Chemische carcinogenese

L. den Engelse
V.J. Feron
C.A. van der Heijden

Pudoc Wageningen 1984

Dankbetuiging

De auteurs danken hun collega's prof. dr. P. Borst, dr. E. Kriek, dr. P. Lens, dr. G.J. Menkveld, dr. R. Michalides en dr. E. Scherer van het Nederlands Kankerinstituut, dr. A. Bisschop, drs. A.G.A.C. Knaap, dr. P.G.M. Kramers en drs. C.E. Voogd van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne en dr. A.P. de Groot, prof. dr. ir. R.J.J. Hermus, dr. R. Kroes, dr. J.F. Meulmeester, drs. M.I. Willems en dr. J.W.G.M. Wilmer van het Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO voor het kritisch doorlezen van tekstonderdelen. De verzorging van alle getekende illustraties was in handen van A. Jans van de Audiovisuele Dienst van het Nederlands Kankerinstituut.

Inhoud

1 Inleiding 1
1.1 Wat is kanker? 1
1.2 De eerste experimentele modelsystemen 1
1.3 Verband tussen chemische stoffen en kanker 2
1.4 De eerste chemische carcinogenen 3
1.5 Chemische stoffen en kanker bij de mens 4

2 Mechanismen van chemische carcinogenese 7
2.1 De inductie van tumoren met chemische stoffen 7
2.2 Kwantitatieve beschrijving van het carcinogene proces 8
2.3 Carcinogenen en cocarcinogenen 10
2.4 Initiatie en promotie 11
2.5 Enzymatische activering van chemische carcinogenen 12
2.5.1 Nitrosamides, nitrosamines, alkylalkaansulfonaten en laktonen 13
2.5.2 Aromatische amines 16
2.5.3 Vinylchloride en aromatische koolwaterstoffen 18
2.5.4 Enkele natuurlijk voorkomende carcinogenen 20
2.6 Modificatie van DNA door chemische carcinogenen 22
2.6.1 DNA en tumorvorming 22
2.6.2 Alkylering door (m)ethylerende verbindingen 25
2.6.3 Interactie met aromatische amines 26
2.6.4 Modificatie door vinylchloride 27
2.6.5 Reactie met polycyclische aromatische koolwaterstoffen 27
2.6.6 Binding van enkele natuurlijk voorkomende carcinogenen 27
2.6.7 Enkele andere soorten DNA-modificaties 28
2.6.8 Verdeling van modificaties over het DNA-molecuul 30
2.7 Herstelmechanismen voor gemodificeerd DNA 31
2.7.1 Verwijdering van het adduct 32
2.7.2 Fotoreactivering van pyrimidinedimeren 32
2.7.3 Verwijdering van gemodificeerde basen 33
2.7.4 Verwijdering van gemodificeerde nucleotiden 33
2.7.5 Enkele andere vormen van DNA-herstel 35
2.8 Gevolgen van modificaties voor het functioneren van DNA 35
2.8.1 Effecten op de structuur 35
2.8.2 Mutagene effecten 38
2.8.3 Beïnvloeding van genregulatie 40

2.8.4 Chromosoombeschadigingen 41
2.8.5 In vitro transformatie 43
2.9 Oncogenen 44
2.10 Promotie: van geïnitieerde cel tot tumor 46
2.10.1 Getransformeerd fenotype 47
2.10.2 Effecten op de differentiatietoestand 47
2.10.3 Gestimuleerde celproliferatie 48
2.10.4 Enzyminductie 49
2.10.5 Membraanveranderingen 49
2.10.6 Mechanismen 50
2.10.7 Tumorpromotie bij de mens 51

3 Het opsporen van carcinogenen 52
3.1 Inleiding 52
3.2 Epidemiologisch kankeronderzoek bij de mens 52
3.2.1 Definitie en doel 52
3.2.2 Registratie van kanker 55
3.2.3 Kankerincidentie en kankersterfte 56
3.2.4 Cohort-, patiënt-controle-, en 'cross-sectional'-onderzoek 57
3.2.5 Retrospectief versus prospectief onderzoek 58
3.2.6 Beperkingen van de epidemiologie 59
3.3 De langdurige dierproef 60
3.3.1 Doel en betekenis 60
3.3.2 Opzet en uitvoering 60
3.3.3 Proeven van beperkte opzet en uitvoering 66
3.3.4 Uitingsvormen van carcinogeniteit 67
3.3.5 Aanvullend onderzoek 69
3.4 Kortdurende testen 71
3.4.1 Inleiding 71
3.4.2 Testbatterij 72
3.4.3 Mutageniteitstesten 73
3.4.4 DNA-interactietesten 73
3.4.5 Celtransformatie 73
3.4.6 In vivo testen 74
3.4.7 Metabole activering 74
3.4.8 Ontwikkeling van nieuwe testen 74
3.4.9 Principes van verschillende testen 75

4 Evaluatie van carcinogeniteit 86
4.1 Kwalitatieve evaluatie 86
4.1.1 Epidemiologische gegevens 86
4.1.2 Dierexperimentele gegevens 86
4.1.3 Screeningstesten 89
4.1.4 Is de mens een knaagdier? 89

4.1.5 Verschillen tussen diersoorten 90
4.2 Kwantitatieve risico-evaluatie 90
4.2.1 Wiskundige modellen 93
4.3 Het beleid ten aanzien van chemische verbindingen in Nederland 96
4.3.1 Praktijkvoorbeelden 97

Literatuur 99

1 Inleiding

1.1 Wat is kanker?

Kanker is de verzamelnaam voor een aantal ziektebeelden die gemeen hebben dat een groep cellen in een individu geheel of gedeeltelijk is ontsnapt aan processen van groeicontrole. Er treedt een min of meer autonome groei van cellen op, meestal in de vorm van een compacte massa (carcinoom, sarcoom), soms ook heel diffuus (mesothelioom) of door het hele lichaam verspreid (leukemie). In het beginstadium kan men, geholpen door kleuringstechnieken, vaak kleine groepjes bij elkaar liggende cellen waarnemen. Deze onderscheiden zich van de omringende cellen door hun uiterlijk en door tekenen van een vaak bescheiden autonome groei.

Zo'n groepje cellen is uit één afwijkende cel ontstaan en vormt dus een kloon. In dit beginstadium vindt nog geen ingroei in omliggende weefsels (infiltratie) plaats. Ook komt het nog niet of nauwelijks voor dat een aan de buitenkant van het groepje gelegen cel loslaat en zich, na transport door bloed of lymfe, op een andere plaats in het lichaam vastzet en tot een uitzaaiing (metastase) uitgroeit. Infiltratie en uitzaaiing zijn processen die pas later in de ontwikkeling van een tumor optreden. Deze ontwikkeling, waarbij de kwaadaardige (maligne) eigenschappen van een tumor stapsgewijs de goedaardige (benigne) verdringen, heet progressie. De controle door het organisme neemt af, de autonomie van de tumor neemt toe. In veel gevallen leidt de groei van de tumor en zijn metastasen tenslotte tot een toestand van algehele uitputting van de patiënt. De directe doodsoorzaak kan, naast deze uitputting, doorgroei in een essentieel orgaan (zoals hersenen, lever of hart), een infectie of een inwendige bloeding zijn.

Het moderne kankeronderzoek is in het midden van de 19e eeuw begonnen met de minutieuze beschrijving van wat men met het blote oog en met de microscoop waarnam. Uit deze tijd stammen de definities van carcinoom en sarcoom: terwijl het eerste type tumor zijn oorsprong vindt in epitheelweefsel, ontstaat het tweede type uit mesenchymale weefselelementen. Beide typen zijn maligne. Hoewel onder carcinogenese in strikte zin het ontstaan van carcinomen moet worden verstaan, zien we later een ontwikkeling waarbij met deze term de vorming van tumoren ongeacht hun oorsprong en graad van kwaadaardigheid wordt aangeduid. In die beginperiode worden ook verschillende theorieën over het ontstaan van kanker naar voren gebracht. Toetsing is uiteraard slechts mogelijk indien men over reproduceerbare experimentele modelsystemen kan beschikken. Rond de eeuwwisseling ziet men dan ook vele, vaak vruchteloze, pogingen om zulke systemen te ontwikkelen.

1.2 De eerste experimentele modelsystemen

Al vóór 1900 probeerde men om spontaan opgetreden tumoren verder te kweken door transplantatie in andere dieren. Dit was nodig om over grotere aantallen identieke

tumoren te beschikken. Het mislukte vrijwel altijd. Een opvallende uitzondering vormt de transplantatie van spontane tumoren uit een 'walsende' muis naar een andere muis met dezelfde afwijking (Tyzzer, 1907).

In 1910 lukte het Marie om sarcomen te induceren door ratten aan röntgenstraling bloot te stellen. Kort daarop werd bekend dat deze straling bij de mens leukemie kan veroorzaken. Andere successen werden behaald door Ellerman en Bang (1904) en Rous (1910); de eersten vonden aanwijzingen voor een kankerverwekkend virus bij het ontstaan van kippe-erythroblastose (een vorm van leukemie), de laatste liet zien dat celvrije extracten van een spontaan opgetreden kippesarcoom bij injectie in kippen tot nieuwe tumoren leiden.

Veel verwarring heeft er bestaan over de rol van parasieten bij het ontstaan van kanker. In 1913 claimde Fibiger dat de worm *Gongylonema neoplasticum* maagtumoren in de rat veroorzaakt. Zijn experimenten, waarvoor hij de Nobelprijs verkreeg, bleken echter slecht reproduceerbaar. Het zal dan nog geruime tijd duren voordat de – in het algemeen geringe – rol van parasieten bij het ontstaan van kanker enigszins duidelijk wordt.

In 1915 rapporteerden Yamagiwa en Ichikawa dat zij, door de konijnehuid gedurende 250 dagen met in benzeen opgeloste koolteer te behandelen, papillomen en in een later stadium ook carcinomen in de behandelde huid konden laten ontstaan. Opzet van deze twee Japanse pathologen was het testen van de theorie van hun leermeester Virchow. Deze hield chronische irritatie verantwoordelijk voor het ontstaan van kanker. Gezien de relatieve eenvoud van dit modelsysteem, de reeds gedetailleerde chemische kennis in die dagen en de wetenschap dat chemische stoffen (roet, teer, oliën, arseen, anilinikleurstoffen) bij de mens tumoren kunnen veroorzaken, verbaast het niet dat de voorkeur van veel onderzoekers uitging naar chemisch geïnduceerde tumoren. Men wilde met name weten welke individuele stoffen uit de koolteer kankerverwekkend zijn.

1.3 Verband tussen chemische stoffen en kanker

Er waren al heel lang aanwijzingen dat kanker bij de mens een gevolg kon zijn van contact met chemische stoffen. Het klassieke voorbeeld is dat van de Londense chirurg Percivall Pott, die in 1775 rapporteerde dat kanker van het scrotum opvallend veel voorkomt bij schoorsteenvegers. Pott suggereerde een verband met blootstelling van de huid aan roet. Maar er zijn meer voorbeelden. Reeds in 1761 heeft Hill een verband gelegd tussen het snuiven van tabak en het optreden van kanker in de neus (figuur 1). In 1795 merkte Sömering de associatie tussen pijproken en lipkanker op. De tweede helft van de 19e eeuw leverde ook een groot aantal voorbeelden op. Dit hing samen met het op grote schaal invoeren van nieuwe chemische produkten en processen. Huidkanker was een beroepsziekte, niet alleen in de teer-, olie- en paraffine-industrie, maar ook in de katoenspinnerijen, waar minerale olie als smeermiddel werd gebruikt. In die periode bleek blaaskanker veelvuldig voor te komen in de chemische kleurstoffenindustrie, waar aromatische amines werden geproduceerd (Rehn, 1895). Het is dan ook geen wonder dat getracht werd om met teerprodukten of aromatische kleurstoffen experimentele tumoren te induceren. Eén van de factoren die bijdroegen tot het succes van Yamagiwa en Ichikawa was dat zij, in tegenstelling tot andere onderzoekers, zeer langdurig met teerpreparaten behandelden, bijvoorbeeld 8 maanden lang om de dag.

CAUTIONS

Against the immoderate USE of

SNUFF.

Founded on the known Qualities of the

TOBACCO PLANT;

And the Effects it must produce when this Way taken into the Body:

AND

Enforced by Instances of Persons who have perished miserably of Diseases, occasioned, or rendered incurable by its Use.

By Dr. J. HILL.

THE SECOND EDITION.

LONDON:

Printed for R. BALDWIN in Pater-noster Row, and J. JACKSON in St. James's-street.

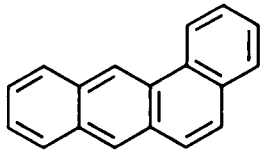
MDCCLXI.

[PRICE ONE SHILLING.]

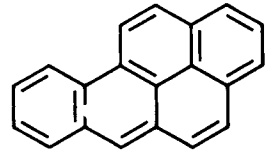
Fig. 1. Titelblad van het in 1761 verschenen boekje van Hill, waarin deze verband legt tussen het snuiven van tabak en het optreden van neuskanker.

1.4 De eerste chemische carcinogenen

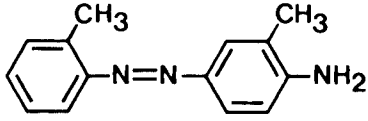
Geleid door een bepaalde lijn in het fluorescentiespectrum van teerpreparaten, die alleen optrad in preparaten met kankerverwekkende eigenschappen, werd aan het eind van de jaren twintig door Kennaway en medewerkers ontdekt dat de actieve stof een polycyclische aromatische koolwaterstof, verwant aan benz(*a*)anthraceen (figuur 2) moest zijn. Door Kennaway en Hieger werd in 1930 het door Clar gesynthetiseerde dibenz(*a,h*)anthraceen (figuur 2) getest en carcinogeen bevonden. Dit is het eerste voorbeeld, waarbij kanker met een chemisch zuivere stof werd opgewekt. De opwerking van een paar ton koolteer door de groep van Kennaway leverde in 1931 7 g van het kanker-



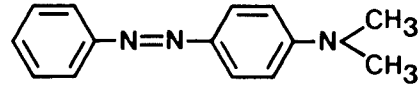
benz[a]anthraceen



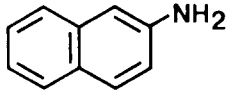
benz[a]pyreen



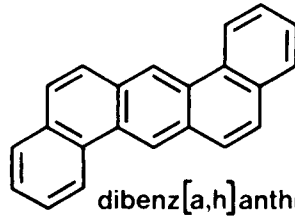
o-aminoazotolueen



N,N-dimethyl-4-aminoazobenzeen



β-naftylamine



dibenz[a,h]anthraceen

Fig. 2. Enkele polycyclische aromatische koolwaterstoffen en aromatische amines.

verwekkende benz(*a*)pyreen (figuur 2) op.

In al deze experimenten werd het carcinogeen vermogen van een chemische stof steeds getest door de huid van bijvoorbeeld konijn of muis met deze stof te behandelen. Het was een vooruitgang toen bleek dat tumoren ook konden worden opgewekt door azokleurstoffen door het voer van ratten te mengen. Sasaki & Yoshida (1935) gebruikten *o*-aminoazotolueen (figuur 2), Kinosita (1936) voerde *N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzeen (figuur 2). In beide gevallen kregen de ratten levertumoren. Op deze experimenten voortbordurend heeft men tot op heden de kankerverwekkende eigenschappen van enkele honderden chemische stoffen aangetoond. De verzamelde gegevens zijn systematisch vastgelegd (zie literatuuropgave).

1.5 Chemische stoffen en kanker bij de mens

Uit epidemiologisch onderzoek blijkt dat in westerse maatschappijen ongeveer één op de drie personen zelf met kanker te maken krijgt, terwijl één op de vier eraan sterft. Voor volwassenen is kanker na hart- en vaatziekten de belangrijkste doodsoorzaak. Voor kinderen in westerse landen vormt kanker ook een relatief belangrijke doodsoorzaak, in Nederland bijvoorbeeld slechts overtroffen door verkeersongelukken. Toch is kanker geen typische beschavingsziekte. Weliswaar kan een hoge kindersterfte de bijdrage van kanker aan de totale sterfte (de kankermortaliteit) naar een lagere plaats dringen, maar dit betekent nog geenszins dat een wat oudere leeftijdsgroep in een tech-

nologisch meer ontwikkeld land een hogere kankerincidentie heeft dan in een onderontwikkeld land. In bepaalde gevallen is zelfs het omgekeerde waar: in delen van Afrika en het Midden-Oosten heeft bijvoorbeeld de met bilharzia geassocieerde blaaskanker epidemische vormen aangenomen, in oostelijk Afrika komen veel levertumoren voor. Dit is een gevolg van de combinatie van een met hepatitis-B-virus geïnfecteerde lever en de consumptie van beschimmeld voedsel, dat het hepatocarcinogene aflatoxine bevat.

De meeste vormen van kanker treden pas op hogere leeftijd op, onder andere omdat er sprake is van een latentietijd van vele, soms tientallen jaren. Er bestaan echter ook kankervormen die naar verhouding veel bij kinderen en jeugdigen voorkomen, zoals het retinoblastoom (tumor van het netvlies), Willms tumoren (nier) en bottumoren. Opvallend is dat het vóórkomen van een bepaald type tumor sterk plaats- en groepsgebonden kan zijn. Voorbeelden van plaatsgebonden tumoren zijn de hiervoor al genoemde levertumoren en verder de vooral in de rijkere, westerse landen veel vóórkomende borst- en darmtumoren. Studies met migranten wijzen uit dat het hier meestal niet om genetisch bepaalde verschillen gaat. Assimilatie van de migranten in hun nieuwe vaderland betekent dat binnen enkele generaties het daar aanwezige kankerpatroon wordt overgenomen. De verwestelijking van Japan brengt met zich mee dat het tumorpatroon meer op dat van Europa en de Verenigde Staten gaat lijken. Dit blijkt onder andere uit een toename van het aantal borstkankerpatiënten naast een uitgesproken afname van de daar traditioneel hoge maagkankerincidentie. Ook in westerse landen zijn in de afgelopen decennia belangrijke verschuivingen in het tumorpatroon opgetreden: naast een relatieve daling van het – op zich al niet hoge – aantal maagtumoren

Tabel 1. Bijdragen van een aantal factoren aan de kankersterfte in de Verenigde Staten (Doll & Peto, 1981).

Factor	Geschatte bijdrage aan de totale kankersterfte (%)	Minimum en maximum bijdrage (%)
Tabak	30	25-40
Alcohol	3	2-4
Voeding	35	10-70
Voedseladditieven	<1	-5[1]-2
Voortplanting en sexueel gedrag	7	1-13
Beroep	4	2-8
Verontreiniging	2	<1-5
Industriële produkten	<1	<1-2
Medicijnen en medisch handelen	1	0,5-3
Geofysisch (ioniserende stralen + UV)[2]	3	2-4
Infectie	10?	1-?
Onbekend	?	?

1. Met inbegrip van een mogelijk beschermend effect van antioxidantia en andere conserveringsmiddelen.
2. Slechts 1 % kan als 'vermijdbaar' worden beschouwd. Bekend is dat UV verantwoordelijk is voor grote aantallen huidtumoren; deze zijn verhoudingsgewijs zelden fataal.

werd bijvoorbeeld een sterke stijging geconstateerd in het vóórkomen van long- en alvleeskliertumoren.

Uit de variatie van de kankerincidenties in plaats en tijd, de migrantenstudies en het onderzoek naar de bijdragen van roken, alcoholgebruik en dergelijke, blijkt dat van buiten de mens afkomstige factoren voor een groot deel bepalend zijn voor het kankerrisico (tabel 1). Een nadere omschrijving van deze exogene factoren als milieufactoren ('environmental factors') heeft veel verwarring gesticht. Veel mensen bleken deze milieufactoren voor hetzelfde te houden als chemische verontreiniging van het algemene milieu. Tot deze factoren moet men echter ook het beroepsmilieu rekenen en het individuele milieu dat ieder voor zich creëert door zijn manier van leven ('life style'). Tot dit laatste behoren het gebruik van tabaksprodukten en alcoholische dranken, voeding, ja zelfs zeden en gewoonten (b.v. de leeftijd waarop men kinderen krijgt, de mode van het zonnebaden, de mate van promiscuïteit, het uitvoeren van besnijdenis).

Veel van bovenstaande gegevens zijn het resultaat van de beschrijvende epidemiologie die kankerincidenties en kankermortaliteit voor verschillende groepen beschrijft en vergelijkt. Verdere voortgang van deze tak der epidemiologie steunt op de analytische epidemiologie, die een nadere analyse van de milieus der te vergelijken groepen op het vóórkomen van kankerverwekkende stoffen en andere risicofactoren uitvoert. Uit talrijke onderzoekingen komt naar voren dat de meeste exogene factoren die het kankerrisico verhogen, chemische stoffen zijn. Fysische componenten zoals zonnestraling spelen een kleinere rol, terwijl het aandeel van kankerverwekkende virussen vermoedelijk gering is.

2 Mechanismen van chemische carcinogenese

2.1 De inductie van tumoren met chemische stoffen

Om na te gaan of een chemische stof kankerverwekkend is, wordt een groep proefdieren gedurende een bepaalde periode met deze stof behandeld. In het kankeronderzoek veel gebruikte diersoorten zijn rat en muis. In bijzondere gevallen worden bijvoorbeeld hamsters, cavia's, honden, forellen, of apen benut. De te onderzoeken stof kan op diverse manieren worden toegediend: in het voedsel of drinkwater, via injectie of maagsonde, op de huid of in onderhuids of in de blaas geïmplanteerde pellets.

De periode tussen het begin van de behandeling en het optreden van de eerste tumor wordt de latentietijd genoemd. Een nauwkeurige maat hiervoor is het tijdstip waarop bijvoorbeeld 30 of 50 % van de dieren tumordragend is (t30, t50). Het percentage dieren dat één of meer tumoren bezit, noemt men de tumorincidentie.

Een carcinogeen is krachtiger of effectiever naarmate eenzelfde dosis tot een hogere tumorincidentie en/of een kortere latentietijd leidt. De verhouding tussen deze twee grootheden is door Iball (1931) gebruikt om de sterkte van een carcinogeen te kwantificeren. De 'Index Carcinogenicus' van Iball wordt nog incidenteel gebruikt, maar de beperking tot huidcarcinogenen sluit een meer algemene toepassing uit. De hoeveelheid stof die nodig is om in een bepaalde tijd een bepaalde toename van de tumorincidentie tot stand te brengen, kan voor verschillende carcinogenen wel een factor 10^6 verschillen. Er is dus sprake van effectieve en minder effectieve carcinogenen. Wat in een groot aantal modelsystemen een effectief carcinogeen is, kan in sommige andere systemen echter minder werkzaam of zelfs geheel onwerkzaam zijn. De volgende factoren kunnen daarbij van doorslaggevend belang zijn:

– Diersoort. De meeste carcinogenen vertonen hun vermogen om tumoren op te wekken in zeer uiteenlopende diersoorten. Er zijn nogal wat uitzonderingen, die voor een deel zijn terug te voeren op verschillen in enzymatische activering tussen verschillende soorten: aflatoxine geeft wel levertumoren in de rat maar vrijwel niet in de muis; 2-naftylamine geeft blaastumoren in de mens en in de hond, maar niet in een aantal knaagdiersoorten; *N*-acetyl-2-aminofluoreen geeft levertumoren in rat, muis, hamster, konijn, hond, kat en kip. De cavia is daarentegen zeer resistent tegen dit carcinogeen.

– Stam. Ingeteelde, dit wil zeggen genetisch zuivere proefdierstammen, kunnen onderling grote verschillen vertonen in gevoeligheid voor eenzelfde carcinogeen. Deze verschillen zijn vaak afhankelijk van het onderzochte orgaan. Een klein deel van deze verschillen kan verklaard worden door verschillen in metabole activering van het carcinogeen.

– Geslacht. Afgezien van tumoren in organen die alleen bij vrouwelijke of bij mannelijke dieren voorkomen, zijn er tumoren (levertumoren, vaattumoren), die voornamelijk bij één van beide geslachten optreden. In een aantal gevallen wordt dit veroorzaakt door geslachtsgebonden verschillen in het hormonale systeem en het metabolisme.

– Leeftijd. Veelal is de gevoeligheid voor tumorvorming sterk leeftijdsafhankelijk. Vaak, maar lang niet altijd, is het proefdier in de periode rond de geboorte het meest gevoelig.
– Voeding. De hoeveelheid en de samenstelling van het voedsel is essentieel, omdat hierin allerlei componenten met een stimulerende of beschermende werking voorkomen. Een extreem voorbeeld is de met *N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzeen (DAB, figuur 2) in het voer behandelde rat, die alleen maar tumoren krijgt als riboflavine in het voer afwezig is. Riboflavine is een essentiële cofactor voor het enzym azoreductase, dat in staat is DAB te inactiveren.
– De manier van toedienen. Deze kan van belang zijn, met name voor stoffen die snel spontaan reageren of moeilijk in het lichaam getransporteerd kunnen worden; deze kunnen lokale tumoren geven. Andere stoffen, zoals de meeste nitrosamines, hebben een systemisch effect: ongeacht de manier van toedienen veroorzaken zij steeds in dezelfde organen tumoren. Opvallend is dat stoffen met een systemisch carcinogeen effect toch een uitgesproken voorkeur kunnen hebben voor tumorvorming in één of enkele organen. Dit verschijnsel heet organotropie. Zo veroorzaakt dimethylnitrosamine in de rat tumoren in de lever en de nier, een tweede nitrosamine (methylbenzylnitrosamine) voornamelijk slokdarmtumoren, terwijl een derde (butylhydroxybutylnitrosamine) vrijwel uitsluitend tot tumorvorming in de blaas leidt.

2.2 Kwantitatieve beschrijving van het carcinogene proces

Voor het resultaat van een tumorinductie-experiment zijn vooral de totale dosis en de hoogte van de dagelijkse dosis van belang. In de langdurige dierproef, waarbij het van belang is om ook minder effectieve carcinogenen op te sporen, dient men de te onderzoeken stof toe over een lange periode en met een relatief hoge dagelijkse dosis. Voor onderzoek naar mechanismen is deze manier van toedienen veelal een nadeel, omdat er dan ook secundaire, dosis-afhankelijke effecten op kunnen treden. Om deze redenen is het van belang te weten hoe het proces van tumorvorming afhangt van de totale dosis carcinogeen en van de dagelijkse dosis.

Een eerste kwantitatieve beschrijving van het proces van tumorvorming is in de jaren vijftig en zestig gegeven door Druckrey en medewerkers. In experimenten waarin *N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzeen (DAB, figuur 2) met het voer aan ratten werd gegeven, lieten zij zien dat het mogelijk was om met een vrij korte behandeling (b.v. 6 weken lang 5 mg DAB per rat per dag) reeds tumoren te krijgen. Deze tumoren manifesteerden zich pas na een latentietijd van ruim 300 dagen. Dit betekent dat in die eerste periode van 6 weken een onomkeerbaar en autonoom voortgaand proces is begonnen dat leidt tot de uiteindelijke manifestatie van tumoren. Ook voerden zij experimenten uit waarin ratten continu met sterk uiteenlopende dagelijkse doseringen DAB behandeld werden. De laagste nog tot tumoren aanleiding gevende dosis (1 mg DAB per rat per dag) bracht een lange latentietijd met zich mee (700 dagen), maar de uiteindelijke incidentie van levertumoren in de overlevende dieren was aanzienlijk (75 %), terwijl in de controlegroep geen tumoren werden gevonden. Het experiment leverde ook een aanwijzing op dat bij een lage dagelijkse dosis in totaal minder carcinogeen nodig was om tumoren te krijgen. Daaropvolgende proeven met diethylnitrosamine (DEN, figuur 6) gaven een duidelijke bevestiging. Zeven groepen ratten werden continu behandeld met dagelijkse doses van 0,15 tot 9,6 mg/kg lichaamsgewicht. Uiteindelijk kregen bijna alle dieren

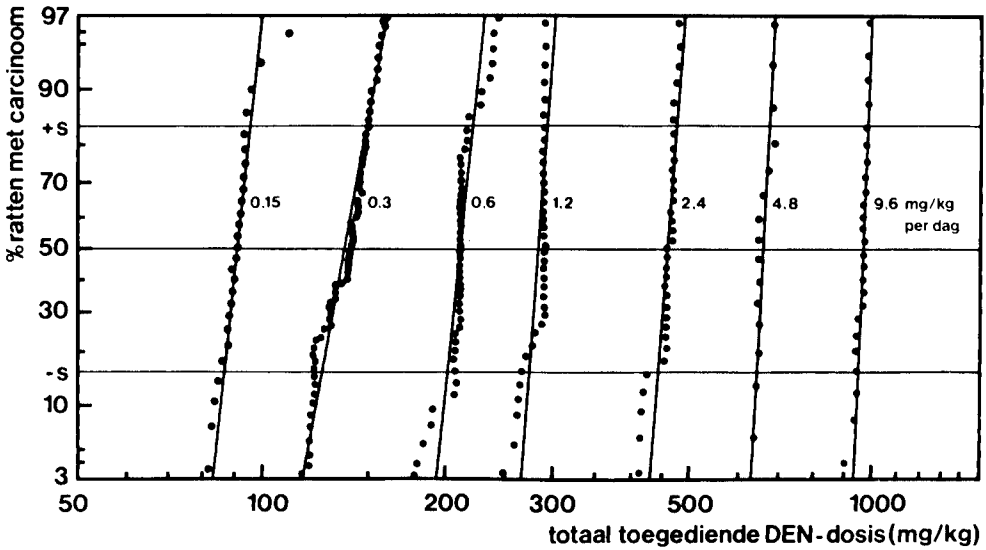


Fig. 3. Het ontstaan van levertumoren in 7 groepen ratten die met verschillende dagelijkse doses van het levercarcinogeen diethylnitrosamine (DEN) behandeld werden. Elke stip stelt een dier met een levertumor voor. De spreiding in het tijdstip waarop de levertumoren manifest worden, blijkt binnen een groep relatief gering te zijn (naar Druckrey, 1967).

levertumoren. In figuur 3 is voor de verschillende groepen de tumorincidentie uitgezet tegen de totale dosis DEN.

De totale dosis waarbij een tumorincidentie van 50 % wordt bereikt, noemt men de D50. Het bijbehorende tijdstip is de t50. Bij het afnemen van de dagelijkse dosis (d) wordt de t50 groter, maar nog steeds krijgen (bijna) alle dieren tumoren. Wordt de D50 uitgezet tegen d, dan ontstaat een rechte lijn (figuur 4). Dit suggereert dat er in theorie geen veilige dagelijkse dosis (drempelwaarde) carcinogeen bestaat, slechts de beperkte levensduur van het proefdier voorkomt het optreden van tumoren. Een lage totale dosis blijkt even effectief in het vormen van tumoren als een hogere, maar heeft daar alleen meer tijd voor nodig. Door Druckrey werd hiermee vastgesteld dat de tijd een belangrijke factor was; hij sprak daarom van de tijdfactor. Het verband tussen dagelijkse dosis d en inductietijd t is $d.t^n$ = constant, waarbij $n > 1$. In deze experimenten is $n = 2{,}3$; in de praktijk blijkt deze waarde van carcinogeen tot carcinogeen te variëren. In biologische termen vertaald, moet men zich bij de tijdfactor een proces voorstellen dat, eenmaal door het carcinogeen in werking gezet, blijft voortbestaan of zich uitbreidt. Men kan hierbij denken aan het ontstaan en uitgroeien van voorstadia van tumoren in een doelwitorgaan, de mogelijkheid dat een voorstadium 'spontaan' in een tumor overgaat, het optreden van persistente beschadigingen van het genoom zoals dat van veel carcinogenen bekend is, of de aanwezigheid van lage niveaus carcinogene risicofactoren in de achtergrond. Hoewel de door Druckrey gevonden wetmatigheid ook voor andere systemen dan chemisch geïnduceerde levertumoren opgaat, staat de algemene geldigheid voor alle typen tumoren, inclusief die bij de mens, nog niet vast.

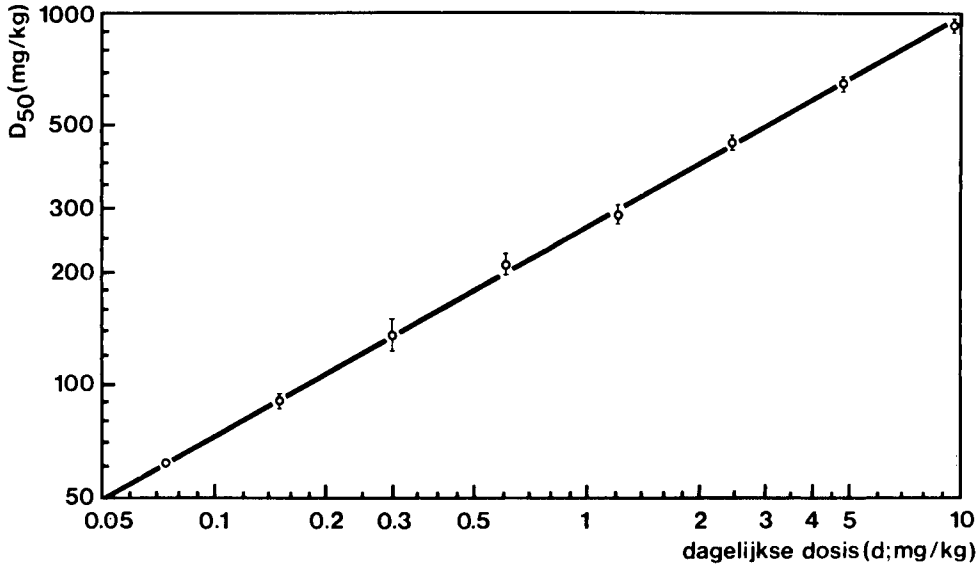


Fig. 4. De in figuur 3 vermelde D50 blijkt evenredig te zijn met de dagelijkse dosis DEN (naar Druckrey, 1967).

2.3 Carcinogenen en cocarcinogenen

Als men het in de wandeling over carcinogeen heeft, bedoelt men meestal een stof die tot een verhoogd kankerrisico leidt.

Het is echter een simplificatie om elke stof of factor die – in wat voor situatie dan ook – tot meer kanker leidt, kankerverwekkend (carcinogeen) te noemen. Door de grote functionele verscheidenheid heeft zo'n definitie nóch voor de wetenschap, nóch voor de wetgeving veel zin. Die verscheidenheid betreft niet alleen chemische stoffen, virussen en straling, maar ook de hoeveelheid energie in het voedsel of het tempo waarmee zich in een orgaan celdelingen voltrekken. Sommige chemische stoffen kunnen in hun eentje tumoren induceren die in onbehandelde dieren niet of bijna nooit vóórkomen. Dan is de kans groot dat we met een volledig carcinogeen te maken hebben. Weer andere stoffen, de zogenaamde tumorinitiatoren, kunnen het proces van tumorvorming wel starten (initiëren), maar niet afmaken. Het omgekeerde is het geval met de promotorverbindingen. Deze kunnen het proces van tumorvorming niet starten, maar zijn wel in staat om een eenmaal geïnitieerde cel tot een duidelijk macroscopisch waarneembare tumor te doen ontwikkelen.

Cocarcinogeen noemt met een stof (of een situatie) die het carcinogene proces versnelt, zonder zelf initiërende eigenschappen te hebben. We spreken hierbij ook wel van modificerende factoren. Een promotor is dus ook een cocarcinogeen, maar is echter alleen maar werkzaam op reeds geïnitieerde cellen. Van grote betekenis zijn verschillende anticarcinogenen. Dit zijn stoffen die de kans op tumorinitiatie verkleinen of het promotieproces vertragen.

Bovenstaande onderscheidingen corresponderen met het werkingsmechanisme van

de verschillende klassen en zijn ook van groot praktisch belang bij het beantwoorden van vragen over een eventuele drempelwaarde of reversibele werking.

2.4 Initiatie en promotie

Het initiatie-promotie model van tumorvorming is het eerst uitgewerkt voor de muizehuid. Brengt men van een huidcarcinogeen slechts een zeer kleine hoeveelheid op de huid, dan is de kans op tumorvorming zeer klein. Dat de behandelde cellen echter een irreversibele eerste stap (initiatie) in het carcinogene proces hebben gezet, is te demonstreren door verder te behandelen met een op zich niet kankerverwekkende promotorverbinding. Er ontstaan dan alsnog aanzienlijke aantallen tumoren (figuur 5). Met het begin van de promotorbehandeling kan men na de initiatie vaak vele maanden wachten, meestal vrijwel zonder verlies van effect. Essentieel is dat de promotor ná de initiatie wordt toegediend; een voorafgaande promotorbehandeling heeft geen stimulerend effect. Uit initiatie-promotie experimenten is ook gebleken dat enkele stoffen alleen of voornamelijk het vermogen tot initiatie bezitten. Deze blijken slechts in combinatie met een promotorbehandeling aanzienlijke aantallen tumoren te induceren. Voorbeelden zijn: methylchloromethylether (huid), 2-methyl-4-dimethylaminoazobenzeen (2-Me-

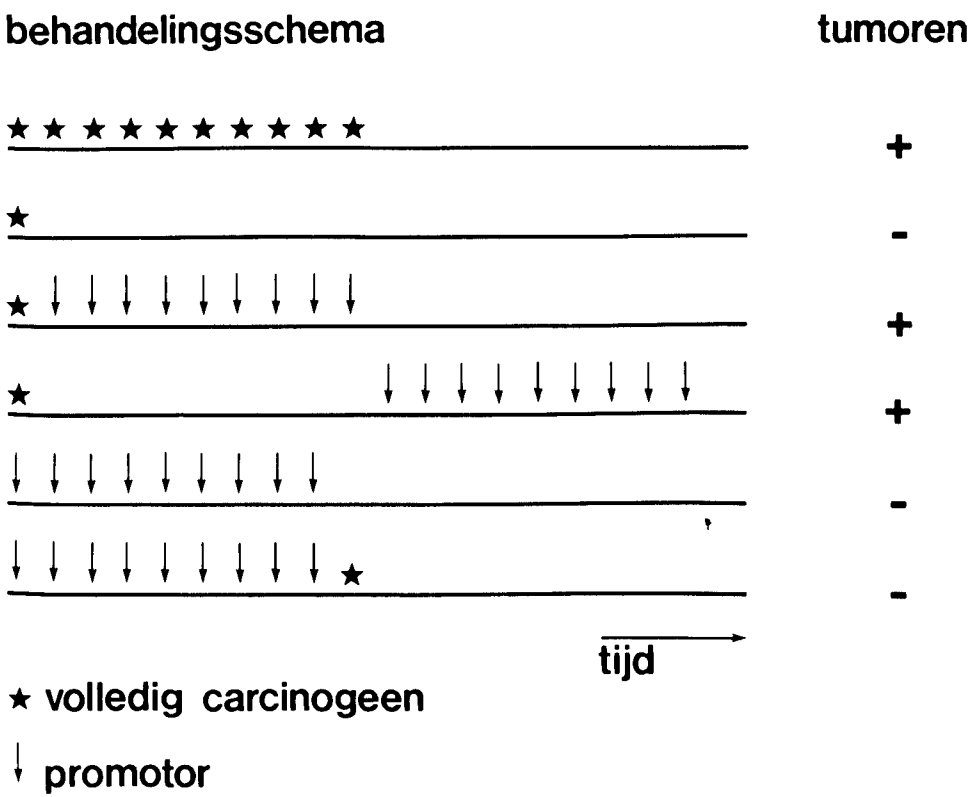


Fig. 5. Schematische voorstelling van het 2-fasenmodel van tumorvorming: initiatie en promotie.

DAB; lever) en urethaan (lever; voor de huid echter een volledig carcinogeen!). Deze initiatoren worden in principe in de klassieke carcinogeniteitstest niet opgemerkt, alleen wanneer toevallig de noodzakelijke promoverende omstandigheden aanwezig zijn, zullen tumoren ontstaan. Een volledig carcinogeen zou dan ook wel beschreven kunnen worden als een combinatie van initiator en promotor. De promotorwerking van een volledig carcinogeen komt bij een zeer lage dosis niet meer tot uiting, initiatie is dan nog zeer goed mogelijk.

In de klassieke experimenten van Berenblum, Boutwell en anderen werd als promotor veelal crotonolie gebruikt. Hecker en medewerkers isoleerden daaruit de werkzame stof en identificeerden deze als tetradecanoylforbolacetaat (TPA). Sinds 1970 is duidelijk geworden dat het initiatie-promotie model ook op vele andere organen van toepassing is. Voorbeelden van enkele organen met daarin werkzame promotorverbindingen zijn opgenomen in tabel 2. Een gemeenschappelijke noemer voor het promotoreffect is een min of meer specifieke stimulering van de groei der geïnitieerde cellen. Men behoeft zich dus niet te verbazen, dat ook andere processen die de celgroei stimuleren, zoals een verwonding of een gedeeltelijke verwijdering van een orgaan (lever, darm), een promoverend effect kunnen hebben.

Het functionele verschil tussen een initiator en een promotor is een verschil in moleculair mechanisme. Initiatoren zijn genotoxisch, dit wil zeggen: reageren met DNA, zijn mutageen en geven chromosoombeschadigingen. Promotoren gaan, hoewel ze de genregulatie beïnvloeden, geen covalente binding met DNA aan, zijn doorgaans niet mutageen en hebben ook geen effect op het herstel van de door initiatoren in DNA aangerichte schade. Veel promotoren veranderen de differentiatietoestand van de cel en stimuleren de proliferatie (zie ook 2.10).

2.5 Enzymatische activering van chemische carcinogenen

De meeste volledige carcinogenen en initiërende verbindingen zijn zonder enzymatische activering tot reactieve, elektrofiele metabolieten niet werkzaam. De uiteindelijk met DNA en andere cellulaire moleculen reagerende metabolieten worden in de En-

Tabel 2. Voorbeelden van organen met daarin werkzame promotoren.

Orgaan	Promotor
Huid	TPA, benzoylperoxyde teleocidine
Luchtpijp	TPA
Maag	TPA
Blaas	tryptofaan, urine saccharine, cyclamaat allopurinol
Darm	galzuren, Na-barbituraat vetrijke voeding
Lever	fenobarbital, oestrogenen dioxine, DDT, PCB's, BHT
Long	BHT
Borstklier	forbol, prolactine
Schildklier	methylthiouracil

gelstalige literatuur beschreven als 'ultimate carcinogenic metabolites', de tussenstappen als 'proximate metabolites'. Indien er ook inactiverende enzymen aanwezig zijn, dan is de balans tussen beide activiteiten bepalend voor de mate van interactie met DNA en daarmee ook voor het uiteindelijke biologische effect. Meting van de activerende stappen alleen heeft dan ook weinig voorspellende waarde. Stoffen die zowel aan activering als inactivering zijn onderworpen, vertonen soms ook een ander reactiepatroon met DNA in de intacte cel of het intacte organisme als in een in vitro systeem, waarin enzymactiviteiten van geïsoleerde microsomen worden benut. Deze discrepantie bemoeilijkt de interpretatie van resultaten uit in vitro (mutageniteits)testen.

Ook als een orgaan in staat is tot activering van een carcinogene verbinding en er relatief veel binding aan DNA optreedt, hoeft dit nog allerminst tot tumorvorming te leiden: tumorvorming is een meerstapsproces. Zolang er geen actief promoverende omstandigheden aanwezig zijn, zullen geïnitieerde cellen zich niet tot tumorcellen ontwikkelen.

Aan de hand van enkele voorbeelden zal worden getracht het soms ingewikkelde metabolisme van chemische carcinogenen te verduidelijken. Alle activeringsstappen hebben gemeen dat er elektrofiele metabolieten ontstaan, die met elektronenrijke plaatsen in een molecuul kunnen reageren. Zulke plaatsen komen voor in macromoleculen zoals nucleïnezuren en eiwitten, maar ook in laagmoleculaire verbindingen zoals water.

2.5.1 Nitrosamides, nitrosamines, alkylalkaansulfonaten en laktonen

Een voorbeeld van elk type verbinding is opgenomen in figuur 6. In deze groep bevinden zich nogal wat uitzonderingen op de regel dat enzymatische activering noodzakelijk is. Met uitzondering van de nitrosamines reageren namelijk al deze stoffen zonder metabole activering met nucleofiele (= elektronenrijke) plaatsen in andere moleculen. Het reactiemechanisme van bijvoorbeeld ethylnitrosoureum (ENU) is verder echter geheel verschillend van dat van stoffen als ethylmethaansulfonaat (EMS) en β-propiolakton (BPL). ENU hydrolyseert in waterig milieu spontaan en levert een zeer reactief ethylerend deeltje, het positief geladen ethylcarboniumion. Deze reactie is weer te geven als: $RX \rightarrow R^+ + X^-$ (figuur 6), waarin R^+ vervolgens reageert met elke bereikbare elektronenrijke plaats, ongeacht de grootte van het ladingsoverschot (nucleofiliteit). De reactiesnelheid bij deze substitutie op een nucleofiele plaats wordt uitsluitend bepaald door het tempo waarmee het ENU ontleedt en is dus van de eerste orde: een S_N1-mechanisme. EMS en BPL reageren volgens een bimolecuïair of S_N2-reactietype, waarbij tijdens een botsing met de elektronenrijke plaats van een ander molecuul een ethyl-, respectievelijk een carboxyethyl-groep kan worden overgedragen (zie reactieschema in figuur 6). Omdat hierbij, sterische belemmeringen daargelaten, bij voorkeur gereageerd wordt met de meest elektronenrijke plaatsen in DNA, eiwitten, of andere moleculen, is het scala van reactieprodukten aanzienlijk kleiner dan bij een alkylering van het S_N1-type. De reactie van al deze monofunctionele alkylerende verbindingen met nucleïnezuren, eiwitten en dergelijke is niet compleet te beschrijven zonder naast het reactietype: S_N1 of S_N2, ook de Swain-Scott factor *s* te hanteren. De factor *s* is voor een aantal alkylerende verbindingen vermeld in tabel 3. Deze geeft aan hoe de alkyleringsreactie afhangt van de nucleofiele sterkte (nucleofiliteit) van het te alkyleren molecuul. Als *s* groot is, zal het alkylerend agens naar verhouding het sterkst reageren met

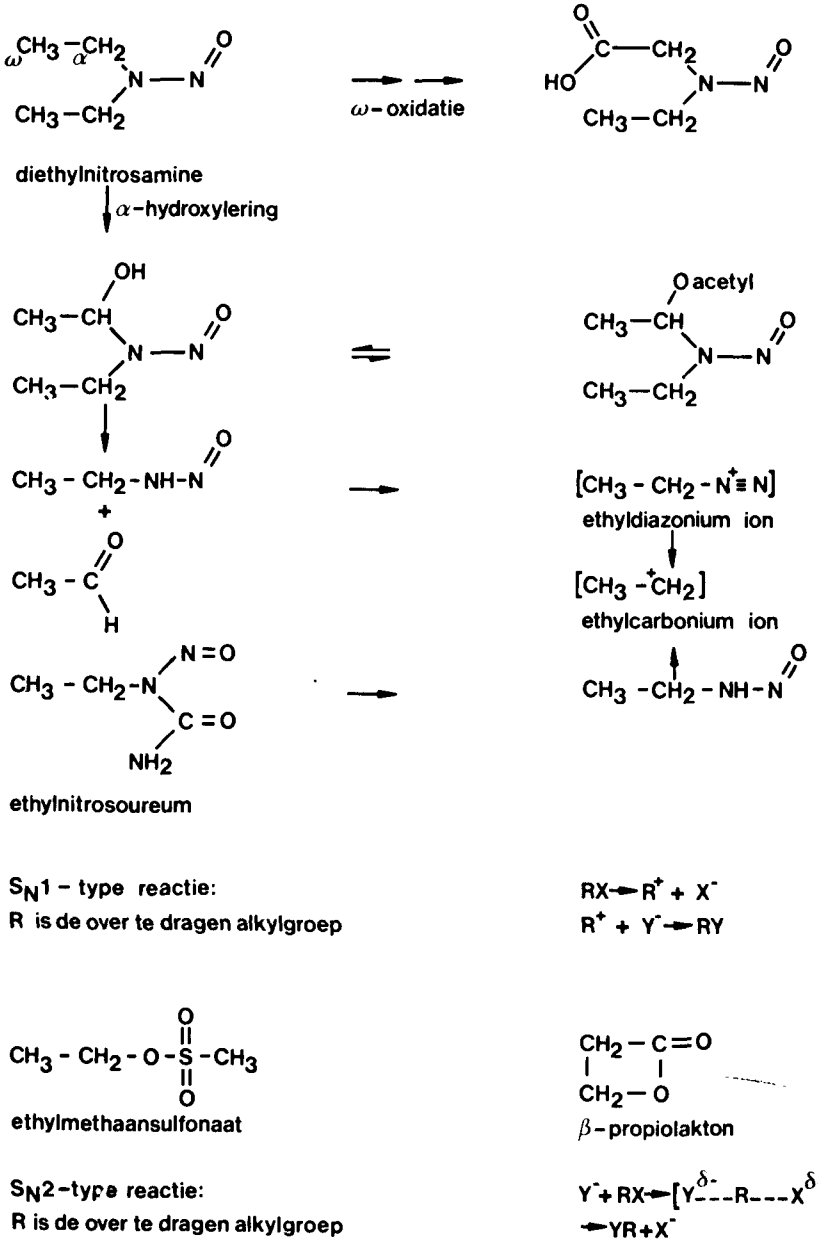


Fig. 6. Activering en reactiewijze van enkele eenvoudige alkylerende verbindingen.

uitgesproken nucleofiele plaatsen, in de volgorde S > N > O. Als voorbeeld is in tabel 3 de verhouding gegeven tussen de reactie met de O^6- en de N-7-positie van guanine in DNA. Op basis van deze volgorde is ook te verwachten dat verbindingen met een hoge s-waarde naar verhouding sterker met SH-groepen bevattende eiwitten dan met nucleïnezuren zullen reageren. Een hoge s-waarde gaat meestal gepaard met een S_N2 reactie-

Tabel 3. De Swain-Scott constante *s* voor enkele direct alkylerende agentia (naar Vogel & Natarajan, 1982).

Verbinding	*s*	Verhouding O^6/N-7 alkylering van guanine in DNA[1]	Voornaamste reactietype
Ethylnitrosoureum	0,26	0,6-0,7	S_N1
Isopropylmethaansulfonaat	0,31	0,3	↑
Methylnitrosoureum	0,42	0,11	↑
Diethylsulfaat	0,64	0,02-0,03	↑
Ethylmethaansulfonaat	0,67	0,03	↑
Methylmethaansulfonaat	0,86	0,004	↑
Dimethylsulfaat	0,86	0,003	S_N2

1. De structuur van guanine met de alkyleerbare posities is afgebeeld in figuur 13.

type. Tòch kan ook de combinatie hoog *s*-S_N1 voorkomen, bijvoorbeeld bij *N*-mosterdverbindingen, die weliswaar spontaan uiteenvallen – en dus tot een S_N1-type reactie leiden – maar daarbij vrij stabiele mosterdkationen genereren, die een sterke voorkeur vertonen voor reactie met de meer nucleofiele plaatsen in DNA of eiwit. Omgekeerd hoeft een lage *s*-waarde niet per definitie een S_N2 reactietype te betekenen. Dit hangt ook af van de nucleofiliteit van het te alkyleren molecuul: hoe hoger deze is, hoe groter de kans op een S_N2 mechanisme. In eiwitten kan alkylering optreden van bijvoorbeeld cysteïne, lysine, arginine en histidine. Voor DNA-alkylering: zie 2.6.2.

Een ander alkylerend agens is diethylnitrosamine (DEN), dit is – in tegenstelling tot ENU – stabiel in waterig milieu. Een hydroxylerend enzymsysteem, gelokaliseerd in het endoplasmatisch reticulum (bij isolatie de microsoomfractie genoemd) en vermoedelijk ook in de celkern aanwezig, en bestaand uit een cytochroom P-450 bevattende elektronentransportketen, heeft voor de hydroxylering der alkylgroepen in nitrosamines NADPH (H-donor) en O_2 nodig. α-Hydroxylering van DEN kan resulteren in directe afsplitsing van aceetaldehyde. De rest van het molecuul valt dan uiteen in onder andere een ethylcarboniumion, zodat alkylering optreedt via een S_N1-mechanisme. Er kan ook acetylering van de α-hydroxylgroep plaatsvinden. De zo gevormde ester is een mogelijke transportvorm die door alom aanwezige esterasen weer gehydrolyseerd kan worden. Ook bij nitrosamines met langere alifatische zijketens treedt α-hydroxylering op. Eindstandige hydroxylering (ω-hydroxylering) en (ω-1)-hydroxylering gaan veelal gepaard met ketenverkorting.

De snel uiteenvallende alkylerende stoffen kunnen bij lokale applicatie – bijvoorbeeld op de huid of in de urineblaas ter plekke tumoren induceren. Nitrosamines daarentegen zijn systemisch werkzaam en zullen in principe slechts effecten geven in organen die tot activering in staat zijn.

Belangrijk is dat nitrosamines (en nitrosamides) ook in het lichaam van mens en proefdier gevormd kunnen worden uit nitriet en een of ander amine. Nitriet kan in

voedsel aanwezig zijn, maar ook in het lichaam ontstaan door (bacteriële) reductie van nitraat. Deze reductie begint al in het speeksel in de mondholte. Vele soorten voedsel en een aantal geneesmiddelen (aminopyrine, cimetidine) bevatten nitroseerbare amines. Bij proefdieren leidt het toedienen van amines en nitriet samen in veel gevallen tot vorming van dezelfde tumortypen als door de corresponderende nitrosoverbindingen worden geïnduceerd. Hoewel endogeen gevormde nitrosamines (en -amides) ervan verdacht worden ook een rol te spelen bij het ontstaan van kanker bij de mens, is hiervan nog geen overtuigend bewijs geleverd.

2.5.2 Aromatische amines

In deze groep komen verbindingen voor die bestaan uit een of meer aromatische kernen en voorzien zijn van een al dan niet gesubstitueerde aminogroep (zie figuur 2 en figuur 7). Aromatische amines en daaraan verwante nitroverbindingen worden op grote schaal toegepast in de chemische industrie, met name als kleurstoffen voor textiel, hout en sommige huishoudelijke produkten en als tussenprodukten bij de bereiding van geneesmiddelen, biociden en plastics. Bij veel van deze toepassingen heeft het gebruik van aromatische amines (vooral dat van 2-naftylamine, benzidine en 4-bifenylamine) geleid tot een – soms sterk – verhoogd risico op blaaskanker voor de bij het produktieproces betrokken werknemers. Een van de meest onderzochte verbindingen is het *N*-acetyl-aminofluoreen (AAF; figuur 7). Centraal bij de activering van AAF staat de *N*-hydroxylering door een mono-oxygenase. Het *N*-hydroxy-AAF op zijn beurt is substraat voor veresterings-, transacetylerings- en deacetyleringsreacties. In de rattelever is de zeer reactieve sulfaatester de uiteindelijk met DNA en eiwitten reagerende metaboliet. Verestering met glucuronzuur vindt in de lever plaats; het *N*-glucuronide is stabiel genoeg om naar blaas en darm te worden getransporteerd. Daar plaatsvindende ontestering door microbiële glucuronidases geeft het *N*-hydroxy-AAF weer terug en schept daarmee de mogelijkheid voor een lokale interactie met epitheelcellen. Soortgelijke transportvormen blijken bij meer aromatische carcinogenen op te treden. Reactieve AAF-metabolieten reageren niet alleen met DNA (zie 2.6.3.), maar ook met eiwitten en vrije aminozuren zoals methionine, tryptofaan en tyrosine. Een direct inactiverende stap is de hydroxylering van een der aromatische kernen van het AAF. Deze vindt voornamelijk op de 1-, 3-, 5- of 7-positie plaats en kan worden gevolgd door glucuronidevorming en uitscheiding.

Het metabolisme van andere aromatische amines zoals de azokleurstof *N*-methyl-4-aminoazobenzeen (vgl. het dimethylanaloog in figuur 2) en 2-naftylamine (figuur 2) vertoont veel overeenkomst met dat van AAF. De activering van carcinogene aromatische nitroverbindingen zoals 2-nitronaftaleen, 4-nitrobifenyl of 4-nitrochinoline-*N*-oxide begint naar alle waarschijnlijkheid met een reductie tot het hydroxylaminederivaat, waarna dan of direct reactie met DNA of verdere activering plaatsvindt.

N-hydroxy-AAF, nitrosamines en andere chemische carcinogenen blijken bij incubatie in vitro met (bio)chemische oxidatiesystemen vrije radicalen te kunnen leveren. In figuur 7 is geïllustreerd dat *N*-hydroxy-AAF in aanwezigheid van peroxidase en H_2O_2 kan worden omgezet in een nitroxide-radicaal. Dismutatie (een omlegging tussen twee identieke moleculen) geeft vervolgens het *N*-acetoxy-AAF en het 2-nitrosofluoreen. Nog onduidelijk is of radicaalvorming ook optreedt in de intacte cel en daarbij mede verantwoordelijk is voor de waargenomen biologische effecten.

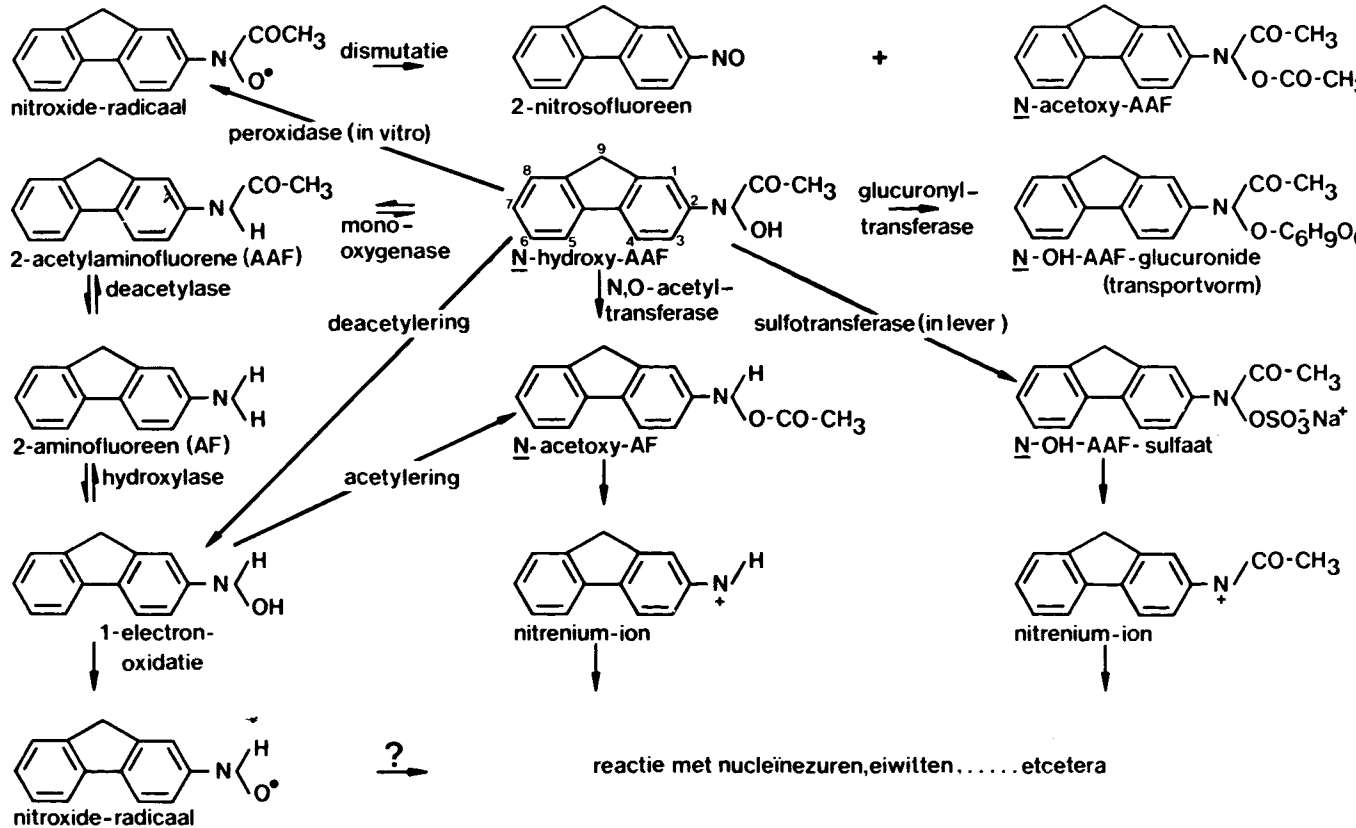


Fig. 7. Activering en inactivering van 2-acetylaminofluoreen.

2.5.3 *Vinylchloride en aromatische koolwaterstoffen*

Voorbeeld van een onverzadigde niet-aromatische verbinding is het carcinogeen vinylchloride. Deze stof wordt op zeer grote schaal gebruikt voor de produktie van de kunststof PVC. Enzymatische activering vindt plaats via epoxydevorming tot chloorethyleenoxyde. Deze reactieve metaboliet is vermoedelijk verantwoordelijk voor de biologische effecten. Een verdere, niet-enzymatische omlegging kan plaatsvinden tot chlooraceetaldehyde, terwijl eveneens koppeling aan glutathion en verdere detoxificatie optreedt.

De polycyclische aromatische koolwaterstoffen vormen een klasse chemische verbindingen met een zeer grote verspreiding, omdat zij kunnen ontstaan bij een onvolledige verbranding van organische verbindingen in bijvoorbeeld olie, benzine, hout, steenkool, tabak. Ook bij het te donker – op het zwarte af – bereiden van vlees, brood en andere levensmiddelen ontstaan in kleine hoeveelheden allerlei polycyclische aromatische koolwaterstoffen. Van de honderden bekende vertegenwoordigers is slechts een gering deel kankerverwekkend bij proefdieren gebleken.

Voor de werking van deze aromatische verbindingen is, net als bij vinylchloride, de vorming van reactieve epoxyden essentieel (zie figuur 2 en figuur 8). Een goed voorbeeld is benz(*a*)pyreen, waarvan het metabolisme de laatste jaren grondig is onderzocht. Enzymatische epoxydevorming door een zogenaamd 'aryl hydrocarbon hydroxylase' (AHH) vindt plaats op de 4,5-, 7,8- en 9,10-posities. Epoxydehydratase (= epoxydehydrolase) kan deze epoxyden omzetten tot *trans*-dihydrodiolen. Eerst werd gedacht dat metabolisme in het K-gebied (K staat voor Krebs = kanker) tot de voor tumorvorming relevante actieve metabolieten leidde. Toen bleek dat het 7,8-dihydrodiol tot een veel grotere binding aan DNA leidde dan benz(*a*)pyreen zelf. Vervolgens bleek dat een der vier stereo-isomeren van het 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxyde, namelijk de (+) enantiomeer van de *anti*-isomeer (figuur 8), een der meest voorkomende actieve metabolieten is en bovendien de grootste biologische activiteit vertoont. De reactieve plaats in de dihydrodiol-epoxyden is de epoxydegroep. In de epoxydering treden ladingsverschillen op; de positieve lading op (een der) beide C-atomen (figuur 9) leidt tot een elektrofiel reactietype.

Inactivering van benz(*a*)pyreen en andere polycyclische aromaten vindt plaats door de vorming van fenolen en chinonen. Ook in het stadium van de dihydrodiolen kan nog inactivering (door een dehydrogenase) optreden tot catecholen. Fenolen, chinonen en catecholen hebben gemeen dat de gesubstitueerde ring zijn onverzadigde karakter heeft behouden. Verdere inactivering en uitscheiding van deze produkten vindt plaats via glucuronidevorming. De balans tussen activering en inactivering is een bepalende factor voor het biologische effect. Ook de verhouding tussen de verschillende activeringsstappen kan van celtype tot celtype, maar ook voor microsoompreparaten, drastisch verschillen: terwijl in intacte dieren epoxydevorming in het baaigebied tot de meeste interactie met DNA leidt, is de vorming van K-gebied-epoxyden in de bacterie *Salmonella typhimurium* goeddeels verantwoordelijk voor de daarin waargenomen mutaties. Een gevolg hiervan is dat in het geval van polycyclische aromatische koolwaterstoffen de Ames-test weinig betrouwbare voorspellingen van het carcinogeen vermogen geeft.

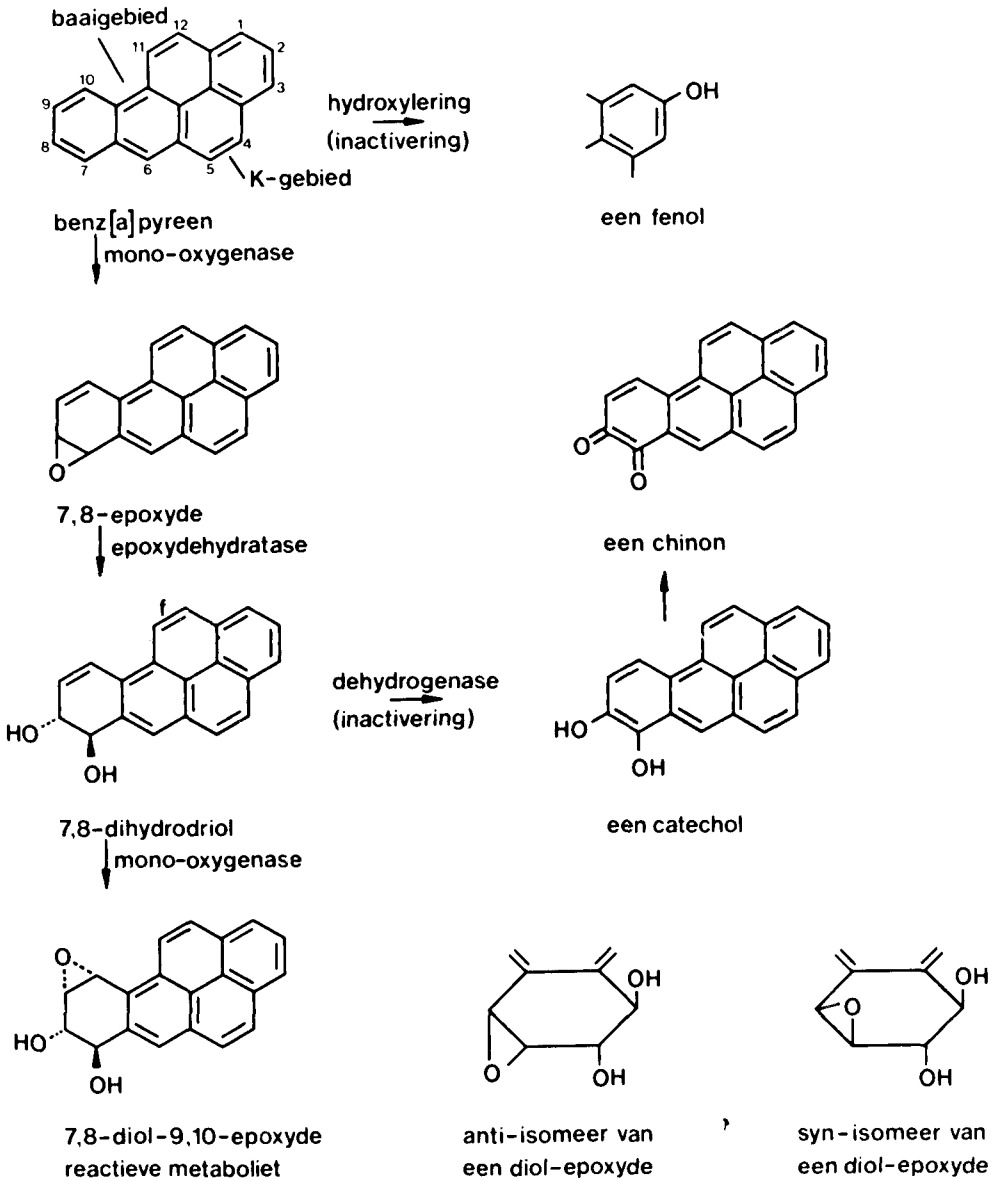


Fig. 8. Bij het metabolisme van benz(*a*)pyreen ontstaan zowel reactieve diolepoxydes als biologisch inactieve fenolen en catecholen.

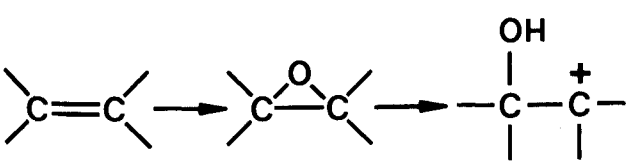


Fig. 9. Via epoxydevorming kan uit een onverzadigde verbinding een elektrofiel deeltje ontstaan, dat tot reactie met onder meer nucleïnezuren en eiwitten in staat is.

2.5.4 *Enkele natuurlijk voorkomende carcinogenen*

Hoewel veel carcinogene risicofactoren in verband kunnen worden gebracht met chemische en andere industrieën, is er een indrukwekkende lijst op te stellen van natuurlijk voorkomende carcinogenen. Zo zijn van de pyrrolizidine-alkaloïden, een klasse verbindingen die wijd verspreid is in het plantenrijk, een aantal kankerverwekkende vertegenwoordigers bekend. Opvallend is dat kanker van de lever veel voorkomt in gebieden waar de betreffende planten – vaak als medicijn – genuttigd worden. Figuur 10 geeft als voorbeeld het hepatocarcinogeen lasiocarpine, een diëster van 1,2-dehydropyrrolizidine. Gesuggereerd is dat activering plaatsvindt via epoxydevorming van de onverzadigde 1,2-binding in het skelet. De belangrijkste metaboliet van het safrool (figuur 10), dat in een aantal kruiden, oliën en in sommige landen ook in medicijnen voorkomt, is het 1′-hydroxysafrool. Beide stoffen veroorzaken levertumoren in muizen en ratten. Hoewel epoxydevorming van de onverzadigde 2′,3′-binding plaatsvindt (vgl. vinylchloride), blijkt de belangrijkste activeringsstap – althans in de muizelever – de vorming van een reactieve sulfaatester met de eerst geïntroduceerde 1′-hydroxygroep te zijn. Cycasine en streptozotocine (figuur 10) zijn aan een suiker gekoppelde derivaten

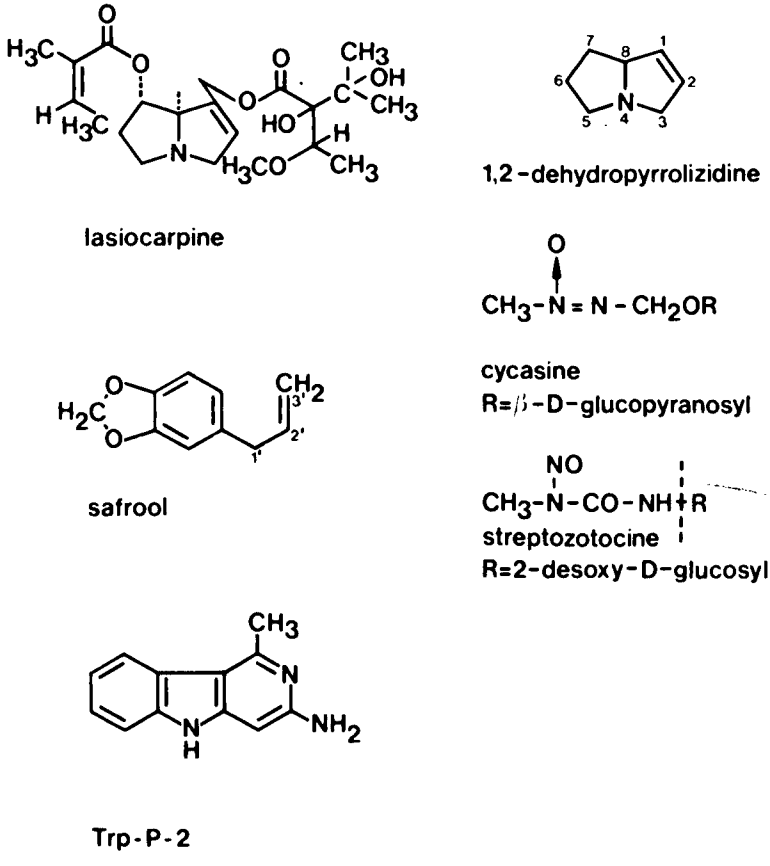


Fig. 10. Enkele natuurlijk voorkomende carcinogenen.

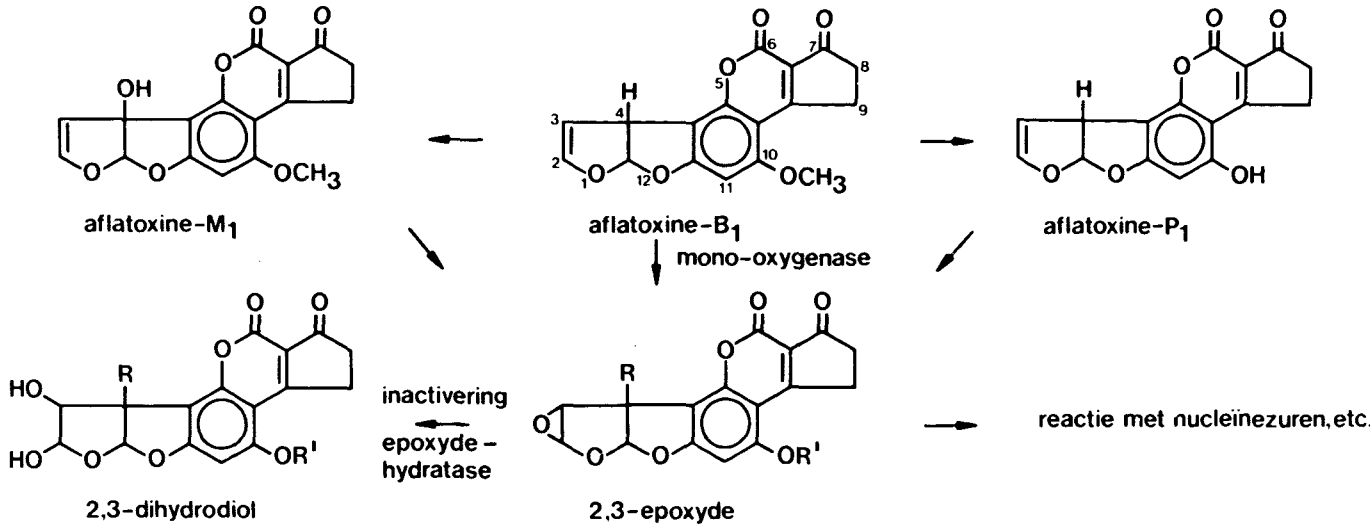


Fig. 11. Het metabolisme van enkele aflatoxines.

van een direct methylerend agens, respectievelijk voorkomend in de plantenfamilie der Cycadaceae en geproduceerd door een *Streptomyces*-schimmel. Voor hun toxische en carcinogene werking is een glucuronidase-activiteit nodig, bijvoorbeeld in de lever of afkomstig van darmbacteriën, die de suikergroep afsplitst. Het daarbij vrijkomende aglycon lijkt in zijn werking sterk op dimethylnitrosamine, respectievelijk methylnitrosoureum (vgl. figuur 6).

Tot de meest onderzochte natuurlijke carcinogenen behoren de aflatoxines. Dit zijn mycotoxines die door de schimmel *Aspergillus flavus* worden geproduceerd (figuur 11). Onder voor schimmelgroei gunstige omstandigheden kunnen per kilogram bonen, granen of pinda's in enkele dagen honderden microgrammen aflatoxines, vooral aflatoxine-B_1, ontstaan. Speciaal in tropische landen is het moeilijk deze verontreiniging van het voedsel te voorkomen, daar hiervoor een zeer droge opslag vereist is. Er zijn sterke aanwijzingen dat aflatoxines bijdragen aan de hoge incidentie van levertumoren in onder meer Oeganda, Kenya, Mozambique en Thailand. Van aflatoxine-B_1 zijn veel metabolieten bekend (figuur 11); naast ring-hydroxylering (o.a. tot aflatoxine-M_1), *O*-demethylering tot aflatoxine-P_1 en reductie van de onverzadigde 2,3-binding is ook epoxydatie van deze laatste binding mogelijk. Deze epoxydes blijken de belangrijkste reactieve metabolieten te zijn en verantwoordelijk voor de reactie met DNA en andere macromoleculen (vgl. figuur 9). Net als bij de polycyclische aromatische koolwaterstoffen is inactivering van het epoxyde (door epoxydehydratase of -hydrolase) tot een dihydrodiol mogelijk. Diersoorten met een grotere capaciteit om het epoxyde af te vangen door middel van conjugatie met glutathion, zoals de muis, danken daaraan hun relatieve ongevoeligheid voor het carcinogeen vermogen van aflatoxine-B_1.

Een interessante groep verbindingen wordt gevormd door de pyrolyseprodukten, onder andere van aminozuren en eiwitten. Deze verbindingen kunnen ontstaan bij de bereiding van eiwithoudend voedsel, vooral bij roosteren (barbecue) en krachtig braden. Een van de pyrolyseprodukten van tryptofaan, Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido (4,3-*b*)indol) (zie figuur 10) is mutageen en carcinogeen in proefdieren. Voor deze effecten is vermoedelijk de waargenomen enzymatische omzetting tot een *N*-hydroxy-verbinding verantwoordelijk, net als bij andere aromatische amines. Ook van een aantal andere pyrolyseprodukten, niet alleen van tryptofaan, maar ook van lysine, glutaminezuur en fenylalanine, zijn mutagene en soms carcinogene eigenschappen beschreven. Daar de meeste gegevens over deze pyrolyseprodukten pas in de laatste jaren bekend zijn geworden, is het nog te vroeg om iets te kunnen zeggen over een eventuele bijdrage aan het ontstaan van kanker bij de mens.

2.6 Modificatie van DNA door chemische carcinogenen

2.6.1 DNA en tumorvorming

DNA is op essentiële wijze betrokken bij de tumorvorming, ongeacht het agens dat de tumor veroorzaakt. Een aantal algemene aanwijzingen hiervoor zijn:

1. Uit de resultaten van het DNA-transfectie-onderzoek blijkt dat het mogelijk is om met behulp van DNA-fragmenten uit tumorcellen, 'normale' cellen blijvend tot kankercellen te transformeren (vgl. 2.9).
2. Een tumor ontstaat uit één cel en vormt dus een kloon.
3. Het tumorkarakter van de cellen in een tumor is erfelijk.

4. De gevoeligheid voor het krijgen van kanker is in een aantal gevallen erfelijk bepaald; dit is bijvoorbeeld het geval met het tweezijdig retinoblastoom.
5. In enkele gevallen bestaan aanwijzingen dat mutaties in een bepaald chromosomaal gebied tot het ontstaan van bepaalde tumoren kunnen leiden (vgl. 2.8.4).
6. Het onderzoek naar tumorvorming onder invloed van straling of virussen laat zien dat DNA hierbij een sleutelpositie inneemt.

Daarnaast zijn er een aantal argumenten die meer specifiek zijn voor de rol van DNA bij chemisch geïnduceerde tumoren. Het gaat hierbij voornamelijk om aanwijzingen dat interactie van reactieve metabolieten met het DNA van een lichaamscel (= somatische cel) essentieel is voor tumorinitiatie.
7. De meeste initiërende chemische carcinogenen gaan een covalente interactie met DNA aan. In een aantal gevallen waar dit niet zo lijkt te zijn, is wel bekend dat de moleculaire structuur van het DNA indirect kan worden veranderd, bijvoorbeeld via fouten bij de DNA-synthese (effect van bepaalde metaalzouten op DNA-polymerase) of door een kwalitatief effect op de enzymatische methylering van DNA (ethionine).
8. Er bestaat een koppeling tussen enerzijds de kans op tumorvorming en anderzijds de mate van DNA-modificatie en het vermogen tot DNA-herstel.
9. Vrijwel alle chemische carcinogenen met initiërende activiteit zijn mutageen. Actieve metabolieten die voor het proces van tumorinitiatie verantwoordelijk worden gehouden, blijken sterkere directe mutagenen te zijn dan de oorspronkelijke stoffen.
10. Er is een nauw verband tussen groeicontrole en genregulatie. Een veranderde genregulatie kan het gevolg zijn van een mutatie. Van sommige carcinogenen is bekend dat zij dit regulatieproces direct beïnvloeden.

Het metabolisme van zeer uiteenlopende chemische carcinogenen kan tot de vorming van reactieve elektrofiele metabolieten leiden: epoxyden, carboniumionen, nitreniumionen, reactieve esters. Door de aanwezigheid van een elektronendeficiënt gebied in het positief geladen of neutrale molecuul kunnen deze metabolieten reageren met elektronenrijke plaatsen in bijvoorbeeld DNA-basen; N-, O- en soms ook C-atomen met een vrij elektronenpaar en de negatief geladen fosfaatgroepen. Ook zijn reacties met de N-, O- en vooral de S-atomen van eiwitten mogelijk. Welke reacties uiteindelijk prevaleren hangt af van onder meer de volgende factoren:
– De nucleofiliteit van de betreffende plaats in het DNA. Bij de reactie spelen de elektrostatische interacties, de polariseerbaarheid van de reactiepartners en de mogelijkheden van ladingsoverdracht een rol.
– Het reactietype: S_N1 of S_N2. In het laatste geval geldt het onder het vorige punt genoemde ten volle. In het geval van een S_N1-reactietype daarentegen wordt met alle bereikbare nucleofiele plaatsen gereageerd (vgl. 2.5.1).
– De bereikbaarheid van de betreffende plaats in het DNA. Zelfs voor een methyl- of ethylcarboniumion zijn bepaalde plaatsen in een DNA-dubbelhelix – bijvoorbeeld de bij de baseparing betrokken *N*-1 van adenine of *N*-3 van cytosine – moeilijk bereikbaar. Dit geldt niet voor de bij de baseparing betrokken O-atomen, vermoedelijk omdat hier, anders dan bij stikstof, een extra elektronenpaar voor reacties beschikbaar is.

Figuur 12 geeft een aantal mogelijkheden van DNA-modificatie door een chemisch carcinogeen. Omdat sommige modificaties schadelijk kunnen zijn, maar andere weer geen biologische gevolgen lijken te hebben, wordt de neutrale term 'modificatie' verkozen boven 'beschadiging'. Niet-covalente interactie met DNA is mogelijk, met name via

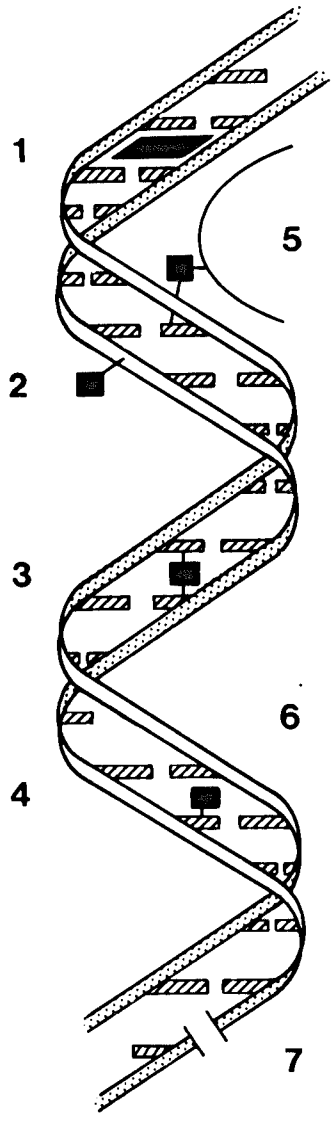


Fig. 12. Modificatie van DNA als gevolg van reactie met een chemisch carcinogeen. Eénwaardige carcinogenen reageren met een base (4) of een fosfaatgroep (2). Reactie met een base kan soms tot verlies van de base leiden (6), reactie met een fosfaatgroep of onvolledig DNA-herstel eventueel tot een breuk (7). Tweewaardige carcinogenen vormen 'cross-links', hetzij van DNA naar DNA (3), hetzij van DNA naar eiwit (5). In enkele gevallen vindt intercalatie tussen twee opeenvolgende baseparen plaats (1); dit kan gevolgd worden door het ontstaan van een covalente binding met het DNA.

intercalatie (invoeging tussen twee baseparen). Bij tumorinitiatie echter spelen voornamelijk covalente interacties met reactieve metabolieten of – in het geval van UV – wijzigingen in de covalente structuur van het DNA zelf een rol. Monovalente alkylerende verbindingen leiden tot monovalente substituties op een base of een fosfaatgroep. Bivalente alkylerende verbindingen kunnen zowel tot een monovalente als een bivalente substitutie leiden. In het laatste geval kunnen er zowel brugverbindingen (cross-links) tussen DNA en DNA (interstrand en intrastrand) als tussen DNA en eiwit ontstaan. Interactie met DNA betekent soms dat de ruimtelijke structuur van een dubbelhelix veranderd wordt. Ook kunnen interactieprodukten uit het DNA verdwijnen, soms spontaan, soms door een actief proces. Het gevolg van dit alles is dat secundaire DNA-

modificaties zoals apurineplaatsen, enkelstrengs stukken, breuken en lokale denaturatie kunnen optreden.

In 2.5.1-2.5.4 is met enkele voorbeelden getoond welke reactieve metabolieten kunnen ontstaan. Hieronder wordt nader ingegaan op hun reactie met DNA.

2.6.2 Alkylering door (m)ethylerende verbindingen

Alle zuurstof- en stikstofatomen in DNA-basen en alle fosfaatgroepen kunnen in principe worden gealkyleerd. In figuur 13 zijn het AT- en GC-basepaar in DNA afgebeeld met daarin de plaatsen die in vivo door ethylnitrosoureum geëthyleerd worden. De mate van alkylering kan per plaats zeer verschillen. Ethylnitrosoureum reageert volgens een S_N1-mechanisme. Er treedt dus relatief veel ethylering van de zuurstofposities en weinig van de stikstofposities op. Ethylering van de exocyclische *N*-atomen door ENU kon alleen nog maar in vitro worden aangetoond. Bij een reactie van het S_N2-type, bijvoorbeeld tussen DNA en methylmethaansulfonaat, worden vrijwel uitsluitend *N*-gemethyleerde produkten gevormd. Een praktische maat is de al eerder gegeven verhouding tussen de gevormde hoeveelheden O^6- en 7-alkylguanine (zie tabel 3). De ab-

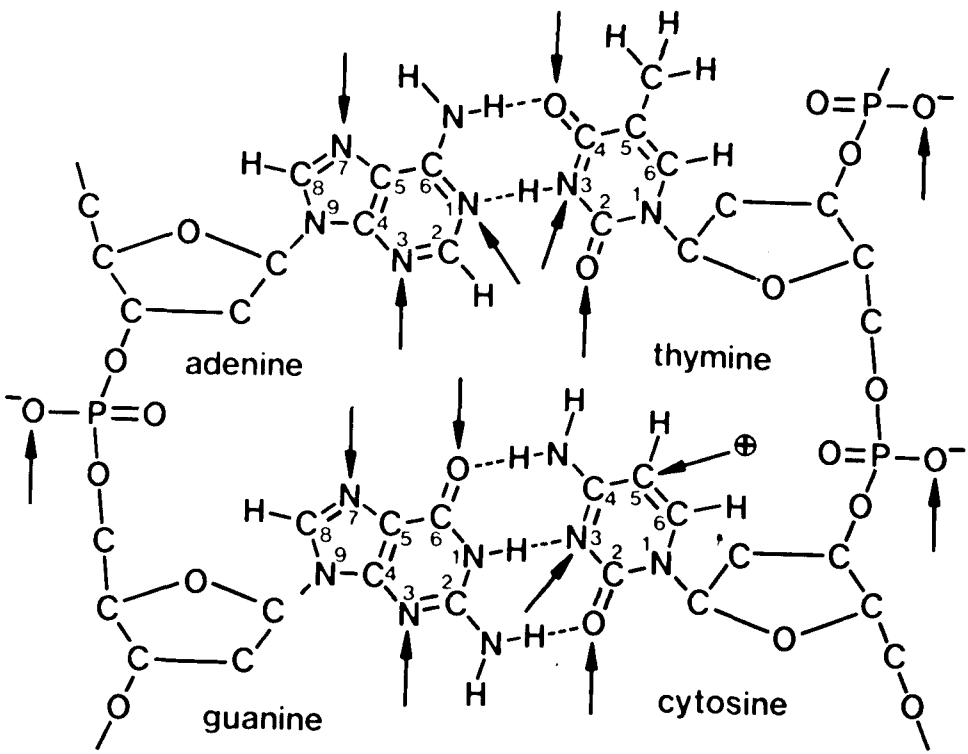


Fig. 13. Een fragment van een DNA-keten met een GC- en een AT-basepaar. Met pijltjes zijn de posities in basen en fosfaatgroepen aangegeven die door ethylnitrosoureum in vivo geëthyleerd kunnen worden. De pijl met het sterretje geeft de C-5 van cytosine aan; met deze positie wordt voor zover bekend niet door alkylerende agentia gereageerd. Vorming van 5-methylcytosine is een fysiologisch, enzymatisch proces dat tot geninactivering kan leiden.

solute hoeveelheden gealkyleerde base die men in het DNA van een proefdier vindt na injectie met een alkylerende verbinding, zijn gering. Zelfs bij een hoge dosis van een sterk alkylerend agens als dimethylnitrosamine wordt minder dan 1 op de 1000 guanines op de *N*-7 gemethyleerd. Slechts met gevoelige methoden zijn de verschillende alkyleringsprodukten aan te tonen. In het verleden werd vrijwel uitsluitend gebruik gemaakt van kostbare radioactieve verbindingen. Sinds kort bestaan er ook zeer gevoelige immunologische methoden, waarmee femtomol-hoeveelheden (1 femtomol = 10^{-15} mol) van een interactieprodukt kunnen worden aangetoond.

Maar weinig ge(m)ethyleerde produkten kunnen zeer lang in cellulair DNA aanwezig blijven. Halveringstijden blijken uiteen te lopen van enkele minuten tot vele weken. Voorbeelden van persisterende modificaties zijn de ethylfosfotriëster en O^6-ethylguanine. De stabiliteit van een DNA-modificatie is verder sterk afhankelijk van de diersoort en het onderzochte celtype. Het verdwijnen van een gealkyleerd produkt uit DNA vindt meestal zijn oorzaak in een actief enzymatisch DNA-herstelmechanisme (zie 2.7). Produkten als 7-alkylguanine en 3-alkyladenine verdwijnen ook spontaan uit DNA, doordat alkylering op deze plaatsen de stabiliteit van de binding tussen base en deoxyribose sterk vermindert. Er blijft in dat geval een apurineplaats over.

2.6.3 Interactie met aromatische amines

Hoewel de uiteindelijk reactieve metabolieten van AAF (zie 2.5.2) ook elektrofiele deeltjes zijn, vinden de reacties met DNA – om nog onbekende redenen – toch op andere posities plaats: met name de *C*-8 en in mindere mate de (exocyclische) N^2 van guanine. Een mogelijkheid die door in vitro experimenten met *N*-acetoxy-AAF gesteund wordt, is dat er ook met sommige andere elektronenrijke plaatsen zoals de *N*-7 van guanine, reactie plaatsvindt, maar dat de ontstane produkten uiterst instabiel zijn, bijvoorbeeld door labilisering van de *N*-glycosylische binding. De gevolgen van deze interacties zijn zeer uiteenlopend (vgl. 2.8.1). Terwijl molecuulmodellen laten zien dat het aan de aminogroep gebonden AAF zonder veel wringen in de smalle groef van de dubbelhelix (zie figuur 18) past, blijkt binding aan de *C*-8 van guanine een aanzienlijke verandering van de helixstructuur te veroorzaken. In dit laatste geval wisselen het guanine- en AAF-molecuul van plaats, zodat niet langer het AAF, maar het guanine uit de helix uitsteekt. Dit verschil in binding gaat gepaard met een verschillende gevoeligheid voor nucleases, die specifiek zijn voor enkelstrengs- of plaatselijk gedenatureerde gebieden in DNA. Lokale DNA-afbraak wordt alleen gevonden bij het aan *C*-8 gebonden AAF. Eenzelfde verschijnsel biedt een verklaring voor de stabiliteit van beide produkten in rattelever-DNA: terwijl het aan N^2 gebonden produkt maandenlang in het DNA aanwezig blijft, verdwijnt de *C*-8 substituent met een halveringstijd van ongeveer 7 dagen. Naast de twee hiervoor genoemde produkten kunnen ook de overeenkomstige gedeacetyleerde interactieprodukten worden aangetoond.

In vivo binding aan de *C*-8 en N^2 van guanine wordt bij 2-naftylamine, *N*-methyl-4-aminoazobenzeen (MAB) en andere aromatische amines gevonden. Binding aan een ringstikstof lijkt weinig voor te komen. Een uitzonderlijke interactie treedt op bij het 1-naftylamine, dat aan O^6 van guanine blijkt te binden. In enkele gevallen is ook binding aan de aminogroep (N^6) van adenine gevonden, zoals in vivo bij MAB en in vitro na reactie van geïsoleerd DNA met *N*-hydroxyverbindingen of actieve sulfaatesters van bijvoorbeeld *N*-acetyl-2-aminofenantreen, 2-naftylamine en 4-aminochinoline-1-oxi-

de. Hoewel het bij de in vivo binding van MAB aan adenine van rattelever-DNA om een produkt gaat dat na één injectie van het carcinogeen slechts enkele procenten van alle DNA-adducten vormt, heeft het persistente karakter tot gevolg dat dit relatief lage gehalte na een langdurige expositie drastisch omhoog kan gaan (tot bijna 25 %).

2.6.4 Modificatie door vinylchloride

Chloorethyleenoxyde, vermoedelijk de uiteindelijk werkzame metaboliet van vinylchloride, reageert onder afsplitsing van Cl^- met DNA, met name met de *N*-7 van guanine. Daarbij wordt 7-(2-oxoethyl)guanine gevormd. De aldehydegroep van dit adduct is mogelijk in staat om een (reversibele) binding aan te gaan met O^6 van hetzelfde guaninemolecuul onder vorming van een hemiacetaal. Een belangrijk gevolg hiervan is dat daarmee twee mogelijkheden van het oorspronkelijke guanine om baseparing aan te gaan, namelijk via de O^6 en de *N*-1-waterstof, verloren gaan (vgl. figuur 13). Dit zou een verklaring kunnen vormen van zowel de mutagene als carcinogene eigenschappen van vinylchloride en chloorethyleenoxyde.

2.6.5 Reactie met actieve metabolieten van polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK)

De eerste experimentele aanwijzingen dat covalente interactie met DNA verantwoordelijk is voor het carcinogene effect van PAK, dateren uit het begin van de zestiger jaren. Gevonden werd dat de binding aan DNA gelijk opging met de enzymatische omzetting tot een epoxyde. Na enzymatische afbraak van met benz(*a*)pyreen gemodificeerd DNA werd met behulp van chromatografische analyse de identiteit van de adducten met DNA vastgesteld. De meest voorkomende bindingsplaats in DNA is de exocyclische aminogroep van purine- en pyrimidinebasen, met name die van guanine. Het benz(*a*)pyreenresidue is via de *C*-10 gebonden. In het geval van het anti-benz(*a*)pyreendiolepoxyde treedt ook enige reaktie met de *N*-7 van guanine op; dit produkt is echter zeer labiel in DNA en depurinatie is een kwestie van uren. Ook in het geval van andere PAK is een diolepoxyde (vgl. figuur 8) de uiteindelijk met DNA reagerende ('ultimate') metaboliet. Voor het onderzoek naar biologische effecten van PAK in modelsystemen is het van belang dat activering door intacte cellen tot andere reactieve metabolieten en dus tot andere adducten met DNA kan leiden dan wanneer – zoals in de Ames-test het geval is – microsoomfracties worden gebruikt.

2.6.6 Binding van enkele natuurlijk voorkomende carcinogenen

Vergelijking van de chromatografische eigenschappen van in vivo interactieprodukten van radioactief gemerkt 1′-hydroxysafrool (zie 2.5.4) en muizelever-DNA met de in de reageerbuis verkregen reactieprodukten tussen individuele deoxyribonucleosides en de zeer reactieve azijnzure ester van het 1′-hydroxysafrool, gaf aanwijzingen over de aard van de in vivo gevormde DNA-adducten. Het 1′-hydroxysafrool reageert na activering voornamelijk met de 2-aminogroep van guanine en in mindere mate met de 6-aminogroep van adenine. Over de in vivo stabiliteit van deze adducten is nog niets bekend. In de muize- en rattelever bleek de reactieve metaboliet van 1′-hydroxysafrool ook met eiwitten te reageren. Isolatie van 3′-methylmercaptoisosafrool toonde aan dat

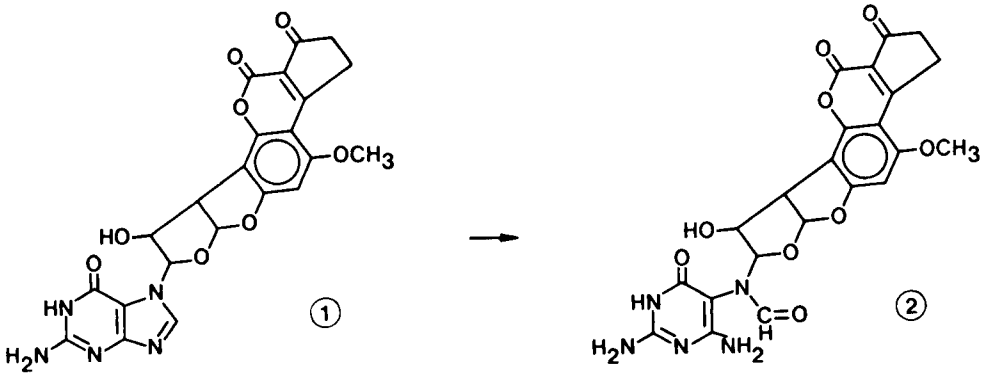


Fig. 14. Aflatoxines, zoals het hier afgebeelde aflatoxine-B_1, binden in de rat aan lever-DNA op de 7-positie van guanine (1). Een van de gevolgen hiervan is het opengaan van de imidazolring, waardoor een zeer stabiel en moeilijk verwijderbaar produkt ontstaat (2).

reactie met zwavelbevattende eiwitten of met glutathion plaatsvindt.

Chemische carcinogenen met aromatische structuren binden in DNA vrijwel uitsluitend aan de exocyclische *N*-posities der basen. Toch zijn er opvallende afwijkingen bekend, zoals 1-naftylamine (2.6.3) en de aflatoxines. Na injectie van aflatoxine-B_1 in de rat treedt voornamelijk binding aan de *N*-7 van guanine op (figuur 14). Een klein deel van het aflatoxine-B_1 wordt eerst omgezet tot aflatoxine-P_1 of -M_1 (figuur 11) en levert na activering de overeenkomstige DNA-adducten. Door de alkylering van guanine op de *N*-7 is echter een positieve lading in de imidazolring geïntroduceerd, die – net als bij 7-methylguanine – de band tussen base en suiker drastisch verzwakt. Een aanzienlijk deel van het aflatoxine-*N*-7-adduct valt om deze reden spontaan uit het DNA. Er treedt ook een andere reactie op, waarbij de imidazolring wordt geopend en een zeer stabiel produkt ontstaat. Dit ringgeopende produkt vormt na één injectie met aflatoxine-B_1 slechts enkele procenten van alle adducten samen. Een herhaalde blootstelling aan kleine hoeveelheden aflatoxine-B_1, zoals ook in de menselijke situatie te verwachten is, leidt echter tot een totaal ander resultaat, waarbij het ringgeopende guanineadduct verre in de meerderheid is. Een eerste belangrijke conclusie hieruit is dat als men de rol van een specifieke DNA-modificatie bij het ontstaan van een of ander biologisch effect wil nagaan, de wijze van toedienen zoveel mogelijk vergelijkbaar moet zijn. Een tweede conclusie is dat men, als men over een goede immunologische detectiemogelijkheid voor het ringgeopende produkt beschikt, de belasting van de mens met aflatoxine-B_1 kan bepalen. Dit kan van groot belang zijn, zowel om het verband tussen aflatoxine-expositie en tumorvorming nader vast te stellen als om eventuele exposities op te sporen en terug te dringen.

2.6.7 Enkele andere soorten DNA-modificaties

Bij de tot op heden besproken voorbeelden van DNA-modificaties door chemische carcinogenen en mutagenen is steeds sprake van een geactiveerde metaboliet die aan DNA bindt. Modificatie van DNA kan ook ontstaan door de inwerking van ioniserende straling of ultraviolet licht. Ioniserende straling, zoals röntgenstraling en α- en β-deel-

tjes, leiden door reactie met water tot het ontstaan van de zeer toxische hydroxylradicalen ($OH^{\cdot}$):

$$H_2O \xrightarrow[\text{straling}]{\text{ioniserende}} H_2O^{\cdot\cdot} + \bar{e} \xrightarrow{H_2O} H^+ + OH^{\cdot} + \bar{e}\,aq$$

($\bar{e}$ aq is een gehydrateerd elektron). Zowel ioniserende straling in zuurstof-bevattende waterige oplossingen als reductie/oxydatie-reacties van een aantal chemische stoffen kunnen leiden tot de vorming van het superoxyde-anion-radicaal $O_2^{\cdot-}$. Via een spontane dismutatie kan hieruit het reactieve singletzuurstof ontstaan: $^1O_2$. Via een enzymatisch gekatalyseerde omlegging ontstaat waterstofperoxyde:

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{superoxydedismutase}} H_2O_2 + O_2$$

Het zeer giftige H_2O_2 kan onschadelijk worden gemaakt door een peroxydase, maar kan echter ook tot hernieuwde radicaalvorming aanleiding geven:

$$H_2O_2 + Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++} + OH^- + OH^{\cdot}$$

$$H_2O_2 + Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++} + HO_2^{\cdot} + H^+$$

Toxiciteit van de in het algemeen zeer reactieve vrije radicalen verloopt via interactie met en verstoring van allerlei (macro)moleculaire structuren zoals fosfolipiden in membranen (peroxydatie) en SH-groepen in enzymen en andere eiwitten. Ook reactie met

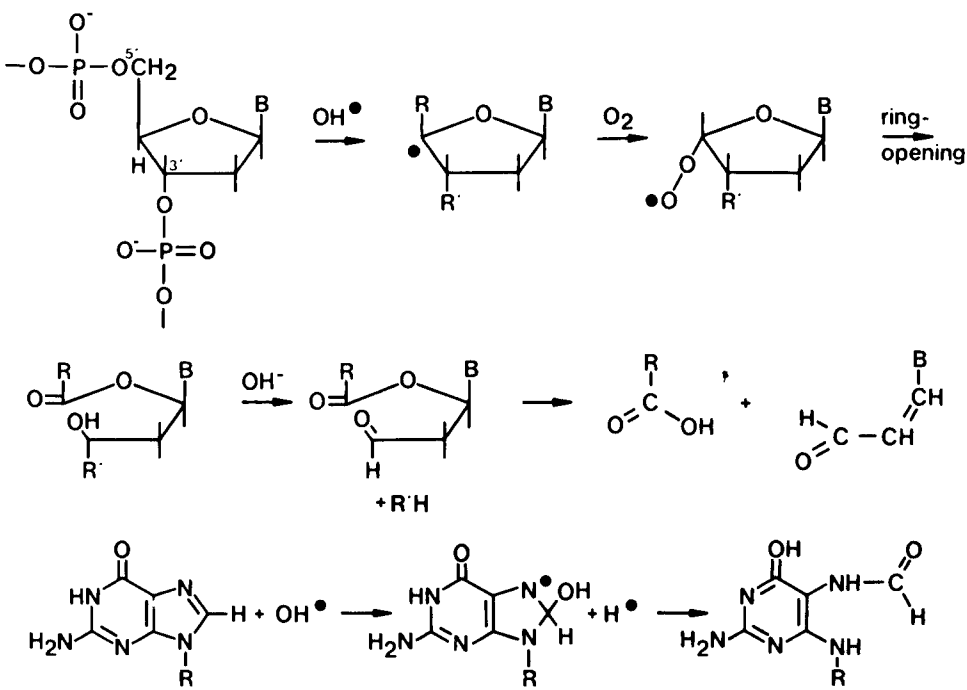


Fig. 15. Reacties van vrije hydroxylradicalen met DNA leiden zowel tot ketenbreuken als tot gemodificeerde basen.

DNA is mogelijk; een aanval van het hydroxyl-radicaal op een base of op het deoxyribose is mogelijk. In het eerste geval kan bijvoorbeeld ringopening optreden, in het laatste geval kunnen ketenbreuken het gevolg zijn (figuur 15).

Gevolg van bestraling van cellen met ultraviolet licht is de vorming van pyrimidinedimeren in DNA. Twee in dezelfde streng naast elkaar gelegen pyrimidines (thymines of cytidines) worden via een cyclobutaanring aan elkaar gekoppeld tot een dimeer: $\widehat{TT}$ of $\widehat{CC}$, ook wel $\widehat{TC}$. Deze dimeren blijken oorzaak te kunnen zijn van mutatie en tumorvorming.

2.6.8 Verdeling van modificaties over het DNA-molecuul

Men zou verwachten dat de ruimtelijke structuur van het $\widehat{DN}$A (enkelstrengs of dubbelstrengs; B- of Z-structuur) en het al dan niet afgeschermd zijn door eiwitten de expositie van sommige groepen in DNA beïnvloeden. Door de reactiviteit van enkelstrengs DNA te vergelijken met die van de dubbelstrengs vorm, werd ontdekt dat de baseparing in enkele gevallen tot een verminderde reactiviteit van de daarbij betrokken posities kan leiden. Zo geeft diëthylsulfaat naar verhouding veel meer (tot ruim 10×) 1-ethyladenine en 3-ethylcytosine in enkelstrengs DNA. De grotere bereikbaarheid van basen in enkelstrengs DNA leidt in het algemeen ook tot een grotere reactiviteit, bijvoorbeeld met geactiveerde metabolieten van aromatische amines. Toch leidt reactie met een vrije base niet altijd tot een grotere verscheidenheid aan produkten dan reactie met dezelfde base in dubbelstrengs DNA. Reactie van *N*-acetoxy-AAF met guanine in dubbelstrengs DNA geeft bijvoorbeeld substitutie op de *C*-8 en de N^2 (vergelijk 2.6.3), terwijl reactie met de vrije base slechts aan de *C*-8 plaatsvindt. De reactiviteit van guanine verandert in dit geval blijkbaar onder invloed van de ernaast liggende basen.

Sterische belemmering door histonen leidt ertoe dat grote moleculen (zoals aflatoxine-B_1, *N*-acetoxy-AAF en benz(*a*)pyreen) wat moeilijker binden aan het om de nucleosomen gewonden 'core DNA' dan aan het tussen deze deeltjes gelegen 'linker DNA'. Om dit vast te stellen, wordt gebruik gemaakt van het verschil in afbreekbaarheid tussen beide soorten DNA door DNAse I. De maximale verschillen zijn echter niet indrukwekkend (tot 5 maal); bovendien neemt het verschil in de tijd meestal weer vrij snel af, doordat ook het enzymatische DNA-herstel effectiever is voor de tussen de nucleosomen gelegen modificaties. Voor kleine groepen (bijvoorbeeld methyl) worden geen kwantitatieve verschillen tussen nucleosomale en internucleosomale binding gevonden.

Differentiële enzymatische afbraak van DNA wordt ook gebruikt om de binding aan actief DNA (in gebruik als matrijs voor RNA-synthese) te vergelijken met die aan inactief DNA. Voor grotere moleculen blijkt er weer een voorkeur voor binding aan actief DNA te kunnen optreden: voor binding van AAF aan rattelever-DNA werd zelfs een 16-voudig verschil gevonden. Voor methylgroepen werden slechts marginale bindingsverschillen gevonden. Vergelijking van kern-DNA met mitochondrieel DNA geeft aan dat dit laatste in veel gevallen een hogere modificatiegraad heeft. De verschillen kunnen aanzienlijk zijn, wel 5 tot 100 maal. Het is niet duidelijk of deze hoge modificatiegraad van mitochondrieel DNA gevolgen heeft voor het functioneren van de cel. Er zijn echter geen aanwijzingen dat mutaties in mitochondrieel DNA ooit tot kanker leiden.

2.7 Herstelmechanismen voor gemodificeerd DNA

Een aantal DNA-modificaties heeft een biologisch effect, soms ten nadele van de cel (celdood, verlies van het delingsvermogen), soms ten nadele van het individu waarvan de cel deel uitmaakt (tumorvorming). Organismen hebben allerlei barrières opgebouwd om te voorkomen dat deze effecten optreden. Maar ook als biologisch actieve DNA-modificaties gevormd zijn, bestaan er nog kansen om de voortgang van het proces te stoppen door DNA-herstel ('repair'). Er zijn verschillende types DNA-herstel bekend; deze werken op het niveau van het adduct, de gemodificeerde base of het gemodificeerde nucleotide (figuur 16).

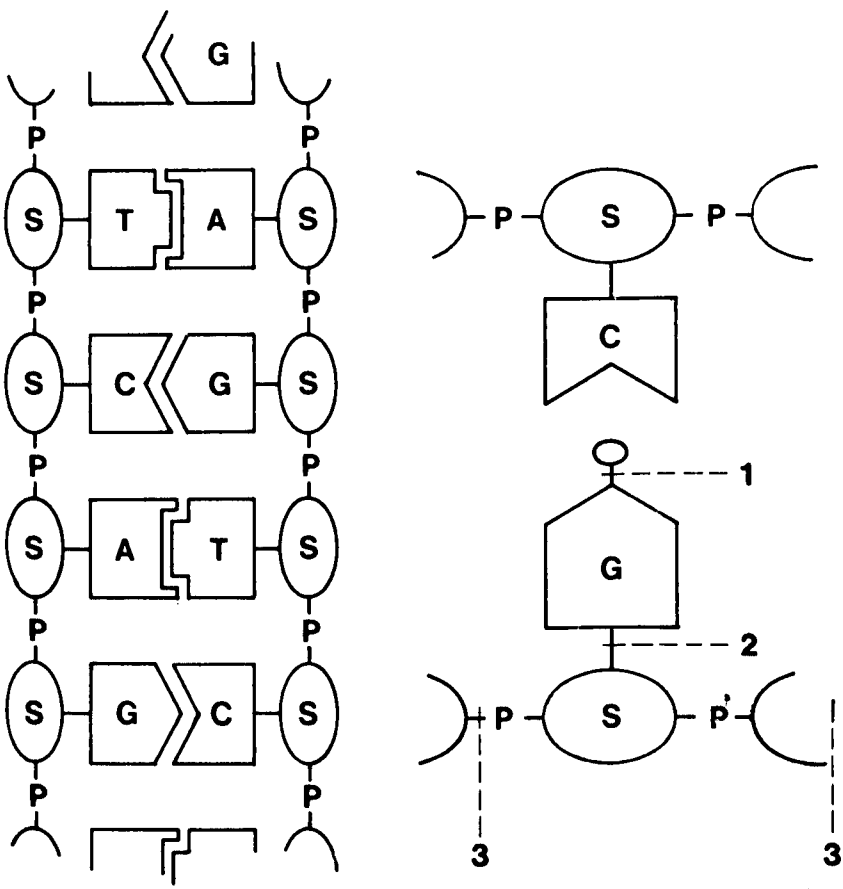


Fig. 16. Schematische weergave van enkele vormen van DNA-herstel. Uit een schematisch weergegeven DNA dubbelhelix is een GC-paar gelicht, waarvan guanine door een carcinogeen of mutageen agens gemodificeerd is. Bij herstel kan de substituent zelf (1), de gesubstitueerde base (2), of een deel van de gemodificeerde DNA-keten (3) verwijderd worden, waarna de oude toestand weer hersteld is (1) of kan worden (2) (3). Welke vorm van herstel optreedt is afhankelijk van het type modificatie.

2.7.1 Verwijdering van het adduct

Op het eerste gezicht zou men denken dat het verwijderen van alleen de groep die aan het DNA is gaan zitten, de eenvoudigste oplossing zou zijn voor een effectief herstel. Er is tot op heden echter nog maar één voorbeeld bekend waarin dit optreedt, namelijk bij de verwijdering van de (m)ethylgroep van het door een aantal (m)ethylerende verbindingen in DNA gevormde O^6-(m)ethylguanine (O^6-MeGua, O^6-EtGua). Dit proces is beschreven voor onder andere *Escherichia coli*, humane fibroblasten in celkweek en de rattelever. Het opmerkelijke aan deze reactie is dat het hier geen enzymatische omzetting in de klassieke zin is, maar dat het 'enzym' tijdens de reactie met het substraat stoichiometrisch (1:1) verbruikt wordt. In het *E.coli*-systeem blijkt de methylgroep van O^6-MeGua over te gaan naar een cysteïneresidu in het 'enzym'molecuul, dat hierdoor geïnactiveerd wordt. Gevolg is dat dit herstelsysteem vrij snel is uitgeput als er grotere hoeveelheden O^6-alkylguanine ($>$ 1 per 10^5 à 10^6 basen) aanwezig zijn.

Een opvallende eigenschap van het enzym is dat het, althans in *E.coli*, te induceren is door voorbehandeling met een kleine hoeveelheid van een agens dat zelf een geringe hoeveelheid O^6-MeGua in DNA vormt. Bij een daarop volgende behandeling, waarbij grotere hoeveelheden O^6-MeGua ontstaan, blijkt deze modificatie buitengewoon snel uit het DNA te verdwijnen: halveringstijden van minder dan een seconde zijn daarbij gevonden. In *E. coli*, maar ook in gekweekte humane fibroblasten, blijkt deze adaptatie samen te gaan met een verminderd biologisch effect: minder celdood, minder mutaties, en bij de fibroblasten ook minder chromosoomafwijkingen. Inductie van deze snelle vorm van O^6-MeGua-herstel is ook mogelijk in de rattelever. Het gaat bij deze inductie echter om een minder specifiek proces: allerlei hepatotoxische verbindingen kunnen de O^6-MeGua-herstelcapaciteit verhogen, ook verbindingen die zelf geen direct methylerende werking vertonen. Het is in dit laatste geval onduidelijk wat de functie van een verhoogde O^6-demethylase-activiteit is.

2.7.2 Fotoreactivering van pyrimidinedimeren

Er zijn twee manieren waarop een cel door UV-bestraling veroorzaakte pyrimidinedimeren in het DNA onschadelijk kan maken: door fotoreactivering en door excisieherstel. Fotoreactivering is de minst ingrijpende manier. Hierbij wordt door het 'fotoreactiverend enzym' de cyclobutaanring weer verbroken en daarmee de dimeer gemonomeriseerd. Het enzym benut daartoe de energie van licht met een wat grotere golflengte dan het oorspronkelijke dimeriserende ultraviolette licht. Afhankelijk van het celtype ligt de optimale reactiveringsgolflengte tussen 350 en 450 nm. Fotoreactivering werkt specifiek op pyrimidinedimeren die gevormd zijn in natief DNA. Enkele andere typen door UV-bestraling veroorzaakte DNA-schade worden niet hersteld. De aanwezigheid van een fotoreactiverend herstelsysteem is vastgesteld in allerlei lagere en hogere organismen, inclusief de mens. Deze vorm van DNA-herstel draagt er – zij het in beperkte mate – toe bij om de door zonnestraling veroorzaakte biologische schade zo gering mogelijk te maken. Opvallend is dat het fotoreactiverend enzym geen enkel effect heeft op pyrimidinedimeren in RNA. Een analoge situatie blijkt ook op te gaan voor de aanwezigheid van O^6-MeGua in RNA. Blijkbaar is het biologisch voordeel om – soms toch ook betrekkelijk lang levende – gemodificeerde RNA-moleculen te kunnen herstellen, te gering.

2.7.3 *Verwijdering van gemodificeerde basen*

Enzymen die in staat zijn om gemodificeerde basen uit DNA te verwijderen door de *N*-glycosylische binding tussen het deoxyribose en de base te verbreken, worden DNA-glycosylases genoemd. Sinds de ontdekking van deze nieuwe klasse DNA-herstelenzymen door Lindahl in 1976 is een zevental glycosylases geïdentificeerd (tabel 4). Het gaat hierbij om relatief kleine eiwitten, die niet alleen sommige door chemische carcinogenen gemodificeerde DNA-basen verwijderen, maar ook in staat zijn om DNA-basen die beschadigd zijn door ultraviolet licht, röntgenstraling of chemische instabiliteit, uit het DNA te halen.

Alle in tabel 4 genoemde DNA-glycosylases zijn aangetoond in bacteriële systemen; de op uracil en de ge(m)ethyleerde purines gerichte activiteiten zijn ook in zoogdiercellen aangetoond. Bij het verwijderen van de gemodificeerde base ('base excision repair') ontstaat een apurine- of apyrimidineplaats (AP-plaats). Er zijn wel aanwijzingen voor het bestaan van een enzym ('insertase'), dat een AP-plaats weer kan opvullen met de correcte base, maar een meer voorkomende oplossing is dat de door een glycosylase gevormde AP-plaats via verder excisieherstel (zie 2.7.4) wordt aangepakt. De eerste stap daarbij is een knip in de gemodificeerde DNA-streng door een endonuclease-activiteit die specifiek is voor AP-plaatsen.

2.7.4 *Verwijdering van gemodificeerde nucleotiden*

Deze vorm van DNA-herstel ('nucleotide excision repair') is van de tot nu toe beschreven vormen het minst specifiek voor de aanwezige modificatie. Alles wat een niet te geringe verstoring van de structuur der dubbelhelix lijkt te veroorzaken, kan in principe via dit mechanisme hersteld worden. In 2.8.1 wordt de verstoring van de DNA-structuur onder invloed van chemische carcinogenen nader besproken. Belangrijk is niet alleen de grootte van de substituent maar ook de positie. Dat koppeling van sommige omvangrijke moleculen aan een DNA-base onherstelbaar blijkt te zijn, is vermoedelijk het gevolg van het feit dat deze substituenten zonder veel verwringen van de helixstructuur goed in de kleine of de grote groef passen. Dit is al eerder vermeld voor het aan de NH_2-groep van guanine gebonden AAF, dat goed in de kleine groef van het DNA past. Een ander voorbeeld is het aan de *N*-7 van guanine gebonden aflatoxine (vgl. 2.6.6 en figuur 14). Het opengaan van de imidazolring maakt waarschijnlijk een minder rigi-

Tabel 4. Modificaties van DNA waarvoor specifieke DNA-glycosylases bestaan.

Substraat in DNA	Oorzaak van het ontstaan in DNA
Uracil	spontane deaminatie van cytosine
Hypoxanthine	spontane deaminatie van adenine
Thymidine-dimeren en	UV-licht
5,6-dihydroxydihydrothymine	UV-licht, ioniserende straling
Ureum	afbraak van pyrimidinebasen door ioniserende straling
3-(M)ethyladenine	reactie met (m)ethylerende agentia
7-(M)ethylguanine	reactie met (m)ethylerende agentia
7-Methylguanine met geopende imidazolring	spontane ringopening van 7-methylguanine

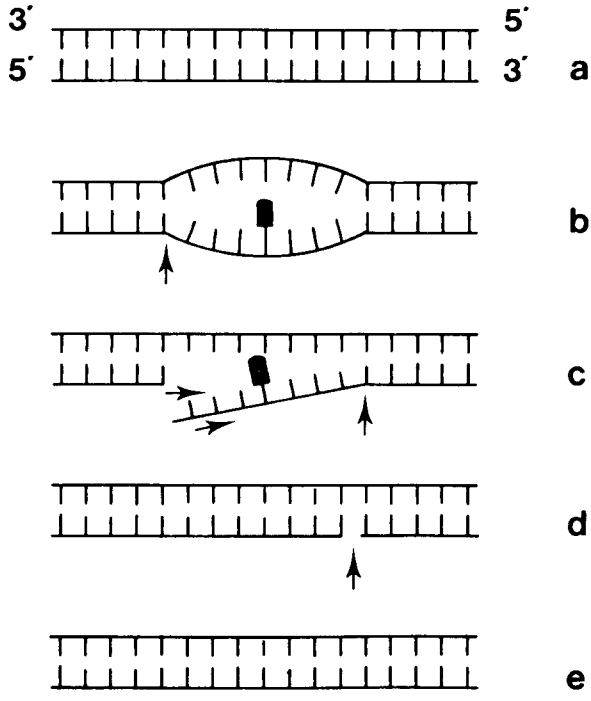


Fig. 17. Excisieherstel van DNA. Gemodificeerd DNA (b) wordt herkend; een incisie-activiteit knipt de beschadigde keten in. Door een exonuclease-activiteit wordt de gemodificeerde keten gedeeltelijk verwijderd, terwijl het ontstane gat door een polymerase-activiteit wordt ingevuld (c). De overblijvende ketenonderbreking wordt door een ligase-activiteit opgeheven (d), waarna weer de oude situatie (e) verkregen is.

de configuratie mogelijk, waarbij het aflatoxineresidu minder verstorend op de dubbelhelix-structuur werkt en het nucleotide-excisieherstel niet meer kan aangrijpen.

Na een herkenning van de gemodificeerde DNA-structuur (figuur 17) volgt een incisie door een endonucleaseactiviteit naast of in de buurt van het gemodificeerde nucleotide en het wegknippen van een tiental tot enkele honderden nucleotiden door een exonuclease-activiteit. De vrijkomende ruimte wordt zeer snel na haar ontstaan door een polymerase-activiteit opgevuld met nucleotiden en door een ligase-activiteit gesloten. Verschillende van bovengenoemde enzymactiviteiten, bij voorbeeld een nuclease- en een polymerase-activiteit, kunnen onderdeel zijn van het zelfde enzymcomplex. In sommige gevallen, onder andere ook bij mensen die aan de ziekte Xeroderma pigmentosum lijden, missen cellen het vermogen om gemodificeerde nucleotiden uit DNA te verwijderen. Dit brengt in het algemeen een sterk verhoogde gevoeligheid met zich mee voor de toxische, mutagene en tumorigene eigenschappen van UV-licht, ioniserende straling en genotoxische chemicaliën.

2.7.5 Enkele andere vormen van DNA-herstel

Twee vormen van DNA-herstel die veel met elkaar te maken hebben en die met name van bacteriën bekend zijn, zijn het induceerbare SOS-herstel en de zogenaamde 'proof reading'. Onder SOS-herstel, voor het eerst aangetoond in *E. coli*, verstaat men de door UV en andere DNA-modificerende agentia induceerbare verdedigingsreacties. Deze reacties omvatten een remming van de celdeling, het tegengaan van de afbraak van beschadigd DNA, profaaginductie en de Weigle-reactivering. Dit laatste houdt in dat een faag met gemodificeerd en daardoor deels geïnactiveerd DNA, die in een met UV-bestraling voorbehandelde colibacterie terecht komt, een grotere overleving vertoont dan in een niet-voorbehandelde colibacterie. Deze grotere overleving gaat echter wel gepaard met een gestegen mutatiefrequentie. Oorzaak hiervan bleek een door UV in de bacterie geïnduceerde DNA-herstelactiviteit (→ grotere overleving), die echter relatief veel fouten maakt (→ hogere mutatiefrequentie). Later bleek deze induceerbare 'error-prone repair' niet alleen op infecterende faagdeeltjes, maar ook op het genoom van de bacterie zelf te werken. Bij deze vorm van herstel krijgt overleven dus de voorrang boven het vermijden van mutaties. Signalen voor de inductie van SOS-functies zijn de beschadiging van DNA en de daarmee veelal gepaard gaande afbraak van het DNA en remming van de DNA-synthese. Verondersteld wordt dat een geïnduceerd eiwit de nauwkeurigheid van het bij het herstel betrokken DNA-polymerase drastisch verlaagt, waardoor dit in staat is om gebruik te maken van de beschadigde DNA-matrijs.

Onder gewone omstandigheden blijken sommige DNA-polymerases (die van de 5′-naar de 3′-uiteinden werken) te beschikken over een achterwaarts gerichte (3′ → 5′-) exonuclease-activiteit, die eventuele incorrect ingebouwde basen weer uitsnijdt: 'proof reading'. Dit is op zich reeds te beschouwen als een vorm van DNA-herstel. Als beide activiteiten een foutenkans van 1 op 10^4 bezitten, dan zal de combinatie tot een veel lagere foutenkans (tot 1 op 10^8) kunnen leiden. Onder omstandigheden van SOS-herstel zou deze 'proof reading'-activiteit wegvallen met de hierboven al beschreven gevolgen. Er zijn enige aanwijzingen dat ook in zoogdiercellen vergelijkbare, foutenrijk werkende 'error prone' herstelenzymen kunnen worden geïnduceerd. Dit kan van belang zijn voor het initiëren van kanker door op zich onschuldige modificaties, maar ook omdat de balans tussen correct en foutief DNA-herstel medebepalend zal zijn voor de uiteindelijke biologische effecten. Bij het verdwijnen van modificaties uit cellulair DNA dient men derhalve ook na te gaan of de oorpsronkelijke toestand daarmee hersteld wordt of niet. Het gebruik van het woord 'DNA-herstel' kan in sommige gevallen misleidend zijn. Naast 'proof reading'-activiteit kan ook de betrouwbaarheid van een DNA-polymerase zelf nadelig beïnvloed worden, bijvoorbeeld door zouten van bepaalde metalen zoals chroom, nikkel of beryllium. Hierop berusten waarschijnlijk de kankerverwekkende en mutagene eigenschappen van deze verbindingen (zie tabel 6).

2.8 Gevolgen van modificaties voor het functioneren van DNA

2.8.1 Effecten op de structuur

Röntgendiffractie-analyse van DNA door Watson en Crick in 1953 gaf aan dat de dubbelhelix voorkomt in de rechtsdraaiende B-vorm. In biologische systemen is dit ver-

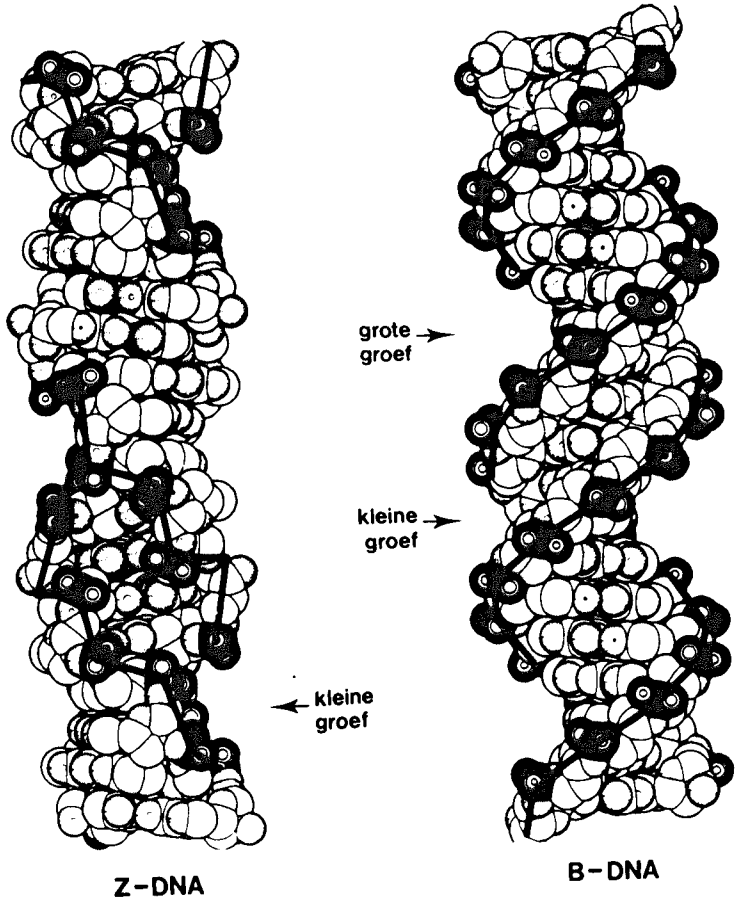


Fig. 18. Van der Waals-modellen van Z- en B-DNA. Door het verbinden van de fosfaatresten (de vette lijn) ontstaat in het B-DNA een regelmatige spiraal maar in het Z-DNA een zigzaglijn. B-DNA heeft een kleine en een grote groef, in het Z-DNA komt alleen de – diep ingesneden – kleine groef voor (naar Wang et al., 1979, Nature 282, p. 680).

moedelijk de meest voorkomende vorm. Recent onderzoek aan een kort dubbelhelix-fragment d(CpGpCpGpCpG), dat in gekristalliseerde vorm kon worden verkregen, toonde aan dat naast de B-vorm ook de linksdraaiende Z-vorm kan voorkomen (figuur 18). Deze structuren worden hier wat nader uitgewerkt vanwege de eraan toegekende moleculair-biologische betekenis. Opvallend is het verschil in de ligging van de fosfaatgroepen: in het B-DNA gelegen op een regelmatige spiraal, in het Z-DNA slechts te verbinden via een zigzaglijn. Verder blijken in het B-DNA de vier nucleosiden een ruimtelijk overeenkomende oriëntatie te bezitten, terwijl in de Z-structuur de oriëntatie van guanine duidelijk verschilt van die van cytosine. In het B-DNA nemen de suikerresiduen identieke posities in; hiermee hangt samen dat de conformatie van de basen ten opzichte van de suikers ook steeds dezelfde is (anti-conformatie). In het Z-DNA daarentegen is de positie van de suikerresiduen langs een keten steeds om en om verschillend, waardoor de cytidines in de anti-conformatie voorkomen maar de guanosines een

syn-conformatie hebben aangenomen (zie figuur 8 voor de begrippen syn en anti). Een gevolg hiervan is dat de *N*-7 en *C*-8 posities van guanine naar de buitenkant van de dubbelhelix wijzen (figuur 19) en hierdoor meer kans lopen op interactie met reactieve metabolieten van genotoxische stoffen. Een ander opvallend kenmerk van de Z-structuur is de diepte van de kleine groef; deze loopt zelfs door tot aan de as van de dubbelhelix. DNA-sequenties die beurtelings G- en C-residuen bevatten, kunnen in oplossing zowel in de B- als in de Z-vorm voorkomen. Door een verhoging van de zoutconcentratie wordt de Z-vorm meer gestabiliseerd, waarschijnlijk doordat de dichtbij elkaar liggende en elkaar afstotende negatieve fosfaatgroepen aan beide zijden van de smalle groef worden afgeschermd. Het is zeer wel voorstelbaar dat verestering van de fosfaatgroepen door een alkylerende verbinding of interactie met de positieve groepen van een basisch eiwit (een histon bijvoorbeeld) de overgang van de B- naar de Z-vorm bevordert.

Er zijn aanwijzingen dat de overgang van B naar Z ook kan optreden bij een korte alternerende G-C sequentie in een lang DNA-molecuul. De overgang kan dan tot stand komen doordat de basen over een hoek van 180 ° omklappen. Guanine draait daarbij om de *N*-glycosylische binding waardoor de anti-conformatie overgaat in syn. In het geval van cytosine draaien base en suiker tegelijk, zodat de anti-structuur behouden blijft. Gebleken is, dat substitutie van een AAF-groep op de *C*-8 van guanine in DNA ertoe leidt dat dit guanine een syn-positie gaat innemen. Hierdoor wordt in een sequentie met alternerend G en C een lokale overgang van B naar Z bevorderd. Is deze overgang niet mogelijk, dan blijft het bij een sterke lokale verstoring van de DNA-structuur, waardoor het betreffende segment gevoelig wordt voor DNAse S_1, een endonuclease dat specifiek kan inwerken op enkelstrengs DNA. Bij dezelfde AAF-modificatie op *C*-8 van guanine in de Z-structuur is die gevoeligheid voor DNAse S_1 niet aanwezig. Substitutie op de *C*-8 met een AF-residu heeft al veel minder gevolgen voor de DNA-structuur terwijl bij een AAF-substitutie van de N^2 van guanine in het geheel geen structurele wijziging meer blijkt op te treden. Opvallend is dat bovengenoemde (A)AF-substi-

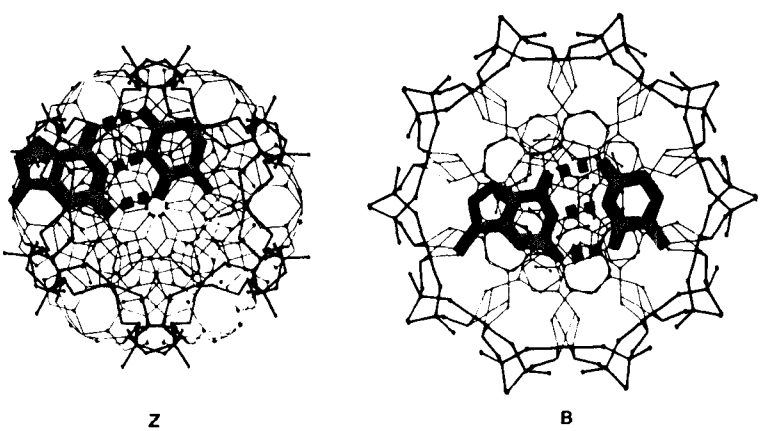


Fig. 19. Gezicht op Z- en B-DNA in de richting van de lengte-as der dubbelhelix. De lichtste lijnen geven de basen weer, de iets zwaardere de fosfaat-suikerketen. Vet aangeduid is een guanine-cytosine basepaar; het verschil in positie is opvallend: aan de periferie van het Z-DNA en midden in het B-DNA (naar Wang et al., 1981).

tuenten slechter door herstelenzymen uit DNA verwijderd kunnen worden naarmate hun verstoring van de DNA-structuur geringer is.

Reactie van grotere moleculen, zoals het diol-epoxyde van benz(*a*)pyreen (vgl. 2.5.3) en mitomycine-C, met DNA-basen blijkt ingrijpende gevolgen voor de DNA-structuur te hebben; in het laatste geval wordt de overgang van B naar Z bevorderd. Als het om kleine groepen gaat, bijvoorbeeld een methyl- of ethylgroep, dan worden in het algemeen slechts geringe verstoringen van de DNA-structuur waargenomen. Zowel een lokale denaturatie als een licht toegenomen gevoeligheid voor DNAse S_1 zijn gerapporteerd voor in vivo gealkyleerd DNA. Het gaat hierbij vermoedelijk om secundaire DNA-modificaties, die het gevolg zijn van het inwerken van cellulaire enzymen op het gealkyleerde DNA. Toch blijken ook kleine DNA-modificaties – zoals 7-methylguanine of 5-methylcytosine – de overgang van de B- naar de Z-structuur te kunnen bevorderen. Vooral dit laatste is interessant omdat de fysiologisch voorkomende, enzymatische methylering van cytosine op de *C*-5 een sleutelrol speelt bij de genregulatie. Hierbij draagt de vorming van 5-methylcytosine in belangrijke mate bij tot de inactivering van het betreffende gen.

Inmiddels is gevonden dat naast de B- en Z-vorm ook andere DNA-structuren aanwezig zijn, afhankelijk van de basenvolgorde, de aanwezigheid van substituenten, en het omringende milieu. Verdere structuuranalyses zullen meer gebruik maken van immunologische technieken, waarbij de expositie van basen en suikers ook onder meer natuurlijke omstandigheden kan worden vastgesteld. Op deze manier werd de aanwezigheid van de Z-conformatie aangetoond in biologisch materiaal: polyteen-chromosomen van *Drosophila melanogaster.*

2.8.2 Mutagene effecten

Bij het aflezen van een gemodificeerde DNA-matrijs tijdens de replicatieve DNA-synthese kunnen er twee dingen gebeuren. Allereerst kan de modificatie een onneembare hindernis vormen voor het aanhechten of de voortgang van het betreffende DNA-polymerase. In veel systemen wordt de remming van de voortgang waargenomen als een ophoping van kleine, nog niet aan elkaar gekoppelde fragmenten DNA. Op moleculair niveau spreken we in dit geval van een inactiverende modificatie; zijn er teveel dan is het gezamelijke effect voor de cel dodelijk.

Pas bij herstel van de blokkerende groep of het in werking treden van andere polymerisatiemechanismen ('by pass', recombinatieherstel, SOS-herstel) kan de DNA-synthese weer voortgang vinden.

Vindt er wel polymerisatie voorbij de modificatie plaats, dan zijn er drie mogelijkheden voor de nieuw gevormde polymeer:

a. er wordt in alle gevallen een correct nucleotide ingebouwd;
b. er is een kans dat een verkeerd nucleotide wordt ingebouwd;
c. bij de aflezing wordt de gemodificeerde base, eventueel met enkele aangrenzende nucleotiden, in de matrijs overgeslagen ('frame shift' mutatie).

In gevallen b en c krijgt de premutagene lesie tijdens de eerstvolgende DNA-synthese een definitief karakter: mutatiefixatie (figuur 20). Er ontstaat een puntmutatie in één van beide dochtercellen. Of deze genotypische mutatie ook tot expressie komt (fenotypische mutatie) hangt af van de aard der mutatie en de omstandigheden waarin de cel verkeert. In dit stadium helpt, althans voor die ene dochtercel, DNA-herstel niet meer.

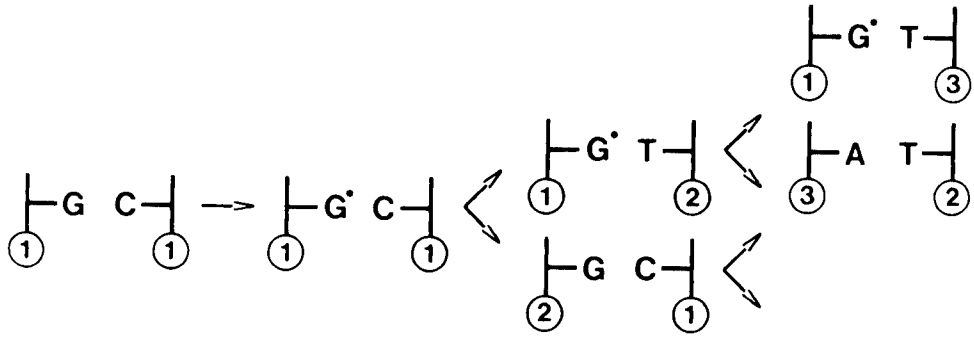


Fig. 20. Het vastleggen (fixatie) van een premutagene modificatie in DNA via twee opeenvolgende rondes van DNA-synthese. In dit voorbeeld treedt er transitie op van GC naar AT.

Hoe groter de DNA-herstelcapaciteit is en hoe meer tijd er beschikbaar is voor DNA-herstel, des te kleiner zal het aantal premutagene modificaties op het tijstip van de premitotische DNA-replicatie zijn. Bij lagere dosering van het mutagene agens zal het DNA-herstelmechanisme nog niet verzadigd zijn en dus in een bepaalde tijd een groter deel van de modificaties herstellen dan bij hoge, verzadigende doses. De dosis-effect relatie in zo'n experiment zal een langzamer oplopende voet vertonen. Cellen, waarin het betreffende DNA-herstelmechanisme grotendeels of geheel afwezig is, of waarin geen sprake is van een verzadigd herstelsysteem, vertonen zoals verwacht een vrijwel lineaire, door de oorsprong gaande dosis-effect relatie (figuur 21). Door mutagenen of carcinogenen beschadigde herstelproficiënte cellen die enige tijd na behandeling in een niet-delende toestand worden gehouden, blijken in veel gevallen minder biologische effecten, zoals mutatie, celtransformatie en celdood te vertonen naarmate deze rustperiode langer is. Later zal nog blijken dat een verhoogde cellulaire proliferatie niet alleen tot een grotere kans op mutaties, maar veelal ook tot een hoger risico voor tumorvorming kan leiden.

In geval b kan (na twee DNA-syntheseronden) een basepaar-substitutie zijn opgetreden. Men spreekt van transitie als de gemodificeerde base wel voor een purine (of een pyrimidine) blijft coderen (AT ↔ GC), van een transversie als ook dit verandert (AT ↔ TA, TA ↔ GC, GC ↔ CG, CG ↔ AT). Basepaar-substitutie komt onder meer voor bij methylering of ethylering van basen op posities die bij de baseparing betrokken zijn: de *N*-1 van purines, de *N*-3 van pyrimidines en alle zuurstofposities (zie figuur 13). Monofunctionele substitutie van de aminogroepen (althans in ribopolynucleotiden) blijkt ook een miscoderend effect te hebben, iets wat men gezien hun vrije rotatie om de N-C-as eigenlijk niet zou verwachten. Apurineplaatsen blijken in celvrije systemen tot een willekeurige incorporatie van een der vier nucleotiden te leiden. In bacteriën ligt dit ingewikkelder: onder normale omstandigheden zijn apurineplaatsen letaal. Als er SOS-functies zijn geïnduceerd dan vindt gedeeltelijk foutieve incorporatie plaats en worden er meer mutanten gevonden. De reactie van zoogdiercellen op apurineplaatsen is niet bekend.

De onder c genoemde mogelijkheid treedt met name op als het DNA gemodificeerd is met grote moleculen (aromatische amines, polycyclische koolwaterstoffen en derge-

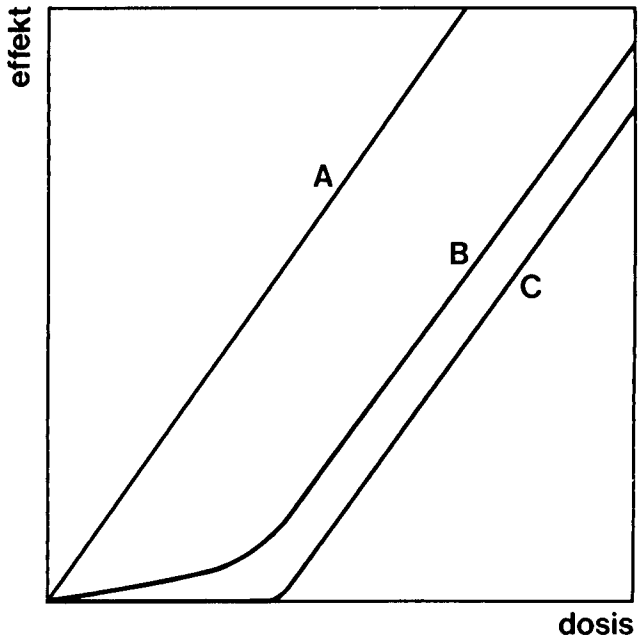


Fig. 21. Verschillende vormen van dosis-effect relaties. A: géén herstelmechanisme aanwezig; B: wel herstelmechanisme aanwezig, boven het verzadigingspunt wordt de helling steiler; C: een drempelwaarde is aanwezig.

lijke). Een 'frame shift' mutatie leidt in veel gevallen tot een sterk gewijzigd en daardoor onwerkzaam genprodukt.

Behalve voor beperkte reeksen structureel sterk verwante stoffen, is er geen algemeen kwantitatief verband tussen mutagene en carcinogene eigenschappen. Een kwalitatief verband is echter duidelijk aanwezig: het merendeel der (initiërende en volledige) carcinogenen is mutageen en omgekeerd. Op dit verband is het gebruik van mutatietesten om carcinogene verbindingen op te sporen gebaseerd (zie 3.4.3).

2.8.3 Beïnvloeding van genregulatie

In de meeste tumoren worden, onafhankelijk van hun wijze van ontstaan, hoeveelheden genprodukten gevonden die veelal sterk afwijken van de niveaus in het uitgangsweefsel. Bepaalde enzymniveaus zijn lager dan normaal, maar ook kan derepressie van genen optreden. Een voorbeeld van dat laatste is het onder andere door darmtumoren geproduceerde carcino-embryonaal antigeen, dat gewoonlijk in volwassen dieren niet meer tot expressie komt. Ook is gevonden dat veel tumoren, ondanks het feit dat ze uit niet-endocrien weefsel ontstaan zijn, toch allerlei peptidehormonen aanmaken. Aangenomen wordt dat het in al deze gevallen om begeleidende verschijnselen gaat, die niet oorzakelijk met de vorming van de tumor verbonden zijn, maar een secundair gevolg zijn van een door het carcinogeen ingebrachte genetische instabiliteit. De eiwitten die het produkt van een geactiveerd oncogen zijn, lijken daarentegen voor de vorming van tumoren van essentieel belang (zie 2.9).

Chemische carcinogenen blijken ook op korte termijn tot opvallende veranderingen in de genexpressie te leiden. In theorie kan de expressie van genen beïnvloed worden door verlies, vermenigvuldiging of herrangschikking van genen, maar ook op het niveau van aflezing (transcriptie) en vertaling (translatie van RNA naar eiwit). Genexpressie in eukaryoten wordt voornamelijk gereguleerd op het niveau van transcriptie. In het geval van chemische carcinogenen gaat het tot op heden om allerlei verspreide voorbeelden, waarbij het mechanisme nog maar sporadisch is onderzocht. Bekend zijn onder andere de inductie van enzymen die geneesmiddelen metaboliseren, inductie van DNA-herstelenzymen, inductie van in het genoom ingebouwde virussen, effecten op de verplaatsing van DNA-fragmenten binnen het genoom en de amplificatie van specifieke genoomfragmenten.

Voorzover bekend zijn de mechanismen zeer verschillend. Bij tumorvorming zijn natuurlijk die mechanismen het meest interessant die tot irreversibele veranderingen kunnen leiden. Hierbij kan men denken aan puntmutaties en kleine deleties in een stuk DNA met een regulerende functie. Toch moeten ook andere mechanismen bij de effecten van carcinogenen op de genexpressie een rol spelen. Een van de mogelijkheden is de verstoring van het normale enzymatische methyleringsproces van DNA (vorming van 5-methylcytosine) door carcinogenen. Uiteenlopende carcinogenen als ENU, EMS, ethionine, *N*-acetoxy-AAF en benzpyreendiolepoxyde bleken sterke remmers van de enzymatische methylering van DNA-cytosine te zijn. Het mechanisme is vermoedelijk meerledig: niet alleen is met carcinogeen gesubstitueerd DNA een slecht methylasesubstraat, maar ook het DNA-methylase zelf blijkt sterk in activiteit achteruit te gaan bij reactie met enkele direct alkylerende carcinogenen. Verder zijn er aanwijzingen dat carcinogenen tot een verlaagd niveau van methionine en S-adenosylmethionine kunnen leiden. Deze laatste stoffen zijn de methyldonoren, die nodig zijn voor de vorming van S-methylcytosine in DNA. Interessant is dat deze verlaging ook op kan treden in de rattelever onder invloed van een aantal tumorpromotoren. De aanwezigheid van 5-methylcytosine op bepaalde plaatsen in een gen kan tot inactivering leiden, terwijl afwezigheid mede bepalend is voor genactiviteit. Bij normale DNA-replicatie wordt de nieuwe dochterstreng spoedig na synthese gemethyleerd. Het DNA-methylase herkent daarbij de volgende sequentie:

-C-G-	dochterstreng
-G-5MeC-	ouderstreng

en methyleert vervolgens het cytosineresidu in de dochterstreng. Op deze manier kan een eenmaal vastgelegd patroon van genexpressie aan de dochtercellen worden overgedragen. Verstoring van deze enzymatische DNA-methylering gedurende twee opeenvolgende S-fases levert een generatie cellen op, waarvan in principe de helft een ander en niet meer te corrigeren methyleringspatroon vertoont. Op deze wijze kan aan een belangrijke voorwaarde voor de expressie van uiteenlopende genen, wellicht ook van een oncogen, blijvend worden voldaan.

2.8.4 Chromosoombeschadigingen

Deze beschadigingen, die ook wel worden omschreven als morfologisch, op chromosoomniveau waarneembare mutaties, treden op in de vorm van breuken, uitwisselingen en andere herrangschikkingen. In de meeste gevallen is interactie met DNA nodig voor

een clastogeen (dit is: chromosoombeschadigend) effect. Dit geldt ook voor de onderlinge uitwisseling van fragmenten tussen beide armen van één chromosoom ('sister chromatid exchange'-SCE), waarbij de correlatie met modificatie van het DNA zelfs zo sterk is, dat hierop een test voor interactie met DNA gebaseerd is. Deze test wordt later (3.4.4; 3.4.9) uitvoeriger beschreven. Een uitzondering vormen clastogene stoffen zoals colchicine die geen interactie aangaan met DNA, maar met de kernspoeleiwitten. Dit leidt vaak tot een ongelijke verdeling van chromosomen over de beide dochtercellen, die daarmee sterk afgenomen overlevingskansen hebben.

Plaatsen waar breuk of uitwisseling optreedt, zijn veelal niet willekeurig over het chromosoom verdeeld. Een chromosoomafwijking houdt in dat een stuk genetische informatie op een andere plaats in een (ander) chromosoom is terecht gekomen (translocatie), verloren is gegaan (deletie) of – omgekeerd – juist in overdosis beschikbaar is. In veel gevallen zal dit dodelijk zijn voor de cel. Verondersteld wordt dat sommige chromosoombeschadigingen een cel juist minder afhankelijk van zijn omgeving maken, bijvoorbeeld voor z'n groei. De waarnemingen dat bepaalde typen tumoren vaak chromosoomafwijkingen op heel specifieke plaatsen bezitten zijn hiermee in overeenstemming. Voorbeelden zijn het optreden van trisomie 15 (chromosoom 15 komt in drievoud voor) bij knaagdierleukemie, het optreden van het Philadelphia-(Ph_1-)chromosoom (ontstaan uit chromosoom 22 door een translocatie naar chromosoom 9) bij humane chronische myeloïde leukemie, en een translocatie van 15 naar 12 bij plasmacytomen in knaagdieren.

Ook bij chemisch geïnduceerde tumoren in de rat zijn karakteristieke chromosoomafwijkingen geconstateerd. Toch zijn er veel tumoren, zowel bij de mens als bij proefdieren, waarin geen specifieke chromosoomveranderingen waargenomen konden worden. Dit aantal is in de laatste paar jaar afgenomen, doordat de technieken om chromosomen te kleuren verfijnd worden: met de invoering van kleuringsmethoden voor profase-chromosomen kan men maar liefst duizend verschillende bandjes in de chromosomen van een cel onderscheiden. Vermoed wordt (zie 2.9), dat ook de verplaatsing van zeer kleine, morfologisch niet waarneembare chromosoomfragmenten tot de voor tumorgroei wezenlijke veranderingen kan leiden. De gedachte dat chromosomale afwijkingen primaire oorzaken van maligne veranderingen zijn, is reeds in 1914 voor het eerst geformuleerd door Boveri.

Een eigenschap van zeer veel tumoren is het grote aantal aspecifieke chromosomale afwijkingen, waarbij met name aneuploïdie opvalt: door ongelijke chromosoomverdelingen en deleties ligt het chromosomenaantal vaak tussen het diploïde en tetraploïde aantal in. De ontwikkeling van tumoren tot een steeds kwaadaardiger karakter (progressie) houdt ook vaak in dat het karyotype steeds meer van het normale patroon gaat afwijken. Het karyotype heeft in sommige gevallen dan ook een diagnostische (herkenning) en prognostische (het gedrag voorspellende) waarde.

De essentiële vraag blijft of de waargenomen specifieke chromosomale veranderingen de oorzaak van het ontstaan van de tumor zijn of alleen maar een gevolg. De waarneming dat de voor een bepaalde tumor karakteristieke translocatie van chromosoomfragmenten samengaat met de translocatie van een oncogen (zie 2.9) of dat oncogenen liggen naast de plaats waar getransloceerde chromosoomfragmenten afbreken, is een sterke aanwijzing voor een oorzakelijke rol van althans sommige translocaties in het proces van tumorvorming. Een niet actief oncogen kan door translocatie naar een ander chromosoom terecht komen in een gebied dat actief wordt afgelezen. In dat geval hoeft

van een specifieke puntmutatie in het oncogen of een daarop werkzaam regulatorgen geen sprake te zijn, hoewel er voor deze beide mechanismen aanwijzingen zijn.

2.8.5 In vitro transformatie

Gekweekte zoogdiercellen kunnen na behandeling met diverse carcinogene chemicaliën, straling of virussen, een aantal overerfbare fenotypische veranderingen ondergaan. Deze duidt men collectief aan met de term transformatie. De fenotypische verandering die het meest wordt gebruikt voor detectiedoeleinden is de zogenaamde morfologische transformatie, waarbij de cellen kris-kras over elkaar heengroeien als gevolg van verlies van contactinhibitie (zie figuur 37 en 38). Normale cellen daarentegen groeien vlák op het substraat en stoppen met groeien bij het bereiken van een bepaalde dichtheid. Een ander belangrijk fenotype uit zich in het vermogen van de cellen om in een suspensie van zachte agar te groeien. Het uiteindelijke criterium voor tumorigene of maligne transformatie is of de cellen na injectie in een geschikte gastheer kunnen uitgroeien tot (kwaadaardige) tumoren. Meestal, maar niet altijd (dit is afhankelijk van het gebruikte celtype), is er sprake van een correlatie tussen tumorigeniteit en groei in zachte agar. De correlatie tussen morfologische transformatie en tumorigeniteit is minder goed. Gebruikelijke systemen zijn cellijnen, ontwikkeld uit hamster-, ratte- en muizecellen, terwijl ook wel primaire celkweken van embryocellen van de hamster worden benut. De eerste succesvolle transformatie werd door Berwald en Sachs in 1963 gerapporteerd voor laatstgenoemde cellen. Het duurde tot 1978 voor men erin slaagde menselijke cellen in vitro te transformeren. Ook met de thans ter beschikking staande methoden is het in vitro transformeren van humane cellen nog steeds moeilijker dan van knaagdiercellen.

Alle hierboven genoemde transformatiesystemen gebruiken fibroblastcellen of -cellijnen. De meeste humane tumoren zijn echter van epitheliale oorsprong. In vitro transformatie van epitheliale cellen is wel beschreven maar deze systemen moeten nog verder worden ontwikkeld.

Het gebruik van in vitro transformatiesystemen voor het opsporen van kankerverwekkende stoffen is in de afgelopen jaren afgenomen, toen bleek dat de reproduceerbaarheid van deze systemen slecht was. Het accent kwam daarmee te liggen op het onderzoek naar mechanismen van de transformatie. Een voorbeeld van dit laatste is de ontdekking van virale en cellulaire oncogene DNA-fragmenten, waarbij een in vitro transformatiesysteem gebruikt wordt als detectiesysteem. Hoewel er voor enkele systemen (b.v. niercellen van jonge hamsters) aanwijzingen zijn dat een mutatie verantwoordelijk is voor de transformatie, ligt in de meeste systemen de transformatiefrequentie zeer veel hoger dan voor structurele (punt)mutaties gebruikelijk is. Transformatiefrequenties kunnen in de orde van procenten, soms zelfs tientallen procenten liggen. Gepostuleerd is daarom dat er meer complexe mechanismen bij betrokken zijn, zoals herrangschikking van DNA (translocaties) of stabiele veranderingen in de expressie van bepaalde genen. In een aantal transformatiesystemen is nabootsing van een initiatie-promotie model mogelijk. Gebruik van dit modelsysteem kan inzicht geven in het mechanisme van tumorpromotie (zie 2.10).

2.9 Oncogenen

Het is duidelijk dat interactie van chemische carcinogenen met DNA een essentiële stap is voor tumorinitiatie. Nu rijst niet alleen de vraag welke interactieprodukten daarbij belangrijk zijn, maar ook of binnen het genoom van tumorcellen bepaalde stukken DNA zijn aan te wijzen die verantwoordelijk zijn voor het tumorkarakter.

Een antwoord op die laatste vraag wordt gegeven door het oncogenenonderzoek. In de oorspronkelijke oncogenentheorie van Todaro en Huebner uit 1972 wordt gesteld dat ontregeling van een cellulair gen dat voor de groeicontrole verantwoordelijk is, tot tumorvorming kan leiden. Dit gen werd door hen oncogen genoemd. Het begrip oncogen kreeg daarna een meer concrete inhoud, toen bleek dat het kankerverwekkende vermogen van sommige in het laboratorium gekweekte virussen gelegen was in een klein gedeelte van het virusgenoom. Dit stukje viraal genoom noemt men het viraal oncogen. Verschillende kankerverwekkende virussen, waaronder DNA- en RNA-virussen, bleken elk een eigen oncogen te bezitten. Na infectie met een oncogeen DNA-virus wordt het virusgenoom ingebouwd in het DNA van de gastheercel en daarin actief afgelezen. Bij de kankerverwekkende RNA-virussen wordt na infectie eerst een DNA-kopie gemaakt, die vervolgens ook integreert in het gastheergenoom. Niet alleen het aantal geïntegreerde kopieën van het virus-DNA, maar ook de plaats van integratie kan sterk variëren.

Een probleem was dat een aantal traagwerkende kankerverwekkende virussen in hun genoom geen oncogen bleek te bezitten. Deze virussen blijken echter gebruik te maken van onderdelen van het normale cellulaire genoom, die verwantschap (homologie) vertonen met de al eerder genoemde virale oncogenen. Bij een tot tumorvorming leidende infectie worden deze cellulaire 'proto-oncogenen' geactiveerd; vermoedelijk doordat het virus vlakbij dit proto-oncogen in het cellulaire genoom geïntegreerd wordt. Aangenomen wordt dat kankerverwekkende virussen met een 'eigen' oncogen dit laatste in de loop van hun evolutie ontleend hebben aan de door hen geïnfecteerde cellen. Belangrijk is nu dat in het DNA van een aantal spontane tumoren in de mens, die vermoedelijk niet door een virus worden veroorzaakt, en ook in het DNA van enkele chemisch geïnduceerde rattetumoren, vergelijkbare transformerende genen konden worden aangetoond. Bij nader onderzoek bleek dat deze transformerende genen identiek zijn met een cellulair proto-oncogen. Dat het bij een transformerend gen echt gaat om geactiveerde DNA-fragmenten kon worden aangetoond met transfectie-experimenten. Hierbij wordt geïsoleerd tumor-cel DNA van hoog moleculair gewicht aangeboden aan en deels opgenomen door 3T3-muizefibroblasten met een 'normaal' (althans niet tumorigeen) groeigedrag. DNA van door 3-methylcholanthreen getransformeerde cellen bleek 3T3-fibroblasten te kunnen transformeren tot cellen, die bij injectie in een proefdier tot een tumor uitgroeiden. Met DNA van hoog moleculair gewicht afkomstig van normale cellen was deze transformatie niet te bewerkstelligen. Dit wijst erop dat structurele veranderingen in het DNA zelf nodig zijn voor het tumorigene effect. Ook DNA van een aantal andere tumorcellijnen, afkomstig van zeer uiteenlopende typen tumoren van knaagdieren en de mens, bleek tot tumorigene transformatie van 3T3-cellen in staat. Analyse met behulp van restrictie-enzymen liet zien dat er een opvallende, wellicht zelfs een totale, overeenkomst bestaat tussen geactiveerde transformerende genen uit onafhankelijk van elkaar chemisch getransformeerde muizefibroblasten. Eenzelfde overeenkomst werd gevonden bij onderlinge vergelijking van

transformerend DNA uit humane colontumoren (etiologie onbekend), terwijl ook onderling identieke transformerende sequenties bleken voor te komen in muizemammatumoren, ongeacht hun wijze van ontstaan. Aangezien verschillende cellen uit één diersoort in principe over dezelfde DNA-informatie beschikken, betekent deze orgaangebondenheid dat de keuze welk transformerend gen in een celtype geactiveerd wordt of met succes tot transformatie leidt, bepaald wordt door de differentiatietoestand van dat betreffende celtype. De invloed van de differentiatietoestand bleek nog directer toen men een serie verschillende lymfomen onderzocht, die weliswaar uit één celtype, maar in verschillende differentiatiestadia ontstaan waren. Afhankelijk van het stadium bleken verschillende oncogenen actief te zijn. In moleculaire termen kan men zich hierbij voorstellen dat de keuze, welk transformerend gen of proto-oncogen geactiveerd wordt, mede af kan hangen van de plaatselijke chromatinestructuur en/of methyleringstoestand van het gen.

Indien blijkt dat de aanwezigheid van verschillende potentieel transformerende genen of proto-oncogenen een algemene eigenschap van eukaryotische cellen is, kan één van de beslissende stappen in het proces van tumorvorming onder invloed van chemische carcinogenen of straling worden opgevat als het activeren van zo'n proto-oncogen.

Hoe belangrijk de functie van het oncogen ook blijkt te zijn, het is onwaarschijnlijk dat de activering van een oncogen op zich voldoende is om alle veranderingen te verklaren die optreden als een normale cel tot tumorcel getransformeerd wordt. Bij de transfectie van 3T3-cellen wordt weliswaar die indruk gewekt, maar daarbij moet worden bedacht dat deze zogenaamd normale cellen essentieel verschillen van cellen die direct uit een intact dier komen. De 3T3-cellen vormen immers reeds een permanente cellijn (zijn 'geïmmortaliseerd') en hebben de eerste stap op weg naar onafhankelijke groei, zoals die in tumoren optreedt, reeds achter de rug.

Recent bleek men ook niet-geïmmortaliseerde cellen door transfectie met DNA tumorigeen te kunnen transformeren. Dit lukte door fibroblasten uit een ratte-embryo te isoleren en deze niet alleen met het humane *ras*-oncogen, maar tegelijk ook met het *myc*-oncogen of een immortaliteitsgen van polyoma- of adenovirus te behandelen. Het verwerven van een actief immortaliteitsgen en een actief gen voor tumorigene transformatie zijn dus noodzakelijke voorwaarden voor een succesvolle in vitro transformatie van vers in de kweek gebrachte (primaire) knaagdiercellen. Belangrijk is daarom om na te gaan hoe de expressie van de betrokken oncogenen tijdens de verschillende fasen van (chemische geïnduceerde) tumorontwikkeling verloopt. De resultaten van transfectie-experimenten suggereren dat activering van oncogenen plaats kan vinden in opeenvolgende stadia van het proces van tumorvorming. Om hierover meer duidelijkheid te krijgen, is het zinvol om naar de mogelijke mechanismen van oncogen-activering te kijken.

In principe bestaan hiervoor de volgende mogelijkheden:

1. Een mutatie in het oncogen zelf: proto-oncogen en oncogen verschillen dan maar in 1 of in een klein aantal nucleotiden. Onderzoek met DNA-fragmenten uit menselijke blaastumoren liet zien dat een verschil in één nucleotide doorslaggevend kan zijn voor het vermogen tot transformatie van 3T3-cellen. Nog uitgezocht wordt of zo'n mutatie van een in het genoom van een (menselijke) lichaamscel aanwezig oncogen een veel voorkomende gebeurtenis is en of deze ook dan tot een verhoogde kans op tumorvorming leidt.
2. Een niet-mutagene verandering van het oncogen zelf, zoals amplificatie (= genver-

sterking). Een voorbeeld hiervan is het c-Ki-*ras* oncogen, dat in tumorcellen in 30- tot 60-voud kan voorkomen. Dit gaat gepaard met een verhoogde genactiviteit.
3. Een verandering in een regulerend gen dat betrokken is bij de expressie van het oncogen. Deze verandering kan men zich onder andere voorstellen via een (punt)mutatie in het regulerend gen. Ook kan men denken aan een verandering in de methyleringstoestand (5-methylcytosine) van het oncogen zelf of van het regulerend gen. Het feit dat men een biologisch inactief cellulair oncogen kon activeren door het in vitro te koppelen aan een tweede gen dat de DNA-transcriptie stimuleert, wijst op de mogelijkheid van zo'n regulerend gen. Er is een aanwijzing dat hypomethylering van *ras*-oncogenen in humane tumoren gepaard kan gaan met de activering van deze oncogenen. Onbekend is echter nog of deze hypomethylering oorzaak kan zijn van activering.
4. De verplaatsing van het proto-oncogen van het ene chromosoom naar het andere (translocatie) met de kans dat het dan terecht komt in een actief afgelezen gebied. Voor deze mogelijkheid is direct experimenteel bewijsmateriaal aanwezig.

In geval 2-4 wordt het oncogen zelf niet gemuteerd, maar alleen actiever afgelezen. In geval 1 ontstaat er dus een ander genprodukt dan normaal, in de andere gevallen ontstaat er meer van hetzelfde produkt. Ook combinaties van bovengenoemde mogelijkheden, bijvoorbeeld een met een translocatie gepaard gaande amplificatie of deletie, lijken op te kunnen treden.

Soms is er iets over de functie van het oncogenprodukt bekend. Het gaat dan om eiwitten met een proteïnekinase-activiteit, dat wil zeggen met het vermogen om een aantal andere eiwitten te activeren door er op een uitzonderlijke plaats (het aminozuur tyrosine) een fosfaatgroep aan te hechten. Deze fosfaatoverdracht is waarschijnlijk een sleutelproces bij het op gang brengen van celgroei; de groei zal dan doorgaan zolang het actieve oncogen zorgt voor een continue stroom van proteïnekinasemoleculen.

In één concreet geval is aangetoond dat het oncogenprodukt een zeer grote structurele verwantschap vertoont met een groeifactor. Het gaat hierbij om het p^{28}*sis*, het voor transformatie verantwoordelijke eiwit van het apesarcoomvirus, dat een aaneensluitend gebied van 90 aminozuren gemeenschappelijk heeft met een in serum voorkomende, door bloedplaatjes geproduceerde groeifactor (PDGF, 'platelet-derived growth factor').

Uit de schaarse gegevens over andere oncogenen kan men opmaken dat ook andere werkingsmechanismen mogelijk zijn. Het is te verwachten dat op dit opwindende gebied in de komende jaren een vloedgolf van nieuwe resultaten gepresenteerd zal worden.

2.10 Promotie: van geïnitieerde cel tot tumor

In 2.3 en 2.4 is het verschijnsel van tumorpromotie kort beschreven. Wat het moleculaire mechanisme van tumorpromotoren is, kan thans nog niet met zekerheid worden gezegd. Dit komt omdat de meeste promotoren een heel scala van op biologisch en moleculair niveau beschreven effecten veroorzaken.
Veel voorkomende eigenschappen van promotoren zijn:
– promotoren geven (gekweekte) cellen het uiterlijk en een aantal andere eigenschappen van tumorcellen;
– zij beïnvloeden de differentiatietoestand van een cel;
– stimuleren de celproliferatie;

– induceren groepen enzymactiviteiten;
– leiden tot allerlei veranderingen in de membraan van (gekweekte) cellen.

Tenslotte blijken sommige promotoren een toename van het aantal chromosoombeschadigingen en SCE's te kunnen veroorzaken. Dit zijn verhoudingsgewijs zwakke effecten, waarvan de betekenis voor het promotieproces nog niet vastgesteld is. Het is op dit moment nog niet duidelijk welke van deze functies essentieel voor tumorpromotie zijn. Een principiële moeilijkheid daarbij is dat de opgesomde effecten het best bestudeerd zijn in systemen waarin geen sprake was of kon zijn van tumorpromotie, bijvoorbeeld in vitro in celkweken.

2.10.1 Getransformeerd fenotype

Als normale gekweekte cellen met TPA of andere forbolesters met promotoreigenschappen worden behandeld, gaan ze zich in veel opzichten gedragen als getransformeerde cellen. Dit getransformeerde fenotype verdwijnt echter weer als men de cellen zonder promotor verder kweekt. Dit betekent dat het fenotype van deze 'getransformeerde' cellen op zich reversibel is. De promotorverbinding fungeert hierbij als schakelaar. Doet men eenzelfde experiment met chemisch geïnitieerde cellen, dan ontstaat onder invloed van TPA hetzelfde getransformeerde fenotype. Alleen blijkt deze verandering irreversibel te zijn geworden: zij blijft bestaan, ook als het TPA uit het medium wordt verwijderd. In een intact dier kan de situatie iets ingewikkelder zijn. Een voorbeeld hiervan is de geïnitieerde muizehuid, waarbij het halverwege afbreken van een promotorbehandeling als resultaat heeft dat de meerderheid van de op dat moment aanwezige papillomen weer verdwijnt, terwijl slechts een klein aantal tot tumoren uitgroeit.

2.10.2 Effecten op de differentiatietoestand

In een zich ontwikkelend organisme vinden veel celdelingen plaats. Een deel van de dochtercellen differentieert uit, zich daarbij op bepaalde punten specialiserend. Denk hierbij bijvoorbeeld aan cellen die grote hoeveelheden van een bepaalde stof produceren (steroïdhormonen, eiwitten zoals albumine, diverse enzymen, keratine) of zich tot een bepaalde functie (transport van zenuwprikkels, spiercellen) zijn gaan beperken. Regel is dat de uitgedifferentieerde cel zich onder normale omstandigheden niet meer deelt. Figuur 22 geeft een schematisch beeld van de opperhuid met verhoornende, dat wil zeggen zich uitdifferentiërende, keratinevormende cellen. Bij elke deling van een stamcel onder in de epidermis blijft één van de beide dochtercellen tot verdere deling in staat, de andere verhoornt. Het gevolg is dat het aantal delende cellen constant blijft. Behandelen we nu met TPA, dan loopt het differentiatieproces sterk terug. Beide dochtercellen houden het vermogen tot delen, met als gevolg een exponentiële toename van het aantal levende en tot verdere deling in staat zijnde cellen. Is de stamcel met een tumorinitiator behandeld, dan zet dit proces zich ook voort als de behandeling met TPA wordt beëindigd. Dit verschijnsel past goed in het algemene beeld van de tumorcel, zeker de kwaadaardige, die veelal weinig gedifferentieerd is.

Interessant is dat retinoïden (vitamine A en verwante verbindingen) in staat zijn om dit proces van dedifferentiatie af te remmen. In enkele gevallen bleek de door retinoïden uitgeoefende differentiatieprikkel zo sterk dat maligne knaagdiercarcinomen om-

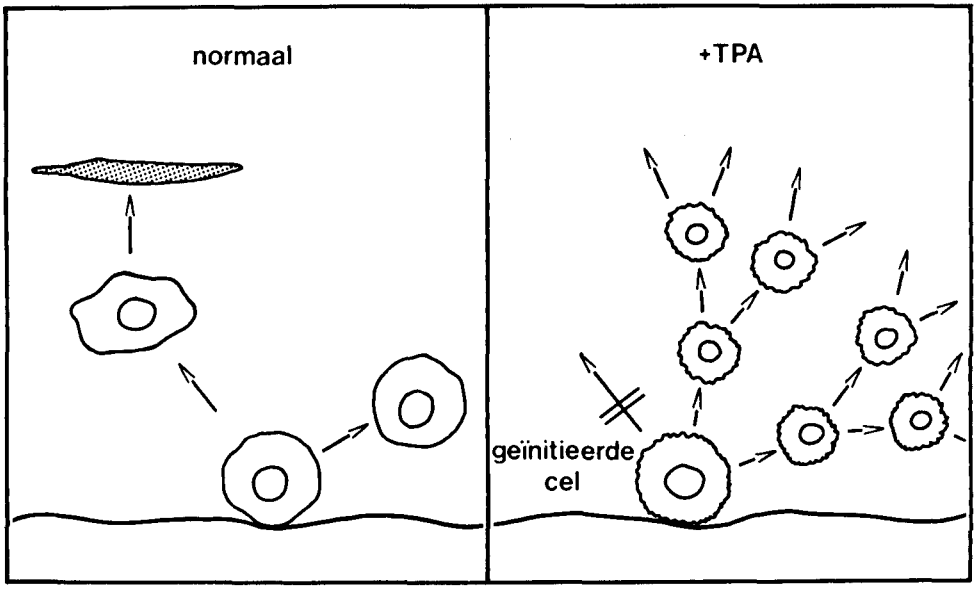


Fig. 22. Effect van tumorpromotoren op het verloop van de celdifferentiatie. Links de normale situatie. Rechts de invloed van een tumorpromotor (naar Weinstein, 1981).

gezet konden worden tot een groeiwijze die veel lijkt op goedaardige teratomen. Dit ging gepaard met een vermindering van de groei en met een verhoogde overleving van de gastheren. Retinoïden kunnen dus een werking hebben, die tegengesteld is aan die van een promotor.

2.10.3 Gestimuleerde celproliferatie

Daar de tot nu toe bekende promotoren tot een verhoogde celproliferatie in het betrokken weefsel of celtype leiden, ligt de conclusie voor de hand dat verhoogde celdeling voor promotie noodzakelijk is. Een verhoogde proliferatie op zich blijkt niet altijd voldoende te zijn om geïnitieerde cellen tot tumoren te doen uitgroeien: stoffen als de forbolester PRA stimuleren de celgroei, maar functioneren niet of nauwelijks als tumorpromotor. Dit kan geïllustreerd worden aan de hand van experimenten met promotie van geïnitieerde cellen in de muizehuid waaruit blijkt dat TPA naast stimulering van de celproliferatie nog een andere essentiële werking vertoont (tabel 5). De forbolester PRA leidt op molaire basis even efficiënt als TPA tot ontstekingsreacties, proliferatie van cellen en aanhoudende hyperplasie in de muizehuid. Toch is het – in tegenstelling tot TPA – geen tumorpromotor in dit systeem. Een enkele TPA-behandeling van de geïnitieerde huid blijkt echter al voldoende te zijn om – samen met een daaropvolgende langdurige PRA-behandeling – tot een vrij hoge tumorincidentie te leiden.

Tumorpromotie blijkt dus uit minstens twee componenten of fasen te bestaan, waarbij in de tweede fase alleen celdeling nodig lijkt. Het is duidelijk dat het bij deze TPA-voorbehandeling niet gaat om het huidirriterend, mitogeen effect dat PRA immers met TPA gemeen heeft. Vermoed wordt dat in de eerste promotiefase activering van een

Tabel 5. Effect van enkele forbolesters op de met een enkele dosis DMBA geïnitieerde muizehuid (naar Fürstenberger et al., 1981).

DMBA	TPA (nmol)	PRA (nmol)	Tumor-incidentie[1] (%)	Aantal tumoren/dier
1 ×	–	–	0	0
1 ×	4 × 20	–	0	0
1 ×	–	32 × 10	0	0
1 ×	4 × 5	32 × 10	54	2,4
1 ×	4 × 10	32 × 10	80	5,2
1 ×	4 × 20	32 × 10	94	10,8

1. Percentage dieren met één of meer tumoren van het totaal aantal in leven zijnde dieren.
DMBA: 7,12-dimethylbenz(*a*)anthraceen.
TPA: tetradecanoylforbolacetaat (forbol-12-myristaat-13-acetaat).
PRA: forbol-12-retionaat-13-acetaat.

bepaald type keratinocyten (primitieve stamcellen) noodzakelijk is. Het anti-promotor effect van retineenzuur blijkt met name op de tweede promotiefase te werken. Ook steroïden die in staat zijn om de bij promotie (in de huid) optredende ontstekingsreacties te onderdrukken (cortisol, dexamethason) zijn effectieve remmers van de promotiefase.

2.10.4 Enzyminductie

Tumorpromotoren stimuleren ieder een breed scala van enzymen. Dit kunnen enzymen zijn die betrokken zijn bij de omzetting van chemische carcinogenen, mutagenen, medicijnen en allerlei andere verbindingen. Een voorbeeld vormen de polychloorbifenylen (PCB's). Deze induceren of stimuleren zoveel van deze enzymactiviteiten in de rattelever, dat in de Ames-test op mutagene verbindingen gebruik wordt gemaakt van levermicrosomen uit ratten of muizen die met PCB's zijn voorbehandeld. De levertumorpromotor dioxine (2,3,7,8-tetrachloordibenzodioxine) heeft een soortgelijk effect en leidt evenals PCB's tot een toename van het endoplasmatisch reticulum: een weerspiegeling van de toegenomen enzymsyntheses.

De meeste promotoren induceren enzymen – zoals ornithinedecarboxylase – die bij de DNA-synthese en celproliferatie betrokken zijn. Daarnaast zijn van sommige promotoren meer gedetailleerde gegevens bekend, zoals van TPA dat enzymen betrokken bij het arachidonzuurmetabolisme en de prostaglandinesynthese induceert. Dit laatste is vooral interessant omdat prostaglandinesynthese kan leiden tot het ontstaan van hyperplastisch weefsel.

2.10.5 Membraanveranderingen

Het meest uitgebreid zijn de effecten van TPA op oppervlak en membranen van gekweekte cellen onderzocht. Daarbij werd, net als voor andere promotoren bekend is, een pleiotroop effect waargenomen: een veelvoud aan functies wordt beïnvloed. TPA leidt niet alleen tot een veranderde samenstelling van het membraan, maar ook tot een

gewijzigde morfologie van de cel, een veranderd contact tussen cellen en een verstoorde metabole coöperatie tussen cellen onderling.

2.10.6 Mechanismen

Tumorpromotoren hebben veel met groeifactoren (zoals hormonen) gemeen. Ze zijn reeds biologisch effectief in zeer lage concentraties (in celkweek 10^{-8}-10^{-10} mol/l) en vertonen een opvallende weefselspecificiteit en hetzelfde pleiotrope effect als groeifactoren. Van veel promotoren is bekend dat ze hun werking op het genoom uitoefenen via receptoren in de celmembraan of in het cytoplasma. Dit leidt tot een signaal (bijvoorbeeld een cyclisch nucleotide of een cytoplasmatisch hormoon-receptor complex) naar het genoom.

Gemeenschappelijke noemer bij de meeste van deze effecten van tumorpromotoren is het vermogen om de bestaande genexpressie van een cel ingrijpend te wijzigen. Dit kan dan niet alleen leiden tot de voor promotie benodigde celproliferatie, maar zou ook als gevolg kunnen hebben het tot expressie komen van genoomfragmenten waarin een potentieel geactiveerd oncogen aanwezig is. Volgens een hierbij aansluitende en vooral op het onderzoek in de muizehuid gebaseerde hypothese (figuur 23), is het eerste promotiestadium nodig voor de fenotypische expressie van het tumorkarakter, de tweede promotiefase vormt 'slechts' een meer of minder specifieke groeistimulus. Dit leidt dan tot een zichtbare goedaardige tumor die – bijvoorbeeld door chromosomale instabiliteit (vergelijk 2.8.4) – een progressie ondergaat tot meer kwaadaardige tumorvormen. Is er sprake van een ernstige chromosomale afwijking in een levensvatbare geïnitieerde cel, dan kan promotie direct tot een kwaadaardige tumor leiden.

Omdat tumoren niet alleen met de combinatie van een initiator en een promotor kunnen worden gevormd, maar ook met volledige carcinogenen, is te verwachten dat deze laatste ook een aantal van de hierboven opgesomde typische promotoreigenschappen vertonen.

Verwacht mag worden dat veel van de nu nog open vragen in de komende jaren beantwoord zullen worden.

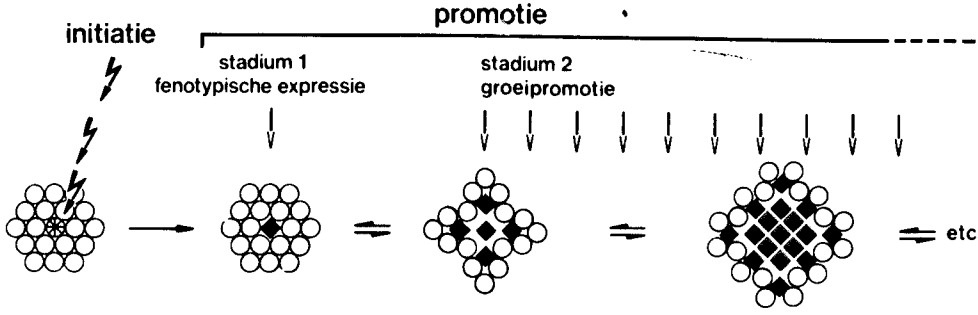


Fig. 23. Schematische weergave van de stadia die men zich bij het ontstaan van een tumor voorstelt.

2.10.7 *Tumorpromotie bij de mens*

Bepaalde ziekten van de mens die gepaard gaan met een sterk toegenomen cellulaire proliferatie – bijvoorbeeld in de blaas (bilharzia) of de lever (hepatitis B) – leiden tot een verhoogd risico op kankervorming in de betreffende organen. Aangenomen wordt dat de sterke proliferatie hier de rol van promotor vervult. Er zijn aanwijzingen dat tumorpromotie ook onder meer normale omstandigheden een grote rol speelt bij het ontstaan van menselijke tumoren. Voorbeelden zijn borst-, darm- en prostaatkanker. Voor de eerste twee tumoren is bekend dat stoffen die in een experimentele opzet duidelijke promotoren kunnen zijn (bijvoorbeeld vetten, galzuren) ook voorkomen bij de mens. Epidemiologische onderzoekingen, waarbij het vóórkomen van deze typen tumoren positief gecorreleerd is met de hoeveelheid geconsumeerde vetten (figuur 24), wijzen in dezelfde richting. Het geval van prostaatkanker is zeer illustratief, omdat gebleken is dat voorstadia van dit type tumor in veel landen bij zeer veel mannen voorkomen. Dat prostaatkanker in sommige van deze landen weinig en in andere landen zeer frequent voorkomt, geeft aan dat sterke verschillen in promotorniveaus tussen beide groepen bestaan. Bij een aantal van de in tabel 1 genoemde, aan de kankersterfte bijdragende factoren, wordt dan ook allereerst gedacht aan een beïnvloeding gedurende het promotiestadium.

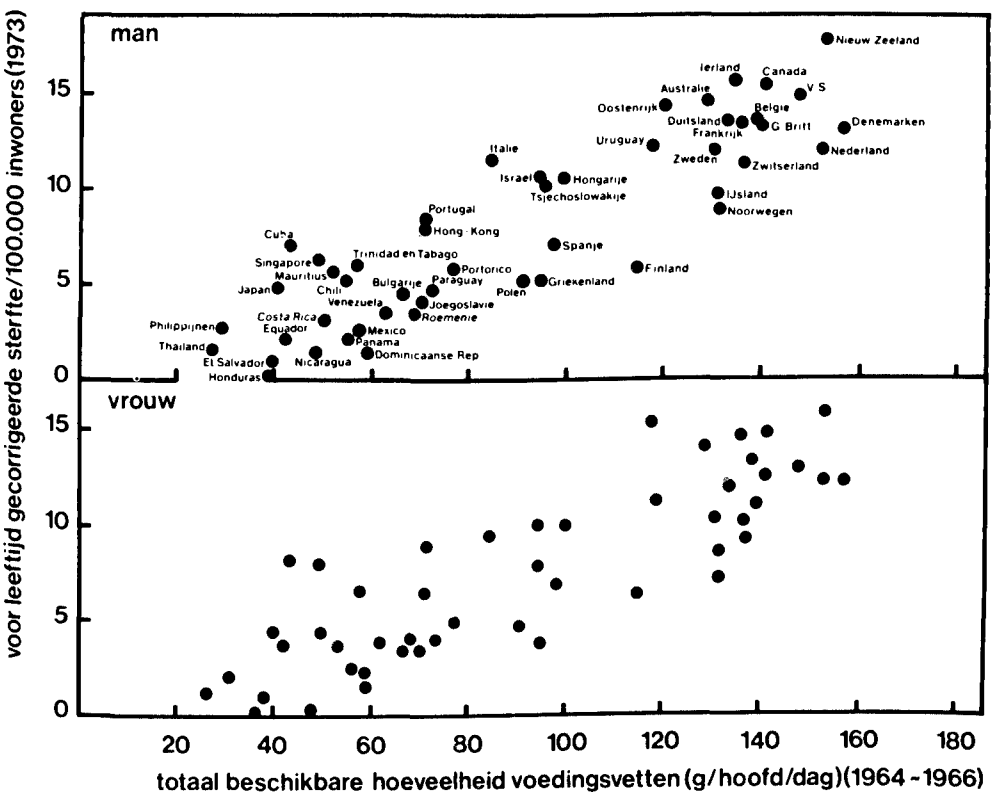


Fig. 24. Het verband tussen de sterfte aan kanker van de dikke darm en de consumptie van vetten (naar Carroll & Khor, 1975).

3 Het opsporen van carcinogenen

3.1 Inleiding

Een carcinogeen is een stof die kanker kan doen ontstaan. Carcinogeen betekent letterlijk kankerverwekkend. De eigenschap kanker te kunnen veroorzaken noemen we carcinogeniteit. De definitie van carcinogeen is gebaseerd op het type biologisch eindeffect (kanker) dat wordt opgewekt en zegt derhalve niets over de wijze waarop dit effect tot stand komt. De eigenschap carcinogeniteit is noch absoluut, noch uniform: het al of niet tot uiting komen ervan kan afhangen van factoren als toegepaste dosis, gebruikte diersoort, manier en periode van blootstellen, enzovoort. Ook zijn er verschillen in de wijze waarop carcinogenen hun werking uitoefenen (Gezondheidsraad, 1979). Dit laatste aspect speelt een belangrijke rol bij de classificatie van carcinogenen.

In de hoofdstukken 1 en 2 is beschreven wat volledige en onvolledige carcinogenen en initiatoren, promotoren en cocarcinogenen zijn. Bij het opsporen van carcinogenen richten we ons op al deze categorieën van stoffen. We gebruiken de term carcinogeen in de ruimste zin; we speuren naar alle stoffen die hoe dan ook bij de mens kunnen leiden tot een verhoogd kankerrisico.

Hiertoe staan ons een drietal mogelijkheden ter beschikking:
- epidemiologisch kankeronderzoek bij de mens;
- de langdurige dierproef;
- kortdurende screeningsproeven.

3.2 Epidemiologisch kankeronderzoek bij de mens

3.2.1 Definitie en doel

Epidemiologie van kanker is de wetenschap die studie maakt van het verspreidingspatroon van kanker bij de mens of andere levende organismen en van de factoren die dit verspreidingspatroon beïnvloeden (Lilienfeld et al., 1967; MacMahon & Pugh, 1970). Waar in het vervolg epidemiologie wordt genoemd, wordt humane epidemiologie bedoeld. De grote betekenis van epidemiologisch onderzoek ligt vooral in het blootleggen van veranderingen in individu, plaats en tijd ten aanzien van het vóórkomen van verschillende vormen van kanker. Door zorgvuldige analyse kunnen verbanden worden gelegd met omgevings- of intrinsieke factoren als determinanten, zodat hypothesen kunnen worden opgesteld die eventueel dierexperimenteel kunnen worden getoetst.

Drie algemene toepassingsgebieden van epidemiologisch kankeronderzoek zijn:

Opsporen van carcinogene factoren De betekenis hiervan voor epidemiologisch kankeronderzoek blijkt onder meer uit het feit dat 21 van de 30 tot nu toe bekende exogene factoren die bij de mens kanker kunnen veroorzaken, aan het licht zijn gekomen door

epidemiologisch onderzoek en klinische waarneming (tabel 6). Op deze manier is bijvoorbeeld het causaal verband aangetoond tussen roken en longkanker, lang voordat een geschikt diermodel voor longkankeronderzoek zelfs maar beschikbaar was (Gezondheidsraad, 1979).

Het hangt van een groot aantal factoren af of het mogelijk is bij de mens een carcinogeen effect op te sporen. De belangrijkste factoren zijn de omvang van de blootgestelde onderzoeksgroep, de duur en mate van blootstelling en de frequentie van optreden van het gevormde tumortype. Het is een vrijwel noodzakelijke voorwaarde dat voor een meetbaar effect de blootstelling aan een carcinogene stof gedurende lange tijd in relatief hoge concentraties moet hebben plaatsgevonden. Eveneens essentieel is de beschikbaarheid van goede gegevens over kankerincidenties in de te onderzoeken groep over liefst een langere periode, zodat ook een procentueel kleine toename van een bepaalde tumor kan worden opgemerkt.

De grootste kans dat aan deze voorwaarden wordt voldaan is bij werkers in de chemische industrieën en bedrijven, omdat hier vaak langdurig dezelfde chemische verbindingen worden gehanteerd en soms relevante expositiegegevens bekend zijn. Anders is het gesteld met de algemene bevolking. Er zijn in ons milieu kleine hoeveelheden van een groot aantal chemische stoffen, waaraan vrijwel iedereen wordt blootgesteld. Zware metalen, PCB's en andere gechloreerde polycyclische koolwaterstoffen, residuen van bestrijdingsmiddelen en chemische voedseltoevoegingen komen algemeen verspreid voor. Dergelijke stoffen kunnen elkaars werking beïnvloeden waardoor additieve, synergistische of neutraliserende effecten mogelijk zijn. Het is dus buitengewoon moeilijk eventueel gevonden effecten aan één chemische verbinding toe te schrijven en een controlepopulatie te vinden die niet is blootgesteld.

Van nieuw geïntroduceerde verbindingen kan door de lange latentietijd pas na 15 jaar of langer de eventuele carcinogene werking bij de mens blijken. Dit betekent dat voor deze groep stoffen andere dan epidemiologische methoden gevolgd moeten worden om mogelijke effecten bij de mens te voorspellen.

Toetsen bij de mens van dierexperimenteel gevonden kankerverwekkende werking

Wanneer kwalitatief de kankerverwekkende activiteit bij de mens wordt bevestigd en voldoende kwantitatieve dierexperimentele gegevens zijn verkregen, kan een schatting worden gemaakt van de grootte van het kankerrisico voor een blootgestelde bevolkingsgroep.

Wanneer de carcinogene werking bij de mens niet kan worden bevestigd, betekent dit nog niet dat expositie aan de betrokken stof geen kankerrisico inhoudt. De toetsmethode kan te ongevoelig zijn om een (zwakke) carcinogene activiteit aan te tonen. Niettemin kan dergelijk epidemiologisch onderzoek in principe bruikbare gegevens opleveren over blootstellingsniveaus bij de mens, zodat op basis van de gegevens uit de dierproef een schatting kan worden gemaakt van de omvang van een mogelijk kankerrisico voor de mens. Een dergelijke schatting speelt een belangrijke rol bij de uiteindelijke beleidsbeslissing of een bepaalde stof of factor wel of niet gehandhaafd kan worden, en zo ja, onder welke condities (Gezondheidsraad, 1979).

Een illustratief voorbeeld is formaldehyde, dat na langdurige inademing bij ratten neuskanker kan induceren (Swenberg et al., 1980; Albert et al., 1982; Feron & Den Engelse, 1982). Epidemiologisch onderzoek leverde tot nu toe geen aanwijzing op voor een causaal verband tussen blootstelling aan formaldehyde en neuskanker bij de mens.

Tabel 6. Chemische stoffen (individueel of als groep), industrieën of industriële processen waarvoor een zeker of zeer waarschijnlijk verband met de inductie van tumoren bij de mens is aangetoond [1].

Verband aangetoond voor	Doelwitorganen	Carcinogeniteit voor het eerst aangetoond in
1. 4-aminobifenyl	blaas	proefdier
2. arseen en arseenverbindingen	huid/long/lever	mens
3. asbest	long/borstholte/ maag-darmkanaal	mens
4. auramine (produktie)	blaas	mens
5. benzeen	bloedvormende organen	mens
6. benzidine	blaas	mens
7. *N,N*-bis (2-chloorethyl)-2-naftylamine (M)	blaas	mens
8. bis (chloormethyl)ether; chloormethylmethylether (technisch zuiver)	long	proefdier
9. leer en schoeisel (bereiding en herstel)	neusholte	mens
10. chroom en sommige chroomverbindingen	long	mens
11. cyclofosfamide (M)	blaas	mens
12. diethylstilboestrol (M)	vagina/cervix/ endometrium	proefdier
13. meubelindustrie	neusholte	mens
14. hematietwinning (radon?)	long	mens
15. isopropylalcohol (bereiding; via sterk-zuurproces	neusholte	mens
16. melfalan (M)	bloedvormende organen	proefdier
17. mosterdgas	ademhalingswegen	proefdier
18. 2-naftylamine	blaas	mens
19. nikkel (ertsverwerking)	neusholte/long	mens
20. roet, teer en oliën	huid/long/blaas	mens
21. rubberproduktie	blaas/long/maag/ bloedvormende organen	mens
22. vinylchloride	lever/hersenen/long/ bloedvormende organen	proefdier
23. geconjugeerde oestrogenen (M)	lever/endometrium	mens
Verband zeer waarschijnlijk		
1. aflatoxine	lever	proefdier
2. azathioprine (M)	huid/lever/ bloedvormende organen	mens
3. cadmium en sommige cadmiumverbindingen	prostaat/long/nier	mens
4. chloorambucil (M)	bloedvormende organen	mens/proefdier
5. nikkel en sommige nikkelverbindingen	long	mens
6. thiotepa (M)	bloedvormende organen	proefdier
7. treosulphan (M)	bloedvormende organen	mens

Voetnoot op p. 55.

Bij de rat bleek neuskanker alleen op te treden na blootstelling aan formaldehydeconcentraties die ook cytotoxische effecten (celbeschadiging) en regeneratieve proliferatie geven. Bij bestudering van alle beschikbare gegevens over de carcinogene, mutagene en cytotoxische activiteit van formaldehyde bleek dat de cytotoxiciteit een zo belangrijke rol speelt bij de kankerverwekkende activiteit van formaldehyde, dat gesteld kan worden dat formaldehyde in concentraties die geen celbeschadiging geven slechts een zwakke initiator is zonder promoverende activiteit. Dit betekent dat in sub-cytotoxische concentraties formaldehyde geen volledig carcinogeen is en derhalve op zichzelf geen kanker kan veroorzaken. De Bijzondere Adviescommissie Formaldehyde (1982) kwam dan ook tot de conclusie dat bij expositieniveaus gelijk aan of lager dan 0,1 ml/m^3 het kankerrisico van formaldehyde voor de mens verwaarloosbaar klein is.

Verschaffen van een basis voor het nemen van maatregelen en beoordelen van hun effect
Epidemiologisch onderzoek kan inzicht geven in de effectiviteit van beschermende maatregelen zoals elimineren van een carcinogene factor, verminderen van de blootstellingsconcentratie, dragen van beschermende kleding en ontwikkelen van minder gevaarlijke produkten. Er zijn zo bijvoorbeeld aanwijzingen uit epidemiologisch onderzoek dat het roken van sigaretten met een laag teer- en nicotinegehalte leidt tot een lagere longkankerincidentie dan het roken van sigaretten met een hoog teer- en nicotinegehalte (Wynder et al., 1976; Hammond et al., 1977).

Twee soorten epidemiologisch onderzoek kunnen worden onderscheiden, te weten *observationele* en *experimentele epidemiologie.* Het belangrijkste verschil tussen beide is dat bij experimenteel onderzoek de epidemioloog zelf de omstandigheden bepaalt waaronder het onderzoek wordt uitgevoerd; hij bepaalt de wijze waarop individuen of groepen aan de proef- en controlegroep worden toegewezen. Bij experimenteel epidemiologisch onderzoek worden onderscheiden klinisch experimenteel onderzoek waarbij veelal de effectiviteit van preventieve of therapeutische maatregelen bij individuele patiënten bestudeerd wordt, en onderzoek bij bevolkingsgroepen dat voornamelijk is gericht op het toetsen van geneesmiddelen, preventieve maatregelen en behandelingsmethoden. Bij het observationeel epidemiologisch onderzoek observeert de epidemioloog en analyseert zijn waarnemingen. Hierbij worden retrospectief, 'cross-sectional' en prospectief onderzoek onderscheiden.

3.2.2 Registratie van kanker

Alleen op basis van betrouwbare gegevens over kankersterfte (mortaliteit) en kankerincidentie (morbiditeit) kan de epidemiologie kankerverwekkende invloeden in ons mi-

---

1. Volgens een opgave van de International Agency for Research on Cancer (IARC, Annual Report 1981, p. 62; zie ook Tomatis et al., (1978)). Niet opgenomen zijn een twaalftal chemische stoffen, waarover volgens de IARC-opgave maar weinig gegevens aanwezig zijn die een rol in het ontstaan van tumoren bij de mens suggereren. Deze lijst is een momentopname. Stoffen waarvan het kankerverwekkend vermogen bij de mens algemeen geaccepteerd wordt zoals tabak, alcohol en betelnoten, ontbreken, omdat deze stoffen nog niet de beoordelingsprocedure van het IARC hebben ondergaan.

(M) Als medicijn gebruikt.

lieu signaleren, waarna beschermende maatregelen kunnen worden overwogen. Om over dergelijke betrouwbare informatie te kunnen beschikken, dient aan de volgende voorwaarden te zijn voldaan:

1. goede, genormaliseerde diagnostiek in de hele gezondheidszorg;
2. nauwgezette, gestandaardiseerde rapportage van alle gediagnostiseerde gevallen van kanker aan een centrale registratie;
3. goed functionerende centrale kankerregistratie.

In de meeste ontwikkelde landen is punt 1 geen probleem; punt 2 ligt al aanmerkelijk moeilijker (alle artsen moeten voor elke kankerpatiënt meedoen), terwijl punt 3 zeer moeilijk te verwezenlijken lijkt. Denemarken is een van de weinige landen waar centrale kankerregistratie reeds in het begin van de 50-er jaren is ingevoerd. Een van de grootste problemen is de vertrouwelijkheid van medische gegevens. Een commissie van de Gezondheidsraad heeft zich duidelijk uitgesproken voor het in Nederland opzetten van een nominatieve (= met vermelding van naam) centrale kankerregistratie (Gezondheidsraad, 1979). Onlangs is met de verwezenlijking hiervan een begin gemaakt.

3.2.3 Kankerincidentie en kankersterfte

Cijfers over kankerincidentie zijn veel meer informatief dan sterftecijfers. Allereerst is het al dan niet overlijden aan een bepaald type kanker ondermeer afhankelijk van de beschikbaarheid en het gebruik van medische verzorging. Voorts is bij de ene vorm van kanker het verschil tussen de incidentie- en sterftecijfers veel groter dan bij de andere vorm. Zo bleek uit een rapport van de Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO, 1975) dat voor mannen tussen de 35 en 64 jaar de incidentiecijfers voor maag- en slokdarmkanker slechts weinig hoger waren dan de sterftecijfers (geringe overlevingskans), terwijl voor kanker van het rectum de incidentiecijfers dubbel zo groot waren als de sterftecijfers (grotere overlevingskans).

Tabel 7. Beschikbaarheid van gegevens over kankerincidentie en kankersterfte voor verschillende delen van de wereldbevolking in de periode 1970 tot 1975 (Muir, 1977).

Gebied	Bevolking		
	Totaal ($\times 10^6$)	gegevens beschikbaar	
		kankerincidentie (%)	kankersterfte (%)
Afrika	320	0,1	0,1
Amerika	560	12	78
Oostelijk Middellandse Zeegebied	250	1	18
Europa[1]	800	11	59
Zuid-Oost Azië	1050	1	4
Westelijk Stille Zuidzeegebied	110	2	16
Wereld[2]	4000	5	30

1. Met inbegrip van de Sovjet-Unie.
2. Met inbegrip van de Volksrepubliek China.

Betrouwbare gegevens over kankerincidentie zijn slechts voor een klein deel van de wereldbevolking beschikbaar (tabel 7). Uit deze tabel blijkt ook dat in grote delen van de wereld zelfs geen cijfers bestaan over kankersterfte. Wanneer men de sterfte aan een bepaalde vorm van kanker of de incidentie van dat type kanker in een bepaalde populatie wil vergelijken met die in een andere populatie, dient men onder meer rekening te houden met mogelijke verschillen in leeftijdssamenstelling tussen de beide populaties. Vaak wordt ook wel gebruik gemaakt van incidentie- of sterftecijfers die voor de leeftijdsopbouw zijn gecorrigeerd ('age-standardized rates'). Ook deze cijfers zijn gebaseerd op gegevens per leeftijdscategorie, maar deze worden op een bepaalde manier gewogen zodat vervolgens een gewogen gemiddelde voor de hele populatie (of bijvoorbeeld voor de mensen onder of boven de 65 jaar) kan worden berekend (Doll & Peto, 1981).

Voor meer bijzonderheden over methodieken voor standaardisering van sterfte- en incidentiecijfers wordt verwezen naar Sturmans (1982).

3.2.4 Cohort-, patiënt-controle- en 'cross-sectional'- onderzoek

Deze drie vormen van epidemiologisch onderzoek zijn belangrijke methoden om een hypothese over de oorzaak van kanker in de praktijk te toetsen.

Bij een cohortonderzoek wordt een groep mensen (het cohort) geselecteerd op basis van blootstelling aan een bepaalde stof of op basis van een speciale leefgewoonte waarvan de mogelijke relatie met een bepaalde vorm van kanker wordt bestudeerd: dit is de proefgroep. Daarnaast wordt een controlegroep geselecteerd waarin de te onderzoeken factor juist niet of in veel mindere mate speelt, maar waarin zoveel mogelijk andere factoren identiek zijn. Vervolgens worden beide groepen over een bepaalde periode met elkaar vergeleken wat betreft incidentie of sterfte aan de te onderzoeken vorm van kanker. Omdat bij dit soort onderzoek de toekomstige ontwikkelingen worden gevolgd vanuit het heden ('concurrent' onderzoek) of vanuit een bepaald punt in het verleden ('non concurrent' onderzoek), wordt dit prospectief onderzoek genoemd (er wordt vanaf een bepaald moment vooruit gekeken). Proefgroepen kunnen op talloze manieren worden gekozen. Voorbeelden zijn rokers, werkers in een bepaalde fabriek, medisch personeel, mensen uit een bepaalde streek en mannen van een bepaald geboortejaar. Aspecten die verder van belang zijn bij het cohortonderzoek zijn:

- vergelijkbaarheid van de controlegroep;
- verkrijgen van betrouwbare gegevens over blootstellingsniveaus en opname van stoffen in de proefgroep;
- mogelijkheid tot het blijven volgen van de totale cohorten;
- wijze van analyseren, evalueren en interpreteren van de resultaten;
- volledigheid van rapportage van de uitkomsten.

Voor details over cohortonderzoek wordt verwezen naar MacMahon & Pugh (1970) en Lilienfeld & Lilienfeld (1980).

Bij een patiënt-controle-onderzoek wordt een groep mensen die lijdt aan een bepaald soort kanker (patiënten), vergeleken met een groep mensen die niet aan deze vorm van kanker lijdt (controles). Bij de vergelijking wordt gelet op factoren die mogelijk van betekenis zijn voor het ontstaan van dit type kanker. Meestal wordt uitgegaan van een specifieke vraagstelling, bijvoorbeeld bestaat er een verband tussen neuskanker en expositie aan formaldehydedamp? Omdat bij dit soort onderzoek de 'geschiedenis' van de

patiënten en de controles wordt bestudeerd, wordt dit onderzoek gerangschikt onder het retrospectief onderzoek.

Bij 'cross-sectional' - (dwarsdoorsnede-)onderzoek worden, evenals bij patiënt-controle-studies, patiënten met kanker vergeleken met controles. Het verschil is dat bij 'cross-sectional'-onderzoek de patiënten op het moment van onderzoek blootgesteld zijn aan de stof of factor die men verantwoordelijk acht voor het type kanker, terwijl bij retrospectief onderzoek de stof of de factor over een (lange) periode in het verleden reeds heeft gewerkt. 'Cross-sectional'-onderzoek is een momentopname, waardoor een verband tussen blootstelling aan een stof en vóórkomen van een bepaald type kanker moeilijker is vast te stellen dan bij retrospectief onderzoek (Lilienfeld & Lilienfeld, 1980). Van groot belang bij retrospectief en 'cross-sectional'-onderzoek is dat de controlegroep zodanig wordt gekozen dat een verantwoorde vergelijking met de patiënten mogelijk is. Voorts moet er betrouwbare informatie kunnen worden verkregen over de blootstelling van de patiënten. Details over dit soort onderzoek zijn beschreven door MacMahon & Pugh (1970) en Lilienfeld & Lilienfeld (1980).

3.2.5 Retrospectief versus prospectief onderzoek

Bij het interpreteren van de resultaten van zowel een retrospectief als een prospectief onderzoek staat het beantwoorden van de twee volgende vragen voortdurend voor ogen:

– Is er sprake van een statistisch verband tussen het type kanker en de bestudeerde etiologische factor(en)?

– Indien een verband wordt gevonden, is dit dan uitsluitend te beschouwen als statistisch verband of kan ook een causaal (oorzakelijk) verband plausibel worden gemaakt?

Een prospectief onderzoek heeft voor- en nadelen ten opzichte van een retrospectief onderzoek. De belangrijkste voordelen zijn:

– Een prospectief onderzoek verschaft informatie over het risico (de kans) een bepaalde vorm van kanker te krijgen dat een groep mensen loopt die aan een bepaalde stof wordt blootgesteld; dit in vergelijking met een andere vergelijkbare groep mensen die niet aan die stof wordt blootgesteld. Bij een retrospectief onderzoek kan alleen een schatting, zij het vaak een zeer redelijke schatting, worden gemaakt van het relatieve risico op het krijgen van een bepaald soort kanker.

– Bij een prospectief onderzoek worden de te hanteren criteria en methodieken van tevoren vastgesteld, waardoor de kans op het gebruik van subjectieve elementen bij het inwinnen van de benodigde informatie vermindert. Bij retrospectief onderzoek is de onderzoeker voor een deel afhankelijk van de gegevens die de proefpersonen zich nog weten te herinneren.

– Bij prospectief onderzoek bestaat de mogelijkheid inzicht te krijgen in veranderingen in de blootstelling van de proefpersonen aan de betrokken stof.

– Prospectief onderzoek biedt de gelegenheid informatie te verzamelen over de relatie van de betrokken stof met diverse vormen van kanker en andere ziekten; bij retrospectief onderzoek wordt in de regel slechts één soort kanker onderzocht, namelijk die der patiënten.

– Bij een retrospectief onderzoek worden alleen personen meegenomen die overleven tot het optreden van de bestudeerde vorm van kanker. Wanneer expositie aan een stof samenhangt met mortaliteit, dan worden de personen die overleden zijn in de periode

na expositie en voor het optreden van kanker, niet in een retrospectief onderzoek opgenomen. Dit betekent onderschatting van de samenhang bij dit type onderzoek.

De belangrijkste nadelen zijn:

– Prospectief onderzoek is in het algemeen moeilijker uit te voeren en veel duurder dan retrospectief onderzoek; er moet met grote groepen mensen en lange waarnemingsperioden worden gewerkt om betrouwbare resultaten te verkrijgen.

– Bij prospectief onderzoek kan het steeds terugkerend onderzoek van de betrokkenen van invloed zijn op de ontwikkeling van het ziekteproces.

– Prospectief onderzoek is haast onmogelijk wanneer het gaat om zeldzame soorten kanker; er moeten extreem grote groepen worden gebruikt om enigszins betrouwbare resultaten te krijgen.

3.2.6 Beperkingen van de epidemiologie

De betekenis van de kankerepidemiologie voor het opsporen van de hoofdoorzaken van de belangrijkste vormen van kanker alsmede voor het aangeven van de ontwikkeling van de kankerincidenties in de toekomst, is buiten kijf. Niettemin kent de epidemiologie ook haar beperkingen. Enkele hiervan zijn reeds hiervoor aangeduid bij het naast elkaar plaatsen van de voor- en nadelen van prospectief versus retrospectief onderzoek. Andere, meer algemene beperkingen zijn de volgende:

– Geringe gevoeligheid. Epidemiologisch methodieken zijn ruw en ongevoelig in vergelijking met laboratoriumonderzoek (Muir, 1979). Een zwak carcinogeen waaraan veel mensen worden blootgesteld, kan niet of nauwelijks worden opgespoord, zelfs als het bij betrekkelijk grote aantallen mensen kanker induceert. Alleen bij een zeldzaam soort kanker en een ongewone expositie is de kans groot dat de carcinogene factor wordt onderkend. Hetzelfde geldt voor het vaststellen van de betekenis van expositie aan lage doses van sterke carcinogenen.

– Geringe betekenis van een negatief resultaat. Dit aspect is terug te voeren op de geringe gevoeligheid van epidemiologisch onderzoek. Indien het onderzoek goed is uitgevoerd, betekent een negatief resultaat nog altijd niet meer dan dat het relatieve risico op kanker verbonden aan blootstelling aan de onderzochte factor niet groter is – maar ook niet kleiner hoeft te zijn – dan de bovenste betrouwbaarheidsgrens. In de praktijk betekent dit ook dat een enigszins overtuigend negatief onderzoek een omvangrijke, en zeker bij prospectief onderzoek, een langdurige en zeer kostbare operatie is. (Muir, 1979; Doll & Peto, 1981). Een negatief resultaat wint aan betrouwbaarheid wanneer het resultaat van andere epidemiologische onderzoekingen uitgevoerd onder andere omstandigheden ook negatief is.

– Geen betekenis voor het toelaten of verbieden van nieuwe stoffen. Lijdt de epidemiologie aan het 'mosterd na de maaltijd' syndroom? Uiteraard kan kankerepidemiologie niet voorspellen of een nieuwe stof een humaan carcinogeen is. Pas na blootstelling van mensen kunnen de gevolgen mogelijk worden vastgesteld. Het al dan niet toelaten van een nieuwe stof dient te gebeuren op basis van andere gegevens (Muir, 1979) en valt buiten de doelstellingen van de epidemiologie. Hoe licht men zich bij epidemiologisch onderzoek kan laten verleiden tot het trekken van verkeerde conclusies blijkt uit een recente publikatie waarin de onderzoekers op grond van retrospectief onderzoek concludeerden dat er een causaal verband is tussen het optreden van kwaadaardige melanomen en het werken onder TL-verlichting (Beral et al., 1982). Aan de hand van

dit onderzoek maakte Wagenaar (1982) duidelijk dat retrospectieve studies alleen kunnen worden gebruikt om hypotheses te ontwikkelen, niet om ze te toetsen; vervolgens maakte hij duidelijk dat de conclusie uit het onderzoek onhoudbaar is.

3.3 De langdurige dierproef

3.3.1 Doel en betekenis

De dierproef is de algemeen aanvaarde methode om langs experimentele weg de carcinogene werking van stoffen op te sporen of de invloed van allerlei factoren op de carcinogeniteit van een stof te bestuderen (Page, 1977a). Er kunnen twee soorten dierproeven worden onderscheiden: een algemene langdurige dierproef, en een meer bijzondere carcinogeniteitsproef. De langdurige dierproef heeft tot doel om van een nog niet of onvoldoende onderzochte stof vast te stellen of deze al dan niet carcinogene eigenschappen bezit. De meer bijzondere dierproef wordt meestal uitgevoerd binnen een speciaal onderzoekkader, heeft qua omvang veelal een beperkte opzet en is toegespitst op een speciale vraagstelling, zoals onderlinge vergelijking van de carcinogene potentie van een bepaald soort verbindingen. Richtlijnen voor dit soort meer bijzondere experimenten zijn moeilijk te geven, omdat opzet en uitvoering sterk kunnen variëren. Daarom wordt hierna voornamelijk ingegaan op de algemene carcinogeniteitsproef, waarvoor basisprincipes en algemene richtlijnen bestaan.

Bij de langdurige carcinogeniteitsproef worden proefdieren, die gedurende het grootste deel van hun leven zijn blootgesteld aan de te testen stof, onderzocht op het eventuele voorkomen van kwaadaardige tumoren (IARC, 1980). De carcinogene activiteit kan zich op verschillende wijzen manifesteren, maar bij elke uitingsvorm staat kanker als het biologische eindeffect centraal (Kroes, 1979).

De voorspellende waarde van carcinogeniteitsgegevens uit dierexperimenten voor het kankerrisico voor de mens door blootstelling aan een bepaalde stof, werd reeds een halve eeuw geleden onderkend. Sindsdien is deze voorspellende waarde steeds duidelijker geworden; nagenoeg alle stoffen waarvan bekend is dat ze bij de mens kanker kunnen opwekken, bleken ook carcinogeen te zijn voor één of meerdere diersoorten. Het is dus alleszins verantwoord alle stoffen waarvan adequate carcinogeniteitsgegevens bij de mens ontbreken, maar waarvan de kankerverwekkende activiteit bij dieren ondubbelzinnig is aangetoond, in de praktijk te beschouwen als kankerverwekkend voor de mens (WHO, 1978).

3.3.2 Opzet en uitvoering

Er bestaat een uitgebreide literatuur waarin de talrijke aspecten van de langdurige dierproef tot in bijzonderheden worden beschreven (Page, 1977a, 1977b; Food Safety Council, 1978; Kroes, 1979; WHO, 1978; IARC, 1980), terwijl ook standaardprotocollen voorhanden zijn (OECD, 1981).

Recente ontwikkelingen bij de chronische dierproef zijn toenemende standaardisering, bewaking van de kwaliteit en internationale harmonisatie. Hierbij zijn betrokken de Wereld Gezondheidsorganisatie, de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, en de Europese Gemeenschap. Voor de verwerking en bewerking van de vele gegevens, maar ook als steun bij het leiden van de proef, zijn computerfaciliteit-

ten welhaast voorwaarde geworden voor het op een verantwoorde wijze uitvoeren van een chronisch experiment. Dit geldt evenzeer voor het werken volgens de nationale en internationale richtlijnen van 'Good Laboratory Practice' (GLP). GLP werd in 1978 geïntroduceerd door de Food and Drug Administration in Washington (Federal Register, 1978) met het doel een einde te maken aan de stroom van inferieure toxiciteits- en carcinogeniteitsexperimenten die werden uitgevoerd onder leiding van een ondeskundige staf door vaak overbelaste en niet gekwalificeerde medewerkers. Chronische proeven vertoonden vaak zoveel ernstige tekortkomingen, dat uit de resultaten geen enkele conclusie kon worden getrokken. Veel voorkomende gebreken waren: te beperkte opzet (te weinig en te kleine groepen en te weinig parameters), slordige uitvoering, te korte overleving, veel autolyse en kannibalisme, en slecht en fragmentarisch pathologisch onderzoek met vaak gebrekkige rapportage. Ook werd in een aantal gevallen fraude vastgesteld: resultaten waren 'aangepast' of zelfs volledig gefingeerd. Dit alles kon gebeuren onder de druk van een explosieve vraag naar toxiciteits- en carcinogeniteitsonderzoek op een tijdstip dat er voor dit onderzoek onvoldoende faciliteiten waren en er een groot tekort was aan gekwalificeerde toxicologen, pathologen en geschoolde medewerkers.

In de GLP-richtlijnen worden de talrijke facetten van een toxiciteitsproef tot in detail geregeld. Zo dienen er gegevens beschikbaar te zijn over de opleiding van alle medewerkers, over de proefdierfaciliteiten en de apparatuur; voor elke proef moet een protocol worden opgesteld en alle procedures en werkwijzen dienen vastgelegd te zijn in zogenaamde Standard Operation Procedures (SOP's). De controle van de 'boekhouding' dient te worden uitgevoerd door personen die niet direct betrokken zijn bij het onderzoek en bij voorkeur door personen die deel uit maken van een aparte, onafhankelijke kwaliteitsbewakingseenheid (Quality Assurance Unit).

Chronische dierproeven zijn kostbaar en zeer tijdrovend, allereerst vanwege hun lange duur maar vooral ook vanwege het uitgebreide histopathologische onderzoek dat zeer arbeidsintensief is. De proeven vereisen goede proefdierfaciliteiten en goed geoutilleerde laboratoria, en ervaring en deskundigheid op het gebied van biotechniek, pathologie, statistiek en rapportage. Onmisbaar is een grondige voorbereiding resulterend in een gedetailleerd op schrift gesteld plan. Belangrijke elementen van een dergelijk protocol zijn:

– Gegevens over de te onderzoeken stof. Alvorens de proef te starten dient alle relevante informatie over de stof beschikbaar te zijn zoals chemisch-fysische eigenschappen, stabiliteit onder de condities van opslag en toediening, verontreinigingen, bron met partij- en monsternummers en ook de reeds bestaande gegevens over biologisch gedrag. Soms rijst de vraag of de proef gedaan moet worden met het zo zuiver mogelijk of met het technisch produkt. In het algemeen wordt de voorkeur gegeven aan het technisch produkt (daarmee komt de mens in contact), eventueel later gevolgd door onderzoek met de zuivere stof en soms wéér later door proeven met de verontreinigingen (Munro, 1977).

– Diersoort en dierstam. De ideale diersoort zou op de te onderzoeken stof hetzelfde moeten reageren als de mens (Food Safety Council, 1978). Omdat zo'n diersoort niet bekend is, wordt in het algemeen geadviseerd een stof te testen bij twee diersoorten. Het meest gebruikt worden ratten, muizen en Syrische hamsters; dit is niet gebaseerd op fysiologische, biochemische of anatomische overeenkomsten met de mens, maar op praktische overwegingen zoals relatief korte levensduur, niet te groot, gemakkelijk te

verkrijgen en het voorhanden zijn van uitgebreide kennis omtrent huisvesting, voeding, spontane ziekten, tumoren, enzovoort. De ideale proefdierstam zou spontaan geen tumoren moeten krijgen en tegelijkertijd zeer gevoelig moeten zijn voor alle carcinogenen die bij de mens kanker kunnen veroorzaken. In de praktijk wordt de keuze voornamelijk bepaald door de ervaring die in een bepaald laboratorium met een stam is opgedaan en door de achtergrondgegevens die ter plaatse zijn verzameld. Verschil van mening is er over de vraag of inteelt- ('inbred'-) of willekeurig geteelde ('random bred') stammen de voorkeur verdienen, of dat F_1-hybriden misschien geschikter zijn. Willekeurig geteelde stammen zouden resistenter zijn tegen ziekten, maar dat zijn F_1-hybriden ook. Bij willekeurig geteelde stammen kunnen zich snel aanzienlijke verschillen ontwikkelen in gevoeligheid voor een bepaald carcinogeen. Anderzijds kunnen ingeteelde stammen extreem gevoelig zijn voor het ene carcinogeen en zeer ongevoelig voor het andere. Gesuggereerd is wel binnen één experiment een aantal verschillende inteeltstammen te gebruiken (Haseman & Hoel, 1979); vanwege de grote praktische problemen die hieraan kleven lijkt dit vooralsnog meer theorie dan praktijk (IARC, 1980). Grotere zoogdieren, zoals honden en apen, worden voor carcinogeniteitsproeven weinig gebruikt. Behalve problemen als huisvesting en verkrijgbaarheid speelt vooral de lange levensduur een rol, waardoor een experiment 10 jaar of langer zou moeten duren. Daarom is voor deze soorten een zogenaamd chronisch experiment van twee jaar volledig onvoldoende om carcinogene effecten te mogen verwachten.

– Manier van toedienen. De te testen stof dient te worden toegediend op een manier die zoveel mogelijk overeenkomt met de wijze waarop de mens wordt blootgesteld. De belangrijkste manieren van toedienen zijn oraal, dermaal en inhalatoir (figuur 25).

– Kiezen van de doses. Het kiezen van de doseringen is het meest controversiële en misschien belangrijkste facet van het totstandkomen van het protocol (Munro, 1977; Food Safety Council, 1978). Het definiëren van de hoogste dosis (Maximum Tolerated Dose) is onderwerp geweest van vele discussies en bijeenkomsten. Een recente definitie luidt: de hoogste dosis is die dosis waarvan op grond van een adequaat sub-chronisch toxiciteitsonderzoek enig toxisch effect wordt verwacht in de langdurige proef; deze dosis mag echter geen ernstige beschadigingen geven, mag de levensduur van de dieren niet bekorten anders dan door tumoren en mag een verminderde toeneming van het lichaamsgewicht van ten hoogste 10 % geven (Food Safety Council, 1978). Omdat informatie over een mogelijke dosis-respons relatie in het algemeen gewenst is, worden naast de controlegroep minstens drie verschillende doseringsgroepen gebruikt, waarbij tussenstappen van een factor 3 of 5, of zelfs 10 gebruikelijk zijn. Wanneer het uitsluitend gaat om het vaststellen van carcinogeniteit, wordt wel volstaan met twee dosesgroepen en één controlegroep. Het gebruik van hoge doses is nodig om het opsporend vermogen ('power of test') bij gebruik van een beperkt aantal proefdieren zo groot mogelijk te doen zijn. Bij hoge doses kan echter door bijvoorbeeld overbelasting van enzymsystemen, de stof op andere wijze worden gemetaboliseerd dan bij lagere doses. Hierdoor kunnen carcinogene metabolieten ontstaan die afwezig zijn bij lagere doses.

– Begin en duur van de proef. Een proef wordt in het algemeen gestart binnen enkele weken na het spenen van de dieren en wordt voortgezet gedurende nagenoeg de hele levensduur. In plaats van de proef te beëindigen na een vooraf vastgestelde periode (bij voorbeeld na 24 maanden voor de rat en na 18 maanden voor de muis en de hamster), komt steeds meer in zwang het experiment te stoppen op het moment dat een bepaald percentage sterfte is bereikt. De OECD-richtlijnen (OECD, 1981) geven aan: 75 %

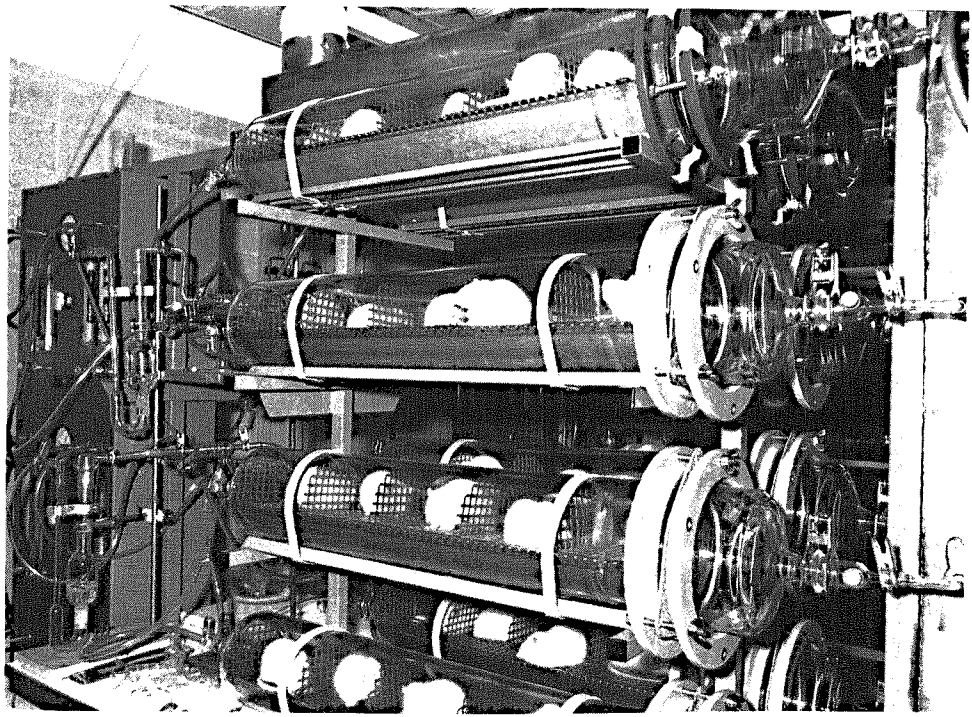


Fig. 25. Inhalatiecylinders met een inhoud van 15 l waarin maximaal 10 kleine laboratoriumdieren individueel kunnen worden blootgesteld aan stoffen die in de atmosfeer zijn gebracht. Dit type inhalatiekamer is speciaal geschikt voor kortdurende inhalatietoxiciteitsproeven met gassen of dampen.

sterfte in de controlegroep of de groep met de laagste dosis. Hierbij geldt als beperking dat de proef onafhankelijk van het sterftepercentage wordt beëindigd voor de rat na 130 weken en voor de muis en hamster na respectievelijk 120 en 100 weken.

– Aantal dieren per groep. Veel gebruikte aantallen zijn 50 mannetjes en 50 vrouwtjes per groep, zowel voor elk van de proefgroepen als voor de controlegroep. Dit aantal wordt gezien als een aanvaardbaar minimum en als een redelijk compromis tussen de kosten en het voorkómen van een vals-negatief resultaat (IARC, 1980). Bovendien wordt de waarde van het experiment nauwelijks groter wanneer het aantal dieren wordt uitgebreid.

– Voeder. Het meest gebruikt worden voeders die grotendeels bestaan uit natuurlijke ingrediënten en waarvan de samenstelling zo nauwkeurig mogelijk bekend is. Het basisvoer moet uiteraard adequate en gestandaardiseerde hoeveelheden macro- en micronutriënten bevatten (Sontag et. al., 1976). Lang bewaren (meer dan 2 weken) dient te worden vermeden; indien dit toch nodig is dan is opslaan in koelkast of diepvries noodzakelijk. Periodiek dienen in het basisvoer de hoeveelheden nutriënten, toevoegingen en verontreinigingen (polycyclische koolwaterstoffen, oestrogenen, zware metalen, nitrosaminen, mycotoxinen en residuen van bestrijdingsmiddelen) te worden bepaald. Wanneer de te onderzoeken stof in het voeder wordt gemengd, dienen stabiliteit en homogeniteit van de stof in het voeder verzekerd te zijn.

– Verdeling van de dieren over de groepen en binnen de dierkamer. Aangegeven moet worden op welke manier de dieren worden verdeeld over de groepen, bijvoorbeeld op basis van lichaamsgewicht of geboortedatum. Verder wordt aangegeven hoe de dieren over de dierkamer worden verdeeld, bijvoorbeeld controlegroep in dezelfde kamer als de proefgroepen, groepsgewijs binnen de kamer of in blokken van bijvoorbeeld 4 kooien per groep. De kooien uit verschillende groepen worden ook wel kris-kras door elkaar geplaatst; in dit geval worden meestal kleurcodes gebruikt om vergissingen tot een minimum te beperken.
– Huisvesting van de dieren. Een goede uitrusting voor het huisvesten van de dieren moet beschikbaar zijn, dat wil zeggen goed geventileerde kamers waarin de dieren onder gestandaardiseerde condities van temperatuur, licht en vochtigheid kunnen worden gehouden (Page, 1977b; Federal Register, 1978).
– Waarnemingen. Voor een adequaat carcinogeniteitsonderzoek geldt dat in elk geval gegevens moeten worden verzameld over de klinische symptomen, sterfte, lichaamsgewichten, voergebruik en macro- en microscopische pathologie. De dieren moeten dagelijks globaal worden gecontroleerd en minimaal eenmaal per week aan een nauwkeurige inspectie worden onderworpen, waarbij het zoeken naar tumoren door middel van palpatie een wezenlijk onderdeel is. Alle bijzonderheden moeten worden genoteerd met speciale aandacht voor het tijdstip waarop tumoren worden ontdekt, de localisatie en progressie. Indien mogelijk moeten zieke dieren apart worden gezet zodat ze optimale aandacht krijgen. Ook wordt dan voorkomen dat ze dood worden gevonden en door autolyse of kannibalisme geheel of gedeeltelijk verloren gaan (IARC, 1980). Het pathologisch onderzoek vormt de hoeksteen van de carcinogeniteitsproef (WHO, 1978). Bij het macroscopisch onderzoek moet vooral gelet worden op aantal, plaats, grootte en hoedanigheid van tumoren. Bij het microscopisch onderzoek zijn uniformiteit bij de diagnosestelling en gebruik van bestaande nomenclatuur van belang. Verder is het aangeven van de criteria die worden gehanteerd voor de diagnose hyperplasie versus neoplasie of goedaardige versus kwaadaardige tumor van belang. In dit verband wordt gewezen op de classificatie van tumoren die is opgesteld door de Wereld Gezondheidsorganisatie. Om een optimale interpretatie (en statistische bewerking) van de gegevens over de tumorpathologie mogelijk te maken, wordt er in een recente publikatie voor gepleit deze gegevens altijd te corrigeren voor de storende invloed van verschillen in overleving tussen de groepen (Peto et. al., 1980).
– Statistiek. De biostatisticus moet reeds tijdens de planningsfase bij een langdurige dierproef worden betrokken. Hierdoor kan vaak worden voorkomen dat er later moeilijkheden ontstaan bij het interpreteren en evalueren van de resultaten.
– Verzamelen, verwerken en opslaan van resultaten. In verband met het grote aantal gegevens dat ter beschikking komt, is het gebruik van een geautomatiseerd systeem haast onontbeerlijk geworden (figuur 26). Voorts dient men over veilige archief- en magazijnruimte te beschikken, onder meer voor het bewaren van alle originele gegevens en van het formaline- en paraffinemateriaal en de histologische preparaten (Cranmer et. al., 1976).
– Veiligheidsmaatregelen. Er dienen zodanige voorzieningen te zijn dat blootstelling van de betrokken personen aan de te onderzoeken stof zoveel mogelijk wordt vermeden (figuur 27). Van belang zijn beschermende kleding, werken onder afzuiging, goede afvoer van besmette materialen, instructies over hoe te handelen bij een ongeluk en periodiek medisch onderzoek (IARC, 1980).

Fig. 26. Patholoog die zijn microscopische waarnemingen direct vanachter de microscoop in de computer brengt.

– Verantwoordelijkheden. Naast het aanwijzen van een projectleider en een plaatsvervanger dienen de verantwoordelijkheden en taken van alle betrokkenen te worden afgebakend en vastgelegd (IARC, 1980).

Voordat begonnen wordt met het interpreteren van de resultaten en zeker voordat conclusies worden getrokken, dient te worden nagegaan of de proef voldoet aan de eisen die worden gesteld aan een adequate carcinogeniteitsproef (IARC, 1980). Dit is speciaal van belang wanneer de dierproef negatief is, dat wil zeggen wanneer er geen aanwijzing is voor carcinogene activiteit van de onderzochte stof, omdat een negatief resultaat bij twee diersoorten een stof in de regel het predikaat 'niet carcinogeen' verleent (WHO, 1978).

Een van de belangrijke vragen in deze is: was de overleving voldoende lang om de proef als een chronisch onderzoek te kunnen aanmerken? In IARC (1980) wordt aangegeven dat de overleving van de controlegroep en de groep met de laagste dosis minimaal 50 % moet zijn voor de rat na 104 weken, voor de muis na 96 weken en voor de hamster na 80 weken.

Een andere vraag is: waren de doseringen niet te hoog (te ernstige toxische effecten zoals sterke groeivertraging en vroegtijdige sterfte) of te laag (geen enkele aanwijzing voor zelfs maar een gering toxisch effect van de stof)? Zijn er geen storende factoren geweest die de tumorrespons sterk hebben kunnen beïnvloeden zoals infecties, vergissingen bij de toediening van de stof, of calamiteiten ten aanzien van de huisvesting (abnormale temperaturen, storing in de voorziening van voer of drinkwater)? Door bij-

Fig. 27. Intratracheaal toedienen van een kankerverwekkende stof bij Syrische hamsters. Het toedienen gebeurt onder afzuiging. De beschermende 'wegwerpkleding' wordt slechts éénmaal gedragen. Om de kans op ongelukken en vergissingen zo klein mogelijk te maken is er naast degene die de stof toedient, een persoon die zorgt voor het narcotiseren van de dieren en een ander die zorg draagt voor het halen en terugzetten van de dieren.

voorbeeld steekproefgewijs resultaten uit verzameltabellen te vergelijken met de oorspronkelijke ruwe gegevens, kan worden vastgesteld of er geen vergissingen zijn gemaakt bij het samenbrengen van de resultaten. Voorts is van belang dat de resultaten en met name de tumorpathologie op een inzichtelijke manier zijn gerangschikt. Tekortkomingen in opzet of uitvoering van de proef moeten in het rapport worden vermeld. Zo ook de argumenten waarop de conclusie stoelt.

3.3.3 Proeven van beperkte opzet en uitvoering

Proeven die beperkter van opzet en eenvoudiger van uitvoering zijn dan de algemene carcinogeniteitsproef, worden nagenoeg altijd uitgevoerd om binnen een bepaald onderzoekproject een antwoord te geven op een specifieke vraag. De beperkte opzet kan onder meer tot uitdrukking komen in het gebruik van slechts één doseringsgroep, een relatief korte proefduur en een gering aantal dieren. Een eenvoudiger uitvoering kan inhouden dat het hematologisch en klinisch chemisch onderzoek achterwege worden gelaten en dat de histopathologie zich beperkt tot tumoren en doelwitorganen. Een positief resultaat in een dergelijke proef kan de carcinogene activiteit van een stof op overtuigende wijze aantonen; veelal zal dit betekenen dat bij een hoog percentage van de

behandelde dieren in korte tijd kwaadaardige tumoren ontstaan. Zo'n resultaat heeft een waarschuwingsfunctie en zal, met name in geval van een maatschappelijk belangwekkende stof, tot vervolgonderzoek leiden. Hierbij kunnen meerdere diersoorten betrokken zijn en er zullen nagenoeg zeker dosis-respons studies worden uitgevoerd. Een negatief resultaat in een dergelijk experiment is geen aanwijzing voor de afwezigheid van carcinogene eigenschappen bij de betrokken stof.

Bij vaststelling van een eventuele carcinogene activiteit van een stof, dienen experimenten van beperkte omvang met grote terughoudendheid te worden gehanteerd. Een van de nadelen is dat te vaak een twijfelachtig antwoord wordt verkregen. Dit kan enerzijds betekenen dat veel tijd verloren gaat alvorens maatregelen kunnen worden genomen. Dit gebeurt namelijk pas als in vervolgonderzoek carcinogene activiteit wordt bevestigd. Anderzijds kan een stof ten onrechte worden verdacht van carcinogeniteit, namelijk wanneer uit vervolgonderzoek het tegendeel blijkt.

3.3.4 Uitingsvormen van carcinogeniteit

De resultaten van een chronische dierproef kunnen tot de conclusie leiden dat de onderzochte stof carcinogeen is of dat de stof verdacht wordt van carcinogene activiteit.

Carcinogene activiteit kan zich op verschillende manieren manifesteren (Gezondheidsraad, 1979):

– Ontstaan van een of meer typen kwaadaardige tumoren in een diersoort waarbij deze tumortypen 'spontaan' zelden voorkomen. Voorbeelden van deze categorie tumoren worden gegeven in figuur 28-30.
– Verhogen van de incidentie van een of meer typen kwaadaardige tumoren.
– Verkorting van de latentietijd van een of meer soorten kwaadaardige tumoren.
– Groter aantal van één of meer soorten kwaadaardige tumoren per dier (= toeneming van hun multipliciteit).
– Ontstaan of eerder ontstaan van meer goedaardige tumoren, of althans tumoren waarvan de kwaadaardigheid ter discussie staat (bijvoorbeeld faeochromocytomen van de bijnier, parafollikelceltumoren van de schildklier).
– Elke combinatie van genoemde mogelijkheden.

De vermelde uitingsvormen zeggen in de meeste gevallen weinig over het mechanisme dat aan de carcinogene activiteit ten grondslag ligt, hoewel het eerst beschreven effect een sterke aanwijzing inhoudt dat de betrokken stof een genotoxisch carcinogeen is. Niettemin verdient het aanbeveling in alle gevallen met behulp van enkele kortdurende screeningstesten (zie 3.4) te onderzoeken of de kankerverwekkende stof al dan niet genotoxische activiteit bezit.

Resultaten van een chronische dierproef die minder duidelijke aanwijzingen, maar niettemin aanwijzingen, inhouden voor carcinogeniteit van de onderzochte stof zijn:
– verhoogde tumorincidentie na toediening van een stof in combinatie met, of voor of na verstrekking van een bekend carcinogeen (dit is dan formeel een cocarcinogeen of een promotor);
– verhoogde tumorincidentie of verkorte latentietijd bij niet geheel adequate proeven (bijvoorbeeld extreme omstandigheden van huisvesting, voedersamenstelling, temperatuur);
– uitsluitend lokale carcinogene werking na subcutane, intra-abdominale of interpleurale injectie of implantatie.

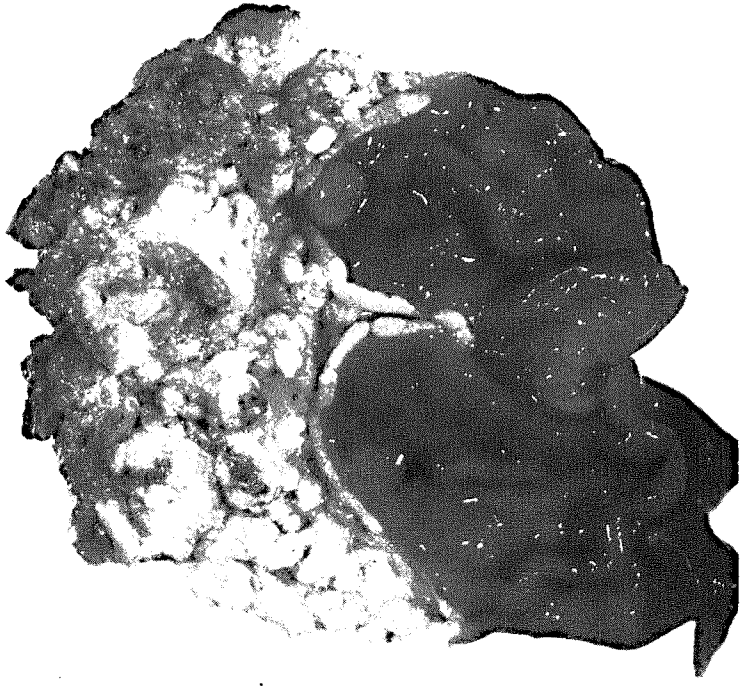


Fig. 28. Uitgebreide tumorvorming in de voormaag van een rat na orale toediening van epichloorhydrine (links voormaag, rechts niet veranderde kliermaag).

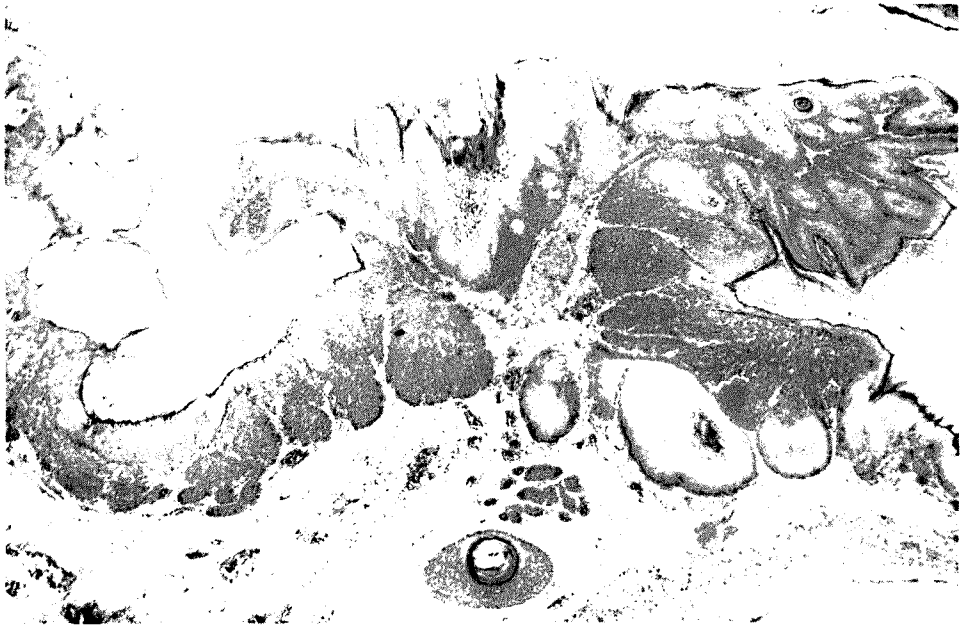


Fig. 29. Microscopisch beeld van de in figuur 28 afgebeelde voormaagtumor (papillifeer plaveiselcelcarcinoom). Opvallend is de wratachtige uitgroei en de invasieve groei in de onderliggende weefsels (× 32).

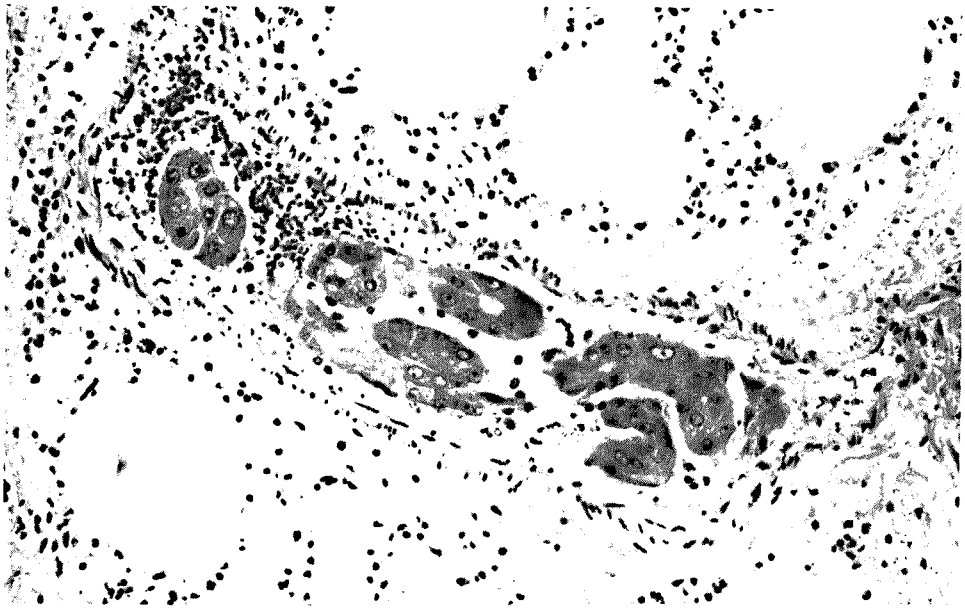


Fig. 30. Het vermogen van een tumor tot metastaseren wordt beschouwd als een teken van kwaadaardigheid. Afgebeeld is een van een levertumor afkomstige uitzaaiing in (een bloedvat van) de long (× 200).

Wanneer één van de genoemde effecten in een experiment wordt gevonden, dient de betrokken stof in een meer op de stof toegespitst, en veelal meer adequaat, testsysteem verder te worden onderzocht om zodoende te komen tot het bevestigen of het ontzenuwen van de verdenking van carcinogeniteit (Gezondheidsraad, 1979).

3.3.5 Aanvullend onderzoek

Indien in slechts één experiment kankerverwekkende eigenschappen van een stof worden aangetoond, zal het resultaat in aanvullend onderzoek al of niet bevestigd dienen te worden. Bijna altijd zal aanvullend onderzoek ook nodig zijn om vast te stellen of we met een genotoxisch (volledig) carcinogeen of met een carcinogeen met een ander werkingsmechanisme te maken hebben. Verschillende soorten aanvullend onderzoek zijn mogelijk (Gezondheidsraad, 1979):

a. een nieuwe chronische proef met een andere diersoort of met dezelfde diersoort, maar met dieren van een andere stam of andere kolonie, of met een langere blootstellingstijd, of met een wijze van toedienen die meer overeenkomt met de manier waarop de mens met de stof in contact komt,

b. nagaan of de stof mutageen is of direct bepalen of deze een interactie met DNA kan aangaan.

Het onder b genoemde onderzoek ligt het meest voor de hand, omdat een positief resultaat direct wijst op een genotoxische werking en de stof in de regel geclassificeerd dient te worden als een volledig carcinogeen. In 3.4 wordt nader ingegaan op de vele mogelijkheden van dit onderzoek.

Is het resultaat van het onder b genoemde onderzoek negatief, dan dient nader onderzocht te worden op welk werkingsmechanisme de carcinogeniteit van de betrokken stof zou kunnen berusten. De belangrijkste mogelijkheid lijkt een promotoreffect te zijn (vgl. 2.10). Hierbij valt te denken aan:

– Niet-specifieke prikkeling. Hieronder wordt verstaan chronische irritatie van een weefsel, bijvoorbeeld door cytotoxiciteit, die leidt tot een steeds terugkerend proces van celverval. Dit gaat gepaard met weefselregeneratie: een verhoogde DNA-synthese en vorming van nieuwe cellen. Voorbeelden zijn implantatie van vaste stof, glasvezels en mogelijk asbest, het ontstaan van huidkanker in littekens van brandwonden, kanker van de dikke darm bij patiënten met chronische colitis (darmontsteking), leverkanker bij mensen met levercirrose en de relatie tussen galstenen en galblaaskanker. Bij proefdieren kan worden genoemd het ontstaan van blaasstenen, die op hun beurt leiden tot hyperplasie van het bekledend epitheel van de urineblaas en niet zelden uiteindelijk tot blaastumoren (Flaks et al., 1973).

– Selectieve prikkeling. Er zijn stoffen zoals fenobarbital, dioxine, DDT en dieldrin die in bepaalde organen (veelal de lever) een scala van microsomale en andere enzymactiviteiten induceren en er de DNA-synthese bevorderen. Dit komt tot uiting in een zekere hypertrofie (grotere cellen) en hyperplasie (meer cellen). In daartoe geschikte systemen vertonen deze verbindingen een sterke promotoractiviteit. In het geval van een zeer sterke promotor als dioxine ontstaan ook (lever)tumoren, zonder dat bewuste tumorinitiatie heeft plaatsgevonden. Er wordt aangenomen dat reeds aanwezige, geïnitieerde cellen tot uitgroei gestimuleerd worden. Deze geïnitieerde cellen kunnen geïnduceerd zijn door zeer kleine hoeveelheden in het voedsel voorkomende of in het lichaam gevormde volledige carcinogenen of initiatoren.

– Verstoring van de hormonale balans. Wijzigingen in spiegels van bepaalde hormonen beïnvloeden de vorming van bepaalde tumoren in hormoongevoelige organen sterk. Zo'n wijziging kan tot stand komen door extra hormoon of een hormoon-analogon toe te dienen of door een hormoonproducerend weefsel te stimuleren, te remmen of operatief te verwijderen. De aanwezigheid van hormoon leidt tot verhoogde activiteit van het doelwitorgaan: enzyminductie, eiwitsynthese, celproliferatie en – bij overstimulatie – zelfs hyperplasie. Hormonen geven geen DNA-schade en hun effecten lijken op promotorwerking te berusten (vgl. 2.10).

– Effecten op het immuunsysteem. In de 'immune surveillance theory' werd gesteld dat zeer veel tumoren in een zeer vroeg stadium van hun ontstaan door een bewakingsmechanisme worden herkend en onschadelijk gemaakt. Deze theorie is inmiddels verlaten; slechts voor het ontstaan van huidtumoren zijn er aanwijzingen dat tumoren daar ontstaan waar een immunologische drempel wegvalt. Tumorvorming door een aantal immuunsuppressieve agentia kan op aannemelijker wijze verklaard worden via effecten op de cellen van het immuunapparaat zelf (bij lymfoomvorming) of uit de genotoxische eigenschappen van sommige immuunsuppressiva.

3.4 Kortdurende testen

3.4.1 Inleiding

De aanduiding van stoffen als carcinogeen is traditioneel gebaseerd op inductie van tumoren in langdurige, vaak de hele levensduur in beslag nemende, experimenten met laboratoriumdieren (vgl. 3.3). De laatste jaren zijn ook kortdurende methoden ter beschikking gekomen, waarmee potentieel carcinogene stoffen snel kunnen worden opgespoord.

Het ontstaan van kanker wordt tegenwoordig beschouwd als een meerstapsproces (vgl. 2.3). De eerste, essentiële, stap in de carcinogenese is een modificatie van DNA door UV, ioniserende straling, een chemische interactie met een elektrofiele verbinding of een fout bij de DNA-replicatie, waaruit een somatische mutatie ontstaat. Hierbij vindt initiatie plaats tot een onvolledige kankercel. Dit proces is irreversibel. Deze cel kan vervolgens uitgroeien tot een tumor. Een tumor vormt een eindstadium van een hele ontwikkeling en kan ook ontstaan door promotie van al bestaande, niet opzettelijk geïnitieerde cellen.

Kortdurende testen voor het opsporen van stoffen met potentieel carcinogene eigenschappen berusten op mutageniteit, celtransformatie of op het op een of andere wijze vaststellen van interactie met DNA.

De laatste 20 jaar is een uitgebreid scala van kortdurende testen ontwikkeld. Met een aantal hiervan bestaat in meerdere laboratoria een zodanige ervaring en overeenstemming van verkregen resultaten, dat deze algemeen geaccepteerd worden als betrouwbare testen. Uit recente rapporten (Hollstein et al., 1979; De Serres & Ashby, 1981) blijkt dat er een sterke correlatie bestaat tussen de mutagene en carcinogene eigenschappen van stoffen. Afhankelijk van de gebruikte testen en de selectie van de geteste verbindingen blijkt dat 60-90 % van de carcinogene stoffen eveneens mutageen is. De niet-initiërende carcinogenen zullen in mutageniteitstesten geen effect veroorzaken en kunnen langs deze weg in principe niet worden aangetoond.

De goed geëvalueerde testmethoden met bacteriën, zoogdiercellen en insekten worden bij voorkeur gebruikt voor screeningsdoeleinden. Van een 'beste' test kan niet worden gesproken; elk systeem heeft zijn zwakke punten en vaak specifieke (over)gevoeligheden, die maar ten dele bekend zijn. Mede hierdoor bestaat er een kans op het verkrijgen van fout-positieve en fout-negatieve resultaten. Alleen een combinatie van verschillende methoden in een zogenaamde testbatterij maakt de kans op foute resultaten aanvaardbaar klein.

Voor de waarde van screeningstesten worden drie criteria gehanteerd:
- gevoeligheid: de fractie correct geïdentificeerde carcinogenen;
- specificiteit: de fractie correct geïdentificeerde niet-carcinogene verbindingen;
- voorspellende waarde: het aantal carcinogenen onder het aantal in de test positief bevonden verbindingen. De voorspellende waarde is sterk afhankelijk van het aantal carcinogene verbindingen in de serie geteste stoffen. Bij de beoordeling van de waarde van korte screeningstesten voor carcinogeniteit zijn tevens van belang de wijze waarop carcinogeniteit wordt gedefinieerd alsmede de kwaliteit van de gegevens waarop de classificatie van carcinogeen/niet-carcinogeen is gebaseerd.

Kortdurende testen worden uitgevoerd om snel, efficiënt en relatief goedkoop de potentiële carcinogeniteit van stoffen voor zoogdieren te kunnen voorspellen. Zij kunnen bovendien inzicht verschaffen in het werkingsmechanisme van stoffen. Hierdoor kunnen stoffen die na toediening aan proefdieren in staat blijken tumoren te induceren, onderscheiden worden in wel en niet-initiërende carcinogenen.

Naast de biologische testen kan soms de moleculaire structuur een indicatie geven over al of niet aanwezige carcinogene eigenschappen. Van verschillende klassen chemische verbindingen zijn immers de functionele groepen bekend die verantwoordelijk zijn voor het carcinogene effect. Meestal kan echter alleen nadat carcinogene activiteit is vastgesteld, achteraf een initiërend effect op basis van de moleculaire structuur van de stof worden verklaard. De voorspelbaarheid van carcinogene eigenschappen uit de moleculaire structuur verschaft vooralsnog onvoldoende zekerheid, zodat deze gegevens slechts ondersteunende waarde bezitten.

3.4.2 Testbatterij

Een overzicht van de belangrijkste testsystemen en het type schade dat hiermee als eindpunt kan worden opgespoord, wordt gegeven in tabel 8. Voor een uitgebreider bespreking van bestaande testen en een gedetailleerde handleiding voor de uitvoering ervan wordt verwezen naar de desbetreffende literatuur. De beschreven testsystemen

Tabel 8. Schematisch overzicht van testsystemen naar organisme en type schade.

Micro-organismen		Insekten	Zoogdieren	Type schade/ eindpunt
prokaryoten (bacteriën)	eukaryoten (schimmels/ gisten)	geslachtscellen en somatische cellen		
Escherichia coli *Salmonella typhimurium*	*Saccharomyces cerevisiae* *Neurospora crassa* *Aspergillus nidulans*	*Drosophila melanogaster*	Zoogdiercellen in vitro	Genmutaties
		Drosophila melanogaster	Zoogdiercellen in vitro Diverse in vivo systemen (muis, rat, hamster)	Chromosoom-afwijkingen
Bacillus subtilis *Escherichia coli*	*Saccharomyces cerevisae* *Aspergillus nidulans*		Zoogdiercellen in vitro Diverse in vivo methoden	Schade aan DNA
			Zoogdiercellen in vitro	Celtransformatie
			Diverse in vivo systemen (huid en long van muis, lever en blaas van rat)	Neoplastische groei. Initiatie-promotie

worden in de praktijk vaak gecombineerd toegepast. De meeste (inter)nationale richtlijnen bevelen aan om voor het testen van stoffen een batterij van 3 à 4 testen toe te passen. Volgens de huidige inzichten zijn testen voor de detectie van genmutaties bij bacteriën en diverse eukaryotische systemen en testen voor de detectie van chromosoomafwijkingen in vitro hiervoor het meest geschikt.

De verschillende typen 'host-mediated assays', waarbij mutatiefrequenties worden bepaald van bacteriën, ingespoten in intacte, met de te testen stof behandelde zoogdieren, en in vivo testen voor chromosoomafwijkingen worden vanwege de relatieve ongevoeligheid in het algemeen niet beschouwd als geschikte screeningstesten. Deze testen kunnen bruikbaar zijn bij voortgezet onderzoek voor extrapolatie en risico-evaluatie.

3.4.3 Mutageniteitstesten

In de mutageniteitstesten worden afhankelijk van het biologische systeem genmutaties en/of chromosoomafwijkingen aangetoond (De La Inglesia et al., 1980; Anderson & Longstaff, 1981):

1. Gen- en puntmutaties. Dit zijn veranderingen op het niveau van één of enkele genen, zoals basepaarsubstituties en 'frame-shift'-mutaties. Deze zijn microscopisch niet waarneembaar.
2. Structurele en numerieke chromosoomafwijkingen. Structurele chromosoomafwijkingen ontstaan gewoonlijk ten gevolge van chromosoombreuken en kunnen in verschillende, microscopisch zichtbare typen worden onderverdeeld:

– fragmenten: stukjes chromosoom zonder centromeer; deze lopen bij een eerstvolgende deling de kans buiten de kern te komen (een z.g. micronucleus) en verloren te gaan;
– deleties: verlies van een deel van een chromosoom;
– ringchromosomen: chromosomen waarbij de beide uiteinden zich, nadat hierin een breuk is opgetreden, tot een ring verenigen;
– reciproke translocaties: onderlinge uitwisselingen tussen delen van verschillende, niet-homologe chromosomen.

Numerieke chromosoomafwijkingen ontstaan in het algemeen door non-disjunctie. Hierbij worden de chromosomen niet gelijk over de dochtercellen verdeeld.

3.4.4 DNA-interactietesten

DNA-interactietesten vormen een nogal heterogene groep. Hiermee wordt met chemische of biologische methoden de eventuele interactie van een stof met DNA aangetoond. Sommige testen constateren DNA-beschadiging op directe wijze, zoals DNA-breuken of covalente binding aan DNA. Andere testen, zoals de bepaling van DNA-herstelsynthese en de test op de uitwisseling van zusterchromatiden, tonen indirect DNA-schade aan.

3.4.5 Celtransformatie

De in vitro celtransformatietest benadert van de besproken in vitro testen waarschijnlijk het meest de processen die plaatsvinden tijdens de carcinogenese in vivo. Ook het in vitro transformatieproces blijkt een meerstapsproces te zijn.

Criteria voor het eerste stadium (morfologische transformatie) zijn voornamelijk microscopisch waarneembare fenotypische veranderingen, zoals afwijkende koloniegroei en atypische cytologie van individuele cellen. Hier wordt van morfologische transformatie gesproken. Van maligne transformatie kan pas worden gesproken, indien cellen na injectie in genetisch identieke dieren of dieren waarvan de immunologische afweer is geremd, uitgroeien tot maligne tumoren.

3.4.6 In vivo testen

Door recente ontwikkelingen lijkt het mogelijk om met behulp van kortdurend in vivo onderzoek zowel initiator- als promotoreigenschappen op te sporen. Voor initiatoren is de meeste ervaring verkregen met experimentele inductie van neoplastische leververanderingen bij ratten. Een combinatie van kortdurende blootstelling aan een carcinogene stof met een stimulus voor celdeling, bijvoorbeeld partiële hepatectomie, geeft in enige weken morfologisch waarneembare, veranderde gebieden in de lever die als voorstadia van levercelkanker worden beschouwd. Stoffen die van promotoractiviteit worden verdacht, kunnen in ditzelfde systeem worden onderzocht in combinatie met een lage, op zichzelf niet effectieve dosis van een initiator. Het betreft hier experimentele systemen waarvan de waarde als testsysteem nog moet worden bewezen.

3.4.7 Metabole activering

Zogenaamde indirecte mutagenen en carcinogenen moeten door metabole processen worden geactiveerd tot een vorm welke met het genetisch materiaal kan reageren. De aanwezigheid van een metabool activeringssysteem is dus een essentieel onderdeel bij de uitvoering van de testen. In testsystemen met micro-organismen of zoogdiercellen in vitro zijn de noodzakelijke enzymsystemen soms niet of onvoldoende aanwezig. Men kan deze activering dan bewerkstelligen door toevoeging van een enzymextract, bereid uit bijvoorbeeld ratte- of muizelever, de zogenaamde S9-fractie. De activiteit van deze fractie, waarin vooral microsomale enzymen voorkomen, kan worden verhoogd door de dieren eerst te behandelen met enzyminducerende stoffen zoals fenobarbital of een mengsel van polychloorbifenylen. Men dient echter te bedenken dat:
– een S9-fractie niet geheel representatief is voor de intacte lever;
– de activiteit in de lever niet representatief hoeft te zijn voor andere organen zoals longen of nieren;
– er tussen verschillende diersoorten grote verschillen kunnen bestaan wat betreft de metabole omzetting;
– stoffen in de lever ook kunnen worden omgezet tot inactieve metabolieten;
– ook niet-microsomale enzymen voor activering of inactivering kunnen zorgdragen.

3.4.8 Ontwikkeling van nieuwe testen

Bij de ontwikkeling van nieuwe testsystemen en verbetering van bestaande methoden ligt de nadruk vooral op het verkrijgen van gevoeliger testen, het vergroten van specificiteit en het verkrijgen van inzicht in werkingsmechanismen.

Wanneer vanuit fundamenteel onderzoek op het gebied van de (genetische) toxicologie nieuwe technieken worden gevonden die in principe als test kunnen worden ge-

bruikt, dan moet nog een lange weg worden afgelegd voordat de methode ook praktische betekenis heeft. De betrouwbaarheid van de test moet worden vastgesteld met een, liefst grote, serie goed bekende modelstoffen. Zo een serie bestaat bij voorkeur uit groepen carcinogene en analoge niet-carcinogene verbindingen die afkomstig zijn uit verschillende chemische categorieën zoals polycyclische aromatische koolwaterstoffen, *N*-nitrosoverbindingen, aromatische aminen en direct werkende alkylerende stoffen als methylmethaansulfonaat (MMS, vgl. figuur 6) en *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG).

3.4.9 Principes van verschillende testen

Detectie van genmutaties bij bacteriën Het principe van mutatietesten bij bacteriën berust op het gebruik van een selectief medium, waarop gemuteerde bacteriën wel, maar normale bacteriën niet kunnen groeien. Afhankelijk van de gebruikte bacteriestammen worden hiermee voorwaartse- of terugmutaties aangetoond. Bij de zogenaamde 'spot'-test en de plaattest vindt de blootstelling aan het mutagene agens direct op een plaat met selectief medium plaats, waarbij de te testen stof in het centrum of homogeen verdeeld over de plaat wordt toegediend. Bij de vloeistoftest en de fluctuatietest worden de bacteriën in vloeibaar medium aan de te onderzoeken stof blootgesteld; voor vluchtige of gasvormige stoffen worden de platen met selectief medium en bacteriën in gesloten vaten geplaatst, zodat de teststof door diffusie via het medium met de bacteriën in contact komt.

Voor het uitvoeren van bacterietesten wordt voornamelijk gebruik gemaakt van stammen van *Salmonella typhimurium* en in mindere mate van *Escherichia coli*-stammen (tabel 9).

Met *Salmonella typhimurium*-stammen die door Ames zijn ontwikkeld, worden terugmutaties opgespoord. Deze stammen hebben histidine als groeifactor nodig omdat zij dit aminozuur niet meer zelf kunnen maken. Wanneer een terugmutatie optreedt, hebben zij histidine niet meer als groeifactor nodig. Voordat een mutatie tot expressie

Tabel 9. Stammen van *Salmonella typhimurium* en *Escherichia coli.*

Stam	Gedetecteerde mutatie	Bijzonderheden
S.typh. TA 1535	basepaarsubstitutie	hersteldeficiënt
S.typh. TA 1537	'frame shift' mutatie	hersteldeficiënt
S.typh. TA 1538	'frame shift' mutatie	hersteldeficiënt
S.typh. TA 98	'frame shift' mutatie	hersteldeficiënt is TA 1538 + R-factor[1]
S.typh. TA 100	basepaarsubstitutie	hersteldeficiënt is TA 1535 + R-factor[1]
E.coli B/r WP2	basepaarsubstitutie	herstelproficiënt
E.coli B/r WP2 uvrA	basepaarsubstitutie	hersteldeficiënt
E.coli K12 343/113	'frame shift' mutatie basepaarsubstitutie deleties	herstelproficiënt

1. De R-factor (pKM 101) is een plasmide (extra-chromosomaal stukje DNA) dat de bacterie extra gevoelig maakt voor straling en een aantal chemische agentia.

kan komen, moet de cel zich nog enkele malen kunnen delen. Daarom zit in het selectiemedium een kleine hoeveelheid histidine, waardoor de op de plaat gebrachte (10^8) bacteriën zich nog enkele malen kunnen delen. Daarna is het histidine verbruikt en kunnen alleen de terugmutanten zich nog delen en kolonies vormen. Indien op de platen met de te onderzoeken stof meer van dergelijke kolonies worden aangetroffen dan op de platen zonder deze stof, moet deze stof als mutageen worden beschouwd. Een aantal van bovengenoemde stammen bezit niet meer het ultraviolet-specifieke endonuclease (uvrB) en is door deze hersteldeficiëntie ook gevoeliger geworden voor tal van mutagene stoffen. Voorts zijn de in tabel 9 genoemde *Salmonella*-stammen als gevolg van een rfa⁻-mutatie niet meer in staat om kapselpolysacchariden te vormen, waardoor veel stoffen nu de cel kunnen binnendringen.

De *Escherichia coli*-stammen B/r WP2 en B/r WP2 uvrA detecteren terugmutaties in het tryptofaangen. Met de stam K12 343/113 kunnen tegelijkertijd terugmutaties in het argininegen, het nicotinezuurgen en het galactose-regulatorgen gedetecteerd worden, alsmede voorwaartse mutaties in twee genen die de galactosefermentatie reguleren en in vijf genen die betrokken zijn bij de stofwisseling van tryptofaan (geselecteerd wordt op resistentie tegen methyltryptofaan).

Het voordeel van bacteriën is de snelle vermeerdering waardoor binnen korte tijd vele (generaties) cellen kunnen worden verkregen. Een nadeel vormen de grote verschillen die tussen bacteriën en zoogdieren bestaan; deze betreffen vooral de organisatie van het erfelijk materiaal (o.a. de chromosoomstructuur), de stofwisseling en de afwezigheid van mitochondriën en van het Golgisysteem.

Voor routine-screening wordt meestal de plaattest met *Salmonella typhimurium*, ook wel Ames-test genoemd, gebruikt. De reeds eerder genoemde 'spot'-test blijkt in de praktijk minder gevoelig te zijn dan de plaattest. Voorts zijn er enkele stoffen waarvan een mutagene werking alleen in de nogal bewerkelijke vloeistoftest kan worden aangetoond. Bij deze testen kan al dan niet de metabole activering met behulp van S9-fracties worden toegepast. Met deze Ames-testen zijn tot op heden een groot aantal (circa 2600) stoffen geëvalueerd. Ames vond dat ongeveer 90 % van de bij zoogdieren carcinogene stoffen ook mutageen was.

Bij vergelijkende onderzoekingen op verschillende laboratoria is gebleken dat de resultaten van de Ames-test door diverse experimentele omstandigheden kunnen worden beïnvloed, zoals het aantal bacteriën per plaat, de kweekcondities, de kwaliteit van de S9-fracties, enzovoort. Daarom moeten bij ieder experiment positieve controles worden gebruikt. Zo kan natriumazide als controle voor basepaarsubstituties en 9-aminoacridine voor frameshift-mutaties worden toegepast. Als controle voor de stammen TA 98 en TA 100 wordt 2-nitrofluoreen gebruikt. De activiteit van de S9-fracties wordt meestal met 2-aminoanthraceen nagegaan.

Met de Ames-test kunnen ook fout-positieve resultaten voorkomen; op de selectieplaat kunnen kolonies groeien omdat bijvoorbeeld terugmutatie optreedt van rfa⁻-mutanten (geen vorming van kapselpolysacchariden). Deze bacteriën hebben dan wel een polysaccharidekapsel en zijn hierdoor ongevoeliger voor de teststof. Omdat hun aantal meestal gering is, kunnen zij voor hun groei gebruik maken van het in kleine hoeveelheden aanwezige histidine in het histidine-arme selectiemedium. Bij nader onderzoek blijken deze kolonies dan toch uit bacteriën te bestaan die histidine voor hun groei nodig hebben. Een andere mogelijkheid is dat het merendeel van de bacteriën door een toxische werking van de teststof wordt gedood. De overlevende bacteriën kunnen dan

ogenschijnlijk uitgroeien als terugmutaties in histidine-vrij medium, maar zijn in werkelijkheid histidine-behoeftige bacteriën die gebruik maken van het feit dat er per bacterie te veel histidine aanwezig is, waardoor zeer veel delingen kunnen plaatsvinden. Ook moet worden vermeld dat de te onderzoeken stoffen of mengsels histidine-vrij dienen te zijn.

Detectie van genmutaties in zoogdiercellen in vitro Het principe van mutatietesten met zoogdiercellen in vitro berust, evenals bij bacterietesten, op selectie van gemuteerde cellen. Het is thans mogelijk om uit verschillende zoogdiercellijnen, onder andere van de Chinese hamster, muis en mens, verschillende typen mutanten te isoleren. Tot deze typen behoren auxotrofe, prototrofe en temperatuurgevoelige mutanten alsmede mutanten die resistent zijn tegen een bepaalde stof bijvoorbeeld tegen purine-analogen, ouabaïne of actinomycine. Met deze methoden worden voorwaartse mutaties gedetecteerd en de verandering ligt op het niveau van specifieke genen en is derhalve microscopisch niet zichtbaar.

Het mutantenselectiesysteem dat momenteel het best onderzocht is en ook de grootste verspreiding heeft is het HGPRT-selectiesysteem. Het principe hiervan is in figuur 31 weergegeven.

Het gen dat codeert voor het enzym HGPRT, hypoxanthine-guanine-fosforibosyltransferase, is gelegen op het X-chromosoom. Dit enzym is betrokken bij het purinemetabolisme, met name bij de vorming van nucleotiden. De cel heeft voor de synthese van nucleotiden twee mogelijkheden ter beschikking:

– de 'de novo' synthese uit aminozuren en suikers;
– de 'salvage pathway', die in feite een hergebruik van purinebasen is, met behulp van het enzym HGPRT.

Wordt nu in plaats van het normale enzymsubstraat guanine een analogon, bijvoorbeeld 6-thioguanine, aan het kweekmedium toegevoegd, dan wordt dit analogon eveneens in het corresponderende nucleotide omgezet en inbouw hiervan in het DNA van de cel leidt tot celdood. Slechts die cellen die geen HGPRT-activiteit bezitten, zullen geen hinder ondervinden van het purine-analogon, en zij zullen groeien, aangezien de 'de novo' synthese intact is. Op deze wijze kunnen met behulp van 6-thioguanine als selecterend agens, HGPRT-deficiënte mutanten uit een celpopulatie geïsoleerd worden. Op min of meer identieke wijze kunnen thymidinekinase-deficiënte mutanten geïsoleerd worden door in plaats van thymidine een analogon, namelijk broomdeoxyuridine aan het kweekmedium toe te voegen (figuur 32). Het gen dat codeert voor thymidinekinase is gelegen op een autosoom (een niet-geslachtsgebonden chromosoom). Door mutaties op enkele genetische markers gelijktijdig te bepalen, is het mogelijk de schade

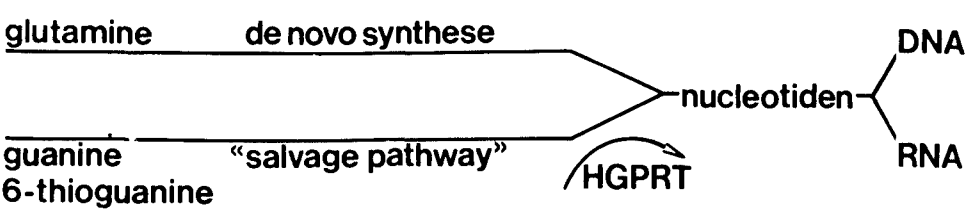


Fig. 31. Biochemische achtergrond van het HGPRT (hypoxanthine-guanine-fosforibosyltransferase)-selectiesysteem.

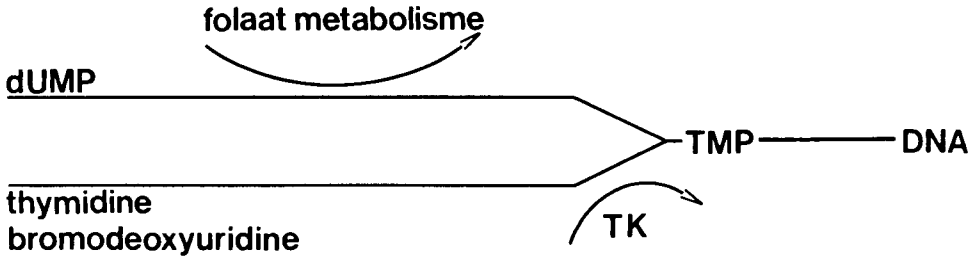


Fig. 32. Biochemische achtergrond van het TK (thymidinekinase)-selectiesysteem.

die in een cel door een mutagene behandeling wordt geïnduceerd, meer betrouwbaar vast te stellen.

Bij de uitvoering van de test worden de cellen in suspensie of in monolayer voor een bepaalde tijdsperiode aan de te onderzoeken stof blootgesteld. Aangezien zoogdiercellen in vitro grotendeels hun metabole capaciteit verloren hebben, dient een exogeen systeem voor metabole activiteit te worden toegepast, bijvoorbeeld S9-mix of intacte levercellen. De toxiciteit van de stof voor de cellen blijkt uit de mate van kolonievorming en/of celgroei.

Na de behandeling worden de cellen gedurende een aantal dagen – afhankelijk van de genetische marker – doorgekweekt in groeimedium. Dit is de expressietijd, waarin alle mutanten die door de behandeling zijn geïnduceerd fenotypisch tot expressie kunnen komen. Na de expressietijd worden de cellen uitgezaaid in a) medium met het selec-

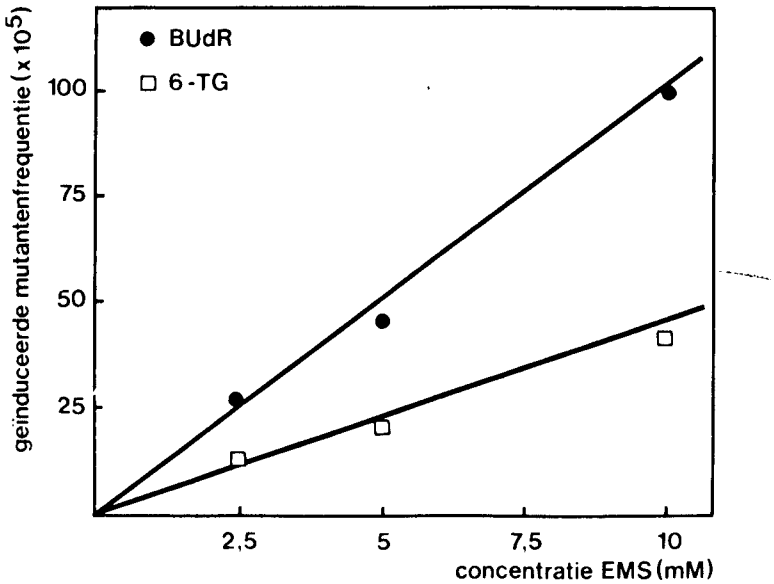


Fig. 33. Dosis-effect relatie voor de inductie van mutaties in L5178Y muizelymfoomcellen na behandeling met ethylmethaansulfonaat (EMS).

terend agens voor de selectie van mutanten en b) normaal groeimedium voor de bepaling van de levensvatbaarheid van de cellen. Na een incubatieperiode (8-12 dagen) worden de kolonies geteld en kan de mutatiefrequentie berekend worden.

De inductie van mutaties op twee genen in muizelymfoomcellen na behandeling met ethylmethaansulfonaat (EMS) is weergegeven in figuur 33. Voor elk van de twee loci wordt een lineaire dosis-effect relatie gevonden, waarbij de inductie op het gen TK ongeveer tweemaal zo hoog blijkt te liggen als voor HGPRT.

Tengevolge van het vele ontwikkelingswerk dat in de afgelopen jaren verricht is met de verschillende cellijnen en genetische markers, neemt het mutatieselectiesysteem met zoogdiercellen in vitro thans een volwaardige plaats in in een batterij van kortdurende testen voor genotoxische activiteit.

Mutageniteitstesten met insekten De bananevlieg *Drosophila melanogaster* is sinds 1910 een geliefd proefobject bij het erfelijkheidsonderzoek. De geschiktheid van *Drosophila* voor het aantonen van mutageniteit van stoffen berust ondermeer op de bekendheid van de genetische kaart en de beschikbaarheid van vele genetische varianten. Hierdoor is het opsporen van verschillende soorten genmutaties en chromosoomafwijkingen mogelijk.

Van de verschillende technieken voor het opsporen van mutagene stoffen die met *Drosophila* kunnen worden uitgevoerd, is de test op geslachtsgekoppelde recessief-letale mutaties de meest gevoelige. Deze test detecteert genmutaties en bepaalde typen chromosoomafwijkingen op het X-chromosoom. Dit chromosoom omvat 1/5 van het haploïde genoom. Van de ongeveer 1000 genen op het X-chromosoom kunnen er circa 750 tot recessief-letaal gemuteerd worden, zodat deze test veranderingen in een groot aantal genen kan opsporen.

Bij de uitvoering van deze test worden in de regel volwassen mannelijke vliegen via voeding, inhalatie of injectie blootgesteld aan de te testen stof. Ook kunnen larven via het voedsel worden blootgesteld. Na kruising van de behandelde P_1 vliegen wordt 2 generaties later (F_2) getoetst op de aan- of afwezigheid van bepaalde segregatieklassen. Door mannelijke vliegen op verschillende tijdstippen na de behandeling te laten paren kunnen verschillende stadia van de spermatogenese afzonderlijk worden onderzocht en kunnen dus verschillen in gevoeligheid tussen kiemcelstadia worden vastgesteld.

Figuur 34 toont het kruisingsschema van de recessief-letaaltest (Muller-5- of Basc-test). Alleen de geslachtschromosomen zijn getekend (XY voor ♂♂; XX voor ♀♀). De essentiële kenmerken van dit schema zijn:

– Het X-chromosoom van de behandelde P_1-vader is altijd van het X-chromosoom van de P_1-moeder te onderscheiden doordat op het laatste (aangeduid als 'Basc') het semi-dominante kenmerk 'B' (smal oog) ligt.

– Eén F_2-cultuurbuisje correspondeert met één vrouwtje in de F_1-generatie, en dit weer met één spermacel van de P_1-vader.

– Wanneer dus in een X-chromosoom van een spermacel van de P_1-vader een recessief letale mutatie (L) optreedt, zal deze mutatie in alle cellen van het corresponderende F_1-vrouwtje aanwezig zijn (dit vrouwtje overleeft omdat zij twee X-chromosomen bezit en de letale mutatie recessief is) en vervolgens in alle F_2-zonen van dit vrouwtje welke het desbetreffende (niet met 'B' gemerkte) chromosoom krijgen toebedeeld. Aangezien deze F_2-zonen slechts één X-chromosoom bezitten zal de letale mutatie bij hen zijn dodelijke effect manifesteren. In zo'n geval zullen in het desbetreffende cultuurbuisje

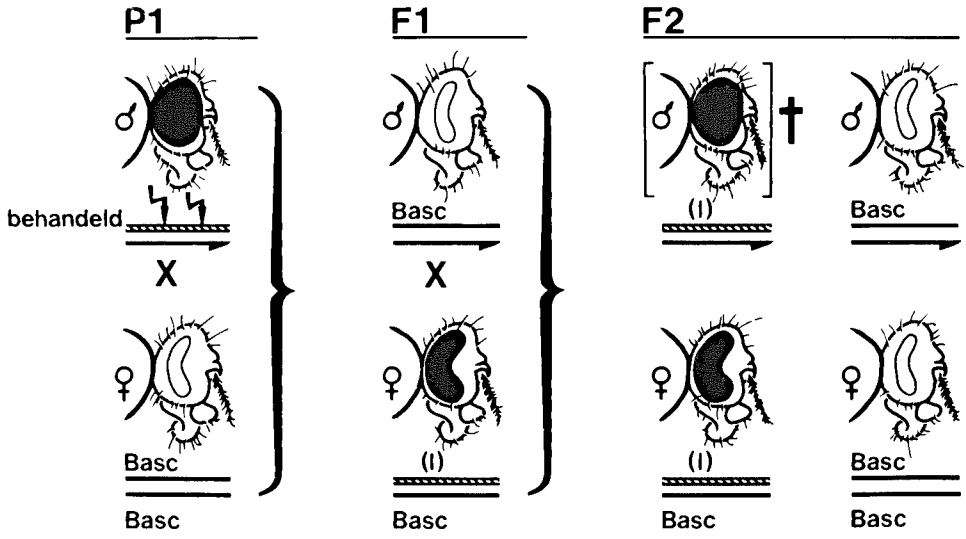


Fig. 34. Kruisingsschema van de Muller-5-test.

de normaal wel aanwezige mannetjes met ronde ogen ontbreken. Het percentage buisjes zonder mannetjes met ronde ogen is normaal circa 0,2 %. Een verhoging duidt op mutageniteit van de geteste stof.

Omdat fout-positieve resultaten bij deze test nauwelijks voorkomen, heeft een positief resultaat een grote voorspellende waarde ten aanzien van mogelijke carcinogeniteit. *Drosophila* toont in zijn metabolisme van lichaamsvreemde stoffen grote overeenkomst met zoogdieren. Er is onder meer cytochroom-P450-activiteit aangetoond. Bovendien zijn veel indirect werkende mutagene stoffen zoals vinylchloride, nitrosaminen en triazenen bij *Drosophila* positief. Voor het aantonen van de effecten van polycyclische aromatische koolwaterstoffen en sommige aromatische aminen is *Drosophila*, om nog niet opgehelderde redenen, minder gevoelig en zijn speciale stammen of condities nodig. Veel van het chemische mutagenese-onderzoek met *Drosophila* gaat verder dan het testen van stoffen. Recente onderzoekingen hebben meer inzicht opgeleverd, niet alleen aangaande de rol van metaboliserende enzymen maar ook over de vorming van DNA-adducten en de rol van DNA-herstel, alsmede over de wijze waarop deze factoren tot een voor de stof specifiek patroon van geïnduceerde genetische veranderingen leiden.

Detectie van chromosoomafwijkingen in zoogdiercellen in vitro Deze testen berusten op de registratie van microscopisch waarneembare chromosoomveranderingen in continue cellijnen, bijvoorbeeld Chinese-hamstercellen, of kortdurende (primaire) culturen van (meestal menselijke) lymfocyten. Veel laboratoria prefereren voor screeningsdoeleinden een van de Chinese hamster afkomstige ovariumcellijn (CHO-cellen), omdat deze in tegenstelling tot bijvoorbeeld cellen van rat en muis een gering aantal (22), goed individueel herkenbare chromosomen heeft, zodat microscopisch onderzoek minder omvangrijk is. De behandeling met de te testen stoffen vindt plaats door blootstel-

ling van de cellen in suspensie of monolayer. De chromosomen worden meestal onderzocht in de metafase (metafasetest).

Evenals bij andere testsystemen kunnen bij de cytogenetische technieken homogenaten van lever of andere organen van zoogdieren worden gebruikt voor de activering van indirect werkende agentia.

Cytogenetische methoden zijn mogelijk minder gevoelig dan gen(= punt)-mutatietesten met bacteriën en zoogdiercellen. Betrekkelijk hoge concentraties van een potentieel genotoxische stof moeten worden toegepast om aberraties te kunnen induceren.

Bij de test met CHO-cellen worden in monolayer groeiende cellen gedurende een cyclus (10-12 uur) blootgesteld aan een reeks doseringen van de te testen stof. Vervolgens wordt door toevoeging van colcemid de mitose in de metafase tot stilstand gebracht waarna de cellen op voorwerpglaasjes worden gekleurd en onderzocht.

Voor een goede statistische analyse dient een groot aantal (100-300) cellen per behandelingsgroep te worden gescoord. Dit maakt dat cytogenetisch onderzoek tijdrovend is. Bovendien is het ook bij cytogenetisch onderzoek een vereiste om gelijktijdig een negatieve en positieve controlestof te testen voor een juiste evaluatie van de resultaten van de te testen stof. De resultaten van de cytogenetische test met CHO-cellen correleren in hoge mate met de carcinogeniteit van de onderzochte stoffen.

Testen op Sister Chromatid Exchanges (SCE's) in vitro Een elegante, gevoelige en betrekkelijk eenvoudig uit te voeren test is die op SCE's. Deze test berust op de registratie van een reciproke uitwisseling tussen zusterchromatiden van een chromosoom. Het

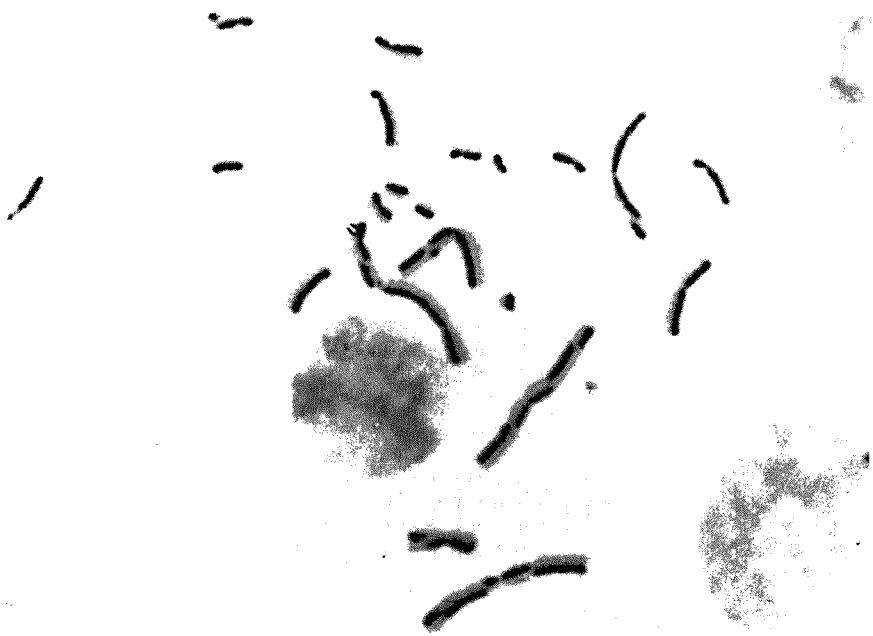


Fig. 35. SCE's in Chinese-hamstercellen (CHO) na behandeling met methylnitrosoureum (MNU) (× 2400).

mechanisme waarmee deze uitwisseling tot stand komt is niet duidelijk. Aangenomen wordt dat voor het ontstaan van een SCE een chromosoombreuk nodig is, waarbij mogelijk DNA-herstelprocessen een rol spelen. De bij het ontstaan van SCE's en chromosoomafwijkingen betrokken mechanismen zijn, tenminste gedeeltelijk, verschillend. De uitwisselingen van chromatiden zijn slechts waarneembaar wanneer de beide zusterchromatiden door verschil in kleuring kunnen worden onderscheiden. In principe kan de test met veel verschillende soorten cellen worden uitgevoerd. Chinese-hamstercellen (CHO) en humane lymfocyten worden echter het meest gebruikt (figuur 35).

Door CHO-cellen enige tijd te laten groeien in aanwezigheid van het thymidine-ana-

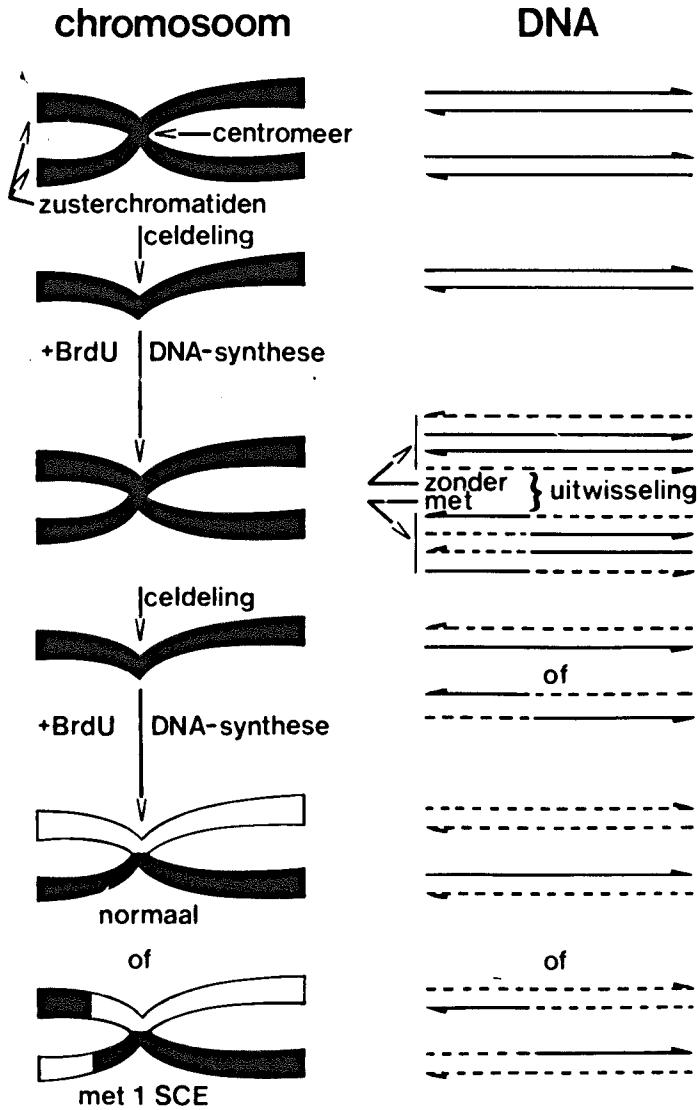


Fig. 36. Het zichtbaar maken van uitwisselingen tussen zusterchromatiden (SCE's).

logon broomdeoxyuridine (BrdU) wordt deze verbinding in plaats van thymidine in het nieuw gesynthetiseerde DNA ingebouwd. Bij cellen die twee cycli DNA-synthese hebben doorgemaakt in aanwezigheid van BrdU kunnen uitwisselingen worden waargenomen, omdat hierbij de beide chromatiden van één chromosoom een verschillende hoeveelheid BrdU hebben ingebouwd (figuur 36). Het broom zorgt voor uitdoving van de fluorescentie van de gebruikte chromosoomkleurstof. In de preparaten wordt vervolgens gezocht naar chromosomen die in beide chromatiden een verschillende hoeveelheid BrdU hebben ingebouwd. Een idee omtrent de gevoeligheid van het systeem kan worden verkregen wanneer men in preparaten van dezelfde cultuur zowel een kleuring uitvoert voor een conventionele chromosomenanalyse als voor het opsporen van SCE's.

Testen op DNA-schade & -herstel in vitro Beschadiging van DNA geeft in de cel aanleiding tot verschillende reacties, waaronder de remming van de normale DNA-synthese en het optreden van herstelprocessen. Door het meten van deze reacties kan worden bepaald of een stof schade aan het DNA toebrengt en dus ook mutageen zou kunnen zijn. Voor de routinematige bepaling van interactie met DNA komen twee methoden in aanmerking: het meten van de 'herstelsynthese', ook wel 'unscheduled DNA synthesis' (UDS) genoemd en het detecteren van breuken in DNA.

Bij de eerste methode meet men de vervanging van beschadigde gedeelten van het DNA door nieuw gesynthetiseerd DNA. Dit proces kan ook plaatsvinden in de periode van de celcyclus waarin normaliter geen DNA-synthese wordt uitgevoerd. Met behulp van bijvoorbeeld autoradiografie kan de inbouw van radioactief thymidine in het DNA van afzonderlijke celkernen die geen normale DNA-synthese ondergaan, worden gemeten.

De tweede methode geeft informatie over de inductie van enkelstrengsbreuken in het DNA en hun daaropvolgende verwijdering tijdens het herstelproces. Het aantal breuken dat door de reactie met het agens in het DNA is ontstaan, kan worden bepaald door bijvoorbeeld sedimentatie-analyse van het DNA op alkalische suikergradiënten of met een zogenaamde alkalische elutiemethode waarbij intact hoogmoleculair DNA op een filter blijft zitten, terwijl kleine DNA-fragmenten geëlueerd en vervolgens bepaald kunnen worden. Door na behandeling met de te testen stof de cel enige tijd in normaal medium door te kweken kan men nagaan of de breuken weer worden hersteld. De autoradiografische bepaling van DNA-herstelsynthese (UDS) en het meten van breuken in DNA blijken (nog) onvoldoende specifiek en/of gevoelig te zijn om als routinescreening te kunnen gelden.

Remming van DNA-synthese wordt als een aspecifieke reactie beschouwd. Deze hoeft niet noodzakelijk door DNA-beschadiging te worden veroorzaakt, maar kan ook door effecten van stoffen op de energiehuishouding van de cel worden veroorzaakt.

De testen kunnen worden uitgevoerd in verschillende celsystemen in vitro, terwijl ook methoden onderzocht worden waarbij in vivo blootstelling plaatsvindt en in vitro de DNA-schade wordt bepaald.

Celtransformatie in vitro De processen die plaatsvinden bij het ontstaan van kanker in het intacte zoogdier, de diverse stappen vanaf initiatie via de opeenvolgende reeks van genotypische en fenotypische veranderingen, worden waarschijnlijk door celtransformatie in vitro het meest benaderd.

Bij celtransformatie in vitro zijn met initiatie en promotie vergelijkbare processen

Fig. 37. Niet-getransformeerde embryonale Chinese-hamstercellen.

Fig. 38. Getransformeerde embryonale Chinese-hamstercellen.

betrokken. Hoewel over het mechanisme van celtransformatie betrekkelijk weinig bekend is, heeft deze methode een geheel eigen plaats in het systeem van voorspellende testen voor carcinogeniteit.

Het meest gebruikte criterium voor morfologische transformatie is een karakteristiek groeipatroon van de cellen in kolonies, zoals 'piling up' en 'criss-cross' groei van cellen. Dit is een verwarde, ongecontroleerde wijze van koloniegroei, waaruit blijkt dat een verlies van groei- en contactremming is geïnduceerd (figuur 37 en 38).

Bij verdere passage van deze cellen ontstaan meer kenmerken die verband houden met maligniteit zoals het vermogen om tumoren en metastasen te geven na injectie van deze cellen in daartoe geschikte dieren (maligne transformatie).

Menselijke cellen zijn theoretisch het meest ideaal voor transformatietesten, maar routinemethoden met deze cellen zijn nog onvoldoende bruikbaar. Voor routine zijn vier of vijf geschikte systemen in gebruik waarbij vooral mesenchymale cellen, zowel primaire cellen als cellijnen worden gehanteerd. De primaire mesenchymale cellen worden verkregen van hamsterembryo's. Verder zijn enige goed bekende cellijnen afkomstig van rat, muis of hamster beschikbaar. De voornaamste moeilijkheid van transformatiesystemen is de geringe reproduceerbaarheid van de methoden in verschillende laboratoria. Voor epitheliale cellen bestaan nog geen goede transformatiecriteria.

4 Evaluatie van carcinogeniteit

Bij de evaluatie van de eventuele carcinogeniteit van een chemische verbinding komen twee verschillende vragen aan bod. In de eerste plaats de vraag of de betreffende verbinding als een carcinogeen beschouwd moet worden; dit is de zogenaamde kwalitatieve evaluatie. De tweede vraag betreft de kwantitatieve aspecten zoals extrapolatie en risicoschatting; hierbij wordt uiteindelijk getracht zo nauwkeurig mogelijk vast te stellen welk risico de mens loopt ten gevolge van blootstelling aan een carcinogene verbinding (National Cancer Advisory Board, 1977; Interagency Regulatory Liaison Group, 1979).

4.1 Kwalitatieve evaluatie

Er zijn drie soorten aanwijzingen die gebruikt kunnen worden om stoffen met een kankerrisico te identificeren:
- epidemiologische gegevens;
- dierexperimentele gegevens bij voorkeur verkregen uit langdurig onderzoek;
- gegevens afkomstig uit screeningstesten, bijvoorbeeld op mutageniteit.

4.1.1 Epidemiologische gegevens

Carcinogeniteit van een stof voor de mens kan in principe alleen worden vastgesteld door epidemiologisch onderzoek bij de mens. Hierbij moet een verhoogde incidentie of een kortere latentieperiode van één of meer vormen van kanker aangetoond worden bij een groep blootgestelde mensen. Van verschillende stoffen is door epidemiologisch onderzoek bij de mens de carcinogene werking ontdekt (zie tabel 6). Positieve epidemiologische gegevens vormen een zwaarwegende aanwijzing dat er een verband bestaat tussen blootstelling aan een verbinding en het carcinogene effect. Het is echter moeilijk aan te tonen dat de verhoogde tumorincidentie ook rechtstreeks is veroorzaakt door de blootstelling. Negatieve epidemiologische gegevens dienen uiterst voorzichtig te worden geïnterpreteerd. Goed uitgevoerd negatief onderzoek kan echter, zeker wanneer positief dierexperimenteel onderzoek beschikbaar is, worden gebruikt in samenhang met expositiegegevens om de bovengrenzen vast te stellen van het risico dat de mens zou kunnen lopen.

4.1.2 Dierexperimentele gegevens

De meest aanvaarde en praktisch meest geschikte methode om carcinogene effecten van stoffen op te sporen en te evalueren is de chronische dierproef. De resultaten bieden bovendien de mogelijkheid van extrapolatie naar de mens: effecten waargenomen bij proefdieren blootgesteld aan hoge concentraties moeten worden vertaald naar effecten

bij uiterst lage blootstellingsniveaus, waarna de te verwachten effecten bij de mens kunnen worden geschat. De resultaten van dierproeven kunnen verder een maat zijn voor de relatieve carcinogeniteit van stoffen en vormen de enige praktische referentiebasis voor het bepalen van de waarde van kortdurende screeningstesten.

In een dierproef kan een positief effect op verschillende manieren tot stand komen; de tumoren kunnen zijn geïnduceerd door een genotoxisch carcinogeen of ontstaan door promotie van reeds op andere wijze geïnitieerde cellen. In verband hiermee zijn mutageniteitstesten en mechanisme-onderzoek zoals DNA-bindingsexperimenten van belang. Als hierbij positieve resultaten worden verkregen wijst dit erop dat het werkingsmechanisme van de betreffende verbinding berust op covalente binding met DNA (vergelijk ook de definitie van een initiator). Een dergelijke stof moet beschouwd worden als een carcinogeen met initiërende eigenschappen (zie ook 3.3.5).

Voor de evaluatie van systemisch werkende promotoren bestaan (nog) geen goede testsystemen. Tot nu toe is het meeste onderzoek met promotoren uitgevoerd in het experimentele 2-stadiamodel van de muizehuid, waarbij gebruik werd gemaakt van forbolesters.

Inzicht in het werkingsmechanisme van een stof is van uitermate groot belang voor het schatten van kankerrisico voor de mens. Voor genotoxische carcinogenen wordt in tegenstelling tot voor promotoren aangenomen dat geen dosering bestaat waar beneden geen effect kan optreden. Ook bij uiterst lage doses, theoretisch zelfs al bij blootstelling aan enkele moleculen, zullen irreversibele effecten op kunnen treden. Het spreekt vanzelf dat bij een uiterst lage blootstelling ook het risico uiterst klein zal zijn (vgl. 4.2).

Bij dierproeven zijn de kernvragen:

– Welke waarde moet aan de resultaten worden toegekend: hoe 'hard' zijn negatieve of positieve resultaten?

– Op welke wijze moet extrapolatie plaatsvinden van de waargenomen effecten bij hoge doseringen naar te verwachten effecten bij lage doseringen?

– Wat betekenen dierexperimentele gegevens kwalitatief en kwantitatief voor de mens?

Om deze vragen te kunnen beantwoorden is het in de eerste plaats nodig een groot aantal kwalitatieve aspecten van de uitgevoerde dierproef te evalueren ten aanzien van proefopzet, wijze van uitvoering en aard van de gevonden resultaten. Alhoewel deze aspecten reeds aan de orde zijn geweest in 3.3.2 worden enkele er van opnieuw belicht, maar nu vanuit hun betekenis voor de extrapolatie van de resultaten naar de mens.

– Verontreinigingen in de teststof. Dierexperimenteel onderzoek kan zijn uitgevoerd met òf het technisch produkt met inbegrip van mogelijke verontreiniging òf met de chemisch zuivere stof. Omdat niet altijd valt uit te sluiten dat verontreinigingen verantwoordelijk zijn voor een carcinogeen effect, is essentieel dat de onzuiverheden worden geanalyseerd. Eventuele carcinogene effecten hiervan kunnen dan worden nagetrokken of experimenteel onderzocht. Er zijn omstandigheden dat een juiste evaluatie van een stof alleen uitgevoerd kan worden indien zowel het technisch produkt als de zuivere stof op carcinogene eigenschappen is onderzocht. Dit is bijvoorbeeld het geval wanneer moet worden aangetoond dat de verontreinigingen die eventueel door het kiezen van een ander produktieproces vermeden kunnen worden, verantwoordelijk zijn voor het carcinogene effect.

– Beperkt aantal dieren per groep. Om praktische redenen is het aantal dieren per groep aan beperkingen gebonden. Uitgangspunt is dat aan het einde van een experi-

ment voldoende dieren beschikbaar zijn om een goede biologische en statistische evaluatie te maken.
– Dierstammen met hoge spontane tumorincidenties. Een moeilijkheid bij sommige stammen ratten en muizen is de hoge incidentie, soms 50 % of hoger, van bepaalde vormen van kanker bij onbehandelde controledieren. Deze tumoren komen bij ratten overwegend voor in organen zoals melkklieren, hypofyse en bijnieren en bij sommige muizestammen in melkklieren, longen en lever. Indien bij behandelde dieren een toename wordt gevonden ten opzichte van een al hoge spontane incidentie is grote voorzichtigheid geboden bij de interpretatie. De toename kan toevallig zijn. Ook kan er sprake zijn van een promotoreffect of – en dit geldt vooral voor tumoren in organen welke hormonaal beïnvloed of gereguleerd worden – het effect kan zijn veroorzaakt via verstoring van het hormonale evenwicht.
– Relevante en minder relevante toedieningsroutes. Om de resultaten van een dierproef te kunnen gebruiken voor extrapolatie en risicoschatting is het voor een vergelijkbare blootstelling van doelwitorganen van groot belang dat bij dieren dezelfde route van blootstelling wordt gekozen als die welke bij de mens zal voorkomen. Voor voedseladditieven is oraal de aangewezen route en bijvoorbeeld niet blootstelling via subcutane injecties. Evenmin bruikbaar is implantatie van de stof in bijvoorbeeld de urineblaas. Dit is op zich een interessante techniek voor het bestuderen van mechanismen en lokale interacties, maar de resultaten zijn doorgaans niet relevant voor het beoordelen van stoffen die normaal door de mond worden opgenomen. Toch is het voorzichtigheidshalve in veel gevallen verstandig om positieve resultaten uit elk experiment, ongeacht de route van toediening, zeker wanneer vaststaat dat de stof wordt geresorbeerd, als een kwalitatieve aanwijzing voor carcinogeniteit te beschouwen.
– Zorgvuldigheid van het (histo)pathologisch onderzoek. Bij het (histo)pathologisch onderzoek gaat het er in de eerste plaats om dat de eventuele aanwezigheid van een tumor bij ieder individueel dier met de grootst mogelijke zekerheid wordt vastgesteld. Bij een goed uitgevoerd onderzoek is dan ook een zorgvuldige sectie en inspectie van weefsels en organen met het blote oog een uiterst essentiële fase. Wanneer bij de sectie plaatselijk weefselveranderingen in grotere organen zoals lever, longen, nieren, darmen over het hoofd worden gezien, dan is de kans beperkt dat bij microscopisch onderzoek van een klein stukje weefsel de verandering wèl wordt gevonden. Voor het opsporen van kleine tumoren in vooral kleine organen als bijnieren, hypofyse, ovaria en schildklieren, en diffuus groeiende tumoren in grotere organen, alsmede voor voorstadia van tumoren, is lichtmicroscopie de aangewezen manier.

Nadat is vastgesteld dat de kwaliteit van het onderzoek voldoende is, zijn de volgende criteria van toepassing om de waarde van positieve resultaten te beoordelen:
– positieve dosis-respons relatie;
– verandering in latentietijd;
– statistische waarschijnlijkheid;
– overeenstemming van de resultaten met die van andere experimenten.
Het resultaat, ook van goed uitgevoerde proeven, is dikwijls niet duidelijk. In veel gevallen kan uit de zwak positieve resultaten niet anders worden geconcludeerd dan dat de stof 'verdacht' is. Wanneer bij één diersoort positieve resultaten zijn verkregen, is dit een aanwijzing voor carcinogeniteit. Wanneer de stof in twee diersoorten positief is, wordt een stof als duidelijk carcinogeen beschouwd en wordt voor extrapolatie naar de

mens in de regel uitgegaan van de respons bij de gevoeligste soort. In de praktijk wordt een stof als niet-carcinogeen beschouwd wanneer negatieve resultaten zijn verkregen in goed onderzoek bij twee diersoorten.

4.1.3 Screeningstesten

Op basis van kortdurende testen alleen kan geen evaluatie en risicoschatting ten aanzien van de carcinogene werking van een stof worden gemaakt. In het hiërarchisch onderzoekschema zijn korte testen in eerste instantie screeningsmethoden, waarna een keuze gemaakt kan worden, welke stoffen voor uitgebreid onderzoek in aanmerking komen. Positieve resultaten betekenen doorgaans dat een stof als een verdacht carcinogeen aangemerkt wordt en in combinatie met positieve resultaten van een dierproef zijn zij van ondersteunende waarde.

Negatieve resultaten van screeningstesten zijn slechts in beperkte mate geruststellend en vooral van waarde bij het stellen van prioriteiten, wanneer uit een aantal verbindingen een keuze gemaakt moet worden voor verder dierexperimenteel onderzoek.

Omdat veel kortdurend onderzoek is gebaseerd op inductie van mutaties of beschadiging van DNA kan hiermee tevens inzicht worden verkregen in het werkingsmechanisme van een stof. Deze gegevens dragen in belangrijke mate bij tot de classificatie van een stof als genotoxisch carcinogeen.

4.1.4 Is de mens een knaagdier?

De beoordeling van de carcinogeniteit van chemische stoffen en de risicoschatting voor de mens berust in hoofdzaak op de resultaten van dierproeven. De belangrijke vraag is nu welke relevantie de dierproeven voor de mens hebben. De mens is immers geen rat of muis. Vast staat dat er voor dierproeven geen alternatief bestaat, omdat experimenten met mensen niet mogelijk zijn. Ofschoon basale biologische processen op het niveau van cellen en organen gelijk zijn, bestaan er grote verschillen tussen knaagdieren en mensen. Ratten hebben bijvoorbeeld geen galblaas; ook hebben zij geen behoefte aan vitamine C in het voedsel. Bovendien is een rattestam in tegenstelling tot een humane populatie homogeen en tijdens het experiment leven de dieren in een zorgvuldig gecontroleerde uniforme omgeving met betrekking tot voedsel, licht, geluid, etcetera, waardoor de effecten aan één oorzakelijke factor kunnen worden toegeschreven. De voorzichtige benadering dat stoffen die bij dieren tumoren veroorzaken ook voor de mens een carcinogeen risico kunnen betekenen, wordt wetenschappelijk door verschillende argumenten gesteund:

– De biologie van de carcinogenese verloopt bij mens en dier op vergelijkbare wijze en berust op identieke processen.

– De meeste carcinogene stoffen veroorzaken tumoren bij verschillende zoogdiersoorten; er zijn echter vaak grote verschillen in gevoeligheid en doelwitorganen.

– Van de ongeveer 26 stoffen waarvan bekend is dat er een positief verband bestaat tussen blootstelling en kanker bij de mens kon slechts in één geval (arseen) geen carcinogene werking bij proefdieren worden aangetoond.

– Van geen van de ongeveer 140 stoffen die bij proefdieren tumoren veroorzaken is het bewijs geleverd dat deze voor de mens niet carcinogeen zouden zijn. Een uitzondering vormt mogelijk fenobarbital, een stof die levertumoren veroorzaakt bij knaagdieren en

in het algemeen als tumorpromotor wordt beschouwd. In een uitgebreid onderzoek bij epilepsiepatiënten in Denemarken, die deze stof langdurig als geneesmiddel in hoge doseringen hadden gebruikt, was geen toename van (lever) tumoren aantoonbaar.
– Diertesten hebben in een aantal gevallen de carcinogene werking van een stof voor de mens voorspeld (vergelijk tabel 6).

4.1.5 Verschillen tussen diersoorten

Om de resultaten van dierproeven te vertalen naar de mens moet in principe rekening worden gehouden met een groot aantal mogelijke verschillen tussen soorten. Door omrekeningsfactoren (conversiefactoren) zou voor deze verschillen kunnen worden gecorrigeerd. Deze verschillen kunnen betrekking hebben op snelheid van het metabolisme, resorptiesnelheid, verdeling van de stof in het lichaam, effecten van darmflora, uitscheiding, terugresorptie in de darm, alsmede lichaamsoppervlak en gewicht.

In de praktijk is er vaak alleen al over het metabolisme van een verbinding, zeker bij de mens, niet veel bekend en zal noodzakelijkerwijs op basis van weinig gegevens een extrapolatie gemaakt moeten worden. Het is mogelijk dat toekomstig onderzoek antwoorden zal kunnen geven op vragen die nu bestaan over de wijze waarop de conversie kwantitatief uitgevoerd kan worden.

Bij extrapolatie wordt er steeds van uitgegaan dat het risico voor de mens niet onderschat mag worden, waardoor de betekenis van allerlei factoren ten gunste van de mens wordt overschat. Dit is dan ook de reden dat, tenzij er sterke aanwijzingen bestaan dat deze benadering onjuist is, wordt uitgegaan van de resultaten bij de meest gevoelige species, hoewel de kans bestaat dat de mens minder gevoelig is. De extrapolatie is gewoonlijk gebaseerd op lichaamsgewicht. Vergelijkingen waarbij wordt uitgegaan van lichaamsoppervlak of snelheid van metabole processen worden minder algemeen toegepast, maar kunnen in bepaalde gevallen een meer realistische benadering zijn.

4.2 Kwantitatieve risico-evaluatie

Aan het vaststellen van blootstellingsniveaus die voor de mens toelaatbaar worden geacht, dienen resultaten van toxicologisch onderzoek ten grondslag te liggen. Ook voor het beleid ten aanzien van carcinogene verbindingen is het essentieel dat inzicht bestaat in het risico dat een bepaalde blootstelling voor de mens kan hebben. Waaraan vooral behoefte bestaat bij carcinogenen is een schatting van de omvang van het risico bij blootstelling aan lage concentraties, omdat de mens in het algemeen aan uiterst kleine hoeveelheden van een kankerverwekkende stof zal worden blootgesteld. Traditioneel bestaan er twee verschillende benaderingen om op basis van dierexperimentele resultaten een voor de mens aanvaardbare blootstelling kwantitatief vast te stellen.

De meest gebruikelijke benadering is het vaststellen van een 'aanvaardbare dagelijkse dosis', de zogenaamde ADI ('Acceptable Daily Intake'), op basis van de hoogste dosis die bij proefdieren geen nadelig effect heeft veroorzaakt. Hierbij wordt uitgegaan van het bestaan van een drempelwaarde, dit wil zeggen een blootstellingsniveau waar beneden geen nadelige effecten meer optreden. Met behulp van een arbitraire veiligheidsfactor – die vaak 100 bedraagt – en rekening houdend met bijvoorbeeld verschillen in lichaamsgewicht of lichaamsoppervlak, wordt vervolgens een voor de mens toelaatbaar geachte dosis berekend. Deze methode wordt echter niet aanvaardbaar geacht voor

genotoxische carcinogenen, omdat wordt aangenomen dat voor deze stoffen een drempelwaarde niet bestaat. Niettemin is het gebruik van een veiligheidsfactor van 5000 wel voorgesteld om tegemoet te komen aan de onzekerheid over de effecten van carcinogene stoffen bij lage doseringen.

De benadering via een veiligheidsfactor en een 'no-effect'-dosering dient in het geval van carcinogenen met een initiërende activiteit te worden verworpen, omdat een vastgestelde 'no-effect'-dosis sterk afhankelijk is van het aantal dieren in de proefgroepen. Wanneer bij een zekere dosering geen tumoren worden waargenomen, maakt het groot verschil of het een groep van 10 of een groep van 1000 dieren betrof. In een kleine groep is de kans groot dat een gering effect wordt gemist. De mogelijkheid bestaat dat een 'no-effect'-dosis, vastgesteld in een beperkte groep proefdieren, een niet te verwaarlozen risico voor een blootgestelde grote populatie betekent. Zo is er bijvoorbeeld bij een groep van 50 dieren een kans van 50 % dat een risico op tumorvorming van 1 % gemist wordt. Dit risico van 1 % lijkt wel klein, maar het betekent voor de mens toch een hoog risico: in een groep van 100 000 blootgestelden zou bij 1000 mensen een tumor ontstaan.

De aanname dat er 'geen drempelwaarde' bestaat voor genotoxische carcinogenen betekent op mathematische gronden de uitsluiting van de mogelijkheid dat er een zeer lage blootstelling zonder risico bestaat. De biologische basis voor het afwijzen van een drempelwaarde berust op het feit dat een mutatie in één enkele somatische cel tot een irreversibele, zichzelf replicerende verandering kan leiden. Dit betekent dat per cel één effectieve treffer ('hit') voldoende kan zijn om tot tumorvorming te komen, waarvoor in theorie één molecuul van een carcinogene verbinding voldoende is. Door tegenstanders van dit standpunt wordt vaak gewezen op het bestaan van metabole detoxificatie, DNA-herstel, immunologische afweer tegen kankercellen en andere mechanismen die effecten bij lage doseringen zouden kunnen opheffen. Deze aspecten spelen ongetwijfeld een rol in de carcinogenese. Het is echter zeer de vraag of op grond hiervan het bestaan van een drempelwaarde mag worden verondersteld.

De veronderstelling dat een tumor geïnitieerd wordt als in de cel een reactie optreedt van één carcinogeen molecuul met een bepaalde, voor tumorinitiatie essentiële plaats op het DNA-molecuul, blijft uitgangspunt bij de kwantitatieve risico-analyse. Nu is er natuurlijk slechts een kleine, door het toeval bepaalde, kans dat in een genoom, dat in een diploïde toestand uit circa 10^{10} baseparen bestaat, zo een voor een proces relevante verandering of treffer (hit) optreedt. Bij in vivo interactie van een actieve metaboliet van een carcinogeen met DNA zal meestal niet meer dan 1 op 10^6 nucleotiden gemodificeerd worden. Een deel van deze modificaties heeft in ieder geval geen tumorinitiërend effect, zelfs niet wanneer het in het voor initiatie essentiële gebied aanwezig is. De typen modificaties die, mits op de goede plaats, wel een tumorinitiërend effect kunnen hebben, lopen bovendien een flinke kans door DNA-herstel uit het genoom verwijderd te zijn voordat de cel een kritieke fase, bijvoorbeeld die van DNA-synthese, ingaat.

Van het carcinogeen dat in een cel binnendringt, bereikt maar een minimale fractie, bij voorbeeld een tienduizendste of een miljoenste, het DNA. De overgrote meerderheid reageert met inactiverende enzymsystemen of, na enzymatische activering, met cellulaire moleculen zoals water of glutathion, waardoor reactie met DNA onmogelijk is geworden. De gedachte dat bij zeer kleine hoeveelheden van een kankerverwekkende stof inactiverende enzymen, stoffen als glutathion en DNA-herstelenzymen effectieve, absolute barrières tegen tumorinitiatie vormen, is in haar absoluutheid echter onjuist. Dit kan aan de hand van enkele voorbeelden worden verduidelijkt.

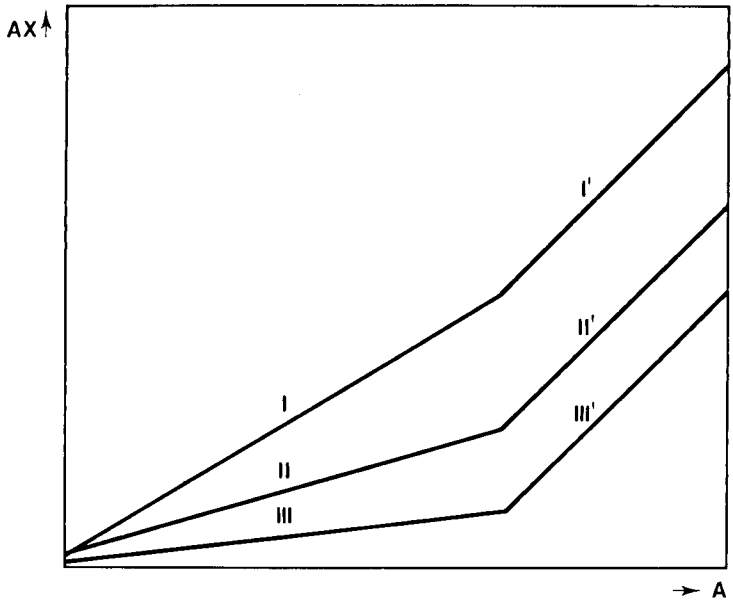


Fig. 39. Verloop van de vorming van AX door reactie van A met X. Voor uitleg zie tekst.

Als in een homogene oplossing een klein beetje A (b.v. een reactieve metaboliet) van een carcinogeen aanwezig is en dit kan reageren met de in overvloed aanwezige X (b.v. DNA) of Y (b.v. glutathion) dan is de hoeveelheid AX die gevormd wordt afhankelijk van de verhouding van de hoeveelheden X en Y en van de verhouding van de snelheden waarmee A reageert met X en Y. Onder bepaalde omstandigheden zal (zie figuur 39, de rechte lijn I) er bij een toenemende hoeveelheid A een evenredig toenemende hoeveelheid AX worden gevormd. Maakt men de hoeveelheid Y bijvoorbeeld 3 × of 10 × zo groot of heeft men te maken met een stof Y die 3 × of 10 × sneller met A reageert, dan komt lijn II, respectievelijk III in de plaats van I. Pas wanneer de hoeveelheid A zo groot wordt dat er sprake is van verzadiging of uitputting van Y zullen de lijnen I, II en III naar boven gaan afbuigen. Lijn III-III' wekt, door de zeer lage helling van III, de foutieve indruk dat er een absolute drempelwaarde is. In veel experimentele systemen en zeker bij de meeste menselijke exposities is bij lange na nog geen sprake van een verzadiging van Y en er bestaat dus in principe een lineaire afhankelijkheid tussen de hoeveelheden carcinogeen en het voor tumorinitiatie belangrijke produkt AX. Ook als een grote hoeveelheid Y aanwezig is, treedt toch, zij het naar verhouding minder, reactie van A met X op. Wordt, bij gelijkblijvende hoeveelheden X en Y, de hoeveelheid A steeds kleiner, dan zal dit geen effect hebben op de uiteindelijke verhouding van de hoeveelheden produkt AX en AY. Ook de activiteit van herstelenzymen vormt geen absolute barrière in die zin dat deze enzymen, totdat ze hun verzadigingspunt bereiken, alle DNA-schade zouden herstellen. Voor elk klassiek, niet-verzadigd enzymsysteem geldt dat de hoeveelheid per tijdseenheid omgezet substraat evenredig is met de substraatconcentratie. Het is redelijk om aan te nemen dat dit ook geldt voor de enzymen die bij het DNA-herstel zijn betrokken. Het gevolg is dat bij afnemende DNA-modificatiegraad het per tijdseenheid herstelde percentage modificaties gelijk blijft. Dit bete-

kent dat het genetisch effect evenredig afneemt met de dosis. Dat ligt natuurlijk anders als er sprake is van verzadigde of snel uitgeputte DNA- herstelmechanismen. Zodra de DNA-modificatiegraad zo hoog is dat verzadiging of uitputting optreedt, kan de dosis-respons relatie steiler gaan lopen. Dit is bijvoorbeeld het geval bij mutagenese onder invloed van methylerende agentia in *E. coli*, waar een snel en een traag O^6-MeGua-herstelmechanisme naast elkaar opereren. Boven die dosis waarbij het snelle herstelsysteem (snel in verhouding met de tijd die het de cel kost om de premutagene lesie te fixeren) uitgeput raakt, zal de dosis-response curve veel steiler oplopen. Dat ook het eerste stuk van de curve (figuur 39) – althans zolang celproliferatie en mutatiefixatie optreden – een zeer lage helling heeft (maar >0), is theoretisch waarschijnlijk, maar in de praktijk meestal niet aan te tonen.

Natuurlijk is een organisme geen homogeen vat met losse moleculen. Het organisme is ingedeeld in compartimenten die weliswaar met elkaar in verbinding kunnen staan, maar dan vaak achter elkaar geschakeld zijn. In dit geval kan Y eerst een deel van A afvangen, zodat X aan een (veel) lagere concentratie wordt blootgesteld dan bij een homogeen systeem het geval zou zijn geweest. De uiteindelijke concentratie A waaraan X wordt blootgesteld, hangt dan af van de snelheid waarmee Y reageert en van de verblijftijd van A in het Y-compartiment. Zolang deze verblijftijd niet verandert en Y niet voor een aanzienlijk deel uitgeput is, zal bij afnemende hoeveelheid A ook de hoeveelheid AX evenredig afnemen. Een voor de extrapolatie van proefdier naar mens belangrijke vraag is of een gehele of gedeeltelijke verzadiging van Y kan optreden bij de in het proefdierexperiment gebruikelijke doseringen. Dit blijkt het geval te kunnen zijn. Geven we bijvoorbeeld een rat met een maagsonde een kleine hoeveelheid dimethylnitrosamine (DMN) dan zal dit in de darm komen, opgenomen worden in het bloed en via de poortader naar de lever stromen. Eenmaal door de lever heen komt het DMN ook in andere organen zoals de nier. Bij hoeveelheden DMN die afnamen van 10 tot 0,001 mg/kg lichaamsgewicht bleek de methyleringsgraad van het nier-DNA veel meer dan evenredig af te nemen. In het lever-DNA bleek juist bij de zeer lage doses naar verhouding meer DNA-methylering op te treden. Doordat de lever voor de nier geschakeld is, fungeert hij dus als een relatieve barrière voor de nier. Deze gegevens kunnen worden gekoppeld aan het carcinogene effect van DMN: toediening van een paar hoge doses kort achter elkaar induceert niertumoren, terwijl dezelfde dosis, maar dan veel meer over de tijd uitgespreid, tot uitsluitend levertumoren aanleiding geeft. Hier maakt dus het ene tumor-type plaats voor het ander. Als eenzelfde kinetiek in het lichaam opgaat voor een stof die alleen niertumoren geeft, dan betekent dit dat orale toediening van zo een stof in zeer lage hoeveelheden relatief veel minder effectief is. Het is de vraag of in een dergelijk (uitzonderings)geval niet van een zekere drempelwaarde gesproken mag worden.

4.2.1 Wiskundige modellen

De vraag welke wiskundige modellen gebruikt moeten worden om het risico bij lage doseringen te schatten is een controversieel punt waarover, zonder dat er veel overeenstemming wordt bereikt, door toxicologen en statistici uitbundig geschreven en gesproken wordt (Cornfield, 1979; Scientific Committee of the Food Safety Council, 1980; Van Rysin, 1980; Munro & Krewsky, 1981; Campbell, 1980).

Uitgaande van verschillende theoretische en empirische veronderstellingen is er een

groot aantal modellen beschikbaar (Krewski & Brown, 1981; Carlborg, 1982). In wezen zijn alle modellen in hoge mate speculatief, omdat praktische toetsing vrijwel onmogelijk is. Het gaat er immers om, boven de bestaande en voor de mens hoge achtergrondincidentie, een zeer kleine additionele kans op het ontstaan van een tumor te voorspellen.

In het algemeen wordt aan een voorzichtige, conservatieve benadering de voorkeur gegeven, waardoor vrijwel zeker onderschatting van het risico wordt voorkomen. Dit is ook van belang omdat een risicoberekening veelal voor één individuele verbinding wordt gemaakt, terwijl de mens in werkelijkheid gelijktijdig aan verschillende carcinogenen, zij het in geringe hoeveelheden, wordt blootgesteld waarbij additieve en mogelijk synergistische effecten een rol kunnen spelen.

Bij de meeste modellen wordt aangenomen dat het gehele carcinogene proces, dat op gang wordt gebracht door één of meer relevante treffers in het DNA van één enkele cel, bestaat uit een aantal opeenvolgende stappen (Scherer & Emmelot, 1979). De waarschijnlijkheid van tumorvorming (P) is een functie (f) van de dosering (D), waardoor $P = f(D)$.

De verschillen tussen de modellen berusten op de keuze van functie (f), die geheel afhangt van de veronderstellingen over de carcinogenese, bijvoorbeeld één-hit of multi-hit kinetiek.

Voor het lage doseringsgebied – blootstellingsniveau in de praktijk – werd aannemelijk gemaakt dat de berekende kans op tumoren bij benadering een lineaire functie van de dosering is.

Bij de modellen die niet uitgaan van een drempelwaarde zal uiteraard nooit een dosering bestaan die geen effect heeft. Hoe klein ook, een kans op een tumor zal altijd aanwezig zijn. Dit betekent dat hierbij 'geen risico' principieel onmogelijk is. Indien ook een zeer gering risico maatschappelijk niet acceptabel is, is de consequentie dat carcinogenen volstrekt uit voeding en milieu geweerd moeten worden.

In werkelijkheid is blootstelling aan carcinogenen nooit geheel te vermijden. Er is een zekere achtergrondbelasting door straling en chemische stoffen. De omvang hiervan is maar ten dele bekend. Hiertoe behoren onder andere natuurlijk voorkomende carcinogene stoffen in ons voedsel, schimmelprodukten (aflatoxinen) en pyrolyseprodukten. Naast deze achtergrondbelasting komen er ook door de mens zelf gemaakte carcinogenen in het leefmilieu. Dit zijn niet alleen ongewilde residuen ten gevolge van het gebruik van chemische stoffen in industrie, landbouw en voedselbereiding, maar ook kunnen carcinogenen bewust worden geïntroduceerd wanneer de voordelen duidelijk opwegen tegen de risico's. Een voorbeeld is het chloreren van drinkwater ten behoeve van de microbiologische zuiverheid. Door reactie van chloor met organische stoffen (b.v. methaan), die door algen en andere planten in het water afgescheiden worden, kunnen bepaalde carcinogene stoffen ontstaan (b.v. chloroform). Andere voorbeelden zijn sommige carcinogene geneesmiddelen en bestrijdingsmiddelen die zelf een gering carcinogeen risico vormen, maar die gelijktijdig de vorming van carcinogene schimmelprodukten in voeding verhinderen.

Om praktische redenen wordt uitgegaan van een zeer klein, te accepteren, risico. Dit is bijvoorbeeld de kans op één extra kankergeval per honderdduizend of per miljoen mensen gedurende een geheel leven. Voor de mens kan een dergelijk blootstellingsniveau, waarbij een uiterst klein risico aanwezig is, feitelijk gelden als een 'veilige' dosis.

Figuur 40 geeft een denkbeeldige dosis-effect relatie, gebaseerd op drie blootstellingsniveaus waaruit een acceptabele dosis kan worden berekend. In het gebied met de lage dosis is het verloop van de curve niet experimenteel te bepalen en sterk afhankelijk

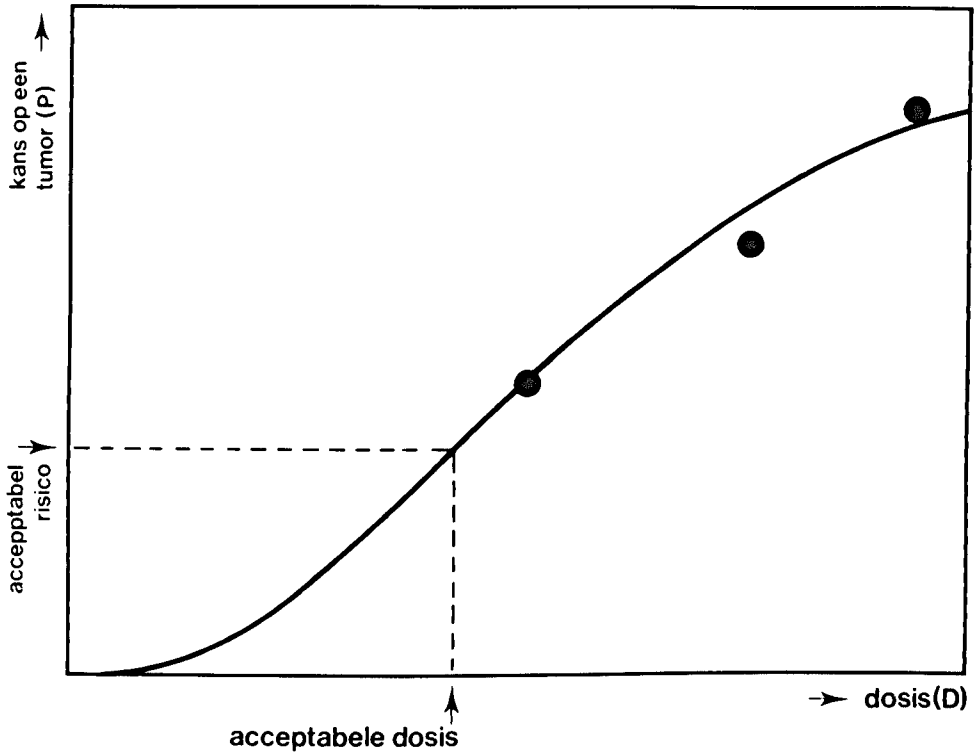


Fig. 40. Denkbeeldige dosis-effect relatie, gebaseerd op waarnemingen bij drie blootstellingsniveaus. Uitgaande van een acceptabel risico wordt een acceptabele dosis vastgesteld.

van het gebruikte model. Enkele van de meest gebruikelijke modellen zijn:

– Lineair model. Het uitgangspunt bij dit conservatieve model is eenvoudig: er wordt een lineair verband aangenomen tussen dosering en tumorinductie, zonder drempelwaarde. Vanuit het laagste experimenteel vastgestelde punt wordt een rechte lijn getrokken door de oorsprong. Deze lijn zal vrijwel altijd (veel) hoger liggen dan de werkelijke dosis-respons curve.

– One-hit model. Dit model is het meest conservatieve en is gebaseerd op de hypothese dat één enkele cel ten gevolge van één treffer (hit) van een carcinogene verbinding de kans heeft getransformeerd te worden tot een kankercel. Aangenomen wordt dat de waarschijnlijkheid dat dit gebeurt bij lage tot zeer lage doseringen een lineaire functie is van de hoeveelheid carcinogeen. In dit model is dus geen sprake van een drempelwaarde.

– Multi-stage model. Bij dit model wordt aangenomen dat er voor de transformatie van één enkele cel tot een kankercel een aantal stappen vereist is. Hierbij worden alle beschikbare dosis-respons gegevens gebruikt. De huidige biologische informatie over carcinogenese wordt in dit model goed weergegeven. Evenals de voorgaande modellen is de respons bij lage doseringen lineair. Dit model berekent de waarschijnlijkheid van een effect boven de al aanwezige achtergrondincidentie voor een populatie. Omdat wordt uitgegaan van een zekere drempelwaarde gaat de curve niet door het nulpunt.

– Probit-dosis modellen (Mantel-Bryan). Hierbij wordt ervan uitgegaan dat ieder individu over een bepaalde weerstand voor carcinogenen beschikt. Voor de totale populatie die is blootgesteld bestaat geen drempelwaarde, doch wel voor elk individu afzonderlijk. De gevoeligheid van de individuen in een populatie met betrekking tot carcinogene stoffen wordt weergegeven door een Gauss-functie van de logaritme van de dosis. Vervolgens wordt geëxtrapoleerd naar een 'geaccepteerd' risico van bijvoorbeeld $1:10^8$. De sigmoïde curve voorspelt bij lage doseringen altijd lagere tumorincidenties dan het lineaire of one-hit model. Voor deze probit-dosis modellen is geen biologische basis beschikbaar.

In de praktijk is het onduidelijk welk model gebruikt dient te worden. Voorzichtigheidshalve en omdat dit model een goede biologische ondersteuning heeft, wordt in Nederland gewoonlijk een lineaire extrapolatie toegepast voor genotoxisch werkende verbindingen. Hierbij wordt uitgegaan van de laagste, bij voorkeur niet-toxische dosis die bij proefdieren nog een significante tumorinductie gaf. De waarde van dit model kan, net als die van de andere modellen, moeilijk in de praktijk worden getoetst.

4.3 Het beleid ten aanzien van chemische verbindingen in Nederland

De toelating van chemische stoffen is in Nederland voor een deel geregeld via de Warenwet, de Bestrijdingsmiddelenwet, de Geneesmiddelenwet en het Veevoederoverlegorgaan. De hier niet onder vallende stoffen worden door de Wet Milieugevaarlijke Stoffen geregeld. Deze wet laat formeel geen stoffen toe, maar verplicht vooralsnog alleen tot aanmelding.

In de Warenwet en Bestrijdingsmiddelenwet geldt al gedurende vele jaren het beleid dat genotoxisch carcinogene stoffen niet worden toegelaten. Bij de toelating van veevoederadditieven wordt rekening gehouden met het al dan niet voorkomen van residuen van deze stoffen in van dit vee afkomstige eetbare produkten. In de Geneesmiddelenwet worden carcinogene stoffen wel toegelaten, maar slechts na uitvoerige afweging van voor- en nadelen. Een voorbeeld is het gebruik van carcinogene cytostatica bij de behandeling van levensbedreigende ziekten. Dit beleid heeft een duidelijke ondersteuning gekregen door het verschijnen van het Gezondheidsraadrapport 'Advies inzake beoordeling carcinogeniteit van chemische stoffen' (1978). Hierin wordt geconcludeerd dat blootstelling van mens en milieu aan genotoxisch carcinogene stoffen in principe moet worden vermeden.

In een aantal gevallen kan blootstelling aan carcinogene stoffen niet of moeilijk totaal worden vermeden. Grondstoffen voor menselijke voeding kunnen onbedoeld verontreinigd zijn of er ontstaan carcinogene stoffen tijdens het produktieproces. Voorbeelden zijn aflatoxinen in pindakaas, sterigmatocystine in kaas, polycyclische aromatische koolwaterstoffen in graan en groenten en nitrosoverbindingen in bier. Ook kunnen bepaalde stoffen economisch belangrijk zijn, zoals vinylchloride en formaldehyde. In deze gevallen dient een risico-evaluatie plaats te vinden. Hieruit kan volgen dat blootstelling aan een bepaalde stof in bepaalde concentraties een 'aanvaardbaar' risico oplevert. Ook in deze situatie zal worden getracht het blootstellingsniveau zo laag mogelijk te houden door eisen te stellen aan grondstoffen, produkten en produktieprocessen. Voor pindakaas geldt dat aflatoxine-B_1 niet 'aantoonbaar' mag zijn, waarbij de ondergrens van de analytische methode bepalend is. Voor bier werd het produktieproces zodanig aangepast dat de vorming van nitrosaminen minimaal was.

Een belangrijk aspect van het Gezondheidsraadrapport voor het beleid is bovendien dat de aanbeveling wordt gedaan om op basis van het werkingsmechanisme en de 'hardheid' van de beschikbare onderzoeksresultaten een onderscheid te maken tussen verschillende categorieën carcinogene verbindingen. In essentie wordt een indeling gemaakt in genotoxische carcinogenen en niet-genotoxisch actieve stoffen. Voor deze beide categorieën verschilt de risicobeoordeling fundamenteel. Voor de genotoxische stoffen wordt ervan uitgegaan dat een drempelwaarde niet bestaat. Voor de stoffen die niet genotoxisch werken, kan op basis van dierexperimenteel toxiciteitsonderzoek en een veiligheidsfactor een aanvaardbare dagelijkse opname (ADI) worden berekend. Tot deze laatste groep behoren een aantal hormonen en stoffen die vooral bij de muis en in mindere mate bij de rat enzyminductie en levertumoren veroorzaken en stoffen die zowel een schildkliervergroting geven als schildkliertumoren induceren.

Een praktisch probleem dat zich voordoet bij het indelen van individuele verbindingen in één van beide categorieën, is dat er zelden voldoende gegevens zijn over het werkingsmechanisme om de stof als niet-genotoxisch te beschouwen. Vaak is bijvoorbeeld het mutageniteitsonderzoek niet eenduidig of onvolledig en kan niet geheel worden uitgesloten dat de stof genotoxische eigenschappen heeft. Voorzichtigheidshalve moet zo'n verbinding dan vooralsnog tot de categorie 'genotoxische stoffen' worden gerekend.

4.3.1 Praktijkvoorbeelden

Hoe gaat regulering nu in de praktijk? Voor de Warenwet en de Bestrijdingsmiddelenwet bestaan in veel gevallen zogenaamde witte of positieve lijsten, waarin stoffen worden opgesomd die voor bepaalde toepassingen nadrukkelijk zijn toegelaten. Indien later onderzoeksresultaten bekend worden die gebruik niet langer rechtvaardigen, zal een toelating kunnen worden ingetrokken. Recente voorbeelden betreffen de carcinogene stof epichloorhydrine die gebruikt werd bij de formulering van bestrijdingsmiddelen in spuitbussen en ethyleendibromide dat na carcinogeen te zijn gebleken niet meer als grondontsmettingsmiddel mocht worden gebruikt. Het komt nogal eens voor dat een afweging gemaakt moet worden tussen voor- en nadelen van het gebruik van een bepaalde stof. De evaluaties van acrylonitril, vinylchloride en TCDD zijn illustratieve voorbeelden van een risicoberekening en normstelling.

Acrylonitril Acrylonitril is een monomeer die onder andere wordt gebruikt bij de fabricage van kunststof buizen voor drinkwatertransport. Dit betekent dat geringe hoeveelheden acrylonitril in het drinkwater kunnen voorkomen, met mogelijke gevaren voor de volksgezondheid. Acrylonitril heeft carcinogene en mutagene eigenschappen en dient te worden beschouwd als een genotoxisch carcinogeen. Langdurige toediening via drinkwater veroorzaakt bij ratten gliaceltumoren in de hersenen. Bij de laagst geteste concentratie acrylonitril (4 mg/kg lichaamsgewicht/dag) werden bij 35 % van de ratten hersentumoren gevonden. Als 'aanvaardbaar' risico wordt vaak gehanteerd 1×10^{-6}, dat wil zeggen dat aanvaardbaar wordt geacht dat 1 op 10^6 mensen kanker krijgt ten gevolge van blootstelling gedurende een mensenleven (70 jaar) aan de stof in kwestie.

Ten aanzien van acrylonitril geeft een lineaire extrapolatie op basis van bovengenoemde dierexperimentele gegevens voor een risico van 1×10^{-6} een dagelijkse opna-

me per persoon van 0,375 μg dag. De reëel gemeten gehaltes aan acrylonitril in drinkwater waren beduidend lager, zodat het risico als verwaarloosbaar klein kan worden beschouwd en er geen reden bestaat buizen van deze kunststof te verbieden.

Vinylchloride Ook vinylchloride kan als monomeer uit PVC-buizen in drinkwater voorkomen. Bovendien kan het in de voeding voorkomen als gebruik wordt gemaakt van verpakkingsmateriaal van PVC. Op basis van humane epidemiologische gegevens, langdurig dierexperimenteel onderzoek en kortdurende testen wordt vinylchloride als een genotoxisch carcinogeen beschouwd. Bij een onderzoek waarin het vinylchloridemonomeer chronisch oraal werd toegediend aan ratten werden in de lever tumoren en neoplastische noduli geïnduceerd. Voerde men op basis van deze resultaten een lineaire extrapolatie uit naar een risico van 1 op 10^6, dan leidde dit tot een 'aanvaardbare' dagelijkse opname van 0,2-0,45 μg. Voor vinylchloride geldt eveneens dat de reëel gemeten concentraties in drinkwater veel lager waren, zodat een risico voor de volksgezondheid uiterst gering genoemd mag worden en er geen aanleiding bestaat voor een verbod van PVC voor drinkwaterbuizen en verpakkingsmateriaal. Het is vanzelfsprekend dat aan PVC-buizen voor drinkwatertransport en aan PVC-verpakkingsmateriaal hoge kwaliteitseisen worden gesteld ten aanzien van het eventueel vrijkomend vinylchloride.

2,3,7,8-TCDD TCDD komt onder andere in geringe hoeveelheden voor als verontreiniging in fenoxyherbiciden en is een voorbeeld van een niet-genotoxisch actieve verbinding. TCDD is een buitengewoon toxische stof en in enkele chronische dierproeven met ratten en muizen werden bij toxische doseringen steeds levertumoren geïnduceerd. Uitgebreid mutageniteitsonderzoek gaf overwegend negatieve resultaten. Uit mechanismestudies bleek een sterke promotorwerking op de lever van knaagdieren; de resultaten van DNA-bindingsexperimenten waren negatief. Op grond van alle beschikbare gegevens werd geconcludeerd dat TCDD een niet-genotoxisch werkzame stof is. De tot op heden gehanteerde verklaring is dat TCDD een zo krachtige promotor is, dat altijd wel aanwezige geïnitieerde cellen tot tumoren zullen uitgroeien. Op basis van de drempelwaarde uit een chronisch onderzoek met ratten werd met behulp van een veiligheidsfactor een aanvaardbare dagelijkse orale opname voor de mens vastgesteld van 0,004 ng TCDD/kg lichaamsgewicht. Dit betekent dat de mens (60 kg) dagelijks 0,24 ng TCDD mag opnemen, zonder dat nadelige effecten op de gezondheid te verwachten zijn.

Literatuur

Algemeen

Cairns, J., 1978. Cancer: science and society. In: C.I. Davern (Editor): A series of books in biology. Freeman, San Francisco, 199 pp.

Pitot, H.C., 1981. Fundamentals of oncology, 2nd edition, revised and expanded. Marcel Dekker, New York, 291 pp.

Per hoofdstuk

1.2 Foulds, L., 1969. Neoplastic development, Vol. I. Academic Press, London, 439 pp. In dit deel worden de biologie en pathologie van tumoren behandeld.

1.2 Foulds, L., 1975. Neoplastic development, Vol. II. Academic Press, London, 729 pp. In dit deel is de stof gerangschikt rond individuele organen en weefsels.

1.3 Peller, S., 1979. Cancer research since 1900. An evaluation. Philosophical Library, New York, 394 pp.

1.3 The Yamagiwa Memorial Foundation, 1965. Collected papers on artificial production of cancer. Maruzen Company, Ltd., Tokyo, 491 pp.

1.4 Redmond, D.E., 1970. Tobacco and cancer: the first clinical report, 1761. New England Journal of Medicine 282: 18-23.

1.4 Potter, M., 1963. Percival Pott's contribution to cancer research. National Cancer Institute Monographs 10: 1-13.

1.4 Rehn, L., 1895. Archiv für Klinische Chirurgie 50: 588-600.

1.5 Phillips, D.H., 1983. Fifty years of benzo(a)pyrene. Nature 303: 468-472.

1.5 National Cancer Institute, U.S.A., 1951-1980. Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity. Bestrijkt met enige onderbreking (1974-1977) alle literatuur over eventuele carcinogene activiteiten van chemische stoffen die tot 1979 verschenen is.

1.5 International Agency for Research on Cancer, Lyon. IARC – Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Tot op heden zijn meer dan 30 delen verschenen over uiteenlopende klassen chemische verbindingen.

1.6 Doll, R., & R. Peto, 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Journal of the National Cancer Institute 66: 1191-1308.

1.6 Higginson, J. & C.S. Muir, 1979. Environmental carcinogenesis: misconceptions and limitations to cancer control. Journal of the National Cancer Institute 62: 1291-1298.

1.6 Arnott, M.S., J. van Eys & Y.-M. Wang (Editors) 1981. Molecular interrelations of nutrition and cancer. University of Texas, M.D. Anderson 34th Annual Symposium on Fundamental Cancer Research, Houston. Raven Press, New York, 1982, 474 pp.

2 Weinstein, I.B., 1981. Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 17: 99-120.

2.1 Arcos, J.C., Y. Woo & M.F. Argus, 1982. Chemical induction of cancer. Structural bases and biological mechanisms. Vol. IIIA, Academic Press, New York, 780 pp.

2.1 Searle, C.E., 1976. Chemical carcinogens, ACS Monograph 173, American Chemical Society, Washington, 788 pp.

2.2 Druckrey, H., 1967. Quantitative aspects in chemical carcinogenesis. In: R. Truhaut (Editor): UICC Monograph Series, Vol. 7, Potential carcinogenic hazards from drugs. Springer, Berlin, p. 60-78.

2.2 Emmelot, P. & E. Scherer, 1980. The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach. Biochimica et Biophysica Acta 605: 247-304.

2.4 Foulds, L., 1969. Zie onder 1.2.

2.4 Foulds, L., 1975. Zie onder 1.2.

2.5.1 Vogel, E. & A.T. Natarajan, 1982. The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems: interspecies comparisons. In: F.G. De Serres (Editor): Chemical mutagens, Vol. 7, Plenum Publishing Corporation, New York, p. 295-335.

2.5.2 Kriek, E. & J.G. Westra, 1979. Metabolic activation of aromatic amines and amides and interaction with nucleic acids. In: P.L. Grover (Editor): Chemical carcinogens and DNA, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 1-28.

2.5.3 Conney, A.H., 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes memorial lecture. Cancer Research 42: 4875-4917.

2.5.4 Miller, E.C., J.A. Miller, J. Hirono, T. Sugimura & S. Takayama (Editors), 1979. Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis. Proceedings 9th International Symposium Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo. Japan Scientific Societies Press, Tokyo/University Park Press, Baltimore, 399 pp.

2.5.4 Sugimura, T., 1982. A view of a cancer researcher on environmental mutagens. In: Sugimura, T., S.Kondo & H. Takabe (Editors): Environmental mutagens and carcinogens. University of Tokyo Press, Tokyo, p. 3-20.

2.6.1 Straus, D.S., 1981. Somatic mutation, cellular differentiation and cancer causation. Journal of the National Cancer Institute 67: 233-241.

2.6.2 Singer, B., 1979. *N*-nitroso alkylating agents: formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 62: 1329-1339.

2.6.3 Kriek, E. & J.G. Westra, 1979. Zie onder 2.5.2.

2.6.5 Meehan, T. et al., 1977. Benzo(a)pyrene diol epoxide covalently binds to deoxyguanosine and deoxyadenosine in DNA. Nature 269: 725-727.

2.6.5 Bigger, C.A.H. et al., 1978. Differences between products of binding of 7,12-DMBA to DNA in mouse skin and in a rat liver microsomal system. Biochemical and Biophysical Research Communications 80: 229-235.

2.6.6 Phillips, D.H. et al., 1981. The in vivo formation and repair of DNA adducts from 1'-hydroxysafrole. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 16: 83-90.

2.6.6 Hertzog, P.J. et al., 1980. A high pressure liquid chromatography study on the removal of DNA-bound aflatoxin B_1 in rat liver and in vitro. Carcinogenesis 1: 787-793.

2.6.7 Floyd, R.A. (Editor), 1982. Free radicals and cancer. M. Dekker, Inc., New York, 541 pp.

2.6.7 Giloni, L. et al., 1981. Bleomycin-induced strand-scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. The Journal of Biological Chemistry 256: 8608-8615.

2.6.8 Jack, P.L. & P. Brookes, 1981. The distribution of benzo(a)pyrene DNA adducts in mammalian chromatin. Nucleic Acids Research 9: 5533-5552.

2.6.8 Singer, B., 1979. *N*-nitroso alkylating agents: formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 62: 1329-1339.

2.6.8 Weinstein, I.B., 1981. Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 17: 99-120.

2.7 Lehman, A.R. & P. Karran, 1981. DNA repair. International Review of Cytology 72: 101-146.

2.7 Friedberg, E.C. et al., 1981. The repair of DNA damage: recent developments and new insights. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 16: 91-103.

2.7 Lehman, A.R., 1981. Cancer-associated human genetic diseases with defects in DNA repair. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 100: 117-124.
2.8 Grunberger, D. & I.B. Weinstein, 1979. Biochemical effects of the modification of nucleic acids by certain polycyclic aromatic carcinogens. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 23: 105-149.
2.8.1 Wang, A.H. et al., 1981. Left-handed double helical DNA: Variations in the backbone conformation. Science 211: 172-176.
2.8.1 Grunberger, D. & R.M. Santella, 1981. Alternative conformations of DNA modified by *N*-2-acetylaminofluorene. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 17: 231-244.
2.8.1 Neidle, S., 1981. New twist to DNA and DNA-carcinogen interactions. Nature 292: 292-293.
2.8.1 Nordheim, A. et al., 1981. Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of Drosophila polytene chromosomes. Nature 294: 417-422.
2.8.2 Singer, B. & M. Kröger, 1979. Participation of modified nucleosides in translation and transcription. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 23: 151-193.
2.8.2 Jensen, D. & C. Ramel, 1980. Relationship between chemical damage of DNA and mutations in mammalian cells I. Dose-response curves for the induction of 6-TG-resistant mutants by low doses of monofunctional alkylating agents, X-rays and UV radiation in V79 Chinese hamster cells. Mutation Research 73: 339-347.
2.8.2 Maher, V.M. et al., 1979. DNA-excision-repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation. Mutation Research 62: 311-323.
2.8.2 Borek, C. & L. Sachs, 1967. Cell susceptibility to transformation by X irradiation and fixation of the transformed state. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.) 57: 1522-1527.
2.8.2 Schaaper, R.M. & L.A. Loeb, 1981. Depurination causes mutations in SOS-induced cells. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.) 78: 1773-1777.
2.8.3 Klein, G., 1981. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. Nature 294: 313-318.
2.8.3 Felsenfeld, G. & J. McGhee, 1983. Methylation and gene control. Nature 296: 602-603.
2.8.3 Fahmy, M.J. & O.G. Fahmy, 1980. Intervening DNA insertions and the alteration of gene expression by carcinogens. Cancer Research 40: 3374-3382.
2.8.4 Cairns, J., 1981. The origin of human cancers. Nature 289: 353-357.
2.8.4 Mitelman, F., 1981. Tumor etiology and chromosome pattern – Evidence from human and experimental neoplasms. In: F.E. Arrighi, P.N. Rao & E. Stubblefield (Editors): Genes, chromosomes, and neoplasia. Raven Press, New York, p. 335-350.
2.8.4 Rowley, J.D. & J.R. Testa, 1982. Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. Advances in Cancer Research 36: 103-148.
2.8.4 Boveri, T.H., 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Fischer Verlag, Jena.
2.8.5 Mishra, N., V. Dunkel & M. Mehlman (Editors), 1980. Mammalian cell transformation by chemical carcinogens. Advances in modern toxicology, Vol 1, 501 pp.
2.9 Bishop, J.M., 1983. Cellular oncogenes and retroviruses. Annual Review of Biochemistry 52: 301-354.
2.9 Weinberg, R.A., 1982. Oncogenes of spontaneous and chemically induced tumors. Advances in Cancer Research 36: 149-163.
2.9 Todaro, G.J. & R.J. Huebner, 1972. The viral oncogene hypothesis: new evidence. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.) 69: 1009-1015.
2.10 Hecker, E., W. Kunz, N.E. Fusenig, F. Marks & H.W. Thielmann (Editors), 1982. Carcinogenesis – A comprehensive survey. Vol 7, Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters, Raven Press, New York, 664 pp.
2.10 Pitot, H.C. et al., 1981. The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 17: 133-146.

2.10 Slaga, T.J. et al., 1982. Studies on the mechanisms involved in multistage carcinogenesis in mouse skin. Journal of Cellular Biochemistry 18: 99-119.
2.10 Weinstein, I.B., 1981. Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 17: 99-120.
2.10.2 Speers, W.C., 1982. Conversion of malignant murine embryonal carcinomas to benign teratomas by chemical induction of differentiation in vivo. Cancer Research 42: 1843-1849.
2.10.3 Fürstenberger, G. et al., 1981. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.) 78: 7722-7726.
2.10.7 Lowenthal, J.P. (Editor), 1983. Workshop conference on nutrition in cancer causation and prevention, 1982. Cancer Research 43: 5 supplement, 2385 s-2519 s.
2.10.7 Cohen, L.A., 1981. Mechanisms by which dietary fat stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. Cancer Research 41: 3808-3810.
2.10.7 Carroll, K.K. & H.T. Khor, 1975. Dietary fat in relation to tumorigenesis. Progress in Biochemical Pharmacology 10: 308-353.
2.10.7 Breslow, N. et al., 1977. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. International Journal of Cancer 20: 680-688.
3 Gezondheidsraad, 1979. Carcinogeniteit van chemische stoffen. Verslagen, adviezen, rapporten 1979, nr. 4, Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Leidschendam, 135 pp.
3.2.1 Albert, R.E. et al., 1982. Gaseous formaldehyde and hydrogen chloride induction of nasal cancer in the rat. Journal of the National Cancer Institute 68: 597-603.
3.2.1 Bijzondere Adviescommissie Formaldehyde, 1982. Formaldehyde en kanker bij de mens. Verslagen, adviezen, rapporten 1982, nr. 7, Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Leidschendam, 47 pp.
3.2.1 Feron, V.J. & L. den Engelse, 1982. Is formaldehyde kankerverwekkend? Kanker 6, nr. 4: 3-6.
3.2.1 Gezondheidsraad, 1979. Zie onder 3.
3.2.1 Hammond, E.C. et al., 1977. Some recent findings concerning cigarette smoking. In: H.H. Hiatt, J.D. Watson & J.A. Winsten (Editors): Origins of human cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 101-112.
3.2.1 Lilienfeld, A.M., E. Pedersen& J.E. Dowd, 1967. Cancer epidemiology: methods of study. John Hopkins Press, Baltimore, 165 pp.
3.2.1 MacMahon, B. & T.F. Pugh, 1970. Epidemiology: principles and methods. Little, Brown and Company, Boston, 376 pp.
3.2.1 Swenberg, J.A. et al., 1980. Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor. Cancer Research 40: 3398-3402.
3.2.1 Tomatis, L. et al., 1978. Evaluation of the carcinogenicity of chemicals: a review of the monograph program of the International Agency for Research on Cancer (1971 to 1977). Cancer Research 38: 877-885.
3.2.1 Wynder, E.L. et al., 1976. The epidemiology of the smoker. Proceedings of the 3d World Conference on Smoking and Health Vol. 7, Government Print Office, Washington D.C.
3.2.2 Gezondheidsraad, 1979. Zie onder 3.
3.2.3 Doll, R. & R. Peto, 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Journal of the National Cancer Institute 66: 1196-1305.
3.2.3 Muir, C.S., 1977. Predictive value of cancer statistics. Journal of Environmental Pathology and Toxicology 1: 3-10.
3.2.3 Sturmans, F., 1982. Epidemiologie, theorie, methoden en toepassing. Dekker en van de Vegt, Nijmegen, 338 pp.
3.2.3 WHO, 1975. World health statistics report. Vol. 28, nr. 12. World Health Organisation, Geneva, p. 458-501.
3.2.4 Lilienfeld, A.M. & D.E. Lilienfeld, 1980. Foundations of epidemiology, 2nd ed. Oxford University Press, New York etc., 375 pp.

3.2.4 MacMahon, B. & T.F. Pugh, 1970. Zie onder 3.2.1.
3.2.6 Beral, V. et al., 1982. Malignant melanoma and exposure to fluorescent lighting at work. The Lancet, August 7: 290-293.
3.2.6 Doll, R. & R. Peto, 1981. Zie onder 3.2.3.
3.2.6 Muir, C.S., 1979. Limitations and advantages of epidemiological investigations in environmental carcinogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences 329: 153-164.
3.2.6 Wagenaar, W.A., 1982. De rare gevolgen van verkeerde oorzaken: Nieuwe Rotterdamse Courant – Handelsblad, 18 november.
3.3.1 IARC, 1980. Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Supplement 2. World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 426 pp.
3.3.1 Kroes, R., 1979. Animal data, interpretation and consequences. In: P. Emmelot & E. Kriek (Editors): Environmental Carcinogenesis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 401 pp.
3.3.1 Page, N.P., 1977a. Chronic toxicity and carcinogenicity guidelines. Journal of Environmental Pathology and Toxicology 1: 161-182.
3.3.1 WHO, 1978. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Part I. Environmental Health Criteria 6. World Health Organisation, Geneva, 273 pp.
3.3.2 Cranmer, M.F. et al., 1976. Research data integrity: a result of an integrated information system. Journal of Toxicology and Environmental Health 2: 285-299.
3.3.2 Federal Register, 1978. Non-clinical laboratory studies: good laboratory practice regulations. Federal Register 43 (248): 59886-60024.
3.3.2 Food Safety Council, 1978. Proposed system for food safety assessment. Report of the Scientific Committee of the Food Safety Council, Columbia, 135 pp.
3.3.2 Haseman, J.K. & D.G. Hoel, 1979. Statistical design of toxicity assays: role of genetic structure of the test animal population. Journal of Toxicology and Environmental Health 5: 89-101.
3.3.2 IARC, 1980. Zie onder 3.3.1.
3.3.2 Kroes, R., 1979. Zie onder 3.3.1.
3.3.2 Munro, I.C., 1977. Considerations in chronic toxicity testing: the chemical, the dose, the design. Journal of Environmental Pathology and Toxicology 1: 183-197.
3.3.2 OECD, 1981. OECD guidelines for testing of chemicals. Section 4: Health effects. Paragraph 451: Carcinogenicity studies. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
3.3.2 Page, N.P., 1977a. Zie onder 3.3.1.
3.3.2 Page, N.P., 1977b. Concepts of a bioassay program in environmental carcinogenesis. In: H. Kraybill & H. Mehlman (Editors): Environmental Carcinogenesis, Hemisphere Publishers Incorporation, Washington D.C., p. 87-171.
3.3.2 Peto, R. et al., 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. IARC monographs, supplement 2, World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 426 pp.
3.3.2 Sontag, J.M., N.P. Page & U. Saffiotti, 1976. Guidelines for carcinogen bioassay in small rodents. National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series nr. 1, DHEW Publication nr. NIH. 76-801, Washington D.C., 65 pp.
3.3.2 WHO, 1978. Zie onder 3.3.1.
3.3.4 Gezondheidsraad, 1979. Zie onder 3.
3.3.5 Flaks, A. et al., 1973. Effect of ammonium chloride on incidence of bladder tumors induced by 4-ethylsulfonylnaphtalene-1-sulfonamide. Journal of the National Cancer Institute 51: 2007-2008.
3.3.5 Gezondheidsraad, 1979. Zie onder 3.
3.4.1 De Serres, F.J. & J. Ashby, 1981. Evaluation of short-term tests for carcinogens. Report of the International Collaborative Program. Progress in Mutation Research. Vol. 1. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam/Oxford/New York, 827 pp.
3.4.1 Hollstein, M. et al., 1979. Short-term tests for carcinogens and mutagens. Mutation Research 65: 133-226.

3.4.3 Anderson, P. & E. Longstaff, 1981. An appraisal of mutagenicity test systems. The Analyst 106: 1-22.

3.4.3 De La Iglesia et al., 1980. Short-term tests for mutagenesis and carcinogenesis in drug toxicology: How to test and when to test is the question. Drug Metabolism reviews 11: 103-146.

4 Interagency Regulatory Liaison Group, 1979. Workgroup on Risk Assessment. Scientific bases for identification of potential carcinogens and estimation of risks. Journal of the National Cancer Institute 63: 241-268.

4 National Cancer Advisory Board, 1977. General criteria for assessing the evidence for carcinogenicity of chemical substances: Report of the Sub-committee on Environmental Carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 58: 461-465.

4.2.1 Campbell, T.C., 1980. Chemical carcinogens and human risk assessment. Federation Proceedings; Federation Proceedings of American Societies for Experimental Biology 39: 2467-2484.

4.2.1 Carlborg, F.W., 1982. The threshold and the virtually safe dose. Food and Chemical Toxicology 20: 219-221.

4.2.1 Cornfield, J., 1979. Carcinogenic Risk Assessment. Science 198: 693-699.

4.2.1 Krewski, D.R. & C. Brown, 1981. Carcinogenic risk assessment: A guide to the literature. Biometrics 37: 353-366.

4.2.1 Munro, I.E. & D.R. Krewski, 1981. Risk assessment and regulatory decision making. Food and Chemical Toxicology 19: 549-560.

4.2.1 Scherer, E. & P. Emmelot, 1979. Multihit kinetics of tumor cell formation and risk assessment of low doses of carcinogen. In: A. Clark & C.R. Shaw (Editors): Carcinogens: Identification and Mechanisms of Action, Houston, 1978. Raven Press, New York, p. 303-318.

4.2.1 Scientific Committee of the Food Safety Council, 1980. Quantitative risk assessment. Food and Chemical Toxicology 18: 711-734.

4.2.1 Van Rysin, J., 1980. Quantitative risk assessment. Journal of Occupational Medicine 22: 321-326.