dosis respons curve van GC-1 spg cellen blootgesteld aan MNU en BPDE: de *clonogenic survival* van GC-1 spg cellen werd getest door cellen bloot te stellen, sterk verdund uit te zaaien en de kolonies te tellen. Per concentratie zijn de gemiddelden en de standaard fout weergegeven.

Na een blootstelling van 1  $\mu\text{M}$  BPDE heeft 60% van de GC-1 spg cellen het vermogen verloren zich te delen in vergelijking met niet-blootgestelde cellen (Figuur 3). Een concentratie van 0.1  $\mu\text{M}$  BPDE heeft geen effect op de *clonogenic survival* van de cellen. MNU geeft voor alle blootstellingen een lichte stijging in kolonies.

De resultaten van de *clonogenic survival assay* geven aan dat BPDE een duidelijk negatief effect heeft op het deelvermogen van GC-1 spg cellen bij een concentratie van 1  $\mu\text{M}$ . MNU heeft een klein positief effect op de *clonogenic survival*.

### 3.3 <sup>32</sup>P-Postlabeling

Om het B[a]P metabolisatie vermogen van CG-1 spg cellen en het herstelvermogen van BPDE geïnduceerde DNA addukten te testen werd gebruik gemaakt van <sup>32</sup>P-Postlabeling. CG-1 cellen blootgesteld aan 0,1 μM B[a]P hebben een DNA addukt niveau van 63 addukt nucleotiden per 10<sup>7</sup> nucleotiden. Concentraties van 10 en 20 μM geven een DNA addukt niveau van ongeveer 3.5x10<sup>4</sup> (Figuur 4A). Wanneer DNA addukten worden geïnduceerd door middel van BPDE in CG-1 spg cellen, is er een lichte stijging te zien in DNA addukt niveau na verloop van tijd. 1 uur na blootstelling is er een DNA addukt niveau van 4.96, na 8 en 24 uur is er een DNA addukt niveau van ongeveer 5.7. De tijdstippen 2 en 4 uur gaven geen resultaten.

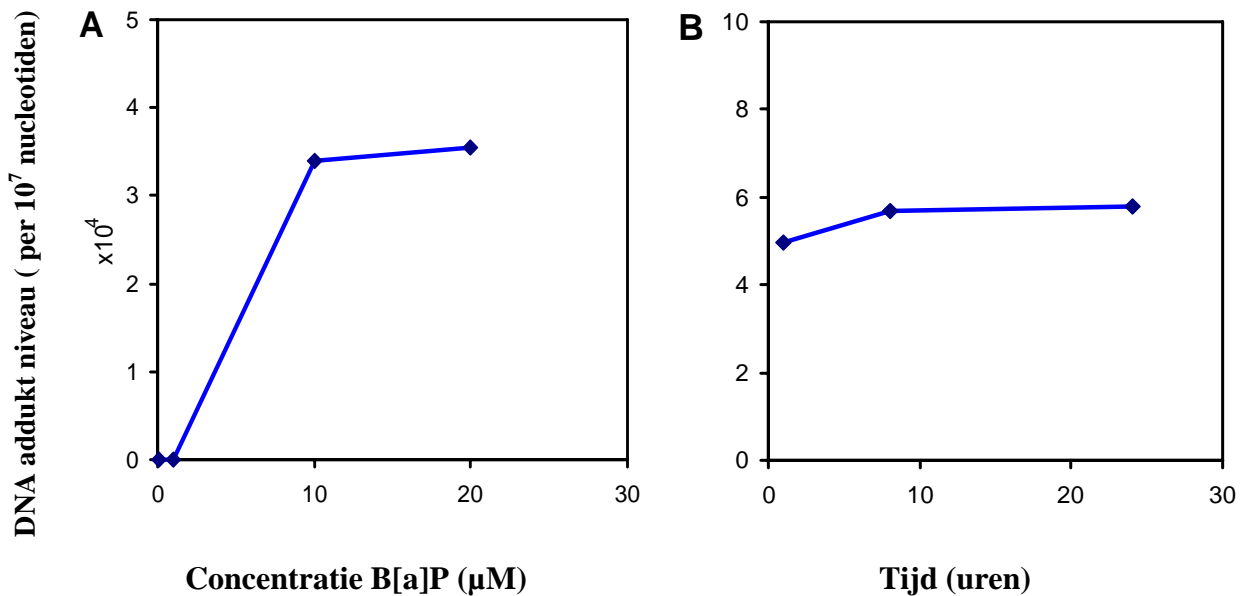


Fig. 4. <sup>32</sup>P-Postlabeling

**A:** DNA addukt niveau in 10<sup>4</sup> per 10<sup>7</sup> nucleotiden na blootstelling aan B[a]P. Cellen werden blootgesteld aan verschillende concentraties B[a]P en overnacht geïncubeerd. Vervolgens werd het DNA addukt niveau bepaald met behulp van <sup>32</sup>P-postlabeling. **B:** DNA addukt niveau per 10<sup>7</sup> nucleotiden over een tijdsperiode van 24 uur. Cellen werden blootgesteld aan 0.1 μM BPDE, na een half uur incubatie gewassen om de cel gelegenheid te geven geïnduceerde DNA addukten te herstellen en vervolgens geogst op verschillende tijdsintervallen. <sup>32</sup>P-postlabeling werd gebruikt om het DNA addukt niveau te bepalen.

De resultaten van de <sup>32</sup>P-Postlabeling tonen aan dat CG-1 spg cellen in staat zijn om B[a]P te metaboliseren tot DNA addukt inducerende metaboliëten. Zij zijn echter niet goed in staat om de BPDE geïnduceerde DNA addukten te herstellen en te verwijderen.

**Tabel 1.** Statistisch overzicht en variantie homogentheids toets van de variabelen zwangerschapsduur, *Hprt* mutatie frequentie, DNA adduct nivo moeder en kind en geboortegewicht kind en de verdeling over de rookgedrag categorieën (1 = niet-roken, 2 = voormalig roker, 3 = roker).

Variabele	Rookgedrag	N	Gemiddelde	Standard fout	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zwangerschapsduur (dagen)	1	20	287.1	1.8	-	-	-	-
	2	13	285.3	2.2	-	-	-	-
	3	15	279.1	2.7	-	-	-	-
	<b>Totaal</b>	48	284.1	1.3	0.76	2	45	0.472
<i>Hprt</i> mutatie frequentie moeder (per 10 <sup>6</sup> cellen)	1	9	2.4x10 <sup>-6</sup>	4.3x10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-
	2	5	1.9x10 <sup>-6</sup>	8.3x10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-
	3	9	6.6x10 <sup>-6</sup>	1.4x10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-
	<b>Totaal</b>	23	3.9x10 <sup>-6</sup>	7.3x10 <sup>-7</sup>	6.06	2	20	0.009
DNA adduct nivo moeder (per 10 <sup>8</sup> nucleotiden)	1	24	0.24	0.06	-	-	-	-
	2	13	0.57	0.13	-	-	-	-
	3	13	1.1	0.35	-	-	-	-
	<b>Totaal</b>	50	0.57	0.11	11.16	2	47	0.000
DNA adduct nivo neonaat (per 10 <sup>8</sup> nucleotiden)	1	24	0.10	0.03	-	-	-	-
	2	13	0.27	0.11	-	-	-	-
	3	13	0.44	0.20	-	-	-	-
	<b>Totaal</b>	50	0.23	0.06	6.27	2	47	0.004
Geboortegewicht neonaat (grammen)	1	12	3382.9	166.8	-	-	-	-
	2	12	3922.9	185.6	-	-	-	-
	3	13	3223.4	155.3	-	-	-	-
	<b>Totaal</b>	37	3502.0	107.1	0.10	2	34	0.909

### 3.4 Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms

Door middel van genotyping van SNP's in de genen van de enzymen CYP1A2, GSTM1, GSTP1, GSTT1 en NAT2 werd onderzocht of zij invloed hebben op de schadelijke effecten van roken. De verkregen data werd toegevoegd aan eerdere data van de vakgroep.

Het rookgedrag is opgedeeld in categorieën waarbij categorie 1 de niet rokers zijn, categorie 2 de rokers die gestopt zijn in de eerste maand van de zwangerschap en categorie 3 de rokers. Om de cumulatieve bijdrage van het aantal risico allelen op de effecten van roken te onderzoeken, werd eerst vastgesteld of er significante verschillen waren tussen rookgedrag en de gekozen variabelen. Van de proefpersonen is bij 48 moeders de zwangerschapsduur bekend, met een gemiddelde van 284.1 dagen en een standaard fout van 1.3 dagen (Tabel 2). Het gemiddelde van de verschillende rookgedrag categorieën verschilt maximaal 8 dagen. Van 23 moeders, waarvan 9 roken, is de *Hprt* mutatie frequentie bekend met een gemiddelde van  $3.9 \times 10^{-6}$  mutaties per miljoen cellen. Het DNA addukt niveau is van 50 moeder kind paren bekend, waarbij er relatief grote verschillen zijn tussen de gemiddelden van de verschillende rookgedrag categorieën. Rokers en kinderen van rokers hebben een hoger gemiddeld DNA addukt niveau dan niet rokers. Van 37 proefpersonen is het geboortegewicht bekend, waarbij de gemiddelden kleine verschillen vertonen.

Voor het uitvoeren van een One Way Anova toets dienen de varianties gelijk te zijn, anders dient de Kruskal-Wallis toets gebruikt te worden. Alleen voor de variabelen zwangerschapsduur en geboortegewicht mag worden aangenomen dat zij gelijke varianties hebben (Tabel 2). De variabelen *Hprt* mutatie frequentie en DNA addukt in moeder en kind hebben significant geen gelijke varianties bij een betrouwbaarheidsinterval van 95%.

De Kruskal-Wallis test geeft voor de variabelen *Hprt* mutatie frequentie moeder, DNA addukt niveau moeder en DNA addukt niveau neonat alleen een significant verschil tussen het rookgedrag voor het DNA addukt niveau van moeder en kind (Tabel 3). Zowel bij moeder als kind zorgt roken voor een stijging in de gemiddelde rang van het DNA addukt niveau.

De One Way Anova toets geeft een significant verschil tussen de categorieën rookgedrag voor de variabelen zwangerschapsduur en geboortegewicht met een betrouwbaarheidsinterval van 95% (Tabel 4). Voor zwangerschapsduur is er alleen een significant verschil tussen rokers en niet-rokers. Niet-rokers hebben een gemiddeld verschil van 8 dagen zwangerschapsduur in vergelijking met rokers. Het geboortegewicht van het kind verschilt alleen significant tussen voormalige rokers en rokers, waarbij het geboortegewicht bij kinderen van voormalige rokers gemiddeld 700 gram zwaarder is. Er is geen significant verschil in geboortegewicht tussen kinderen van rokers en niet-rokers. De Mann-Whitney toets geeft aan dat er een significant

verschil is tussen niet-rokers en voormalig rokers en tussen niet-rokers en rokers voor het DNA addukt niveau bij de moeders met een betrouwbaarheidsinterval van 95% (Tabel 4). Voor het DNA addukt niveau bij het kind is er alleen een significant verschil tussen rokende en niet-rokende moeders.

Er zijn significante verschillen gevonden voor rookgedrag en de variabelen zwangerschapsduur en geboortegewicht, waarbij er voor de variabele zwangerschapsduur er een significant verschil is tussen rokers en niet-rokers. Het DNA addukt niveau bij de moeder is significant verschillend tussen alle rookgedrag categorieën en het DNA addukt niveau bij het kind is significant verschillend tussen rokende en niet-rokende moeders.

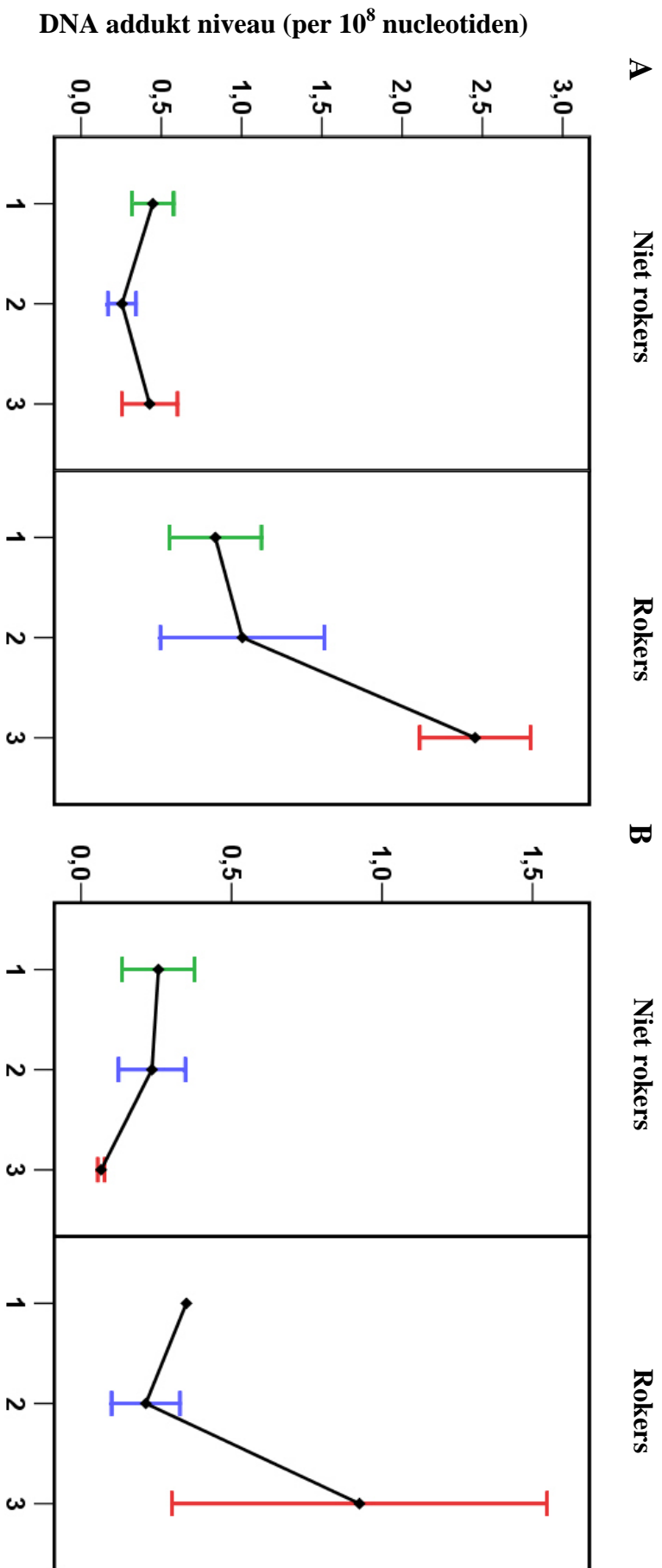
**Tabel 3.** Een Kruskal-Wallis toets werd uitgevoerd tussen de categorieën rookgedrag (1 = niet-roken, 2 = voormalig roker, 3 = roker) voor de variabelen *Hprt* mutatie frequentie moeder en DNA addukt niveau moeder en kind.

Variabele	Chi-Square	df	Asymp. Sig.	Rookgedrag	Gemiddelde rang
<i>Hprt</i> mutatie frequentie moeder (per 10 <sup>6</sup> cellen)	5.12	2	0.077	1	10.56
				2	7.80
				3	15.78
DNA addukt niveau moeder (per 10 <sup>8</sup> nucleotiden)	12.09	2	0.002	1	18.50
				2	29.62
				3	34.31
DNA addukt niveau neonaat (per 10 <sup>8</sup> nucleotiden)	6.07	2	0.048	1	21.10
				2	28.04
				3	31.08

Om de rol van polymorfismen in de genotypen van metabolisatie eiwitten te onderzoeken, werd getoets wat het effect is van het aantal risico allelen op het DNA addukt niveau in moeder en kind. Voor zowel moeder als kind geeft 5 of meer risico allelen bij rokende moeders een significant hoger niveau in DNA addukten (Figuur 5). Voor niet-rokende moeders is er geen verschil tussen het aantal risico allelen en het DNA addukt niveau bij moeder en kind. Deze resultaten tonen aan dat het aantal risico allelen bijdraagt aan het DNA addukt niveau van de rokende moeder en haar kind.

**Tabel 3.** One Way Anova toets tussen de categorieën rookgedrag (1 = niet-roken, 2 = voormalig roker, 3 = roker) voor de variabelen zwangerschapsduur en geboortegewicht en Mann-Whitney toets voor de variabelen DNA adduct nivo moeder en kind. Een *post-hoc* Scheffe's toets is uitgevoerd om verschillen tussen specifieke categorieën rookgedrag voor de variabelen zwangerschapsduur en geboortegewicht te toetsen.

Variable	Rook- gedrag	df	F	Sig.	Vershil gemiddelde tussen groepen	Standard fout	Sig.	Mann- Whitney U	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig.
Zwangerschapsduur (dagen)	Tussen groepen	2	3.7	0.032				-	-	-	-
	1 versus 2				1.84	3.12	0.841	-	-	-	-
	1 versus 3				8.02	3.00	0.036	-	-	-	-
	2 versus 3				6.17	3.33	0.190	-	-	-	-
	Tussen groepen	2	4.7	0.016				-	-	-	-
	1 versus 2				-540.00	242.41	0.099	-	-	-	-
Geboortegewicht (grammen)	1 versus 3				159.46	237.71	0.800	-	-	-	-
	2 versus 3				699.46	237.71	0.021	-	-	-	-
	1 versus 2							83	-2.469	0.014	0.020
	1 versus 3							61	-3.180	0.001	0.002
	2 versus 3							65	-1.004	0.316	0.336
	1 versus 2							113.5	-1.673	0.094	0.179
DNA adduct nivo moeder (per 10 <sup>8</sup> nucleotiden)	1 versus 3							93	-2.410	0.016	0.046
	1 versus 2							75	-0.521	0.603	0.650
	2 versus 3										
DNA adduct nivo neonaat (per 10 <sup>8</sup> nucleotiden)	1 versus 3										
	1 versus 2										
	2 versus 3										



Figuur 5. DNA addukt niveau voor niet rokers en rokers in relatie tot het aantal risico allelen

**A:** DNA addukt niveau bij moeders voor niet rokers en rokers en de relatie tot het aantal risico allelen. Het aantal risico allelen werd ingedeeld in categorieën (1 = <2; 2 = >2<5; 3 = >5), waarna voor elke categorie het gemiddelde DNA addukt niveau en de standaardfout werd bepaald. **B:** DNA addukt niveau bij kinderen voor niet rokers en rokers en de relatie tot het aantal risico allelen.



## 4 Discussie

Rookgedrag heeft niet alleen een nadelig effect op de gezondheid van de roker zelf, maar ook op zijn of haar nageslacht. Sigarettenrook bevat PAKs die verantwoordelijk zijn voor een aanzienlijk deel van de carcinogenen effecten van tabak. Van deze PAKs is B[a]P een van de meest gebruikte modellen in het onderzoek naar de effecten van sigarettenrook. B[a]P wordt gemetaboliseerd tot BPDE, een gevaarlijk genotoxische verbinding. De effecten van carcinogenen stoffen in PAKs hangt af van de metabole activatie en detoxificatie door fase 1 en 2 enzymen. Er zijn individuele verschillen gevonden voor de activiteit van deze enzymen, wat te wijten is aan polymorfismen in de genen die deze enzymen coderen.

Roken heeft bij mannen een nadelig effect op de frequentie van DNA fragmentatie van spermacellen. De kwaliteit van sperma gaat achteruit, waarbij er minder spermacellen wordt gevormd, de spermacel mobiliteit afneemt, de spermacel morbiditeit toeneemt en er meer spermacellen zijn met chromosomen die diploïde zijn. In dit onderzoek werd bij de MTT test voor blootstelling van spermatogoniale cellen aan B[a]P geen cytotoxisch effecten gevonden, terwijl zij wel in staat zijn B[a]P te metaboliseren, met DNA addukten tot gevolg. BPDE heeft echter wel een cytotoxisch effect, zorgt voor een hoger DNA addukt niveau en een daling in het vermogen van spermatogoniale cellen om zich te delen.

Roken van zwangere vrouwen is gerelateerd aan vroegtijdige geboortes, intra-uteriene groeiachterstand van de foetus en afwijkingen van de placenta. In de proefpersonen groep van dit onderzoek werd een significant effect gevonden van roken op de zwangerschapsduur, op het DNA addukt niveau bij moeders voor huidige rokers en op het DNA addukt niveau van kinderen bij rokers. Daarnaast is gekeken naar het cumulatieve effect van risico allelen in bioactivatie en detoxificatie enzym genotypen op de gevolgen van roken. Voor risico allelen in het bioactivatie enzym cytochroom p4501A2 en de detoxificatie enzymen N-acetyltransferase 2 en de Glutathione-S-transferase familie kon een cumulatief effect worden aangetoond.

### 4.1 Paternale effecten van roken

Om de effecten van sigarettenrook op de spermatogoniale cellen te onderzoeken werden GC-1 spg cellen blootgesteld aan verschillende carcinogenen stoffen. Uit de resultaten van de MTT cytotoxiciteits test blijkt dat na blootstelling van GC-1 spg cellen aan MNU, MMS, B[e]P, B[a]P en BPDE, MNU een licht positieve werking op de mitochondriale activiteit van GC-1 spg cellen heeft. De *clonogenic survival assay* laat ook een lichte stijging in celgroei zien. Een

mogelijke verklaring hiervoor is dat bij hogere concentraties MNU de cel extra hard moet gaan werken om de DNA beschadigingen van MNU te repareren. De stimulatie van MNU om zichzelf te repareren, kan leiden tot een hoger metabolisme in de cel, waardoor de cel zich sneller gaat delen. MNU is een direct carcinogeen, dat werkt gedurende alle spermatogenetische stades (18). MNU heeft echter het grootste mutagene effect tijdens en na differentiatie van spermatogoniale cellen (19). Het is mogelijk dat MNU licht genotoxische effecten heeft op de ongedifferentieerde spermatogoniale CG-1 spg cellen, die de cel in staat is te repareren of die niet in de testen naar voren komen. Het mechanisme of significantie hiervan is onduidelijk.

Zoals bepaald met de MTT test heeft B[a]P geen effect op de mitochondriale activiteit, wat zou kunnen betekenen dat hier een ander proces plaats vind. De <sup>32</sup>P-*Postlabeling* toonde aan dat B[a]P wel wordt gemetaboliseerd in de cellen, wat leidt tot DNA addukten, maar dit heeft kennelijk geen effect op de mitochondriale activiteit van de cel, waardoor de levensvatbaarheid niet verandert. De <sup>32</sup>P-*Postlabeling* is echter slechts eenmaal uitgevoerd en zal nog herhaald moeten worden om doorslaggevende resultaten te leveren.

BPDE geeft vanaf 1 µM een sterke daling in de levensvatbaarheid van de cellen. Dit is in overeenstemming met de verwachtingen, aangezien BPDE een sterke cytotoxische stof is. BPDE concentraties hoger dan 1 µM geven een sterke daling in de celgroei. Concentraties hoger dan 1 µM brengen dus effectieve schade aan de cel toe. Kleine dosissen van BPDE-2 zijn echter al zeer cytotoxisch. Er werd in andere studies bij hamster V79 cellen een 40% daling in kloon vermogen gevonden bij 0.1 µM, en een daling van 70% bij 0.3 µM tot 97% bij 0.7 µM (2). Deze sterke dalingen werden niet gevonden bij dit onderzoek, maar benadrukken het belang van BPDE concentraties tussen de 0.1 en 1 µM, omdat tussen deze waarden grote veranderingen in effecten plaats vinden. De <sup>32</sup>P-*Postlabeling* toonde aan dat een concentratie van 0,1 µM BPDE al voor DNA addukten zorgt die CG-1 spg cellen niet in staat zijn te repareren. Dit experiment zal echter herhaald moeten worden voor betrouwbaardere resultaten.

Deze resultaten tonen de cytotoxiciteit, het inhiberend vermogen op de celdeling en het DNA addukt inducerende vermogen van BPDE aan. Er is echter een groot verschil in effect tussen de concentraties 0.1 en 1 µM. Een vervolg onderzoek zou de effecten van concentraties tussen 0.1 en 1 µM beter in kaart kunnen brengen, waarbij het mogelijk is dat er mutaties optreden zonder dat de cel het vermogen verliest om zich te delen door de hoge cytotoxiciteit van BPDE. Als de cellen beter in staat zijn te overleven kan de mutatie frequentie van B[a]P en BPDE worden onderzocht door bijvoorbeeld de zogenaamde hypoxanthine

phosphoribosyltransferase (*hprt*) mutatie test. De *hprt*-test toont de aanwezigheid van mutaties aan op het *hprt*-gen. Het *hprt*-gen zorgt na transcriptie voor de aanwezigheid van het eiwit hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*hgprt*). Het *hgprt* eiwit speelt een rol in het hergebruik van purinen. Bij transformatie van de purine analoog 6-thioguanine (6-TG) door *hgprt* ontstaat een cytotoxische stof die dodelijk is voor de cel. Wanneer er echter spontane of geïnduceerde mutaties hebben plaatsgevonden in het *hprt*-gen door bijvoorbeeld BPDE geïnduceerde DNA addukten, zal de cel geen 6-TG omzetten, waardoor zij in leven blijft en kolonies kan vormen. Als de genotoxische effecten van B[a]P en BPDE in spermatogoniale cellen beter zijn onderzocht kan worden bekeken wat de invloed is van de herstelmechanismen in spermatogoniale cellen.

#### *4.2 Maternale effecten van roken*

Om de rol van polymorfismen in de effecten van roken bij zwangere vrouwen te onderzoeken werden gegevens verzameld over rookgedrag, zwangerschapsduur, geboortegewicht neonaat, DNA addukt niveau moeder en kind en *hprt* mutatie frequentie bij het kind. Statistische analyse van de data van de proefpersonen en hun rookgedrag geeft voor rokers een significant negatief effect op de zwangerschapsduur. Dit is in overeenstemming met de resultaten in de literatuur, waarbij er een dosis respons verhouding werd gevonden tussen roken en vroegtijdige geboorte (13).

Er werd echter geen negatief effect van roken op het geboortegewicht gevonden tussen rokers en niet-rokers, wat te wijten kan zijn aan de kleine groep proefpersonen. Er is wel een significant verschil in DNA addukt niveau tussen niet-rokers en rokers, wat overeenkomt met de literatuur (21). Deze relatie tussen rookgedrag en DNA addukt niveau in het kind is tussen niet-rokers en rokers eveneens significant, wat overeenkomt met de notie dat foetussen via de placenta worden blootgesteld aan carcinogenen (8).

Voor het cumulatieve effect van de onderzochte polymorfismen op de gevolgen van roken zijn bewijzen gevonden. Rokende zwangere vrouwen hebben een hoger addukt niveau wanneer zij meer dan 5 risico allelen hebben in vergelijking met rokende zwangere vrouwen met minder dan 5 risico allelen. Dit geldt eveneens voor de kinderen van de rokers met meer dan 5 risico allelen. Bij niet-rokers zijn er geen verschillen gevonden tussen het DNA addukt niveau en de hoeveelheid risico allelen. De effecten van de individuele polymorfismen op de gevolgen van roken konden niet worden onderzocht door de kleine groep proefpersonen. Voor het polymorfisme in het CYP1A2 gen, wat voor een verhoogde induceerbaarheid van dit bioactivatie enzym zorgt, is in andere studies een verband gevonden tussen het polymorfisme

en een hoger risico op colon-rectale kanker (23). In dit onderzoek is geen verband aangetoond voor de invloed van N-acetyltransferase 2 op de effecten van roken. Andere studies tonen echter aan dat NAT2 een rol speelt in de detoxificatie van lichaamsvreemde stoffen waarbij bepaalde polymorfismen die zorgen voor een langzamere werking, een verhoogd risico op kanker geven (24,25). De GSTM1 en GSTP1 polymorfismen worden in de literatuur geassocieerd met een verhoogd DNA addukt niveau na blootstelling aan PAKs in sigarettenrook (25,26).

De gevolgen van roken op zwangere vrouwen, hun zwangerschap en nageslacht zijn aangetoond, waarbij het aantal risico allelen zorgt voor verschillen in de gevolgen van roken tussen rokers. Een grote groep proefpersonen zou kunnen leiden tot het vinden van specifieke interacties tussen en de effecten van genotypen op de gevolgen van roken. Wanneer deze specifieke interacties bekend zijn, kan de genetische opmaak van personen leiden tot het identificeren van risico groepen. Hierdoor zouden interventie of preventie programma's doelgerichter te werk kunnen gaan en deze risico groepen beter gewaarschuwd kunnen worden voor de gevolgen van roken.

#### *4.3 Conclusie*

Zowel de moeder als de vader benadeelt hun nageslacht door te roken. Sigarettenrook bevat PAKs, waaronder B[a]P. BPDE, een metaboliet van B[a]P heeft genotoxische effecten op spermatogoniale cellen, waarbij de levensvatbaarheid en het vermogen van de cel om zich te delen afneemt. B[a]P en BPDE zorgen eveneens voor een verhoogd DNA addukt niveau. Wat precies de invloed is van herstel en beschermingsmechanismen op de genotoxische effecten in spermatogoniale cellen moet nog nader worden onderzocht. De CG-1 spg cellijn heeft mogelijk een aangetast DNA reparatiemechanisme, wat de hoogte en herstelsnelheid van DNA addukten kan beïnvloeden.

Een hoger aantal risico allelen zorgt voor een hoger DNA addukt niveau bij rokende moeders en hun kinderen. Om de rol van de verscheidene genotypen op de gevolgen van roken beter te onderzoeken zal er een grotere groep proefpersonen moeten worden genomen, zodat er voldoende *cases* zijn voor elke interactie, of moet er meer worden gefocussed op 1 afhankelijke variabele en/of 1 genotype. Deze genotypen zouden in de toekomst gebruikt kunnen worden voor het identificeren van risico groepen, zodat interventie en preventie programma's beter kunnen worden afgestemd.

## Referenties

- 1: Boyle. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996, Lung cancer 1997; 17: 1-60. *Overzichtsartikel*
- 2: Rubin. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates, Carcinogenesis 2001; 22:1903-1930. *Overzichtsartikel*
- 3: Sheweita SA. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions, Curr Drug Metab. 2000; 1: 107-132. *Overzichtsartikel*
- 4: Ketelslegers HB, Godschalk R, Gottschalk R, Knaapen AM et al. Inter-individual variations in DNA adduct levels assessed by analysis of multiple genetic polymorphisms in smokers, *niet geplubliceerd*.
- 5: Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, Mutat Res. 2003; 531: 5-23. *Overzichtsartikel*
- 6: Bolt HM, Foth H, Hengstler JG, Degen GH. Carcinogenicity categorization of chemicals- new aspects to be considered in a European perspective, Toxicol Lett. 2004; 151: 29-41. *Overzichtsartikel*
- 7: Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action, Environ Mol Mutagen. 2005; 45: 106-14. *Overzichtsartikel*
- 8: Godschalk R, Hogervorst J, Albering H, Mercelina-Roumans P et al. Interaction between cadmium and aromatic DNA adducts in hprt mutagenesis during foetal development, Mutagenesis. 2005;20: 181-5.
- 9: Rubes J, Lowe X, Moore D 2nd, Perreault S, Slott V et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men, Fertility and sterility 1998; 70: 715 -723.
- 10: Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm, Molecular reproduction and development 2001; 59: 417-421.
- 11: Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation, Toxicology 2006; 223: 54-60.
- 12: Amos CI, Xu W, Spitz MR. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? Recent results in cancer research 1999; 151: 3-12. *Overzichtsartikel*

- 13: Andres RL, Day MC. Perinatal complications associated with maternal tobacco use, *Seminars in neonatology* 2000; 5: 231-241. *Overzichtsartikel*
- 14: Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H et al. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers, *Cancer epidemiology biomarkers & prevention* 2000; 9: 3-28. *Overzichtsartikel*
- 15: Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study, *Carcinogenesis* 2005; 26: 395-401.
- 16: Reddy MV. Methods for testing compounds for DNA adduct formation, *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 32: 256-63. *Overzichtsartikel*
- 17: Knaapen AM, Ketelslegers HB, Gottschalk RW, Janssen RG et al. Simultaneous genotyping of nine polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes by multiplex PCR amplification and single base extension, *Clin Chem.* 2004; 50: 1664-8.
- 18: Vogel EW, Natarajan AT. DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo, *Mutat Res.* 1995; 330: 183-208. *Overzichtsartikel*
- 19: Ehling UH, Neuhauser-Klaus A. Induction of specific-locus and dominant lethal mutations in male mice by 1-methyl-1-nitrosourea (MNU), *Mutation research* 1991; 250: 447-456.
- 20: Bowman KK, Sicard DM, Ford JM, Hanawalt PC. Reduced global genomic repair of ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in simian virus 40-transformed human cells, *Mol Carcinog.* 2000; 29: 17-24.
- 21: Phillips DH. DNA adducts as markers of exposure and risk, *Mutation research* 2005; 577: 284 -292. *Overzichtsartikel*
- 22: Moonen H, Engels L, Kleinjans J, Kok T. The CYP1A2-164A-->C polymorphism (CYP1A2\*1F) is associated with the risk for colorectal adenomas in humans, *Cancer letters* 2005; 229: 25 -31. *Overzichtsartikel*
- 23: Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis, *Mutation research* 2002; 506-507: 65 -77. *Overzichtsartikel*
- 24: Frazier ML, O'Donnell FT, Kong S, Gu X et al. Age-associated risk of cancer among individuals with N-acetyltransferase 2 (NAT2) mutations and mutations in DNA mismatch repair genes, *Cancer research* 2001; 61: 1269-1271.
- 25: Viezzer C, Norppa H, Clonfero E, Gabbani G et al. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and EPHX gene polymorphisms on DNA adduct level and HPRT mutant frequency in coke-oven workers, *Mutation research* 1999; 431: 259-269.

26: Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C et al. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH, *Cancer epidemiology biomarkers & prevention* 2004; 13: 1342-1348.

## Auteursrechterlijke overeenkomst

*Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).*

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**De parentale effecten van roken op de genetische integriteit van het**

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

**Rick van Haastert**

Datum: **25.10.2006**