

enzymes'. Omdat zowel aktivering als inaktivering kan optreden is de naam 'ontgiftingsenzymen' duidelijk niet meer op zijn plaats. Een voorbeeld van inaktivering in de lever is de hydroxylering en de daarop volgende koppeling aan glucuronzuur van aromatische amines. Deze glucuroniden worden gewoonlijk via de gal of de urine uitgescheiden. De aanwezigheid van glucuronidasen in de blaas of de darmflora veroorzaakt echter het lokale vrijkomen van het carcinogeen met als gevolg de inductie van blaas- en darmtumoren. Het zal met dit voorbeeld duidelijk zijn dat de verstoring van het drugmetabolisme door allerlei van buiten komende stoffen – ook bij de mens – tot onvoorspelbare verschuivingen in de balans aktivering/inaktivering zal leiden.

Geaktiveerde metabolieten reageren o.a. met DNA. Dit heeft onder meer tot gevolg dat de werking van RNA polymerase geremd is. Belangrijker is echter dat van (*in vitro*) gealkyleerd DNA of RNA is aangetoond dat de informatieoverdracht ook kwalitatief gestoord kan zijn: Zowel bij de transkriptie van DNA naar RNA als translatie van RNA naar eiwit kan miskodering optreden.

Sommige substituenten verdwijnen met een halveringstijd van enkele uren uit het DNA, andere zijn persistent en blijven weken tot maanden aanwezig.

Op enkele uitzonderingen na is het verdwijnen een actief enzymatisch proces. Omdat bij deze 'repair' breuken in de DNA keten worden gemaakt geeft het aantal breuken een indruk van (het herstel van) de schade. Omdat DNA-fragmentatie op weinig tijdrovende wijze en zowel in gekweekte cellen als in intacte dieren kan worden bepaald, is voorgesteld deze methode te gebruiken voor de pre-screening van carcinogenen.

Voor lever-DNA zijn er aanwijzingen dat de in DNA aangerichte schade moeilijker te herstellen is naarmate de verbinding sterker hepatocarcinogeen is. Mogelijk levert dit onderzoek nadere aanwijzingen op welk van het skala interactieprodukten met DNA een essentiële bijdrage levert aan de inductie van tumoren (of voorstadia daarvan).

Vindt DNA-synthese plaats op een door carcinogeen beschadigde DNA-matrijs dan kunnen twee dingen gebeuren:

a er wordt een dochter DNA-molekuul gevormd dat tegenover de gesubstitueerde baseparen nieuwe, eventueel foutieve baseparen heeft ingebouwd; de

kans op miskodering hangt af van de aard en de plaats van de substituent;

b de substituent veroorzaakt (in het algemeen door zijn grootte) een zodanige verstoring van de DNA-dubbelhelix dat het nieuw gesynthetiseerde DNA-molekuul op de plaats tegenover de lesie over een afstand van vele baseparen onderbroken is. Er zijn aanwijzingen dat deze gaten later op betrekkelijk willekeurige wijze worden opgevuld met DNA-basen. Omdat de kans op inkorrekte informatieoverdracht hierbij zeer reëel is spreekt men van zgn. 'error-prone DNA repair'.

Aangenomen wordt nu dat fouten op bepaalde plaatsen in het DNA (de hypothetische kankergenen) kunnen leiden tot een ontregelde groei van de cel. Het molekulaire mechanisme van dit proces is nog vrijwel onbekend. In het verleden zijn er herhaaldelijk 'claims' geweest dat de ontregelde groei herleid kon worden tot een bepaald, algemeen geldend verschil tussen 'normale' en tumorcellen. De meeste van deze verschillen blijken slechts op te gaan voor een zeer beperkte serie tumoren en vervallen vaak als naar verschillen op molekulaire niveau gekeken wordt. Een uitzondering hierop vormen wellicht afwijkingen die in bepaalde membraankomponenten van tumorcellen worden gevormd.

Konklusie

Het fundamentele onderzoek naar mechanismen van chemische mutagenese en carcinogenese verzamelt gegevens en inzichten op basis waarvan een aantal bedreigingen te onderkennen zijn. Het schept tevens de basis voor onderzoek met directe consequenties voor het beleid ten aanzien van potentieel mutagene en carcinogene chemische verbindingen.

Summary

Mechanisms of chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis

The close relationship between mutagenic and carcinogenic properties of chemicals is stressed. The important role of DNA-repair enzymes in the conservation of DNA structure is discussed. Both chemical mutagenesis and carcinogenesis are supposed to be the result either of direct mispairing of DNA-bases or of mis-repair of DNA-damage by error-prone repair processes.

vervolg van pag. 132

McCann, J. & B. N. Ames, Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73 (1976) 950-954

Montesano, R., L. Saint Vincent, L. Drevon & L. Tomatis, Production of epithelial and mesenchymal tumors with rat liver cells transformed *in vitro*. *Int. J. Cancer* 16 (1975) 550-558

Pott, P., Chirurgical observations relative to the cataract, polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures and the mortification of the toes and feet. p. 63-68.

Hawes, Clark & Collings, Londen 1775

Shubik, Ph., Shubik Group hammers out document on 'carcinogenicity criteria'. *The Cancer Letters* 2 no. 11 (1976) 2-7

Williams, G. M., J. M. Elliott & J. H. Weisburger, Carcinoma after malignant conversion *in vitro* of epithelial-like cells from rat liver following exposure to chemical carcinogens. *Cancer Res.* 33 (1973b) 606-612

Williams, G. M., K. Stromberg & R. Kroes, Cytochemical and ultrastructural alterations associated with confluent growth in cell cultures of epithelial-like cells from rat liver. *Lab. Invest.* 29 (1973a) 293-303

Yamagiwa, P. & K. Ishikawa, Über Theer- und Russkrebs. *Verh. Dtsch. Gesell. Chirurgie* 3 (1918) 1-29

De Ames-test, een snelle pre-screeningsmethode voor mutagene en carcinogene stoffen*

Dr. INA E. MATTERN** te Delft

Inleiding

Volgens recente schattingen van de International agency for research on cancer (IARC) wordt 80% van het aantal gevallen van kanker veroorzaakt door omgevingsfactoren. Hieronder bevinden zich zowel natuurlijk voorkomende stoffen – bijvoorbeeld aflatoxinen – als door de mens vervaardigde chemische producten. Bij de bestrijding van kanker zou het dus een grote stap voorwaarts betekenen als men tijdig de carcinogeniteit van deze stoffen zou kunnen onderkennen. In de praktijk blijkt dit echter niet zo eenvoudig te zijn.

Stoffen die voor de mens carcinogeen zijn, kan men eigenlijk alleen op het spoor komen door bevolkingsonderzoek, bijvoorbeeld bij werknemers en omwonenden van chemische industrieën. Dit is echter alleen mogelijk indien specifieke of zeldzaam voorkomende tumoren worden gevormd, zoals het geval is na blootstelling aan 2-naftylamine en vinylchloride. Bovendien moet rekening worden gehouden met vele andere – grotendeels onbekende – factoren die een rol spelen bij het ontstaan van kanker, bijvoorbeeld rookgewoonten, en dan nog is een causale relatie met een verdachte stof moeilijk ondubbelzinnig vast te stellen.

Tot nu toe worden stoffen waarvan de carcinogeniteit moet worden onderzocht, zoals geneesmiddelen en voedingstoevoegingen, getest in langlopende dierexperimenten. De vele problemen die bij uitvoering en interpretatie van dergelijke experimenten een rol spelen zijn uitvoerig door Kroes (1976) geschetst. Bovendien zijn deze testen uit praktische en ethische overwegingen alleen mogelijk voor een beperkt aantal stoffen. Aangezien er momenteel per jaar duizenden nieuwe stoffen geproduceerd worden die een potentieel gevaar kunnen zijn voor de volksgezondheid, is men wel gedwongen om te zien naar het gebruik van snelle testmethoden om te proberen carcinogene stoffen op te sporen.

In de afgelopen jaren is een aantal van dergelijke methoden ontwikkeld en voor een deel geëvalueerd op hun bruikbaarheid als voorspelling van carcinogeniteit. De tot nu toe beste methode is de door de Amerikaan B. N. Ames ontwikkelde test met de bacterie *Salmonella typhimurium*. Deze test berust – evenals de meeste andere – op de detectie van een verandering van het DNA, de drager van de erfelijke eigenschappen van een organisme.

Dit artikel geeft een beschrijving van de Ames-test, een testsysteem waarmee de induc- tie van mutaties in bacteriën onder invloed van chemische stoffen kan worden aangetoond. Door de toevoeging van een leverhomogenaat kunnen stoffen worden aangetoond die in zoogdieren pas door metabole omzettingen in de lever mutageen worden. De test is eenvoudig, snel, goedkoop en gevoelig.

Resultaten verkregen met 300 stoffen wijzen uit dat er een 90% correlatie bestaat tussen mutageniteit in dit systeem en carcinogeniteit bij zoogdieren, inclusief de mens. Het systeem kan o.a. worden gebruikt voor het testen van stoffen in een vroeg stadium van productontwikkeling of als pre-screening om prioriteiten voor verder onderzoek met meer kostbare testen aan te geven.

Mutaties

De interactie van een stof met het DNA van een cel leidt dikwijls tot het ontstaan van een mutatie, een verandering in de erfelijke eigenschappen van de cel. Een mutatie kan optreden in een somatische cel en dan mogelijk aanleiding geven tot de vorming van een tumor (zie artikel *Den Engelse*, 1976), of in een geslachtscel. In dit laatste geval kan de mutatie worden doorgegeven aan het nageslacht en de oorzaak zijn van een erfelijke ziekte. Momenteel zijn bij de mens zo'n 1000 erfelijke ziekten bekend, voornamelijk stofwisselingsziekten (fenylketonurie) of bloedziekten (sikkelcelanemie). Deze ziekten zijn meestal het gevolg van kleine veranderingen in het DNA, de zogenaamde puntmutaties. Grotere genetische afwijkingen, die bijv. hele chromosomen betreffen, leiden dikwijls tot spontane abortus van de vrucht in een vroeg stadium van de zwangerschap, of tot miskramen.

Vele erfelijke ziekten zijn recessief, d.w.z. dat ze alleen tot uiting komen wanneer de mutatie aanwezig is op beide chromosomen die de betreffende genetische informatie bevatten, de zogenaamde homozygote toestand. Dit is bijvoorbeeld het geval bij fenylketonurie. Het zal duidelijk zijn dat de kans op het optreden van afwijkingen in ons nageslacht zal toenemen indien het aantal dragers van recessieve mutaties ten gevolge van chemische stoffen uit het milieu toeneemt; al komt dat misschien pas over een aantal generaties tot uiting. Men schat dat momenteel al 7-9% van alle levend geboren babies een min of meer ernstige erfelijke afwijking heeft!

* Inleiding gehouden op de Bedrijfsgeneeskundige dagen, 6 en 7 mei 1976 te Eindhoven

** Research-medewerker van het Medisch biologisch laboratorium TNO, Rijswijk ZH

Herstel van beschadigingen van het DNA

Een groot deel van de beschadigingen die in het DNA worden aangebracht door chemische stoffen of door straling kunnen door het organisme weer worden hersteld. Dit herstel geschiedt via een aantal enzymatische reacties en heeft tot gevolg dat mutagene beschadigingen uit het DNA worden verwijderd en dus niet tot een mutatie leiden. Organismen waarin dit herstelvermogen is geblokkeerd, zogenaamde hersteldeficiënte mutanten, hebben dan ook een verhoogde gevoeligheid voor mutagene agentia.

Hersteldeficiënte mutanten, die het eerst geïsoleerd en bestudeerd werden bij bacteriën, hebben een grote bijdrage geleverd tot onze kennis van herstelprocessen in de cel. Ook bij de mens zijn een aantal erfelijke ziekten bekend, zoals xeroderma pigmentosum, waarbij een defect in het vermogen tot herstel van beschadiging in DNA is vastgesteld. Xeroderma-patiënten blijken bovendien een verhoogde gevoeligheid voor kanker te hebben.

Dit wijst op het bestaan van een mogelijke relatie tussen het tekort schieten van herstelprocessen en het ontstaan van kanker.

Aantonen van mutaties in bacteriën

Een van de meest gevoelige methoden om stoffen aan te tonen die DNA beschadigen, maakt gebruik van het vermogen van deze stoffen om mutaties in bacteriën te induceren.

Bacteriën zijn in principe in staat om uit eenvoudige grondstoffen, zoals ammoniumzouten en glucose, alle bouwstenen te synthetiseren die ze voor hun groei en vermenigvuldiging nodig hebben. Indien nu echter in een bacterie een mutatie is opgetreden die tot gevolg heeft dat een bepaalde bouwsteen niet meer zelf kan worden gesynthetiseerd, dan zal deze bacterie zich niet meer kunnen vermenigvuldigen, tenzij de betreffende bouwsteen aan het voedingsmedium wordt toegevoegd. Als bijvoorbeeld een mutatie is opgetreden in een gen dat codeert voor een enzym dat betrokken is bij de synthese van het aminozuur histidine, dan heeft dit tot gevolg dat de bacterie alleen maar kan groeien in een medium dat histidine bevat.

Een dergelijke bacterie noemt men histidinedeficiënt (of histidine-auxotroof) en de betreffende mutatie een voorwaartse mutatie naar histidine-deficiëntie. Wanneer men nu een groot aantal van deze bacteriën (bijv. 10^8) op twee petrischalen met een vaste voedingsbodem uitstrijkt, waarbij aan de ene schaal wel en aan de andere geen histidine is toegevoegd, dan zal door vermenigvuldiging van de cellen op de eerste een dicht bacteriedek ontstaan, op de tweede niet.

Meestal zijn in het tweede geval echter toch enkele bacterie-kolonies gegroeid. Deze komen voort uit bacteriecellen waarin 'spontaan' een zogenaamde terugmutatie is opgetreden die de cellen het vermogen heeft teruggegeven om zelf histidine te maken. Deze bacteriën zijn dus weer histidine-onafhankelijk geworden (prototroof) en kunnen dus wel tot een kolonie uitgroeien.

Men heeft op deze wijze dus een eenvoudige selectiemethode in handen waarmee men het ontstaan van mutaties kan aantonen, ook als deze met een zeer lage frequentie voorkomen. Spontaan, dus zonder behandeling van de bacteriën met een mutageen agens, ligt deze frequentie in de orde van grootte van 10^{-6} tot 10^{-8} ; d.w.z. dat er één terugmutant wordt aangetroffen op 10^6 tot 10^8 bacteriën. De spontane terugmutatiefrequentie is afhankelijk van de bacteriestam en de mutatie waarop men selecteert.

De terugmutatiefrequentie kan sterk worden verhoogd door de inwerking van chemische stoffen of van straling; afhankelijk van het agens en de dosering kan deze verhoging oplopen tot een factor 10.000. De mate van de verhoging bij een bepaalde dosis is een maat voor de mutageniteit van het agens.

Hoewel de bouw van de chromosomen van hogere organismen afwijkt van die van het bacteriechromosoom, is de samenstelling en structuur van het essentiële bestanddeel, het DNA, in alle organismen in principe gelijk. Men dient er dan ook rekening mee te houden dat een stof die mutageen is voor een bacterie, in beginsel ook voor de mens mutageen zal zijn. Het effect van dergelijke stoffen in zoogdieren, inclusief de mens, wordt echter mede bepaald door vele andere factoren, zoals absorptie, distributie, excretie en metabole omzettingen.

Metabole activering

Eén van de belangrijkste factoren die het effect van een chemische stof in een zoogdier bepalen is hun metabolisme waardoor de stof geïnactiveerd of juist geactiveerd wordt. Vele stoffen worden pas carcinogeen en/of mutageen na omzetting in het lichaam (bioactivering). Vooral de lever neemt bij deze omzetting een belangrijke plaats in (zie ook het artikel van *Den Engelse*, 1976). Voor de evaluatie van de resultaten van bacteriële mutatietesten, met betrekking tot de mens, moet men dan ook terdege met deze omzettingen rekening houden.

Bij de hieronder te beschrijven test met de bacterie *Salmonella typhimurium*, de zogenaamde Ames-test, wordt dit gedaan door toevoeging van een leverhomogenaat aan het mengsel van de te testen stof en de bacteriën. Een dergelijk homogenaat bevat de enzymen, zoals de 'mixed function oxidases', die de omzettingen welke normaliter *in vivo* in de lever zouden plaatsvinden, nu *in vitro* bewerkstelligen. De op deze wijze omgezette stof kan dan op de bacteriën inwerken en hierin eventueel mutaties induceren. Meestal wordt een homogenaat van rattelever gebruikt, maar men kan ook levers van andere diersoorten (ook de mens) nemen, of homogenaten maken van andere organen, bijv. de long.

De gevoeligheid van het testsysteem kan vaak enorm worden verhoogd door de metabole activiteit van de leverhomogenaten op te voeren. Dit doet men door levers te gebruiken van ratten die van te voren zijn behandeld met stoffen als phenobarbital, 3-methylcholanthreen of aroclor 1254 (een commercieel verkrijgbaar mengsel van gechloreerde bifenylverbindingen).

Door toevoegen van een weefselhomogenaat kan men dus de mutagene werking aantonen van stoffen die pas door bioactivering mutageen worden; voorts kan men door al dan niet een homogenaat toe te voegen nagaan of een bepaalde stof bioactivering nodig heeft alvorens mutageen te zijn, of dat de mutagene werking door metabole omzettingen juist teniet wordt gedaan.

De Ames-test

Bij deze test worden dus bacteriën gebruikt om mutaties aan te tonen, terwijl het zoogdiermetabolisme *in vitro* wordt nagebootst door toevoeging van een leverhomogenaat. De uitvoering is heel eenvoudig (zie ook Ames e.a. 1975): histidine-behoefte bacteriën worden gemengd met een 0,6% agaroplossing en met de te onderzoeken stof, leverhomogenaat en voor de omzetting benodigde cofactoren. Het mengsel wordt uitgegoten op petrischalen met een vaste voedingsbodem zonder histidine. Na stollen van de agar worden de schalen gedurende 48 uur bij 37 °C geïncubeerd, waarna het aantal kolonies wordt geteld afkomstig van de bacteriën die door de geïnduceerde terugmutatie weer zelf histidine kunnen maken. Dit aantal wordt vergeleken met dat van een controle-experiment waarbij de te testen stof wordt weggelaten en de bacteriegroei dus uitsluitend afhankelijk is van spontane terugmutaties.

Nadat in enkele oriënterende experimenten bepaald is in welk concentratiegebied de stof niet toxisch is voor de bacterie, wordt met verschillende concentraties een dosis-effect relatie bepaald. Met behulp hiervan kan men de mate van mutageniteit vergelijken met die van bekende stoffen en een indruk krijgen van de laagste dosis die nog mutageen is. Om de optimale testomstandigheden voor de betreffende stof te verkrijgen, dienen ook andere parameters, zoals de hoeveelheid leverhomogenaat per petrischaal, te worden gevarieerd. De stof (of een mengsel van stoffen) moet oplosbaar zijn – liefst in water, alcohol, aceton of dimethylsulfoxide – en bij voorkeur niet te vluchtig zijn of in oplossing ontleden. Bovendien moet men verschillende bacteriestammen gebruiken om stoffen die verschillende typen mutaties induceren te kunnen detecteren. Het bacterie-DNA kan namelijk op verschillende manieren gemuteerd worden, voornamelijk door basepaarsubstituties en door 'frameshift'-mutaties.

Een basepaarssubstitutie is een verandering in het DNA waarbij door de mutatie een base is vervangen door een andere. Dit heeft tot gevolg dat bij de eiwitsynthese een verkeerd aminozuur wordt ingebouwd in het eiwit dat door het betreffende stukje DNA wordt gecodeerd.

Een 'frameshift'-mutatie is een additie of deletie van één of twee baseparen, waardoor de aflezing van de genetische code vanaf de plaats van de mutatie ontregeld is.

In het systeem van Ames kan men met één bacteriestam één type mutatie aantonen. De gebruikte stammen zijn alle histidine-behoefte en bevatten verschillende typen histidine-mutaties, hetzij een

basepaarssubstitutie, hetzij verschillende soorten 'frameshift'-mutaties. Om het systeem gevoeliger te maken zijn de stammen bovendien hersteldeficiënt en meer permeabel gemaakt voor grote moleculen, zoals polycyclische koolwaterstoffen. Voorts is de 'reikwijdte' van de stammen verhoogd door invoering van een zogenaamde R-factor, waardoor de stammen gevoelig blijken te zijn voor een groter aantal mutagene stoffen, met name voor nitrofuranen. Door de diverse modificaties die door Ames in zijn stammen zijn aangebracht, zijn ze niet meer pathogeen.

Voorspellende waarde van de Ames-test m.b.t. de carcinogeniteit van stoffen

Ames heeft in dit testsysteem ongeveer 300 stoffen onderzocht, zowel bekende carcinogenen als niet-carcinogenen (McCann e.a. 1975 en 1976). Bijna 90% van de carcinogene stoffen (157/179) is in dit systeem mutageen. Hieronder bevinden zich verschillende typen carcinogene stoffen, zoals aromatische amines, chlooralkylethers, epoxiden, polycyclische koolwaterstoffen, nitrosamines, aflatoxinen en antibiotica. Deze 90% correlatie geldt ook voor de stoffen die carcinogeen voor de mens zijn, zoals 2-naftylamine, vinylchloride en condensaten van cigaretterook.

Van de 117 onderzochte niet-carcinogene stoffen waren er 101 evenmin mutageen, d.i. 87%.

In een ander onderzoek, recentelijk uitgevoerd door het Centraal toxicologisch laboratorium van ICI in Engeland, waarbij 120 chemische stoffen in verschillende testsystemen werden onderzocht, werd eveneens een 90% correlatie gevonden tussen carcinogeniteit in proefdieren en mutageniteit in *Salmonella* bacteriën (Bridges 1976, p. 198). Vanwege deze sterke correlatie tussen mutageniteit en carcinogeniteit heeft de Ames-test dus een grote voorspellende waarde voor de carcinogeniteit van chemische stoffen!

Uit de resultaten van deze test komt ook een meer kwantitatieve relatie naar voren: in het algemeen blijken sterk carcinogene stoffen ook sterk mutageen te zijn, en zwak carcinogene stoffen zwak mutageen. Hierbij dient men te bedenken dat carcinogeniteitstesten niet altijd even betrouwbaar zijn; in het bijzonder voor zwak carcinogene stoffen is het moeilijk de carcinogeniteit ondubbelzinnig vast te stellen.

Voor enkele van de 'fout positieve' stoffen in de Ames-test – dus de stoffen die wél mutageen zijn terwijl ze als niet-carcinogeen werden beschouwd – is bij hernieuwd testen (soms met andere muize- of rattestammen) toch een carcinogene werking aangetoond. Voorbeelden hiervan zijn niridazol en furylfuramide, een nitrofuraan-derivaat dat in Japan jarenlang als conserveringsmiddel voor voedsel is gebruikt. Sommige stoffen die mutageen zijn in de Ames-test zijn nog niet op carcinogeniteit getest: ethidiumbromide, een geneesmiddel tegen slaapziekte en een veel gebruikt hulpmiddel bij biochemisch

onderzoek (Mattern 1976), proflavine, een antisepticum en dexton, een pesticide.

Er zijn ook een aantal 'fout-negatieve' stoffen, dus carcinogeen bevonden stoffen die géén mutaties geven in de Ames-test.

Hiervoor is vaak een verklaring aan te voeren (McCann e.a. 1976), zoals bioactivering door de darmflora i.p.v. door de lever (bijv. bij cycasine). Momenteel wordt verder onderzoek verricht om de test te verbeteren voor dit soort stoffen; het is echter onwaarschijnlijk dat een correlatie van 100% zal worden bereikt, omdat een aantal stoffen wellicht carcinogeen zal zijn via een niet-mutageen mechanisme, of omdat de activering *in vivo* via een uitzonderlijk mechanisme verloopt.

Voor- en nadelen van de Ames-test

De voordelen van deze test zijn dat hij snel, goedkoop, gevoelig en eenvoudig uit te voeren is, waardoor men in relatief korte tijd een groot aantal stoffen kan onderzoeken. Bovendien toont men in dit systeem puntmutaties aan. Deze zijn grotendeels verantwoordelijk voor de erfelijke ziekten bij de mens.

Het nadeel is dat de afstand bacterie-mens slechts ten dele overbrugd is – niet alleen wat betreft de metabole activering, maar ook wat betreft de structuur van het chromosoom – en dat men geen chromosoomafwijkingen kan aantonen. Hiervoor zijn testen met zoogdiercelsystemen in ontwikkeling, zoals door *Tates* (1976) is uiteengezet. Deze zijn echter meestal tijdrovender en kostbaarder en dienen derhalve bij voorkeur toegepast te worden op een beperkt aantal geselecteerde (bijv. met behulp van de Ames-test) stoffen die van grote economische of sociale waarde worden geacht.

Toepassingsmogelijkheden

1 Voorspelling van mutageniteit en carcinogeniteit voor de mens van

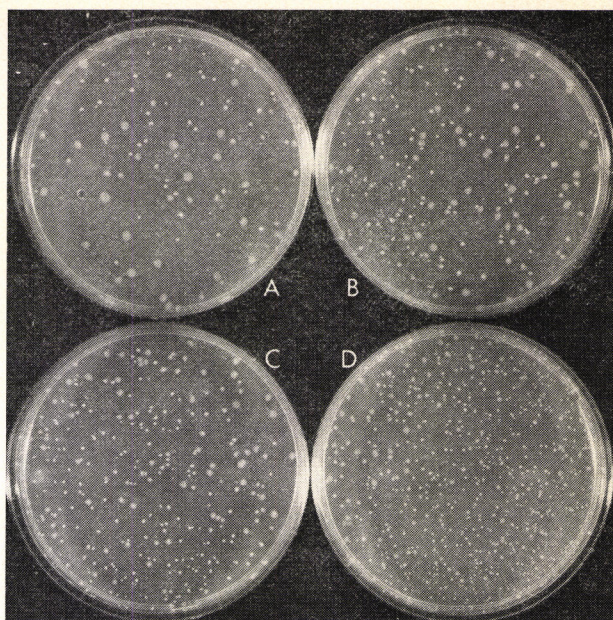
- nieuwe chemische stoffen zoals geneesmiddelen, pesticiden, kleurstoffen, voedingsconserveringsmiddelen e.d., vooral in een vroeg stadium van productontwikkeling;

- onbekende stoffen of mengsels hiervan, die bijvoorbeeld kunnen voorkomen in industrieel afvalwater (zie *Figuur 1*);

- metabolieten die in bloed of urine van mens en proefdier terechtkomen.

2 Aangeven van prioriteiten voor het testen van stoffen in meer kostbare testsystemen (zie ook *Bridges* 1976).

3 Als hulpmiddel bij fundamenteel onderzoek naar de rol en het mechanisme van metabole activering bij het ontstaan van mutaties en tumoren, en naar de mogelijke interactie van verschillende stoffen hierbij.



Figuur 1. Inductie van mutanten in de Salmonella typhimurium stam TA100 door toevoeging van oplopende hoeveelheden van 1000 × verdund industrieel afvalwater. A0 μ l; B25 μ l; C50 μ l; D200 μ l

Summary

The Ames-test, a quick screeningmethod for mutagenic and carcinogenic agents

A short-term test system is described for detection of mutagenic and carcinogenic agents. This test, developed by *Ames*, is based on the ability to detect mutations in bacteria after *in vitro* metabolic activation of the test substances by mammalian microsomal enzymes. The system is quick, cheap, sensitive and easy to perform. Testing of 300 chemicals by *Ames* et al. has shown a 90% correlation between mutagenicity and mammalian carcinogenicity.

Literatuur

- Ames, B.N., J. McCann & E. Yamasaki*, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31 (1975) 347-364
- Bridges, B. A.*, Short term screening tests for carcinogens (review). *Nature* 261 (1976) 195-200
- Engelse, L. den*, Mechanismen van chemische mutagenese en chemische carcinogenese. *T. soc. Geneesk.* 55 (1977) 133-135
- Kroes, R.*, Onderzoek naar carcinogene eigenschappen: vroeger en nu. *T. soc. Geneesk.* 55 (1977) 126-132, 135
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki & B. N. Ames*, Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 5135-5139
- McCann, J. & B. N. Ames*, Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 950-954
- Mattern, Ina E.*, Mutagenicity of ethidium bromide after metabolic activation *in vitro* (abstr.). *Mutation Res.* 38 (1976) 120
- Tates, A. D.*, Cytogenetische technieken voor de detectie van chemische mutagenia in zoogdiersystemen. *T. soc. Geneesk.* 55 (1977) 140-145, 161

Cytogenetische technieken voor de detectie van chemische mutagen- tia in zoogdiersystemen*

Dr. A. D. TATES** te Oegstgeest

Inleiding

In het artikel van dr. *Mattern**** werd uiteengezet hoe met behulp van de *Ames*-test informatie kan worden verkregen over het mutageen effect van stoffen. Er werd gewezen op de correlatie die voor allerlei chemische verbindingen is gevonden tussen mutageniteit in deze test en carcinogeniteit in zoogdieren. Ook werd duidelijk gesteld dat de *Ames*-test, evenals elke testmethode, behalve voordelen ook nadelen heeft. De nadelen hebben vooral betrekking op de problemen die ontstaan wanneer men schattingen wil maken van de omvang en aard van de genetische schade bij de mens als gevolg van blootstelling aan mutagene stoffen, bijvoorbeeld voor stoffen die van grote maatschappelijke waarde worden geacht. In dergelijke gevallen, maar ook voor allerlei zuiver wetenschappelijke onderzoeken, is het noodzakelijk dat studies met microorganismen worden aangevuld met onderzoek aan zoogdiersystemen. Essentiële verschillen tussen beide celsystemen zijn o.a.:

- de zoogdiercel bevat meer DNA en een andere chromosoomstructuur dan de cel van een microorganisme;
- zoogdiercellen hebben meer 'repetitief' DNA dan de cellen van microorganismen; In de zoogdiercel blijkt slechts 6% van het DNA te coderen voor de verschillende genetische eigenschappen.
- zoogdieren hebben immunologische verdedigingsmechanismen tegen lichaamsvreemde stoffen en deze lijken bij microorganismen te ontbreken;
- cellen van microorganismen kunnen uitsluitend stoffen in opgeloste vorm opnemen, terwijl zoogdiercellen ook vaste stoffen (bijv. asbestnaaldjes) kunnen incorporeren;
- wat betreft de farmakokinetiek bestaan er tussen beide celsystemen grote verschillen;
- bij microorganismen kan men uitsluitend de geïnduceerde puntmutaties en kleine deleties detecteren, terwijl in de zoogdiercel bovendien allerlei types chromosoomafwijkingen kunnen worden geanalyseerd, al is dit ook dikwijls niet eenvoudig.

Genetische studies met zoogdiersystemen

In de geslachts- en somatische cellen van zoogdieren kunnen in principe drie types genetische veranderingen

In dit artikel wordt aangegeven waarom onderzoek naar chromosoomafwijkingen bij zoogdiersystemen een nuttige bijdrage kan vormen tot onderzoek naar de schadelijke genetische effecten van chemische stoffen in ons leefmilieu. Naast een algemeen schets van de karakteristieken van het cytogenetisch onderzoek, wordt een beschrijving gegeven van de meest gangbare cytologische technieken voor de detectie van chromosoomafwijkingen in somatische cellen en geslachtscellen.

Met behulp van een tweetal voorbeelden wordt geïllustreerd dat alleen door toepassing van een combinatie van technieken kan worden vastgesteld dat een stof chromosoomafwijkingen induceert.

gen worden geïnduceerd, namelijk: puntmutaties, structurele chromosoomafwijkingen en numerieke chromosoomafwijkingen.

Voor de detectie van in vivo geïnduceerde puntmutaties zijn verschillende technieken ontwikkeld (o.a. de zogenaamde specifieke locus test) die vrijwel uitsluitend worden toegepast bij de muis. De inductie van puntmutaties kan ook worden bestudeerd bij in vitro behandelde somatische cellen van mens, muis, Chinese hamster of andere zoogdieren. Bij vrijwel alle *in vivo* en *in vitro* methodes wordt informatie verkregen over mutatie-inductie bij hooguit enkele tientallen genen terwijl het totale aantal genen bij zoogdieren geschat wordt op 20.000-30.000. Een uitvoeriger beschrijving van deze technieken valt buiten het kader van dit artikel. In het algemeen kan worden gesteld dat de methodes tijdrovend en kostbaar zijn, zodat zij in hun huidige vorm nagenoeg uitsluitend worden toegepast voor zuiver wetenschappelijke studies, alsmede voor onderzoek aan stoffen met onbetwistbaar maatschappelijke relevantie. Daarnaast wordt in verschillende laboratoria gewerkt aan de ontwikkeling van nieuwe testmethodes voor de detectie van puntmutaties in zoogdiercellen, die goedkoper zijn en waarmee de mutatie-inductie kan worden bestudeerd op grotere aantallen loci.

Cytogenetische technieken

De moeilijkheden die men ondervindt bij de detectie van puntmutaties bij zoogdieren zijn er de oorzaak van dat de meeste informatie over de genetische effecten van chemische stoffen bij zoogdieren is verkregen met behulp van cytogenetische technieken. Met behulp van deze technieken gaat men na of

N.B. De auteur dankt dr. I. E. *Mattern* en dr. P. *Buul* voor hun kritisch commentaar bij het doorlezen van het manuscript.

* Inleiding gehouden op de Bedrijfsgeneeskundige dagen, 6 en 7 mei 1976 te Eindhoven

** Sylviuslaboratorium voor stralengenetica en chemische mutagenese, Leiden.

*** T. soc. Geneesk. 55 (1977) 136-139