

Toxicologie van bloed en bloedvormende organen

B.J. Blaauboer
R.A. Woutersen



O G I S C H E R E E K S 5

5.9 B157 (1)

CIVO-INSTITUTEN TNO
ZEIST

(1)
615.97154

Toxicologie van bloed en bloedvormende organen



Toxicologische Reeks 5

In de Toxicologische Reeks verschijnen publikaties over het gedrag van chemicaliën in levende organismen en ecosystemen en over de manier waarop deze chemicaliën schade kunnen toebrengen aan de mens en andere levende organismen. Deze reeks staat onder redactie van: prof. dr. J.H. Koeman, drs. G.J. van Esch, prof.dr. H. van Genderen, dr. A.P. de Groot, prof, dr. P.Th. Henderson en R.J. P. Aalpol (Pudoc).

615.9:616.1

Toxicologie van bloed en bloedvormende organen

B.J. Blaauboer
R.A. Woutersen



Pudoc Wageningen 1988

Dr. B.J. Blaauboer is verbonden als universitair hoofddocent toxicologie aan de vakgroep Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie van de Fakulteit der Diergeneeskunde van de Rijksuniversiteit Utrecht.

Dr. R.A. Woutersen is verbonden als wetenschappelijk medewerker aan het Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO.

CIP-gegevens Koninklijke Bibliotheek, Den Haag

Blaauboer, B.J.

Toxicologie van bloed en bloedvormende organen / B.J. Blaauboer, R.A. Woutersen. — Wageningen : Pudoc. — Ill. — (Toxicologische reeks ; 5)

Met index, lit. opg.

ISBN 90-220-0914-9

SISO 605.19 UDC 615.9:611.4 NUGI 743

Trefw.: bloed ; toxicologie.

ISBN 90 220 0914 9

© Centrum voor Landbouwpublicaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen, 1988.

Niets uit deze uitgave, met uitzondering van referaat, titelbeschrijving en korte citaten ten behoeve van een boekbespreking, mag worden gereproduceerd, opnieuw vastgelegd, vermenigvuldigd of uitgegeven door middel van druk, fotokopie, microfilm, langs elektronische of elektromagnetische weg of op welke andere wijze ook zonder schriftelijke toestemming van de uitgever Pudoc, Postbus 4, 6700 AA Wageningen.

Voor alle kwesties inzake het kopiëren uit deze uitgave: Stichting Reprorecht, Amsterdam.

Inhoud

Dankbetuiging	1
1 Inleiding	2
2 Samenstelling, vorming en functies van bloed: het corpusculaire deel	4
2.1 Inleiding	4
2.2 Vorming van bloedcellen	4
2.3 Kenmerken en functies van bloedcellen	7
2.3.1 Rode bloedcellen of erythrocyten	7
2.3.2 Witte bloedcellen of leukocyten	10
2.3.2.1 Granulocyten	10
2.3.2.2 Lymfocyten	11
2.3.2.3 Monocyten	11
2.3.3 Bloedplaatjes of trombocyten	12
3 Samenstelling, vorming en functies van bloed: het niet-corpusculaire deel	13
3.1 Inleiding	13
3.2 Anorganische stoffen	13
3.3 Voedings- en afvalstoffen	14
3.4 Eiwitten	16
3.5 Stollingsfactoren	16
4 Toxicologie van de bloedcelvorming	18
4.1 Inleiding	18
4.2 Benzeen	19
4.2.1 Gebruik en blootstelling	19
4.2.2 Metabolisme	20
4.2.3 Hematotoxiciteit	20
4.2.4 Leukemie	21
4.2.5 Hematotoxiciteit bij proefdieren	21
4.2.6 Immunotoxiciteit	22
4.2.7 Mogelijke mechanismen van de benzeenintoxicatie	22
4.3 Lood	23
4.3.1 Gebruik en blootstelling	23
4.3.2 Hematotoxiciteit	24
4.3.3 Immunotoxiciteit	26
4.4 Ribavirine	27
4.5 Cytogenetisch onderzoek van schade aan beenmergcellen	28
4.5.1 Inleiding	28

4.5.2	Chromosomale afwijkingen (CA's)	28
4.5.3	Sister chromatid exchanges (SCE's)	29
4.5.4	Micronuclei (MN)	31
5	Toxicologie van de rode bloedcel	33
5.1	Inleiding	33
5.2	Binding van stoffen aan ferro-heem van hemoglobine	33
5.2.1	Zuurstofbindingskarakteristiek van hemoglobine	34
5.2.2	Binding van koolmonoxyde	34
5.3	Ferrihemoglobine-vorming	35
5.3.1	Ferrihemoglobine-vormende stoffen	36
5.3.2	Werkingsmechanismen van ferrihemoglobine-vormende stoffen	38
5.4	Vorming van lichaampjes van Heinz	39
5.5	Hemolyse	40
5.5.1	Normale afbraak van erythrocyten	41
5.5.2	Erfelijke afwijkingen in het metabolisme van de erythrocyt, resulterend in hemolyse	42
6	Toxicologie van bloed- en beenmergcellen in vitro	44
6.1	Inleiding	44
6.2	Oxydatieve hemolyse	45
6.3	Effecten van fototoxische stoffen op erythrocyten in vitro; fotohemolyse	50
6.3.1	Inleiding	50
6.3.2	Fototoxiciteit bij mens en dier	50
6.3.3	Werkingsmechanisme van fototoxische stoffen: fotohemolyse	52
6.4	Vorming en reductie van ferrihemoglobine in vitro	54
6.5	Effecten van toxische stoffen op beenmergcellen in vitro	57
7	Toxicologie van bloedplasma	60
7.1	Inleiding	60
7.2	Plasma-eiwitten	60
7.2.1	Enzymen en hormonen	60
7.2.2	Transporteiwitten	63
7.3	Nutriëntensamenstelling	65
7.3.1	Vitaminen	65
7.3.2	Mineralen	66
7.4	Water- en zouthuishouding	66
8	Toxicologie van de bloedstelping	68
8.1	Inleiding	68
8.2	Bloedstelpingstesten	69
8.3	Functioneren van plaatjes	70
8.4	Aanmaak en functioneren van stollingsfactoren	71
9	Toxicologie van het immuunsysteem	73
9.1	Inleiding	73
9.2	Het immuunsysteem	73

9.3	Methoden voor detectie van een immunotoxisch effect	77
9.4	Stoffen met een immunotoxische werking	79
9.4.1	Meervoudig gechloreerde bifenylen (PCB's)	79
9.4.2	2,3,7,8-Tetrachloordibenzo-p-dioxine (TCDD)	79
9.4.3	Organotinverbindingen	81
9.5	Slot	83
Literatuur		84
Index		88

Dankbetuiging

De auteurs danken hun collega's drs. G.S.J. Bunnik, dr. H.E. Falke, A. van Garderen-Hoetmer, dr. C.F. Kuper, drs. M.I. Willems en dr. J.W.G.M. Wilmer van het Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO; C.W.M. van Holsteijn, dr. A.H. Penninks en prof. dr. W. Seinen van de Vakgroep Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie, RU Utrecht; dr. J.G. Vos van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne; dr. J.W.N. Akkerman van de Vakgroep Haematologie, RU Utrecht; dr. G.J. van den Engh van het Radiobiologisch Instituut TNO en dr. H.B. Lewis van Smith Kline & French Laboratories, Philadelphia, USA voor het kritisch doorlezen van tekstonderdelen of het ter beschikking stellen van illustraties. De verzorging van veel teken- en fotowerk was in handen van J.M. Eyndhoven van de Vakgroep Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie, RU Utrecht.

1 Inleiding

Bloed speelt in vele opzichten een centrale rol bij het functioneren van dierlijke organismen. Het verzorgt het transport van zuurstof en van voedingsstoffen. Bovendien vervoert bloed afvalstoffen naar de uitscheidingsorganen en ook stoffen (o.a. hormonen) die een belangrijke rol spelen bij de homeostase, dat wil zeggen het in-standhouden van het organisme. Verder is bloed van belang bij processen als de osmoregulatie, de regulatie van de lichaamstemperatuur en de bescherming van het lichaam tegen infecties.

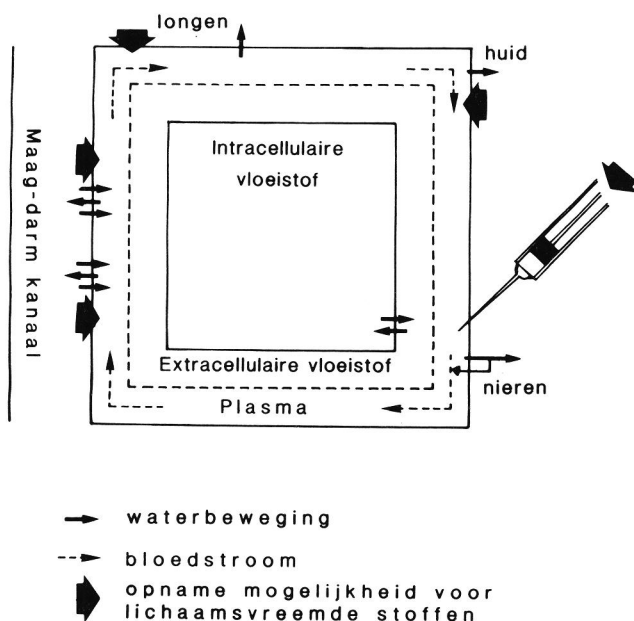
Bloed kan worden opgevat als een orgaan bestaande uit de inhoud van alle bloedvaten in het organisme. Verschillende eigenschappen van dit orgaan zijn van belang voor de goede vervulling van zijn functies. Zo is de samenstelling, en vooral de constantheid (binnen zekere grenzen) hiervan, erg belangrijk voor de transportfuncties. Een belangrijk aspect hierbij is dat bloed stroomt. In het bloed bestaat dus onder normale omstandigheden geen structureel verband tussen cellen, zoals in andere organen, en ongeveer de helft bestaat uit extracellulaire vloeistof: het bloedplasma. Bloed is voor het lichaam zo belangrijk, dat het beschikt over een mechanisme om bloedverlies te voorkomen: de bloedstelping. Een zeer gecompliceerd systeem van stollingsfactoren draagt zorg voor het afsluiten van gaten in bloedvaten, die kunnen ontstaan bij verwondingen (Hoofdstuk 8).

Ernstig bloedverlies en veranderingen in de bloedsamenstelling hebben vaak grote gevolgen voor het voortbestaan van het organisme. Als bij voorbeeld het aantal rode bloedlichaampjes sterk verminderd is zal het zuurstoftransport niet goed verlopen en zal er een zuurstoftekort in de weefsels ontstaan. Een ander voorbeeld: koolmonoxyde verstoort de zuurstofbinding van het bloed waardoor ook een zuurstoftekort in de weefsels kan ontstaan. Wanneer deze situatie langer dan twee minuten duurt, worden de hersenen ernstig beschadigd en kan de dood het gevolg zijn.

In het toxicologisch onderzoek neemt bloed een belangrijke plaats in. Veranderingen in het zgn. bloedbeeld worden als indicatie voor vergiftigingen gebruikt (Hoofdstukken 2 en 4). Het in verhoogde concentratie voorkomen in bloedplasma van bepaalde eiwitten, die normaal in hoge concentraties in cellen van andere organen dan bloed te vinden zijn, is een diagnostisch criterium voor het vaststellen van beschadigingen van dat orgaan (Hoofdstuk 7).

De gemakkelijke bereikbaarheid van bloed maakt het mogelijk veelvuldig bloedmonsters te nemen. Dit is van belang bij de studie naar het kinetische gedrag van toxische stoffen. In de toxicokinetiek worden processen als opname, verdeling, ophoping, metabolisme en uitscheiding van toxische stoffen bestudeerd. Frequente monsternamen en bepaling van de te onderzoeken stof in plasma geven een beeld van de hoeveelheid opgenomen stof, de snelheid van verdeling en uitscheiding en van de biologische beschikbaarheid van de stof (Figuur 1).

Dit boekje wil de lezer een beeld geven van de invloeden van lichaamsvreemde



Figuur 1. Schematische weergave van de verschillende vloeistofcompartimenten in het lichaam. Tevens is weergegeven hoe deze compartimenten met elkaar in contact staan en hoe lichaamsvreemde (toxische) stoffen het lichaam kunnen binnenkomen. Bloed is bij het transport van deze stoffen belangrijk.

stoffen op de vorming, samenstelling en functies van bloed. Bij de bespreking van de toxische effecten van stoffen zullen veelal de verstoringen van het functioneren van bloed centraal staan; bij uitzondering wordt een stof of groep stoffen als voorbeeld behandeld. Een stof wordt als toxisch aangemerkt als het effect van de stof in de gegeven omstandigheden als schadelijk of hinderlijk voor het organisme aangemerkt kan worden. Hierbij bestaat er een relatie met de dosis: lagere doseringen kunnen onschadelijk zijn, hogere dodelijk. Voor een nadere beschouwing van het begrip toxische stof verwijzen we naar deel 1 in deze Toxicologische Reeks: 'Algemene inleiding in de toxicologie'.

In de volgende hoofdstukken zal eerst aandacht worden besteed aan de vorming, de samenstelling en de functies van bloed, waarbij onder meer ingegaan zal worden op verschillen tussen diersoorten. Tevens zal de invloed van toxische stoffen op de vorming, de samenstelling en het functioneren van het orgaan bloed worden besproken.

2 Samenstelling, vorming en functies van bloed: het corpusculaire deel

2.1 Inleiding

Bloed is een suspensie van cellen in een vloeistof. Door centrifugeren kan men het cellulaire gedeelte van het bloed (de bloedcellen oftewel het corpusculaire gedeelte) scheiden van het vloeibare gedeelte (het plasma of serum).

Het corpusculaire gedeelte van het bloed is te verdelen in drie hoofdgroepen: de rode bloedcellen of erythrocyten, de witte bloedcellen of leukocyten en de bloedplaatjes of trombocyten. De cellen functioneren slechts gedurende een beperkte tijd in het lichaam waarna ze te gronde gaan. Daarom dient er een voortdurende aanmaak van nieuwe bloedcellen plaats te vinden. Interferentie van een lichaamsvreemde stof met een dergelijk dynamisch proces leidt meestal snel tot meetbare veranderingen.

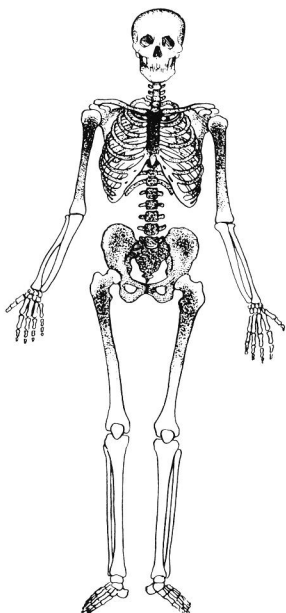
De diverse bloedceltypen vertonen een grote variatie in aantal, waardoor het niet altijd juist is om een afwijking van het bloedbeeld (de verhouding van de aantallen rode en witte bloedcellen) toe te schrijven aan een toxische werking van een stof. Het konijn is wat dit betreft een van de meest onbetrouwbare proefdieren. Een onderzoeker drukte het eens zo uit: 'Bij het konijn is het mogelijk om het bloedbeeld te veranderen door het dier een dreigende blik toe te werpen.'

2.2 Vorming van bloedcellen

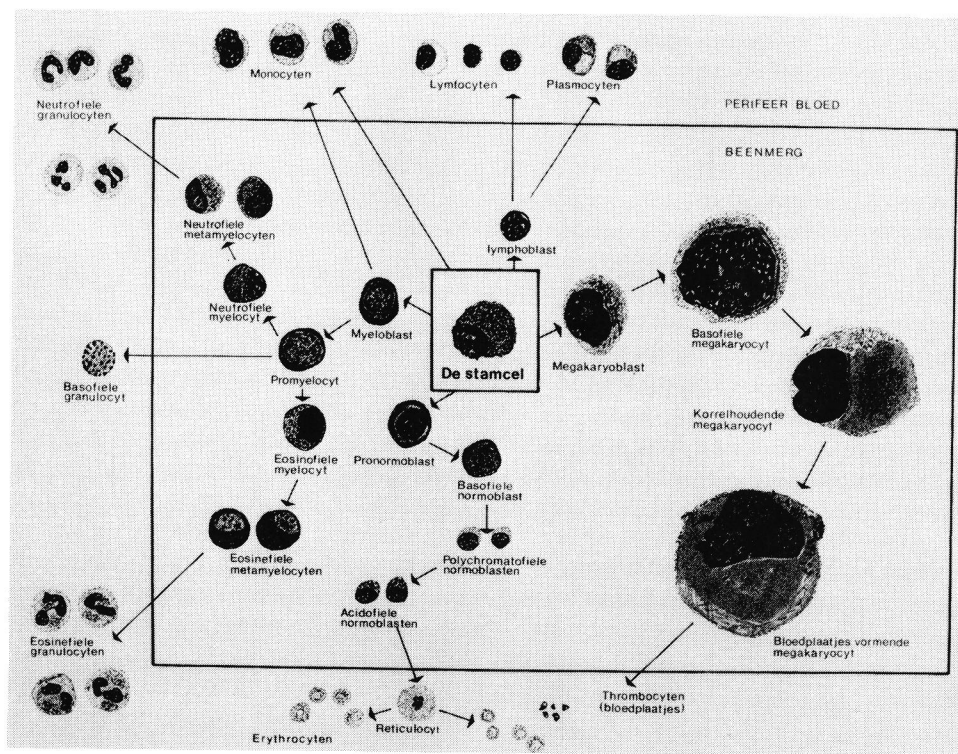
Onder normale omstandigheden vindt de vorming van bloedcellen plaats in het beenmerg en de lymfoïde organen (inclusief thymus).

Bij een volwassene maakt het beenmerg ongeveer 4,6% van het lichaamsgewicht uit, wat bij een persoon van 70 kg neerkomt op ongeveer 3,2 kg. Het bevindt zich in de ribben, het ruggemerg, het borstbeen, de pijpbeenderen en een deel van de schedel (Figuur 2). Onder normale omstandigheden bestaat het beenmerg voor ongeveer 50–70% uit vet; de rest is de belangrijkste vormingsplaats van de diverse bloedcellen.

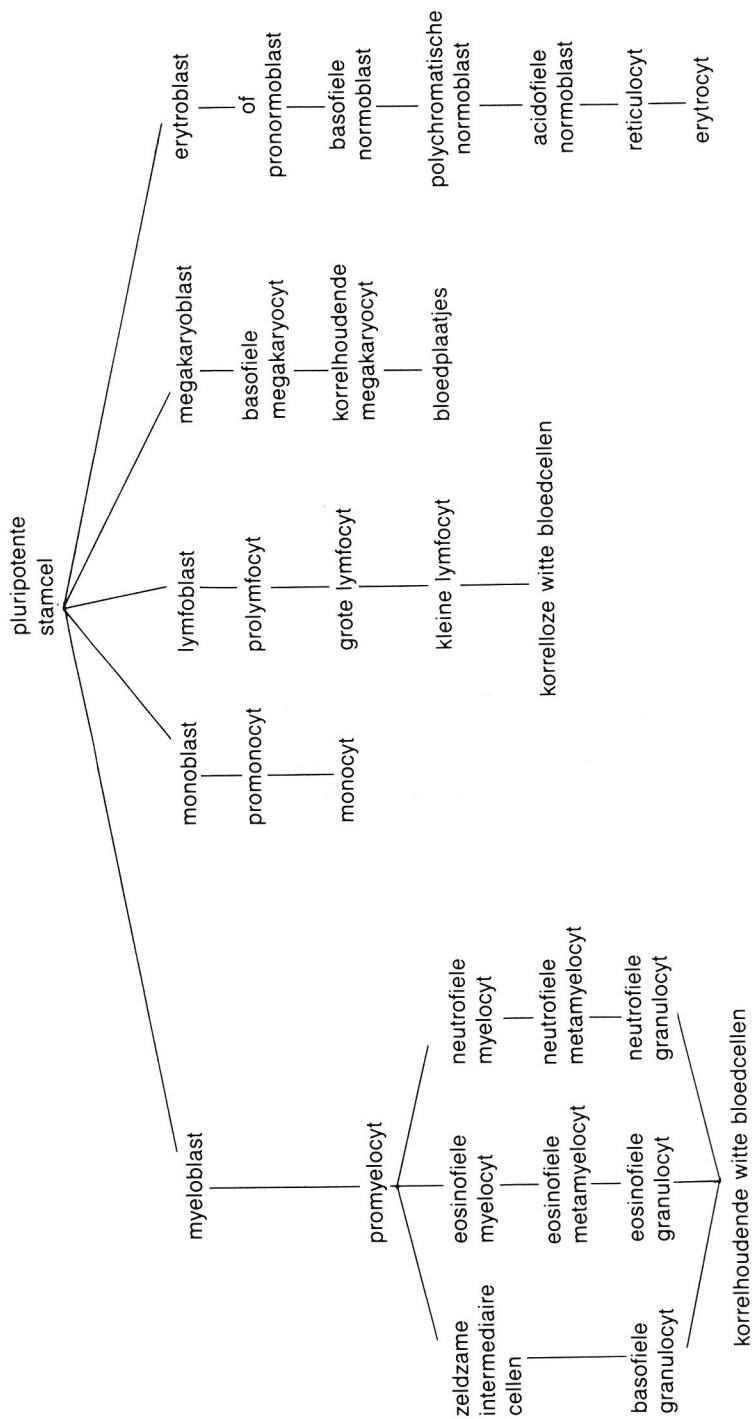
De bloedcellen ontstaan uit de zogenaamde 'pluripotente' stamcellen via diverse delings- en rijpingsstadia (Figuur 3). De witte bloedcellen worden onderverdeeld in de zogenaamde korrelhoudende en de korrelloze leukocyten (Figuur 4). De laatstgenoemde cellen zijn onder te verdelen in lymfocyten en monocyten. De monocyten ontstaan uit de pro-monocyten. Na migratie naar de weefsels, ontstaan uit de monocyten de macrofagen. De Kupffer-cellen in de lever en de alveolaire macrofagen in de longen zijn voorbeelden van macrofagen die uit monocyten zijn ontstaan. De stamcellen van de lymfocyten migreren vanuit het beenmerg naar de lymfoïde organen zoals de milt, de lymffollikels en de thymus waar ze 'uitrijpen' tot lymfocyten (Hoofdstuk 9).



Figuur 2. Lokalisatie van het beenmerg (aangegeven door de stippeling) bij een volwassene.



Figuur 3. De verschillende soorten bloedcellen die in het beenmerg kunnen ontstaan uit de ongedifferentieerde stamcel. Naar G.J. van den Engh e.a., Natuur en Techniek 46 (1978): 540.



Figuur 4. Schema van de vorming van de hoofdtypen bloedcellen uit de stamcel.

Onder normale fysiologische omstandigheden vormt de milt hoofdzakelijk lymfocyten en het beenmerg de cellen van de myeloïde reeks (erythrocyten, granulocyten en trombocyten). Onder pathologische omstandigheden kunnen milt en lever echter sterk bijdragen aan de vorming van erythrocyten, granulocyten of megakaryocyten. Dit verschijnsel wordt aangeduid met extramedullaire (buiten het beenmerg plaatsvindende) hematopoïese. Bij muizen treedt dit verschijnsel zo vaak op dat het normaal beschouwd wordt.

2.3 Kenmerken en functies van bloedcellen

2.3.1 Rode bloedcellen of erythrocyten

De erythrocyten maken het grootste deel uit van de cellen in het bloed (Tabel 1). Deze cellen nemen 40–50% van het volume van het bloed in.

De rode bloedcel van zoogdieren heeft de vorm van een platte schijf die aan de randen wat dikker is dan in het midden. De doorsnede van de erythrocyt varieert sterk per diersoort (Tabel 2), maar ligt voor de meeste zoogdieren rond de 6–8 μm . In het bloed komen naast de uitgerijpte erythrocyten, ook reticulocyten voor. Dit zijn eveneens kernloze, maar nog niet geheel uitgerijpte erythrocyten met een wat grotere diameter.

De inhoud van de erythrocyt bestaat voor ruim 30% uit hemoglobine. Dit eiwit kan via de zgn. heem-groep zuurstof reversibel binden en verzorgt het zuurstoftransport vanuit de longen naar de andere weefsels. Bovendien bindt het hemoglobine koolzuur (als bicarbonaat), dat in de weefsels ontstaat, en vervoert dit naar de longen waar het wordt uitgescheiden.

De erythrocyten van mensen hebben een levensduur van ongeveer 120 dagen. Daarna worden de cellen, voornamelijk door de milt, uit het bloed verwijderd.

De erythrocyten van andere vertebraten dan zoogdieren zijn aanmerkelijk groter en anders van vorm dan die van zoogdieren (Figuren 5 en 6). Bovendien hebben zoogdiererythrocyten geen kern en geen mitochondriën terwijl erythrocyten van andere vertebraten die wel hebben.

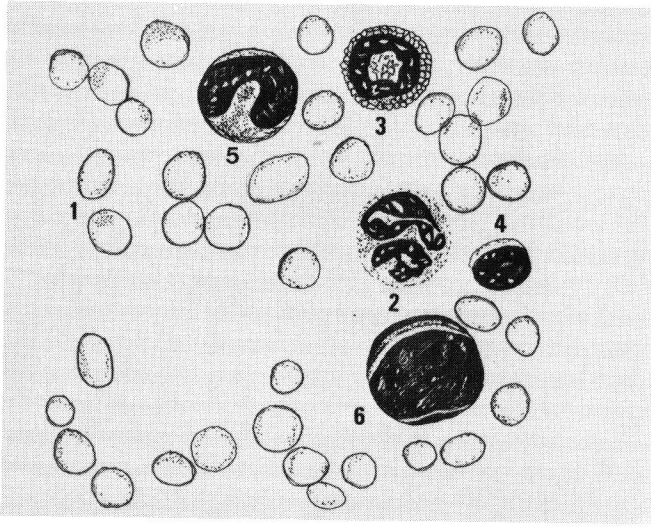
Opmerkelijk is het verschil in levensduur tussen rode bloedcellen van zoogdieren en die van vogels (120 respectievelijk 30–40 dagen). Dit verschil zou wel in verband gebracht kunnen worden met de aanwezigheid van mitochondriën in vogelerythrocyten. Deze celorganellen gebruiken zuurstof bij het proces van de oxydatieve fosforylering, een belangrijk proces in de energiehuishouding van cellen. Bij dit zuurstofverbruik wordt uiteindelijk water gevormd, maar ook kunnen 'tussenprodukten' ontstaan: reactieve vormen van zuurstof, zoals het superoxyde-radicaal. Deze radicalen zijn zeer schadelijk voor de cel. Veel organen, en met name de long en de lever, worden beschermd tegen deze schadelijke zuurstofradicalen door effectieve wegvangsystemen (Hoofdstuk 5). In principe bezitten alle celtypen die aan hoge zuurstofconcentraties worden blootgesteld deze beschermingssystemen, dus ook de rode bloedcellen. In zoogdiererythrocyten zullen, vanwege de afwezigheid van mitochondriën, veel minder actieve vormen van zuurstof ontstaan dan in rode bloedcellen van vogels. Door veelvuldige ontsporingen van het zuurstofverbruik, waardoor actieve vormen van zuurstof ontstaan, zullen vogelerythrocyten eerder verouderen en dus korter overleven.

Tabel 1 Aantal bloedcellen bij diverse diersoorten.

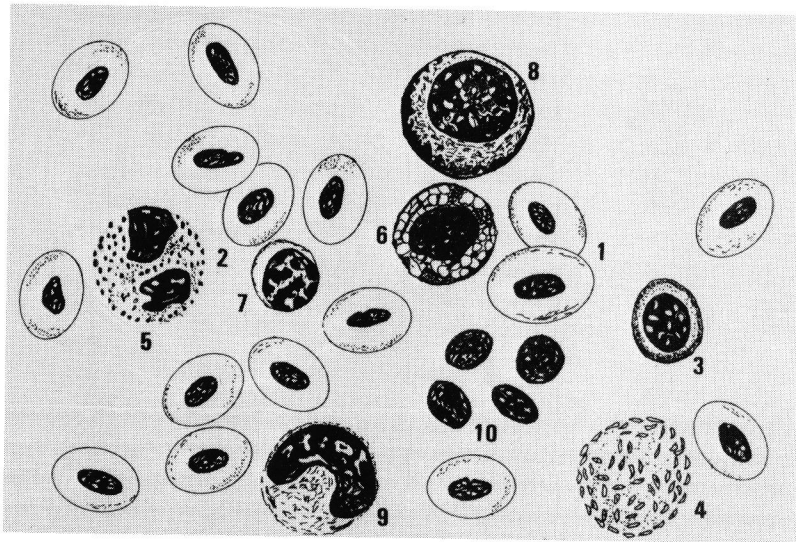
	Erythrocyten ($\times 10^6$) σ/φ	Reticulocyten (%)	Trombocyten ($\times 10^5$)	Leucocyten ($\times 10^3$)	Lymfocyten (%) klein/groot	Granulocyten		Monocyten (%)
						Neutrofiële (%)	Eosinofiële (%)	Basofiële (%)
Mens	5,2/4,5	0,8	2,5	5-10	20-25	65-75	2-5	0,5-1
Aap	4-7	0,3-0,7	8,6-26,5	5,5-12	47-75	21-47	0-6	0-2
Cavia	4,6-6,5	0,5-1,5	12-13,2	3,2-15	55-75	18-35	1-5	0-3
Duif	2,1-4,2	0,2-5	0,7-2,7	10-30	18-50/7-20	15-50	0-5	0-3
Goudhamster	6-9	0,4-2,8	33,6-58,7	3,4-7,6	50-96	3-43	0-2	0
Hond	5,6-6,8	0,2-0,9	16,5-37,8	7,0-11,4	9-50	42-77	0-14	0-1
Kat	7-10	2-3	15-36,5	8,6-27,4	10-64	31-85	1-10	0-2
Kip	3-4/1,5-3	2,5-10	1,7-5,0	9,3-32,3	31-72/6-28	13-49	2-14	1-7
Konijn	4-6,4	1-7	12,6-100	5,2-12	20-90	8-50	1-3	0,5-30
Muis	6-12	2-5	10-40	7-15	35-90	10-60	0-7	0-1
Rat	5,5-10	2-5	43-84	5-25,6	62-75	18-36	1-4	0
Schaap	8-12	soms	26,3-59,8	6,4-9,8	38-72/2-4	21-49	0-20	0,5-2

Tabel 2 Afmetingen (in μm) van de bloedcellen bij diverse diersoorten.

	Erythrocyten	Trombocyten	Lymfocyten klein/groot	Granulocyten		Monocyten
				Neutrofiële	Eosinofiële	Basofiële
Mens	7,0-7,4	3	6-8/15-20	7-9	9	9-12
Aap	7,1-7,5	variabel	7,5-10	12-14	12-14	variabel
Cavia	6,6-7,5	2-3	variabel	10-12	10-15	variabel
Duif	6,4 $\times$ 13,0	6,5	4-6/8-12	6-8	-	-
Hond	6,2-8,0	1-10	7-9/10-12	10-12	10-15	15-19
Kat	3,2-7,5	6	6-12	8-12	10-17	12-18
Kip	7,5 $\times$ 12,0	5-8	4-8/12-15	10-12	10-12	12
Konijn	5,0-7,8	1-3	variabel	7-11	10-15	variabel
Rat	5,7-7,0	-	15	11	11	variabel
Schaap	4,2-5,1	5	7-11/12-20	9-12	10-16	11-17,6



Figuur 5. Bloedbeeld van een rat ($\times 1000$). (1) erythrocyt, (2) neutrofiële granulocyt, (3) eosinofiele granulocyt, (4) kleine lymfocyt, (5) monocyte. Naar: S. Schermer, 1968. The blood morphology of laboratory animals.



Figuur 6. Bloedbeeld van een kip ($\times 1000$). (1) erythrocyten, (2) polychromatische erythrocyt, (3) erythroblast, (4) pseudo-eosinofiele granulocyt, (5) eosinofiele granulocyt, (6) basofiele granulocyt, (7) kleine lymfocyt, (8) grote lymfocyt c.q. een monocyte, (9) monocyte, (10) trombocyten. Naar: S. Schermer, 1968. The blood morphology of laboratory animals.

2.3.2 Witte bloedcellen of leukocyten

Er bestaat een grote variatie tussen de diverse diersoorten wat betreft de concentratie witte bloedcellen in het bloed (Tabel 1). Bovendien komen er binnen een diersoort en zelfs binnen een dier grote variaties voor in de concentratie leukocyten. Die sterke fluctuaties hangen samen met de conditie van het dier, het jaargetijde en de omstandigheden waaronder het bloed is afgenomen. De in Tabel 1 vermelde cijfers moeten dan ook gezien worden als een grove indicatie.

Witte bloedcellen zijn kleurloos, maar door gebruik te maken van een speciale kleuring (de May-Grünwald-Giemsa-kleuring) zijn de diverse typen goed van elkaar te onderscheiden. Er komen twee hoofdtypen voor: de korrelhoudende en de korrelloze witte bloedcellen. Binnen de groep van de korrelhoudende zijn drie en binnen de groep van de korrelloze twee typen cellen te onderscheiden (Figuur 4).

2.3.2.1 Granulocyten

De kern van granulocyten is sterk gesegmenteerd. Deze cellen worden daarom ook wel aangeduid met de term polymorfkernige leukocyten (Figuur 3). De levensduur van de granulocyten is slechts enkele dagen. Granulocyten bezitten fagocyterende eigenschappen en spelen een essentiële rol bij de niet-specifieke afweerreacties (ontstekingsreacties) van het lichaam tegen micro-organismen en lichaamsvreemde partikels zoals glasvezels, asbestdeeltjes en stofdeeltjes die via de ademhaling of via het voedsel ons lichaam binnendringen (Hoofdstuk 9).

Binnen de granulocytenreeks maakt men onderscheid tussen de neutrofiele, de eosinofiele en de basofiele granulocyten op basis van verschillen in kleurbaarheid van hun granula. In aantal zijn de neutrofiele granulocyten verreweg in de meerderheid. Bij de niet-zoogdieren zoals vogels, vissen en reptielen is de kleurbaarheid van de granula niet specifiek, waardoor er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen neutrofiele, eosinofiele en basofiele granulocyten.

Neutrofiele granulocyten

Neutrofiele granulocyten verblijven na rijping in het beenmerg gedurende korte tijd in de bloedcirculatie en komen uiteindelijk in de weefsels terecht om daar gedurende enkele dagen (4–5) hun functie uit te oefenen. Voor een deel gaan de cellen te gronde in de weefsels en worden vervolgens gefagocyteerd door macrofagen. Het aantal neutrofiele granulocyten varieert sterk tussen de species. Katten, runderen, ratten en muizen hebben een sterk lymfocytair bloedbeeld, terwijl de verhouding tussen neutrofiele granulocyten en mononucleaire cellen bij paarden ongeveer 1:1 is en bij honden ongeveer 3:5. Bij een ontsteking neemt het aantal neutrofiele granulocyten in de circulatie doorgaans toe. In circulatie kunnen deze cellen niet fagocyteren; ze worden functioneel in de weefsels.

Eosinofiele granulocyten

Deze cellen lijken morfologisch en qua levenscyclus erg veel op de neutrofiele granulocyten, maar het aantal is veel geringer. Onder normale omstandigheden maken de eosinofielen slechts 2–5% van de totale granulocytenpopulatie in het bloed uit. In de weefsels komen ze in zeer geringe aantallen voor, in de huid en de baarmoeder

relatief het meest. De eosinofiele granulocyt speelt vooral een rol bij de afweer tegen eukaryotische micro-organismen (protozoën). Bij sommige parasitaire infecties kan het aantal oplopen tot 20–30% van de totale granulocytenpopulatie. Er wordt verondersteld dat de eosinofiele granulocyt een functie heeft bij de allergische reacties.

Basofiele granulocyten

Deze cellen komen maar heel weinig voor in het bloed (0,5–2,0% van het aantal leukocyten) en de weefsels en zijn erg moeilijk te onderscheiden van mestcellen. De basofiele granulocyt raakt gemakkelijk zijn granula kwijt en zet op die manier de ontstekingsreactie in gang. Ze bezitten receptoren voor het immunoglobuline E (IgE) en spelen een rol bij overgevoeligheidsreacties die door IgE worden gemedieerd.

2.3.2.2 Lymfocyten

De lymfocyten kunnen sterk variëren in grootte maar ze zijn over het algemeen kleiner dan de monocytten. In het bloed komen voornamelijk de kleine lymfocyten voor. Deze cellen zijn iets groter dan erythrocyten. De grote lymfocyten treft men bij zoogdieren meestal aan in de lymfbanen en de lymffollikels, zelden in het bloed. In principe kan echter elke tussenvorm tussen de kleine en de grote lymfocyt in het bloed aangetroffen worden.

Behalve bij het schaap is er bij de andere zoogdieren dan ook geen echte tweedeling te maken (Tabel 1). Bij het schaap komen duidelijk te onderscheiden grote en kleine (bloed)lymfocyten voor en nauwelijks tussenvormen. Hetzelfde geldt voor de kip en de duif.

Bij bepaalde infecties worden in het bloed nog andere gespecialiseerde lymfocyten aangetroffen: de plasmacellen, maar onder normale omstandigheden is het aantal van deze cellen in het bloed verwaarloosbaar klein.

De lymfocyten circuleren van het bloed naar de lymfe en vice versa. Ze hebben niet allemaal dezelfde levensduur. Sommige leven minder dan een week, terwijl andere 4-5 jaar in leven blijven; sommige T-lymfocyten kunnen zelfs 20 jaar functioneel blijven.

Lymfocyten en plasmacellen bezitten weliswaar geen fagocyterende eigenschappen maar ze zijn wel betrokken bij de bescherming van het lichaam tegen lichaamsvreemde stoffen. Ze spelen een belangrijke rol bij de immuunreactie. Voor de differentiatie en functie van deze cellen wordt verwezen naar Hoofdstuk 9.

2.3.2.3 Monocyten

De monocytten zijn bij de meeste diersoorten de grootste cellen die in het bloed voorkomen (Tabel 2). De cellen hebben een cilindrische boonvormige kern en een helder cytoplasma. De monocytten worden gerekend tot het mononucleaire fagocytenstelsel (vroeger aangeduid als het reticulo-endoteliale stelsel), waartoe rondkernige cellen behoren met sterk fagocyterende eigenschappen zoals de pro-monocyten in het beenmerg, de monocytten uit het bloed en de vrije en gefixeerde macrofagen in veel organen zoals de Kupffer-cellen in de lever en de alveolaire macrofagen in de longen. Hun aantal in het bloed is gering (2–8% van de leukocyten). Na een verblijf van enkele dagen in de circulatie, verhuizen de monocytten naar de weefsels waar ze

differentiëren tot macrofagen. In tegenstelling tot de granulocyten zijn macrofagen langlevende cellen met als belangrijkste en meest bekende functie de fagocytose. Als fagocyt zijn ze te vergelijken met de granulocyten. Evenals de neutrofiele granulocyt bezitten macrofagen receptoren voor immunoglobulinen en complementfactor C3b, waardoor de fagocytose-activiteit gestimuleerd wordt. T-lymfocyten kunnen de activiteit van macrofagen stimuleren via specifieke lymfokinen (Hoofdstuk 9). De laatste jaren is gebleken dat de macrofaag niet alleen materiaal kan opnemen en afbreken, maar ook veel biologisch actieve stoffen kan vormen en uitscheiden. Hierbij zijn stoffen die een rol spelen bij de stolling (zoals tromboplastine, plasminogeenactivator en complementfactoren), stoffen die een rol spelen bij ontstekingsreacties (zoals prostaglandines), antibacteriële producten (zoals lysozym) en antivirale producten (zoals interferon). Hun functie bij de immuunreactie komt in Hoofdstuk 9 nog aan de orde.

2.3.3 Bloedplaatjes of trombocyten

De bloedplaatjes of trombocyten zijn eigenlijk geen echte cellen maar stukjes cytoplasma met een maximale doorsnede van 4–6 μm (Tabel 2). Deze kleine kernloze cellen ontstaan door fragmentatie van megakaryocyten, grote meerkernige cellen die voornamelijk in het beenmerg, maar bij sommige proefdieren (rat, muis) ook in de milt voorkomen. Bloedplaatjes komen uitsluitend voor in de bloedcirculatie. Morfologisch worden ze gekarakteriseerd door de aanwezigheid van granula waarin vasoactieve amines zijn opgeslagen.

Vogels, reptielen en amfibieën hebben geen bloedplaatjes maar zgn. 'spindle cells', spoelvormige, ovale cellen met een kern. De functie van dit celtype zou vergelijkbaar zijn met die van de bloedplaatjes bij de zoogdieren.

De bloedplaatjes zijn betrokken bij de bloedstolling (Hoofdstuk 8). Als een bloedvat beschadigd wordt zorgen de bloedplaatjes in eerste instantie voor de bloedstopping. Ze hechten onmiddellijk aan het bindweefsel van de beschadigde bloedvatwand en aan elkaar. Bovendien bevatten ze diverse stoffen die vrijkomen en het bloedstollingsproces bevorderen.

3 Samenstelling, vorming en functies van bloed: het niet-corpusculaire deel

3.1 Inleiding

Bloed kan door centrifugering gescheiden worden in cellen en vloeistof. Centrifugering van gestold bloed levert serum. Als bloed wordt verzameld onder toevoeging van antistollingsmiddelen, wordt na centrifugering plasma verkregen. Serum bevat geen fibrinogeen meer, plasma nog wel (Paragraaf 3.4 en Hoofdstuk 8).

In plasma kunnen globaal de volgende componenten worden onderscheiden:

- anorganische stoffen (waaronder spoorelementen) en water;
- voedingsstoffen, vitamines en afvalstoffen;
- eiwitten (o.a. albumine, globulines, stollingsfactoren, hormonen).

De volgende paragrafen geven enige informatie over functie, herkomst, aanmaak, verbruik (turnover) en uitscheiding van deze componenten.

3.2 Anorganische stoffen

De voornaamste stoffen in plasma zijn vermeld in Tabel 3, evenals hun normaalwaarden. De ionensamenstelling wordt voornamelijk in stand gehouden door opname uit voedsel en door het wegwerken van overschotten via de uitscheidingsorganen. Dank zij de vrij constante ionensamenstelling van bloedplasma is deze in andere organen ook binnen bepaalde grenzen te houden (Figuur 7). De ionen in plasma, voornamelijk Na^+ en Cl^- , leveren de grootste bijdrage aan de osmotische waarde van bloed. Tevens vervullen Na^+ , K^+ , Ca^{2+} en Mg^{2+} -ionen een rol bij de regulatie van enzymactiviteiten zodat ze het metabolisme van het organisme sterk kunnen beïnvloeden.

Na^+ en K^+ vervullen ook een rol bij de cellulaire osmoregulatie. In de celmembraan zijn energievragende (ATP verbruikende) Na^+ - K^+ -pompen aanwezig, die betrokken zijn bij actief transport over de membraan en bij het in-stand-houden van het elektrische spanningsverschil over de membraan (membraanpotentiaal). De K^+ -concentratie is in cellen veel hoger dan erbuiten; bij Na^+ -ionen is dit andersom (Figuur 7). In het bijzonder voor het goed functioneren van het zenuwstelsel zijn deze verschillen in ionenconcentraties binnen en buiten de cel van groot belang in verband met de voortgeleiding van zenuwprikkels.

Ca^{2+} -ionen beïnvloeden de werking van veel enzymen, verminderen de doorlaatbaarheid van membranen voor andere ionen en water en zijn essentieel voor het proces van de bloedstolling. Verder dragen Ca^{2+} -ionen bij tot de verbindingen tussen de cellen onderling in de epiteliale weefsels (calciumbruggen of desmosomen) en zijn ze ook essentieel bij de botvorming.

Mg^{2+} -ionen werken vaak tegengesteld aan Ca^{2+} -ionen bij de regulatie van enzymactiviteiten.

Tabel 3 Overzicht van de ion- en mineraalsamenstelling van menselijk bloed.

	Totaal bloed		Erytrocyten		Plasma/serum	
	gem.	spreid.	gem.	spreid.	gem.	spreid.
Water (g/l)	850	830 – 865	713	693 – 733	945	930 – 955
Bicarbonaat (mval/l)			11,2	10,9 – 11,5	24,9	21,3 – 28,5
Chloride (mval/l)	82	77 – 88	67,9	58,9 – 76,9	106	101 – 111
Fosfor-totaal (mg/l)	370	314 – 443	719	609 – 867	112	89 – 149
Zwavel (mg/l)						
totaal	1221		1900		780	
eiwitgebonden	1180		1859		740	
Bromide (mg/l)	3,72	2,27 – 5,27			2,8	0,7 – 13,3
Fluoride (mg/l)	0,18	0,04 – 0,36			0.16	0,14 – 0,19
Jodium (μ g/l)						
totaal					52,1	38 – 60
anorganisch					2,8	1,0 – 5,2
eiwitgebonden					52	32 – 72
Kalium (mval/l)			81,7	68,3 – 95,1	4,30	3,40 – 5,20
Natrium (mval/l)			8,7	5,1 – 13,1	138	132 – 144
Calcium (mval/l)					5,2	4,8 – 5,6
Magnesium (mval/l)			5,3	4,2 – 6,4	2,0	1,7 – 2,3
IJzer (mg/l)						
♂ ♂	500	440 – 560			1,34	0,58 – 2,10
♀ ♀	450	420 – 480				
Koper (mg/l)						
♂ ♂	0,89	0,72 – 1,06			1,10	0,79 – 1,41
♀ ♀	0,89	0,64 – 1,14			1,20	0,84 – 1,56
Zink (mg/l)	5,9	3,7 – 8,1	12,44	8,84 – 16,04	1,09	0,69 – 1,49
Lood (μ g/l)	270	170 – 370				

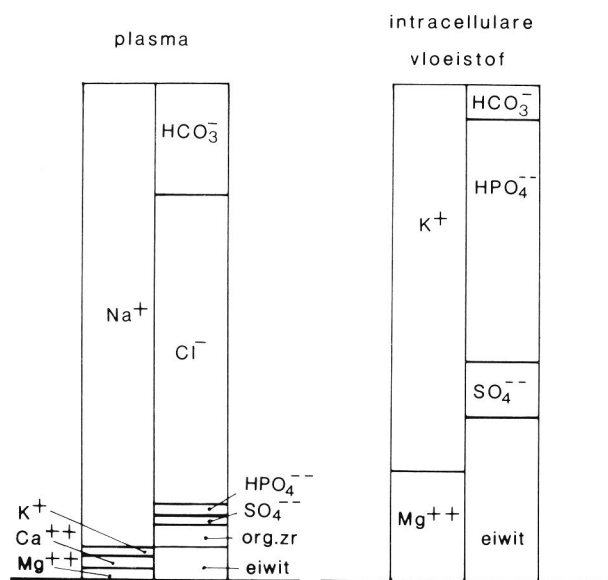
Bicarbonaationen zijn via evenwichtsreacties van belang voor het CO₂-transport van de lichaamsweefsels naar de longen en tevens voor het in-stand-houden van de juiste waterstofionenconcentratie (pH) van het bloed. De pH wordt bovendien gereguleerd via de bufferende werking van hemoglobine.

Fosfaat, sulfaat en spoorelementen (bij voorbeeld Cu, Fe, Zn, Se) spelen op vele plaatsen in het organisme een rol in het metabolisme. Water, tenslotte, maakt een groot deel van bloedplasma uit (ca 94 vol%).

3.3 Voedings- en afvalstoffen

Bloed verzorgt het vervoer van voedings- en afvalstoffen door het lichaam. Voedingsstoffen (met inbegrip van vitaminen) worden vanuit het maagdarmkanaal al of niet via opslagorganen naar de weefsels vervoerd, waar ze beschikbaar komen voor het celmetabolisme. Plasmaconcentraties van de belangrijkste van deze stoffen staan vermeld in Tabel 4.

Glucose is als het belangrijkste koolhydraat in plasma aanwezig. De glucoseconcentratie in het bloed wordt door een ingewikkeld regulatiesysteem zo constant mo-



Figuur 7. Ionensamenstelling van plasma en van intracellulaire vloeistof. Er is een verschil tussen plasma en de overige extracellulaire vloeistof: deze laatste bevat aanzienlijk minder eiwit.

Tabel 4 Voedings- en afvalstoffen in plasma.

Voedingsstof	Concentratie (mmol/l)	Afvalstof	Concentratie ($\mu\text{mol/l}$)
glucose	5	melkzuur	100
aminozuren	3 – 5	bilirubine	10
		creatinine	80
gekoppeld aan eiwitten (lipoproteïnen):		ureum	5000
lipiden	9	urinezuur	0,2
triglyceriden	1,5		
fosfolipiden	3		
cholesterol	4		
vrije vetzuren	0,2 – 2,0		

gelijk gehouden. Hierbij spelen de hormonen insuline en glucagon een rol (Figuur 39). Vanuit het maagdarmkanaal wordt glucose naar de lever vervoerd, waar overschotten opgeslagen worden in de vorm van glycogeen. Hieruit wordt naar behoefte weer glucose vrijgemaakt, dat vervoerd kan worden naar de weefsels. Aminozuren in bloed zijn afkomstig uit het voedsel (na splitsing van daarin aanwezige eiwitten) maar ook van de afbraak van lichaamseiwitten. Lipiden, triglyceriden, vetzuren, fosfolipiden, enz., die in plasma voorkomen, zijn gekoppeld aan eiwitten (de zgn. lipoproteïnen).

Belangrijke metabole afbraakprodukten in plasma zijn CO_2 (in de vorm van bi-

carbonaat), melkzuur, ureum, urinezuur, bilirubine en creatinine. Normale concentraties in plasma zijn eveneens vermeld in Tabel 4.

3.4 Eiwitten

Tabel 5 vermeldt enkele belangrijke eiwitten in plasma met een aanduiding van het molecuulgewicht, de concentratie en de functie.

Albumine is het belangrijkste eiwit dat een rol vervult bij het handhaven van de colloïd-osmotische druk. Veel stoffen (vnl. de in water slecht oplosbare verbindingen) worden gebonden aan albumine door het lichaam getransporteerd. Deze zgn. niet-specifieke binding aan albumine is in toxicologisch opzicht van grote betekenis. Omdat de toxische werking van stoffen veelal afhankelijk is van de concentratie van de vrije stof op de plek van werking, zal binding aan albumine de toxiciteit kunnen verminderen. Door nalevering van gebonden stof blijft een eventueel effect wel langer voortduren. Binding aan albumine kan dus als reservoir dienen van biologisch niet-actieve stof.

Onder de α_1 -, α_2 - en β -globulinen treffen we eiwitten aan met een transportfunctie, bij voorbeeld transferrine (Fe), ceruloplasmine (Cu) en de verschillende lipoproteïnen. Een ander globuline, het haptoglobine, bindt het hemoglobine (Hb), dat vrijkomt bij hemolyse, al of niet na beëindiging van de normale levensduur van de erythrocyt (Hoofdstuk 5). Na binding van Hb aan haptoglobine wordt het complex opgenomen in de milt, waarna afbraak tot bilirubine mogelijk is. Haptoglobine speelt dus een regulerende rol bij de afbraak van Hb. Andere proteïnen kunnen de afbraak van eiwitten reguleren doordat ze als remmer van eiwitsplitsende enzymen werken. Tenslotte vermelden we fibrinogeen, een belangrijk onderdeel van het bloedstollingssysteem.

Een aparte groep plasma-eiwitten zijn de γ -globulinen (immunoglobulinen) en de eiwitten van het complementsysteem. Beide groepen globulinen zijn betrokken bij de afweerreacties van het lichaam tegen infecties; de zgn. immuunreactie (Hoofdstuk 9).

De plasma-eiwitten worden voornamelijk gevormd in de lever, behalve de immunoglobulinen, die geproduceerd worden door de plasmacellen (Hoofdstuk 2).

3.5 Stollingsfactoren

Bij beschadiging van een bloedvat treedt het proces van de bloedstelping in werking. Dit leidt in korte tijd tot afdichting van de wond. Hierbij spelen bloedplaatjes een belangrijke rol. Deze verkleven aan collageenvezels en de basaalmembraan in de wond, en ook met elkaar, waardoor een plaatjesaggregaat ontstaat. Het contact met collageenvezels en wefelseltromboplastine uit de vaatwand start de bloedstolling. Via een opeenvolging van reacties, waarbij steeds inactieve factoren worden omgezet in actieve factoren, resulteert dit proces in de omzetting van protrombine in het actieve trombine. Dit eiwit bevordert het aggregeren van plaatjes en de samentrekking van het aggregaat en zet tevens het oplosbare fibrinogeen om in het onoplosbare fibrine. De fibrinemoleculen polymeriseren en het dan ontstane netwerk verstevigt het plaatjesaggregaat, waardoor een goede wondafsluiting plaatsvindt en overmatige bloeding wordt voorkomen. De toxische beïnvloeding van de bloedstolling komt aan de orde in Hoofdstuk 8.

Tabel 5 Overzicht van de belangrijkste eiwitten in bloedplasma. (Naar Zandee & Ballieux, 1978)

groep	eiwit	M.G.	concentratie g/l	functie
α_1 -globulinen	prealbumine	54980	0,1 – 0,4	transport
	albumine	66290	35 – 55	transport, colloïd- osmotische druk
	α_1 -glycoproteïne	40000	0,55 – 1,40	
	α_1 -antitrypsine	54000	2 – 4	proteïnaseremmer
	α_1 -antichymotrypsine	68000	0,3 – 0,6	chymotrypsineremmer
α_2 -globulinen	α_1 -lipoproteïnen, HDL, dichtheid 1,063 – 1,21:	1,8 – 3,6 $\times 10^5$	2 – 5	lipidtransport
	α_2 -macroglobuline	725000	1,5 – 4,2	plasmine- en trypsine- remmer
	ceruloplasmine	151000	0,15 – 0,60	kopertransport
	haptoglobine	100000	10 – 200	binding van vrij hemoglobine
β -globulinen	β -lipoproteïnen:			lipidtransport
	VLDL, dichtheid 0,95 – 1,006:	5 – 10 $\times 10^6$		lipidtransport
	LDL, dichtheid 1,019 – 1,063:	2 – 3,5 $\times 10^6$		ijzertransport
	transferrine	76500	2 – 3,2	complementfactor C ₃
	β_{1C} -globuline		80 – 140	binding van heem
	hemopexine	80000	1	plasminevorming
	plasminogeen	87000	0,15 – 0,35	fibrinevorming
γ -globulinen	fibrinogeen	340000	2,0 – 4,5	
	IgG	150000	8 – 18	bestrijding van micro-organismen
	IgA	160000	0,9 – 4,5	afweerfunctie in slijm
	IgM	950000	0,6 – 2,5	eerste afweer tegen bacteriën
	IgD	175000	<0,15	
	IgE	190000	0,0006	parasitaire infectie, atopische allergie

4 Toxicologie van de bloedcelvorming

4.1 Inleiding

In Hoofdstuk 2 is beschreven hoe, uitgaande van de pluripotente stamcel, via een groot aantal delings- en rijpingsstadia de diverse typen bloedcellen ontstaan (Figuur 2).

In principe kan een lichaamsvreemde stof interfereren met elk van deze tussenstadia, waardoor een verandering in het rode of witte bloedbeeld (de verhouding van de aantallen rode en witte bloedcellen) ontstaat. Van veel stoffen is bekend dat ze afwijkingen veroorzaken in het bloedbeeld (Tabel 6). Vaak is echter onduidelijk wat deze veranderingen in de samenstelling van het bloed veroorzaakt.

Om meer te weten te komen over de manier waarop een lichaamsvreemde stof het bloedbeeld beïnvloedt is onderzoek met proefdieren of celkweken (Hoofdstuk 6) een goed hulpmiddel.

Het meeste onderzoek naar de effecten van toxische stoffen op de vorming van bloedcellen is uitgevoerd met rode bloedcellen. Lichaamsvreemde stoffen die een vermindering van het aantal functionele rode bloedcellen veroorzaken, kunnen dit op diverse manieren doen:

- Remming van de ontwikkeling van de rode bloedcellen uit pluripotente stamcellen, bij voorbeeld door remming van de synthese van het hormoon erythropoietine. Dit hormoon wordt gevormd door de nier en prikkelt de stamcellen om zich te differentiëren tot rode bloedcellen; een nefrotoxische stof kan de nier dermate beschadigen dat er een tekort aan dit hormoon ontstaat.
- Remming van de ontwikkeling van snel delende tussenstadia, zoals de pronormoblasten; chemotherapeutica hebben een dergelijk effect.
- Remming van de hemoglobinesynthese.
- Remming van de zuurstofbinding door een effect op het hemoglobine (Hoofdstuk 5).
- Een beschadiging van de celmembraan, waardoor hemolyse ontstaat (Hoofdstuk 5).

Aan de hand van enkele modelstoffen zal besproken worden op welke manieren lichaamsvreemde stoffen met de vorming van bloedcellen in het beenmerg kunnen interfereren.

Benzeen en lood zijn als 'modelstoffen' gekozen omdat er al veel bekend is over de toxische effecten van deze stoffen op het beenmerg en het bloed. Beide stoffen veroorzaken een groot aantal afwijkingen in het lichaam; in dit hoofdstuk zullen echter alleen de effecten op de bloed- en beenmergcellen besproken worden. Bovendien worden de hematotoxische bijwerkingen van het potentiële geneesmiddel ribavirine besproken.

Tabel 6 Enkele lichaamsvreemde stoffen waarvan is aangetoond dat ze het bloedbeeld veranderen.

Stof	hemolytische anemie	pancyto- penie	trombocyto- penie	leuko- penie	anemie
Aceetanilide	×				
Allyl-isopropyl-ethylureum			×		
Aminopyrine	×			×	
Benzeen		×	×	×	×
Chlooramfenicol		×	×	×	×
Chloordaan		×	×	×	×
Chloorthiazide			×	×	
Chloorpromazine				×	
Colchicine		×	×	×	×
Fenylbutazon	×				
Fenylhydrazine	×				
Imipramine				×	
Lood					×
Naftaleen	×				
p-Aminosalicylzuur	×				
Primaquine					×
Pyrimethamine			×	×	×
Streptomycine		×	×	×	×
Sulfacetamide	×				
Sulfanilamide	×			×	
Sulfoxon	×				
Thiobarbital				×	
Thiouracil				×	
Tolbutamide		×	×	×	×
Trinitrotolueen		×	×	×	×

Tenslotte wordt aandacht besteed aan het gebruik van beenmergcellen voor het aantonen van een cytotoxische of genotoxische werking van een lichaamsvreemde stof.

4.2 Benzeen

4.2.1 Gebruik en blootstelling

Benzeen komt van nature in de atmosfeer voor uit biologische bron. Minerale oliën bevatten benzeen (0,001–0,4%), tevens wordt voortdurend benzeen geproduceerd door de vegetatie. Luchtmonsters genomen in Alaska en in het Amazone-gebied bevatten respectievelijk 0,32 en 44,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,1 en 14 ppb) benzeen. Ook in Nederland is op diverse plaatsen benzeen in de atmosfeer aangetroffen (Tabel 7). Benzeen komt tevens in de atmosfeer door industriële activiteit (rubberindustrie, drukkerijen, petrochemische industrie, leerindustrie e.d.) en door uitlaatgassen van auto's. Benzine bevat gemiddeld 2,5 volume% benzeen. De door uitlaatgassen in de buitenlucht veroorzaakte benzeenconcentraties van ongeveer 4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zijn overigens veel lager dan

Tabel 7 Voorbeelden van benzeenconcentraties in de lucht in een geïndustrialiseerd en in een landelijk gebied (Den Hartog, 1982).

	Benzeenconcentraties (ppb)			
	Vlaardingen		Terschelling	
	$\bar{x}$	max.	$\bar{x}$	max.
Winter 1979 – 1980	2,3	11,0	0,3	1,7
Zomer 1980	0,8	3,7	0,15	0,7
Winter 1980 – 1981	9,5	61,5	0,6	5,8
Zomer 1981	11,8	213,5	1,1	2,4

de gehalten in de auto's die wel $10\times$ hoger kunnen zijn met uitschieters tot 2500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

De belangrijkste opname vindt plaats door de longen. Ongeveer 50% van de ingeademde hoeveelheid benzeen wordt door het lichaam geabsorbeerd, de rest wordt onveranderd uitgeademd. Kleine hoeveelheden benzeen kunnen het lichaam binnen komen via de mond. Benzeen komt o.a. voor in groenten, fruit, vis en melkproducten.

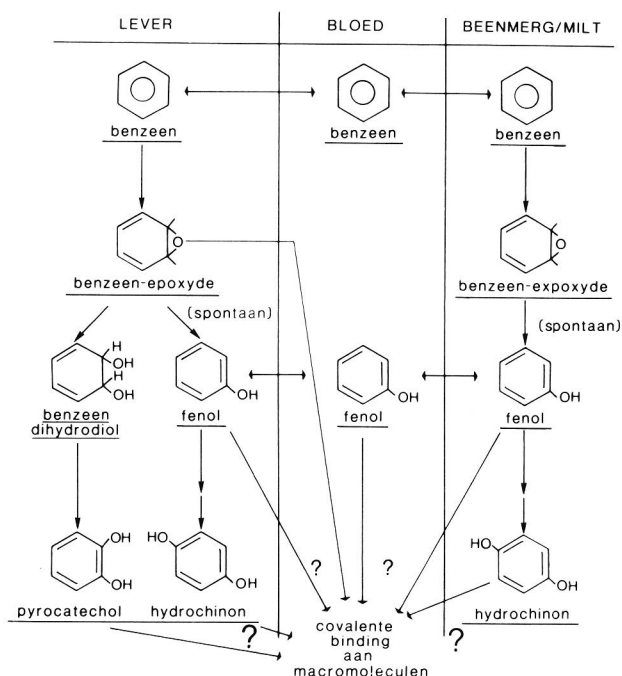
4.2.2 *Metabolisme*

Benzeen wordt voornamelijk gemetaboliseerd in de lever, en in geringe mate in het beenmerg en de milt. Door oxydatie onder invloed van cytochroom P-450 worden o.a. fenol, catechol en hydrochinon gevormd (Figuur 8). Ook in het beenmerg, en mogelijk de milt, wordt benzeen gemetaboliseerd. De metabolieten worden gedeeltelijk uitgescheiden via de urine of hopen zich op in het vet, beenmerg, lever of milt.

Ondanks het vele dierexperimentele onderzoek dat met deze stof is gedaan, is het mechanisme van de toxiciteit van benzeen nog niet in detail opgehelderd. Het is wel duidelijk dat de toxiciteit van benzeen voornamelijk wordt bepaald door zijn metabolieten. De eerste metabole stap is de vorming van een reactief tussenproduct, het benzeenepoxyde. Deze metaboliet bepaalt waarschijnlijk sterk de toxiciteit van benzeen.

4.2.3 *Hematotoxiciteit*

Langdurige blootstelling aan benzeen veroorzaakt bij mensen een afname van het aantal rode bloedcellen (anemie). In een later stadium vermindert ook het aantal bloedplaatjes (trombocytopenie) en het aantal granulocyten (granulocytopenie). In het ergste geval leidt dit tot vervanging van het functionele beenmerg door vet. In andere gevallen is een toename van het aantal leukocyten in het bloed (leukocytose) een eerste symptoom van blootstelling aan benzeen. Daarnaast worden soms macrocyten (afwijkende rode bloedcellen) in het bloed en beenmerg aangetroffen.



Figuur 8. Metabolisme van benzeen.

4.2.4 Leukemie

In 1928 werd door Delore en Borgomano voor het eerst een door benzeen geïnduceerde leukemie beschreven. Het aantonen van een direct verband tussen blootstelling aan benzeen en leukemie wordt ernstig bemoeilijkt door de lange tijd die kan liggen tussen de expositie aan benzeen en het optreden van de leukemie. Leukemie lijkt in sommige gevallen voort te komen uit door benzeen geïnduceerde aplastische anemie. Het aantal voorstadia van de bloedcellen in het beenmerg wordt steeds talrijker en uiteindelijk resulteert dit in een acute (myeloblastische of soms erytroïde) leukemie. De aanwijzingen dat benzeen kankerverwekkende eigenschappen heeft zijn voornamelijk afkomstig uit epidemiologisch onderzoek van arbeiders uit schoen- en rubberfabrieken en drukkerijen. Aangezien echter veelal gegevens over de blootstellingsduur of -concentraties ontbreken, is de interpretatie van de resultaten erg moeilijk.

4.2.5 Hematotoxiciteit bij proefdieren

Langdurige blootstelling van proefdieren (rat, muis) aan 320 mg/m^3 (100 ppm) benzeen veroorzaakt de volgende vier afwijkingen:

- een afname van het aantal rode bloedcellen en in een later stadium tevens een afname van het aantal witte bloedcellen (zowel granulocyten als lymfocyten) en het aantal bloedplaatjes;
- een afname van het aantal cellen in beenmerg en milt;
- een remming van de ontwikkeling van de normoblasten en pronormoblasten (beide snel delende voorstadia van rode bloedcellen);
- een aantasting van de membraan van de rode bloedcel en wel zodanig dat de cel van grootte, vorm en kleuringseigenschappen verandert en tamelijk snel lyseert.

In grote lijnen komen de toxische effecten van benzeen, die bij proefdieren worden gevonden, overeen met die welke worden waargenomen bij de mens. Er zijn echter twee essentiële verschillen.

Bij muizen veroorzaakt benzeen niet alleen een afname van het aantal granulocyten, maar ook van het aantal lymfocyten. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een effect op de milt, bij de muis een belangrijk lymfocytenvormend orgaan. Een tweede verschil is dat het bij proefdieren nog niet gelukt is om onomstotelijk aan te tonen dat benzeen leukemie kan induceren. Onlangs heeft men aangetoond dat bij een bepaalde muizenstam, die 6 uur per dag, 5 dagen per week, gedurende 26 weken werd blootgesteld aan een benzeenconcentratie in de lucht van 960 mg/m³ (300 ppm), proliferatie van voorstadia van de witte bloedcel in het beenmerg ontstaat. Langdurige inhalatie van benzeen induceert veranderingen in het beenmerg die bij de ene muizenstam neerkomen op een afname en bij de andere muizenstam op een toename van het aantal cellen. De keuze van de stam blijkt van doorslaggevende betekenis te zijn, omdat verschillende stammen door de aanwezigheid van bepaalde virussen al een verhoogd risico hebben op het krijgen van tumoren. Benzeen lijkt dit risico nog verder te verhogen.

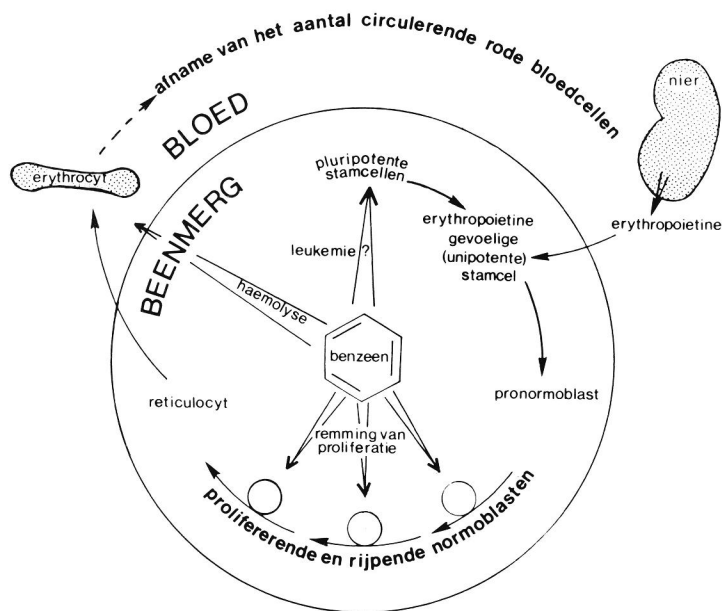
4.2.6 Immunotoxiciteit

Bij muizen werden na subcutane injectie van benzeen afwijkingen gevonden in de thymus en het aantal T-lymfocyten was verminderd. De B-lymfocyten in het perifere bloed namen niet in aantal af. Bij konijnen daarentegen vond men na een kortdurende benzeenintoxicatie een vermindering van het aantal B-lymfocyten terwijl het aantal T-lymfocyten niet werd beïnvloed.

4.2.7 Mogelijke mechanismen van de benzeenintoxicatie

Uitgaande van de waarnemingen bij mensen en proefdieren worden thans verschillende werkingsmechanismen verondersteld, waarvan er hier drie genoemd worden (Figuur 9).

De vormveranderingen die bij rode bloedcellen worden waargenomen wijzen op een effect van benzeen op de membraan, waardoor er sneller cellysis ontstaat met als gevolg een verkorting van de levensduur van de rode bloedcel. Het aantal vitale rode bloedcellen neemt daardoor af waardoor het hormoon erythropoetine stamcellen prikkelt om tot erythrocyt te differentiëren. Als echter de benzeenconcentratie in het bloed en beenmerg hoog is, zal deze stimulatie van de stamcellen niet het gewenste effect hebben doordat de nieuw gevormde rode bloedcellen weer zullen lyseren. In het meest extreme geval leidt dit tot een uitputting van de stamcelvoorraad



Figuur 9. Mogelijke werkingsmechanismen van benzeen.

(pancytopenie of aplastische anemie) waardoor er ook een tekort ontstaat van andere bloedcellen.

Een tweede veronderstelling is dat benzeen een direct effect op de stamcel heeft, wat aanleiding kan geven tot een vermindering van het aantal bloedcellen – als de differentiatie van de stamcellen wordt geremd – of tot het tegenovergestelde, leukemie – een ongeremde aanmaak van bloedcellen. Experimenteel heeft men voor dit laatste echter nog onvoldoende bewijs.

Een derde veronderstelling is dat benzeen de ontwikkeling van elk type bloedcel remt door een effect op de snel prolifererende tussenstadia van de bloedcelvorming.

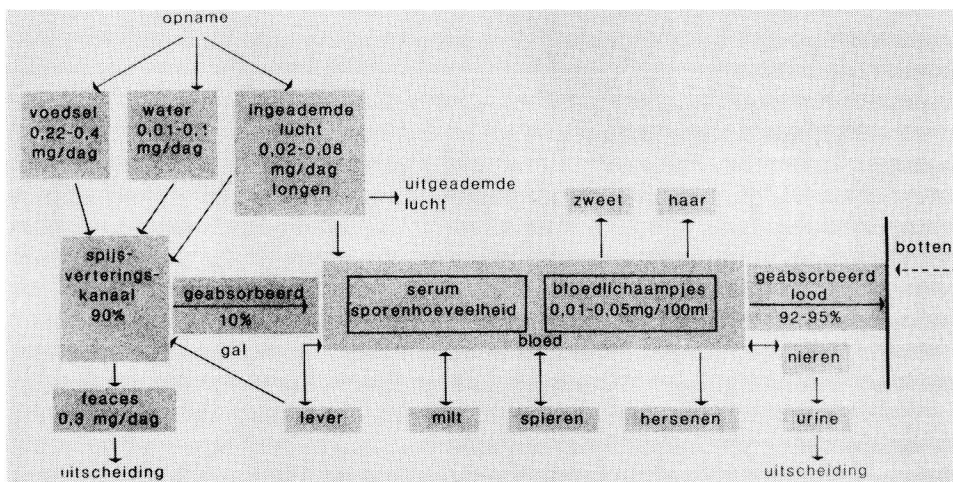
Door het ontbreken van een goed proefdiermodel is het tot nu toe niet mogelijk gebleken om op te helderen op welke manier benzeen kanker veroorzaakt. Wellicht kan het in vitro onderzoek hierin meer inzicht verschaffen (Hoofdstuk 6).

4.3 Lood

4.3.1 Gebruik en blootstelling

Lood wordt gebruikt in de verf- en glasindustrie en bij de fabricage van batterijen en kunststoffen. Deze toepassingen vormen een aanzienlijk geringer toxicologisch probleem dan het gebruik van lood in de vorm van tetra-alkyllood als antiklop-middel in benzine.

De mens neemt lood op via het voedsel, drinkwater en de lucht. Ongeveer 10% van het lood dat op deze manier het lichaam binnenkomt wordt opgenomen en hoopt zich voornamelijk (92–95%) op in de botten (Figuur 10). Daardoor kan de



Figuur 10. Verdeling van oraal en inhalatoir opgenomen lood over het lichaam. (Naar: A.J. Paskins-Hurlburt. Environmental Research 14(1970): 128-140.

loodconcentratie in het beenmerg wel $50\times$ hoger zijn dan in het bloed.

Langdurige blootstelling aan teveel lood leidt tot afwijkingen van het centraal zenuwstelsel, het maagdarmkanaal, de nieren en het bloed.

4.3.2 Hematotoxiciteit

Lood dat zich in het bloed bevindt, zit hoofdzakelijk in de rode bloedcel (Figuur 10). Het effect van lood op deze cel is drieledig: afname van de levensduur (anemie), afname van de activiteit van een aantal enzymen die betrokken zijn bij de heemsynthese en ophoping van voorstadia van heem zoals protoporfyrine.

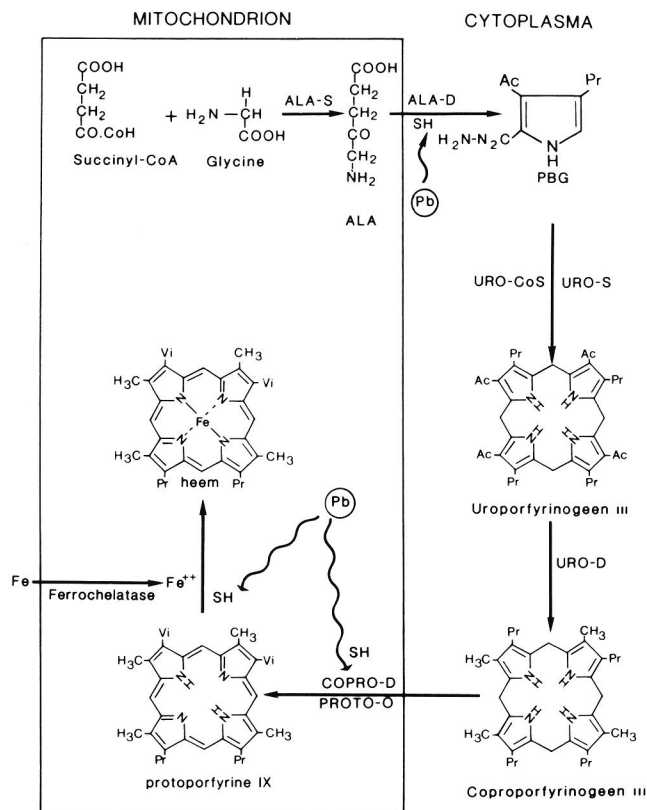
Anemie

Lood veroorzaakt een onomkeerbaar verlies van kaliumionen uit de rode bloedcel. Soms bevat de cel nog slechts 1% van de normale hoeveelheid K^+ -ionen. Hierdoor wordt de levensduur van deze cellen aanzienlijk bekort, waardoor er een tekort ontstaat (anemie). Dit proces wordt nog versterkt doordat lood nierbeschadigingen veroorzaakt, die aanleiding kunnen geven tot een verminderde productie van het hormoon erythropoietine, waardoor er minder stamcellen zullen worden geprikkeld om zich te differentiëren tot rode bloedcel.

Effect van lood op de heemsynthese

De vorming van hemoglobine vindt hoofdzakelijk plaats tijdens de ontwikkeling van de erytrocyt in het beenmerg. De vorming van heem vindt in de cel gedeeltelijk plaats in de mitochondriën en gedeeltelijk in het cytoplasma (Figuur 11).

Een uitgerijpte, in het bloed circulerende, rode bloedcel heeft geen kern en mitochondriën meer en kan daardoor geen hemoglobine meer synthetiseren. Zij bezit echter nog wel de cytoplasmatische enzymen, zoals het δ -amino-levulinezuurdehydratase (ALAD). Lood remt de activiteit van dit enzym sterk: gering verhoogde



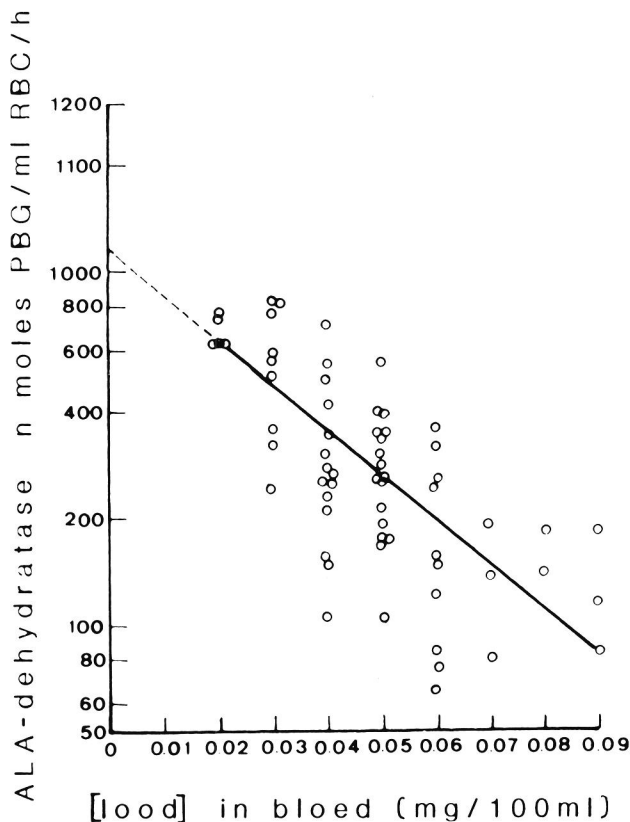
Figuur 11. Effecten van lood op de biosynthese van porfyrynes en heem. Lood interfereert voornamelijk met reacties waarbij SH-groepen een rol spelen: (1) de omzetting van δ -aminolevulinezuur (ALA) naar porfobilinogeen (PBG), (2) de vorming van protoporfyrine uit coproporfyrinogeen III en (3) de inbouw van Fe in het protoporfyrine IX (Ac=azijnzuurrest: $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; Pr=Propionzuurrest: $-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$; Vi=Vinylrest: $-\text{CH}=\text{CH}_2$).

loodgehalten in het bloed geven al aanleiding tot een verminderde activiteit van dit enzym. De ALAD-activiteit in het bloed wordt daarom beschouwd als een van de gevoeligste parameters voor het vaststellen van een loodbelasting (Figuur 12).

Overigens heeft een vermindering van de activiteit van dit enzym alleen een diagnostische betekenis; het beïnvloedt de vorming van heem niet, omdat die al heeft plaatsgevonden. Een acute loodvergiftiging zal gepaard gaan met een daling van de ALAD-activiteit, maar niet met een ontregelde heemsynthese. Bij een langdurige loodbelasting echter hoopt zich ook veel lood op in het beenmerg, waardoor er wel direct effect op de vorming van heem kan ontstaan.

Effecten van lood op de ontwikkeling van de rode bloedcel in het beenmerg

In het beenmerg veroorzaakt lood naast een daling van de ALAD-activiteit ook een remming van de werking van het enzym ferrochelatase (Figuur 11), waardoor zich



Figuur 12. Correlatie tussen de log ALAD-activiteit en de hoeveelheid lood in het bloed.

ijzer (basofiele stippeling) en protoporfyrine in de cel ophopen (Figuur 13).

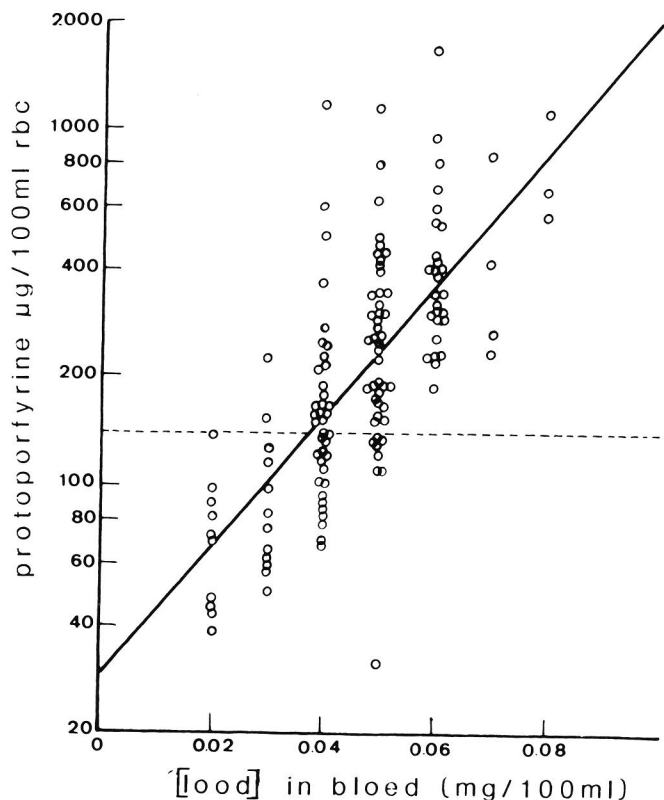
Noch de verminderde ALAD-activiteit, noch de daling van de ferrochelatase-activiteit leidt tot een aantoonbare vermindering van de hoeveelheid hemoglobine in de cel. De bepaling van de activiteit van het ALAD of van het ferrochelatase heeft dus alleen betekenis voor het vroegtijdig opsporen van een acute respectievelijk chronische loodbelasting.

4.3.3 Immunotoxiciteit

Naast de effecten op de rode bloedcel veroorzaakt lood tevens:

- een verkorting van de levensduur van de witte bloedcellen;
- een vermindering van het aantal unipotente stamcellen (Figuur 3), waaruit de granulocyten ontstaan;
- een afname van het aantal plasmacellen.

Deze effecten van lood resulteren in een verminderde weerstand van het lichaam tegen infecties.



Figuur 13. Spreidingsdiagram waarin de hoeveelheid protoporfyrine in de rode bloedcellen is uitgezet tegen de hoeveelheid lood in het bloed. De doorgetrokken lijn is de meest betrouwbare regressielijn. De correlatiecoëfficiënt is 0,72. De stippellijn geeft de gemiddelde waarde aan, daarboven kan er sprake zijn van loodvergiftiging.

4.4 Ribavirine

Als voorbeeld van een geneesmiddel met een hematotoxische werking is gekozen voor ribavirine, een middel met sterke antivirale werking. Dierproeven hebben aangetoond dat deze stof zeer geschikt is om virusinfecties te bestrijden, inclusief griep. Het ribavirine is echter zo hematotoxisch dat humane toepassing tot nu toe onmogelijk is gebleken.

Toediening van ribavirine aan proefdieren veroorzaakt een daling van het aantal rode bloedcellen en een verminderd hemoglobinegehalte in het bloed, wat uiteindelijk leidt tot anemie. Ribavirine wordt door de erytrocyt uit het bloed opgenomen waarna de cel in het beenmerg, de milt en de lever wordt afgebroken. Wat de reden is van deze vroegtijdige destructie van ribavirine bevattende erytrocyten is onduidelijk. Bij rhesusaapjes veroorzaakt het ribavirine bovendien een vermindering van het aantal reticulocyten in het bloed; er komen wel heel vroege voorstadia van de erytro-

cyt in het bloed voor. Dit wijst erop dat het ribavirine voorstadia van de reticulocyt in hun ontwikkeling remt. Deze bijwerkingen van het ribavirine zijn weliswaar reversibel (na beëindiging van de behandeling komt het aantal rode bloedcellen en reticulocyten weer op het oude niveau terug), maar ze zijn toch zo ernstig dat het middel in de huidige vorm waarschijnlijk niet op de markt kan worden toegelaten.

Ondanks het vele onderzoek dat aan stoffen als benzeen en lood is gedaan, is hun werkingsmechanisme nog niet volledig opgehelderd. Vaak is het onderzoek in het levende (intacte) organisme ook te complex om een goed inzicht te krijgen in het mechanisme dat ten grondslag ligt aan bepaalde toxische effecten van een stof. Onderzoek met geïsoleerde cel- of weefselsystemen biedt de onderzoeker de mogelijkheid om het werkingsmechanisme van een stof beter te bestuderen (Hoofdstuk 6).

4.5 Cytogenetisch onderzoek van schade aan beenmergcellen

4.5.1 Inleiding

Beenmerg is een snel delend weefsel dat erg gevoelig is voor stoffen met een genotoxische of cytotoxische werking. Alle typen cellen die in het beenmerg voorkomen kunnen in principe schade ondervinden van een genotoxische stof. De schade aan het beenmerg kan specifiek zijn en alle cellijnen beïnvloeden, maar een specifiek effect op één type cel komt eveneens voor. De in het beenmerg waargenomen afwijkingen blijken vaak een aanduiding voor een mogelijk relevant effect van een stof. Zo kan een cytotoxisch effect van een stof op het beenmerg een aanduiding zijn voor het optreden van pancytopenie of anemie en kunnen chromosomale afwijkingen een aanduiding zijn voor genotoxische eigenschappen van een stof.

Cytogenetische afwijkingen die men het meest onderzoekt zijn: chromosomale afwijkingen (Chromosomal Abberations = CA's), Sister-Chromatid Exchanges (SCE's) en micronuclei (MN).

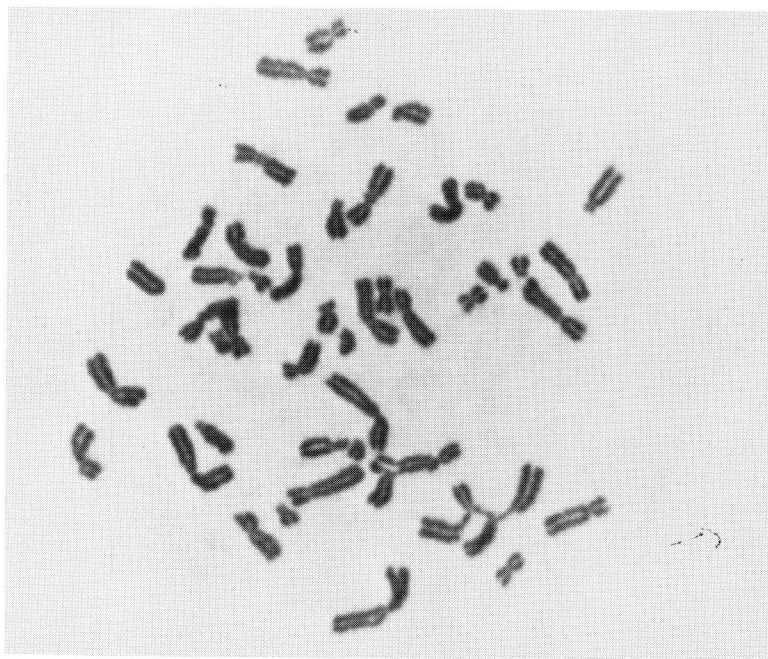
Voor het bepalen van CA's en SCE's moeten de cellen in metafase zijn (Figuren 14 en 15). Voor het bepalen van micronuclei is dat niet nodig. Dat is tevens de beperking van de testen op CA's en SCE's: het is niet mogelijk om van cellen in metafase te bepalen tot welke cellijn ze behoren. Micronuclei daarentegen kunnen in specifieke celtypen worden bepaald en kunnen daarom gebruikt worden om een genotoxisch effect op verschillende typen cellen (leukocyten, erythrocyten) te bepalen.

Voor de theoretische achtergrond van deze toetsen wordt verwezen naar deel twee in de Toxicologische Reeks: Chemische carcinogenese.

4.5.2 Chromosomale afwijkingen (CA's)

Voor het aantonen van CA's worden in de regel lymfocyten, geïsoleerd uit het bloed van mensen of ratten, gebruikt. Chromosomale afwijkingen die op identieke platen van beide chromatiden optreden noemt men 'chromosomal type' en afwijkingen die slechts op één chromatide voorkomen noemt men 'chromatid type' (Tabel 8). Alle in tabel 8 schematisch weergegeven, meest voorkomende (groe) structurele afwijkingen in het chromosoom zijn met het lichtmicroscopisch waarneembaar. Men kan de CA's onderverdelen in twee typen. Die, welke leiden tot

– verlies aan genetisch materiaal – wat meestal leidt tot de dood van de cel – en



Figuur 14. Voorbeeld van 'chromatid type' chromosomale afwijkingen (CA). Vergelijk met Tabel 8.

- een verandering van het genetisch materiaal zonder dat dit gepaard gaat met verlies van viabiliteit.

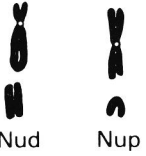
Verschillende vormen van kanker brengt men wel in verband met deze laatstgenoemde chromosomale afwijkingen. Dit wordt nog eens ondersteund door de waarneming dat diverse bekende mutagene of carcinogene stoffen CA's induceren. Hieruit blijkt dat een CA-test relevante informatie kan opleveren over de mogelijk genotoxische of cytotoxische werking van een lichaamsvreemde stof.

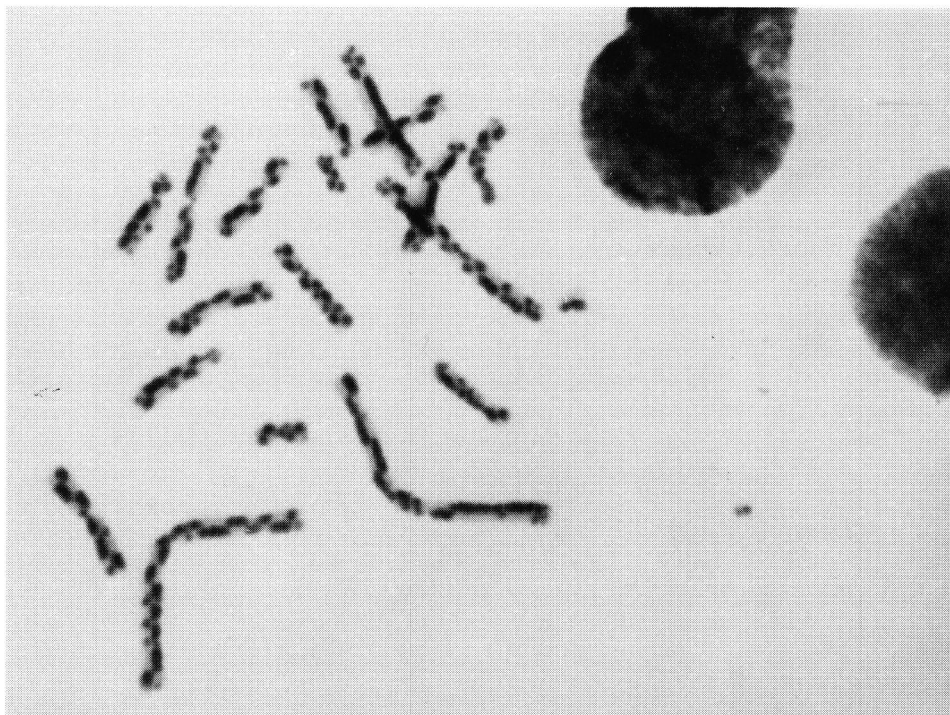
4.5.3 Sister chromatid exchanges (SCE's)

Men veronderstelt dat SCE's ontstaan doordat tijdens de DNA-replicatie breuken ontstaan in de twee zusterchromatiden, die vervolgens op een verkeerde manier worden hersteld. Het exacte mechanisme en de aard van de DNA-lesie die er aan ten grondslag ligt, is echter niet bekend. Niet alle bekende genotoxische stoffen induceren SCE's. Maar de meeste S-fase-afhankelijke clastogene agentia (dat zijn stoffen die alleen dan chromosomale afwijkingen induceren als er DNA-replicatie heeft plaats gevonden) zijn goede induceerders van SCE's. Er zijn enkele stoffen bekend die SCE's induceren, terwijl ze geen puntmutaties induceren, wat erop duidt dat er niet altijd een verband bestaat tussen de vorming van SCE's en mutagene activiteit.

Het voordeel van de SCE- boven de CA-toets is de grotere gevoeligheid; concentraties van toxische stoffen die geen CA's meer induceren zijn wel in staat om een aanzienlijk aantal SCE's te veroorzaken, en verder behoeft men veel minder cellen in

Tabel 8 Nomenclatuur van frequent voorkomende chromosomale afwijkingen.

Chromosoomtype	Opmerkingen
1. 'Gap' of achromatische lesie	 Betreft beide chromatiden van een chromosoom op identieke loci. Men spreekt van een 'gap' als de diameter van het ongekleurde gebied niet breder is dan de diameter van een chromatide.
2. Chromosoombreuk	 Betreft een 'gap' met een grotere diameter dan de diameter van een chromatide. Het is vaak moeilijk om te bepalen in welk chromosoom de breuk is ontstaan.
3. 'Exchange'	 'Exchanges' ontstaan door 2 of meer lesies in verschillende chromosomen (interchange) of binnen hetzelfde chromosoom (intrachange) Voorbeeld van een dicentrisch chromosoom. Het fragment is het gevolg van de 'exchange' en wordt niet apart gescoord.
Chromatidetype	Opmerkingen
1. Gap	 Diameter van het ongekleurde gebied niet breder dan de doorsnede van een chromatide.
2. Chromatidebreuk of -deletie	 Diameter van ongekleurde gebied is groter dan de doorsnede van een chromatide. Het fragment dat bij dergelijke breuken ontstaat blijft meestal met het oorspronkelijke chromosoom verbonden.
3. Isochromatidebreuk	 Een dergelijke breuk kan zich op verschillende manieren manifesteren: a. volledige versmelting van de gebroken uiteinden; b. onvolledige versmelting van de uiteinden waardoor een 'Nud' of een 'Nup' ontstaat.
4. Chromatid exchange	
a. Interchange (tussen chromosomen)	 — asymmetrisch  symmetrisch
b. Intrachange (binnen een chromosoom)	 Voorbeeld van een asymmetrische intrachange waarbij een fragment ontstaat.



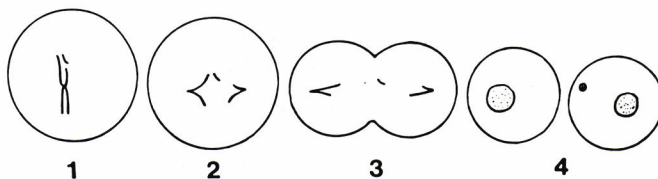
Figuur 15. Voorbeeld van een metafasecel met SCE's (Sister Chromatid Exchanges). Deze ontstaan doordat tijdens de DNA-replicatie breuken optreden in twee zusterchromatiden, die vervolgens op een verkeerde manier worden hersteld. Dit wordt zichtbaar door middel van een speciale chromosomale kleuring.

metafase te tellen (de helft tot een kwart) om bij de SCE-toets statistisch betrouwbare resultaten te krijgen.

4.5.4 Micronuclei (MN)

Micronuclei zijn kleine stukjes DNA, die buiten de celkern liggen en ontstaan zijn doordat een breuk in een chromosoom niet is hersteld waardoor een deel van het genetisch materiaal verloren gaat tijdens de celdeling (Figuur 16).

De MN-toets wordt vaak toegepast als een gevoelig, minder duur, en minder tijdrovend alternatief voor het klassieke metafase-onderzoek. Zoals met nagenoeg elke cytogenetische bepaling is het ook voor de MN-toets noodzakelijk dat de cel deelt, maar in tegenstelling tot de CA's en SCE's is het mogelijk om de MN te tellen in interfasecellen en behoeven de cellen niet in metafase te zijn. Voor de MN-toets gebruikt men meestal muize-beenmergcellen. De dieren worden aan de te onderzoeken stof blootgesteld en 24, 48 en 72 uur daarna wordt geteld hoeveel micronuclei per 1000 polychromatische erythrocyten voorkomen. De aanwezigheid van MN wordt meestal geteld in dit type cellen omdat de polychromatische erythrocyt ontstaat na een groot aantal celdelingen, maar zelf niet meer deelt en bovendien geen kern meer be-



Figuur 16. Schematische voorstelling van een chromosoombreuk tijdens de metafase (1) waardoor na de anafase (2) en telofase (3) een micronucleus zichtbaar wordt tijdens de interfase (4).

vat zodat de micronucleus simpel te detecteren is .

De meeste stoffen met CA-inducerende eigenschappen zijn ook in staat om MN te induceren.

5 Toxicologie van de rode bloedcel

5.1 Inleiding

Voor de zuurstofvoorziening van lichaamsweefsels is hemoglobine (Hb) onontbeerlijk, omdat dit eiwit zuurstof reversibel kan binden. Deze binding vindt plaats aan het tweewaardige ijzeratoom in de heemgroep. De binding wordt onmogelijk zodra andere moleculen het ijzeratoom bezetten (bijvoorbeeld koolmonoxyde). Ook oxydatie van het tweewaardige (ferro)-ijzer tot driewaardig (ferri)-ijzer maakt de reversibele binding onmogelijk. Als deze ijzeroxydatie optreedt, ontstaat ferrihemoglobine (methemoglobine; HbFe^{3+}).

De functie van de rode bloedcel is, eenvoudig gesteld, er voor te zorgen dat hemoglobine zijn zuurstoftransporterende taak goed kan vervullen. Als al het Hb, nodig voor voldoende O_2 -transport, in oplossing in het bloed aanwezig zou zijn, dan zou de colloïd-osmotische waarde van bloed te hoog worden. Omdat hemoglobine 'verpakt' is in de rode bloedcel, kan bloed veel meer Hb bevatten en dus veel meer O_2 vervoeren.

De rode bloedcel bezit allerlei mechanismen die er – direct of indirect – voor zorgen dat het hemoglobine zijn functie kan blijven vervullen. Als een van deze mechanismen wordt ontregeld, kan de cel voortijdig te gronde gaan. Voor het goed functioneren van de rode bloedcel zijn nodig:

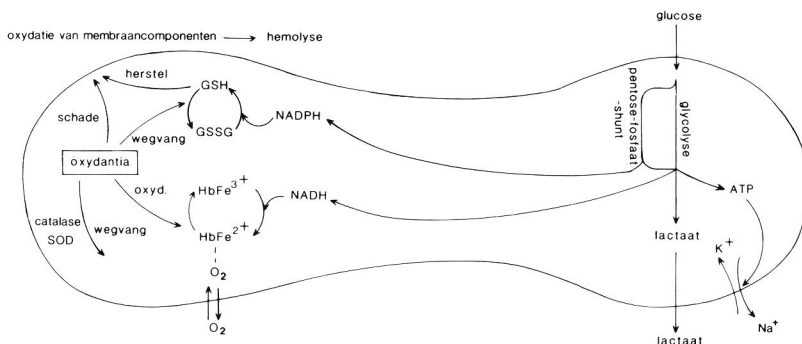
- functioneel, intact hemoglobine (HbFe^{2+});
- mechanismen ter bescherming van Hb tegen oxydatie;
- een intacte celmembraan;
- mechanismen ter bescherming van de celmembraan tegen oxydatie (zoals een energiebron (ATP) voor het in-stand-houden van Na^+ - en K^+ -gradiënten over de membraan; glutathion, catalase, etc).

Figuur 17 geeft deze cellulaire functies schematisch weer. In dit schema is te zien, dat er steeds een relatie is met het koolhydraatmetabolisme van de cel (NADH, NADPH, ATP).

Afwijkingen in de vier hierboven genoemde functionele componenten van de rode bloedcel kunnen een erfelijke oorsprong hebben, of veroorzaakt worden door toxische stoffen. Het resultaat is altijd een verkorting van de functionele levensduur van de rode bloedcel. In de volgende paragrafen wordt ingegaan op de functies van de erythrocyt en de verstoring daarvan door toxische stoffen.

5.2 Binding van stoffen aan ferro-heem van hemoglobine

Als de bindingsplaats voor zuurstof aan het hemoglobine is ingenomen door een andere stof, dan is het O_2 -transport naar de lichaamsweefsels verstoord. Een aantal stoffen bindt sterk aan het ferro-heem. Voorbeelden zijn: koolmonoxyde (CO), alkyl-



Figuur 17. Schematische voorstelling van de belangrijkste functies van de rode bloedcel. Centraal staat dat hemoglobine de zuurstoftransportfunctie goed moet kunnen uitoefenen. Hiervoor is nodig dat Hb binnen de erythrocyt blijft (de intacte membraan) en dat het functioneel, d.w.z. in de gereduceerde vorm (HbFe^{2+}) blijft.

isocyanides en aromatische nitrosoverbindingen. Niet alleen zal de plaats van zuurstof op het Hb zijn ingenomen door deze stoffen, ook zal de O_2 -bindingskarakteristiek van Hb veranderen.

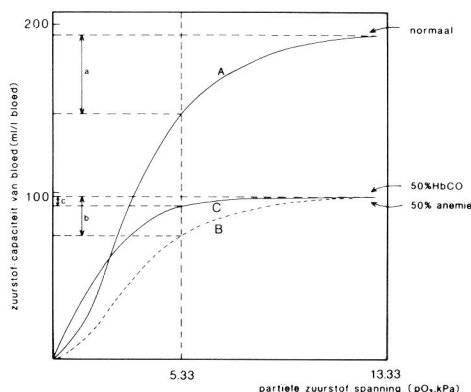
5.2.1 Zuurstofbindingskarakteristiek van hemoglobine

De vier eiwitketens van Hb hebben twee aan twee een gelijke structuur (α en β). Iedere keten bevat een heemgroep, dus een molecuul Hb kan vier zuurstofmoleculen binden. Deze binding verloopt stapsgewijs, steeds met één O_2 -molecuul tegelijk. Door de binding van ieder zuurstofmolecuul verandert de structuur van het Hb zodanig dat een volgend molecuul gemakkelijker gebonden wordt. Met andere woorden: binding aan de ene heemgroep beïnvloedt de binding aan de andere heemgroepen (zgn. heem-heem-interactie). Anderzijds zal het loslaten van de eerste van vier O_2 -moleculen tot gevolg hebben dat het volgende zuurstofmolecuul gemakkelijker loslaat, enzovoort.

Grafisch weergegeven levert dit de S-vormige O_2 -bindingskarakteristiek (Figuur 18). Het hier beschreven mechanisme heeft tot gevolg dat de afgegeven hoeveelheid zuurstof in de weefsels groter is dan wanneer de heem-heem-interactie niet zou optreden. Ook binding van andere moleculen aan andere plaatsen op het Hb (CO_2 , ATP, 2,3-difosfoglyceraat, inositol-hexafosfaat) en de pH beïnvloeden de affiniteit voor zuurstof. De binding van zuurstof aan Hb wordt zo gereguleerd door het metabolisme in de rode bloedcel.

5.2.2 Binding van koolmonoxyde

Koolmonoxyde (CO) bindt ongeveer $210\times$ sterker aan het ferro-heem dan zuurstof. Lage concentraties CO in lucht zijn dus al in staat om veel zuurstof van Hb te verdringen. Bij voorbeeld: 0,1 vol% CO in lucht (zuurstofgehalte 21 vol%) heeft tot gevolg dat 50% van de heemgroepen bezet is met CO. Omdat deze binding willekeurig over alle heemgroepen verdeeld zal zijn, zullen in een dergelijk geval de meeste Hb-



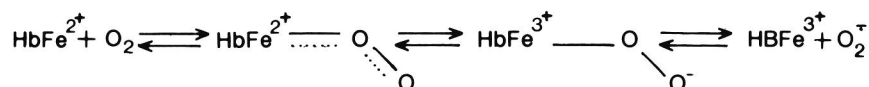
Figuur 18. De zuurstofdissociatiecurve van hemoglobine. Curve A: de normale situatie; curve B: bij aanwezigheid van slechts 50% van de normale hoeveelheid Hb; curve C: bij normale hoeveelheid Hb, maar met 50% van de heemgroepen bezet met koolmonoxide (CO). a, b en c representeren de hoeveelheden zuurstof die per liter bloed van de longen ($p(\text{O}_2) \approx 13,3 \text{ kPa}$) naar lichaamsweefsels ($p(\text{O}_2) \approx 5,3 \text{ kPa}$) getransporteerd kunnen worden.

moleculen zowel O_2 als CO gebonden hebben. Als CO aan een heemgroep gebonden is, voorkomt dit de structuurverandering die samenhangt met de heem-heem-interactie en verdwijnt de S-vorm van de zuurstofbindingskarakteristiek. Dit betekent dat de zuurstofafgifte in de lichaamsweefsels vermindert, zoals in Figuur 18 is weergegeven. In deze figuur zijn de effecten van een anemie (waarbij 50% van het Hb nog beschikbaar is) vergeleken met die van een 50%-binding van CO aan heem. De binding van koolmonoxyde vermindert dus niet alleen het zuurstoftransport door de plaats van O_2 in te nemen, zij heeft daarnaast een vermindering van de zuurstofafgifte in de weefsels tot gevolg.

5.3 Ferrihemoglobine-vorming

Hb wordt onder normale omstandigheden in geringe mate geoxydeerd door zuurstof (auto-oxydatie; Figuur 19). Per dag wordt in menselijk bloed ca. 2% van het Hb aldus omgezet in ferrihemoglobine (HbFe^{3+}). Er bestaan bij de mens vele erfelijke afwijkingen die resulteren in veranderde hemoglobines. Een aantal van deze Hb's is gevoeliger voor auto-oxydatie, maar ook voor HbFe^{3+} -vorming door een aantal stoffen.

Door de aanwezigheid van HbFe^{3+} -reducerende systemen zijn rode bloedcellen in staat om de HbFe^{3+} -spiegel laag te houden. Vitamine C (ascorbinezuur) en gluta-



Figuur 19. Schematische weergave van de autoxydatie van oxyhemoglobine.

thion (een cysteïne bevattend tripeptide) kunnen bijdragen aan de HbFe^{3+} -reductie, zij het met geringe efficiëntie. Verder bevatten erythrocyten tenminste twee enzym-systemen die ferrihemoglobine reduceren. Eén van deze systemen heeft NADPH als cofactor. Dit systeem is fysiologisch van geringe betekenis, maar kan door redoxstoffen zoals methyleenblauw in hoge mate gestimuleerd worden. Intraveneuze injecties met methyleenblauw worden dan ook wel therapeutisch gebruikt wanneer HbFe^{3+} in het bloed hoge concentraties bereikt, bij voorbeeld als gevolg van vergiftigingen.

Onder normale omstandigheden speelt een NADH-afhankelijk reductase de belangrijkste rol bij de HbFe^{3+} -reductie. Dit enzym, NADH-ferrihemoglobine-reductase, draagt voor tenminste 60% bij tot de reductie. Bij de reductie van ferrihemoglobine door dit enzymstelsel speelt ook cytochroom b_5 een rol (Figuur 20).

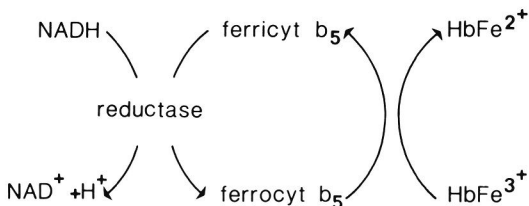
Er bestaan grote soortverschillen in de snelheid waarmee HbFe^{3+} wordt gereduceerd in erythrocyten. Rat, muis, cavia en konijn reduceren HbFe^{3+} sneller dan andere zoogdieren. Ook vogels behoren tot de 'snelle reduceerders'. Dit wordt deels verklaard door verschillen in reducerend vermogen van het enzymstelsel en deels door verschillen in structuur van Hb's. Ook speelt een ander celmetabolisme waarschijnlijk een rol. De erythrocyten van vogels (en andere niet-zoogdiervertebraten) bevatten intacte mitochondriën waardoor verschillen in NADH-beschikbaarheid of in glutathionconcentraties kunnen optreden.

Bij de mens zijn vele typen erfelijke ferrihemoglobinemie beschreven. Deze afwijkingen hebben veelal echter slechts geringe fysiologische gevolgen. Door compensatiemechanismen, bij voorbeeld verhoogde aanmaak van rode bloedcellen, stelt zich een ander evenwicht in, waarbij weliswaar verhoogde gehalten aan HbFe^{3+} gevonden worden (tot 40%), maar zonder dat de zuurstofvoorziening van de weefsels ernstig verstoord wordt. Als echter een plotselinge en massale HbFe^{3+} -vorming optreedt, dan is compensatie veel moeilijker. Een dergelijke acute verhoging van HbFe^{3+} -spiegels kan veroorzaakt worden door de reactie van ferrihemoglobine-vormende stoffen met Hb.

5.3.1 Ferrihemoglobine-vormende stoffen

Veel stoffen kunnen ferrihemoglobine vormen. Deze zijn als volgt in te delen:

- stoffen die direct oxydatief inwerken op Hb (nitriet, waterstofperoxyde, ferricyanide, hydroxylamine, chinonen);
- stoffen die in aanwezigheid van zuurstof ferrihemoglobine vormen (hydrazines, aminofenolen, arylhydroxylamines, nitriet);



Figuur 20. Reductie van ferrihemoglobine door het NADH-ferrihemoglobinereductase-systeem. Bij dit systeem is ook cytochroom b_5 betrokken.

Tabel 9 Amino-, nitro- en andere stikstofverbindingen, die kunnen leiden tot vorming van ferrihemoglobine.

acetanilide	hydroxylamine
α -naftylamine	lidocaïne
2- en 4-aminofenol	methylacetanilide
ammoniumnitraat	natrium- en kaliumnitraat
amylnitriet	natriumnitriet
aniline	nitrobenzeen
aniline-ethanol	nitroglycerine
benzocaïne	nitrosobenzeen
bismuthsubnitraat	4-aminopropiofenon
butylnitriet	paraquat
dimethylamine	prilocaine
dinitrobenzeen	prontosil
ethylnitriet	sulfanilamine
fenacetine	sulfapyridine
fenyleendiamine	sulfathiazol
fenylhydroxylamine	tolueendiamine
hydroxylacetamide	trinitrotolueen

- stoffen die pas na biochemische omzetting (bioactivatie) HbFe^{3+} kunnen vormen (aromatische amines, aromatische nitroverbindingen) (Tabel 9).

Bij de HbFe^{3+} -vormende stoffen nemen de aromatische stikstofverbindingen en nitriet een bijzondere plaats in. In het verleden zijn veel gevallen van anilinevergiftiging voorgekomen (in anilinefabrieken, bij de verwerking van aniline in leer- en kleidingverven). Vaak was sprake van opname via de huid. Vele in de industrie gebruikte aromatische amino- en nitroverbindingen vormen eveneens HbFe^{3+} . Het vroeger veel toegepaste antibacteriële middel sulfanilamide heeft ook veel gevallen van ferrihemoglobinemie veroorzaakt. Aromatische stikstofverbindingen zijn pas na biotransformatie in staat tot HbFe^{3+} -vorming. Zo wordt aniline gehydroxyleerd tot aminofenolen en ook N-hydroxylering treedt op. Nitroverbindingen kunnen gereduceerd worden tot amines en zo dezelfde metabolieten opleveren als de amines. Deze biotransformaties leveren dus stoffen op die meer toxisch zijn dan de stof waaruit ze zijn ontstaan; we kunnen hier spreken van bioactivatie.

De nitriet- en nitraatvergiftigingen zijn reeds lang bekend. In het verleden zijn veel vergiftigingsgevallen met nitriet beschreven, vaak ten gevolge van verwisseling van keukenzout en natriumnitriet in slagerijen of door nitraatverontreiniging van drinkwater. Het gebruik van nitriet in koelinstallaties heeft in het recente verleden geleid tot verontreiniging van diepvriesvoedsel. Nitraat kan bij sommige dieren in het maag-darmkanaal gereduceerd worden tot nitriet. Dit geldt met name voor herkauwers, waar de omstandigheden voor nitraatreductie in de pens uitstekend zijn. In Nederland is nitraatvergiftiging bij runderen bekend, als gevolg van hoge nitraatconcentraties in hooi of stoppelknollen. Bij volwassen mensen speelt nitraatreductie in het maag-darmkanaal geen belangrijke rol. Bij zeer jonge kinderen kan nitraat echter wel worden gereduceerd tot nitriet, omdat de maaginhoud veel minder zuur is. Bovendien is foetaal Hb gevoeliger voor oxydatie dan volwassen Hb. Vooral kinderen die flesvoeding krijgen zijn een groep met verhoogd risico: ze hebben een relatief hoge

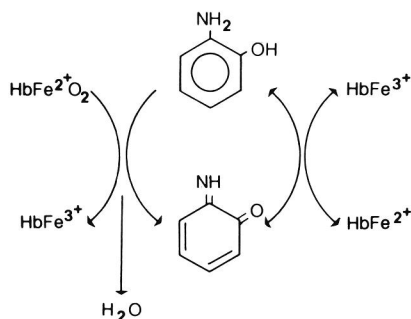
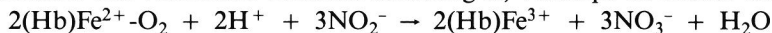
wateropname en hoge nitraatgehaltes in dit water zullen al snel tot ferrihemoglobine-vorming leiden. In sommige bladgroenten, bij voorbeeld spinazie, kunnen ook hoge gehalten aan nitraat worden aangetroffen. Daarom is het raadzaam om babies niet te veel van dergelijke groenten te laten consumeren.

Van het vermogen van nitriet om HbFe^{3+} te vormen is wel gebruik gemaakt bij de behandeling van cyanidevergiftiging. Het CN^- -ion bindt nl. sterk aan ferriheemgroepen en kan daardoor de werking van cytochromen blokkeren, o.a. in de oxydatieve fosforylering (ATP-vorming) in de mitochondriën. Door natriumnitriet toe te dienen wordt een deel van het Hb geoxydeerd, waardoor HbFe^{3+} een deel van het cyanide kan wegvangen. Hierdoor wordt de blokkering van de cytochromen deels voorkomen.

5.3.2 Werkingsmechanismen van ferrihemoglobine-vormende stoffen

Stoffen die direct oxydatief werken, kunnen een elektron van het ferro-heem overnemen. Verbindingen die slechts in aanwezigheid van zuurstof ferrihemoglobine geven, doen dit echter via meer gecompliceerde reacties. In het algemeen geldt dat dergelijke stoffen in een gekoppelde reactie met zuurstof en hemoglobine reageren. In Figuur 21 is als voorbeeld het reactiemechanisme voor 2-aminofenol gegeven. Deze stof reageert met oxyhemoglobine, waarbij ferrihemoglobine, water en een chinon-imine ontstaan. De elektronen worden dus zowel van de heemgroep als van aminofenol op zuurstof overgedragen. Het chinon-imine kan op zijn beurt met hemoglobine reageren onder vorming van extra HbFe^{3+} en het oorspronkelijke aminofenol. Deze laatste reactie verloopt in afwezigheid van zuurstof in tegengestelde richting, zodat aminofenolen dan ferrihemoglobine reduceren. Zuurstof duwt dus de reactie in de richting van HbFe^{3+} -vorming. Het hierbij ontstane kringproces resulteert in een meer dan equivalente HbFe^{3+} -vorming. Voor een meer gedetailleerde beschrijving van experimenteel werk naar de werkingsmechanismen van dergelijke stoffen wordt verwezen naar Hoofdstuk 6.

Het reactiemechanisme van nitriet met Hb is afhankelijk van de aanwezigheid van zuurstof. Als voldoende zuurstof aanwezig is, verloopt de reactie als volgt:

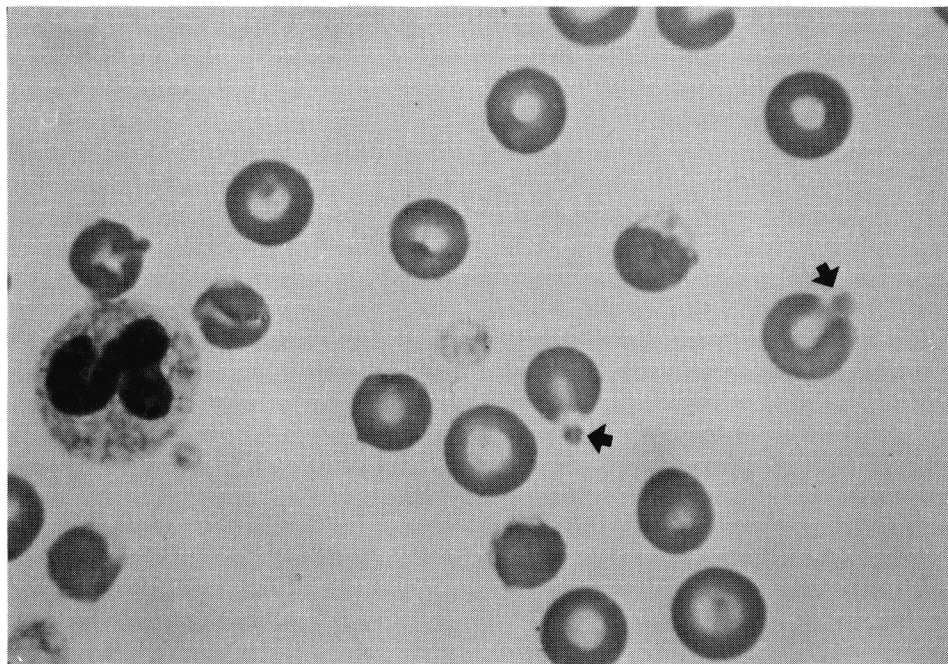


Figuur 21. Schema voor het reactiemechanisme van 2-aminofenol met hemoglobine.

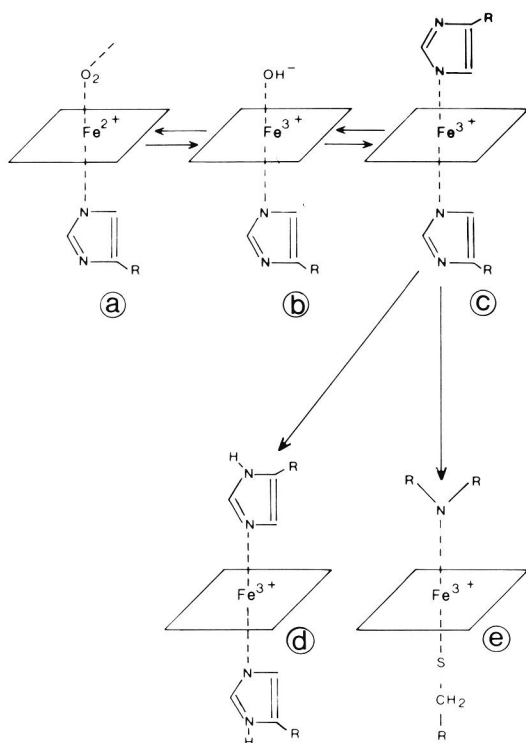
5.4 Vorming van lichaampjes van Heinz

Heinz-lichaampjes zijn insluitsels in rode bloedcellen, bestaande uit gedenameerd Hb (Figuur 22). Stoffen die deze vorm van hemoglobinedenaturatie veroorzaken, vormen eerst HbFe^{3+} , en vervolgens hemichromen door verdergaande oxydatie van de heemgroep (Figuur 23). Deze vormen van geoxydeerd Hb zijn instabiel, slaan neer in de rode bloedcel, en binden zich via zwavelbruggen met de membraan van de erytrocyt. Hierdoor wordt de erytrocyt minder flexibel en wordt bij passage door de milt uit de circulatie genomen. Dit kan leiden tot een tekort aan rode bloedcellen (anemie).

Stoffen die Heinz-lichaampjes veroorzaken hebben dus een verdergaand effect dan HbFe^{3+} -vormende stoffen. Bovendien is dit effect irreversibel. Er bestaan grote soortverschillen in gevoeligheid voor deze stoffen. Zo blijken katten gevoeliger te zijn dan andere zoogdiersoorten. Zelfs 'van nature' komen Heinz-lichaampjes voor in een klein deel van de rode bloedcellen van katten. Heinz-lichaampjes-vormende stoffen zijn o.a.: waterstofperoxyde (H_2O_2), hydroxylamine, fenyldiazine, acetylphenylhydrazine, fenolen, hoge concentraties ascorbinezuur (vitamine C) en sulfiet. In vivo kunnen enkele aromatische amino- en nitroverbindingen ook (na bioactivatie) tot Heinz-lichaam-vorming aanleiding geven.



Figuur 22. Erytrocyten met lichaampjes van Heinz (bij de pijltjes).



Figuur 23. Hemichromen, betrokken bij de vorming van lichaampjes van Heinz. Weergegeven is steeds het vlak van de heemgroep niet loodrecht daarop de vijfde (beneden) en zesde (boven) ligandplaats van het ijzeratoom.

- oxyhemoglobine: de vijfde ligandplaats wordt ingenomen door een histidineresidu uit de globineketen, op de zesde plaats bindt zuurstof.
- ferrihemoglobine-hydroxyde: ijzer is geoxydeerd en heeft een OH^- -ion op de zesde ligandplaats.
- hemichroom H: de zesde ligandplaats is bezet door een ander histidineresidu.
- en e. irreversibele hemichromen: Fe^{3+} heeft oxydatieproducten op plaatsen 5 en 6.

5.5 Hemolyse

Aantasting van de membraan van de rode bloedcel kan leiden tot hemolyse. Als overmatige (of ontijdige) hemolyse leidt tot een tekort aan rode bloedcellen (hemolytische anemie), dan komt het zuurstoftransport in het lichaam in gevaar. Abnormale hemolyse kan veel oorzaken hebben. Zo treedt hemolyse op door:

- directe effecten op de membraan (zware metalen, oxydantia, stoffen die actieve vormen van zuurstof genereren, zoals peroxyden (Hoofdstuk 6);
- aantasting van het celmetabolisme, waardoor ATP-gebrek ontstaat en daardoor membraanlekkage, bij voorbeeld voor kaliumionen;
- aantasting van het celmetabolisme, met NADPH-gebrek als gevolg, waardoor de cel gevoeliger wordt voor oxydatie;

- erfelijke afwijkingen in het metabolisme of in de membraanstructuur;
- immuunreacties (bij voorbeeld via het bloedgroepsysteem);
- beschadiging door verandering van de osmotische waarde van bloedplasma.

Membranen worden thans beschreven als een 'vloeibaar mozaïek', opgebouwd uit een lipidendubbellaag en daarin dobberende of verankerde eiwitmoleculen. Verstoring van deze structuur door aantasting van membraancomponenten kan verschillende gevolgen hebben:

- er kan lekkage optreden van cellulaire bestanddelen (K^+ , eiwitten);
- er kan 'verstarring' van de membraan optreden (in het geval van de rode bloedcel zal dit leiden tot een versnelde eliminatie van de cellen in de milt);
- er kunnen zeer selectieve ingrepen in het functioneren van de membraan plaatsvinden, bij voorbeeld remming van de opname van glucose door ouabaïne.

Aantasting van de lipide-component kan veroorzaakt worden door oxyderende stoffen. De daardoor optredende lipide-peroxydatie zal gevolgd worden door membraanlekkage. Voorbeelden: dapsone, hydrochinon, actieve vormen van zuurstof (Hoofdstuk 6). Zware-metaalionen (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) kunnen door binding aan sulphydrylgroepen eiwitten aantasten. Het gevolg is steeds een verstoring van de membraanstructuur. Deze tweewaardige kationen kunnen tevens calciumionen verdrijven, waardoor de membraanstabiliserende calciumbruggen verbroken worden.

5.5.1 Normale afbraak van erythrocyten

Onder normale omstandigheden vindt de afbraak van rode bloedcellen voornamelijk plaats in de milt. De gezonde zoogdiererythrocyt is een platte schijf die door vorm en membraaneigenschappen sterk vervormbaar is. Naarmate de erythrocyt ouder wordt, verliest de cel geleidelijk een aantal essentiële enzymsystemen, waardoor het vermogen om de cel vervormbaar te houden op den duur verdwijnt. De minder elastische cellen worden door de milt selectief uit de bloedbaan weggevangen. De hiervoor beschreven vorming van Heinz-lichaampjes kan opgevat worden als een versnelde veroudering van de rode bloedcel. Bij de afbraak van de rode bloedcellen komt het hemoglobine vrij. De heemgroep wordt omgezet in bilirubine en na koppeling met glucuronzuur door de lever via de gal uitgescheiden.

De rode bloedcel kan ook kapot gaan in de bloedbaan (zgn. intravasculaire hemolyse). In dat geval wordt het vrijgekomen hemoglobine gebonden aan een 'afvangewit', het haptoglobine. Dit complex wordt opgenomen in de lever, waar verdere verwerking tot bilirubine-glucuronide en uitscheiding plaatsvindt. Een te hoog gehalte aan vrij bilirubine in de bloedbaan (geelzucht) kan leiden tot te hoge concentraties in de hersenen, wat, met name bij jonge kinderen, hersenbeschadiging tot gevolg heeft. De capaciteit van het bilirubine-verwerkende systeem is echter groot omdat onder normale omstandigheden constant Hb wordt aangemaakt en afgebroken ('turn-over'). Er zal dus een aanzienlijke hemolyse moeten plaatsvinden alvorens gevaarlijk hoge concentraties aan bilirubine in het bloed gevonden worden. Een milde hemolyse zal slechts een gering effect hebben op het zuurstoftransport, omdat als respons veelal een extra aanmaak van erythrocyten in het beenmerg zal plaatsvinden (Hoofdstuk 2).

5.5.2 Erfelijke afwijkingen in het metabolisme van de erytrocyt, resulterend in hemolyse

Voor een goed functioneren van de celmembraan is het nodig dat de cel over voldoende energie kan beschikken. Voor het in-stand-houden van de membraanpotentiaal en de intracellulaire ionenconcentraties zijn bij voorbeeld goed werkende ionenpompen noodzakelijk. Deze pompen verbruiken ATP. De rode bloedcellen van zoogdieren beschikken niet over mitochondriën en zullen dus voor hun ATP-behoefte aangewezen zijn op de glycolyse. Erfelijke afwijkingen in enzymen van de glycolyse kunnen leiden tot ATP-tekort en dit verhoogt de kans op hemolyse. In Tabel 10 wordt een overzicht gegeven van de enzymen waarvan deficiënties geassocieerd zijn met hemolyse. Een merkwaardigheid hierbij is wel, dat de hemolyse pas optreedt bij extra belasting van de cellen met lichaamsvreemde stoffen (o.a. oxydantia). Een aantal belangrijke stoffen in dit verband is vermeld in Tabel 11.

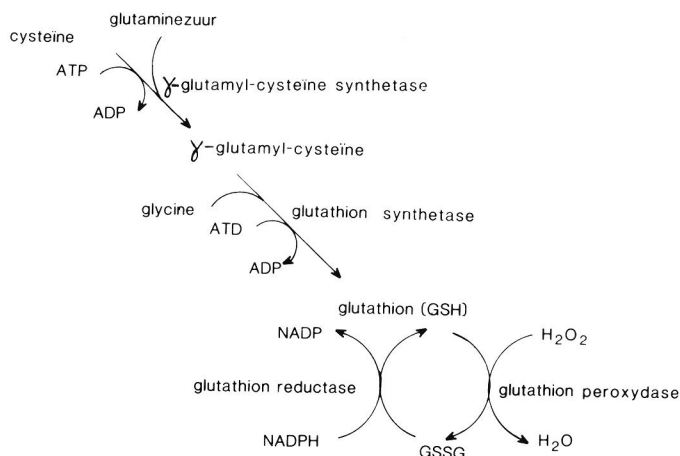
Hetzelfde geldt voor deficiënties van enzymen die betrokken zijn bij het zgn. glutathion-systeem (Figuur 24). Glutathion (GSH) is een stof, opgebouwd uit drie aminozuren, waaronder cysteine. GSH kan worden beschouwd als een 'natuurlijk antioxydant'. Als de SH-groep geoxydeerd wordt, ontstaat het glutathiondimeer (GSSG). Oxydatie van GSH voorkomt oxydatie van structurele celbestanddelen, tevens zou GSH de oxydatie, bij voorbeeld van lipiden of hemoglobine, kunnen 'herstellen'. Hierbij speelt het enzym GSH-peroxydase een rol. Het GSH-systeem zorgt voor het op peil houden van de GSH-spiegel in de cel. Hierbij is een aantal enzymen betrokken (Figuur 24). De aanmaak van glutathion uit de drie aminozuren verloopt via twee enzymatische reacties. Glutathion-reductase kan GSSG reduceren, met NADPH als cofactor. Dit NADPH kan geleverd worden door het celmetabolisme via de hexosemonofosfaat-shunt van de glycolyse. Hierbij is onder andere het enzym

Tabel 10 Enzymen waarvan erfelijke enzymdeficiënties bekend zijn, die ('drug-induced') hemolytische anemie tot gevolg kunnen hebben (met de veel gebruikte afkortingen en het zgn. EC-nummer).

Systeem	Enzym	Afkorting	EC-nummer
glycolyse	hexokinase	HK	2.7.1.1
	glucosefosfaatisomerase		5.3.1.9
	1-fosfofructokinase		2.7.1.56
	6-fosfofructokinase		2.7.1.11
	aldolase		4.1.2.13
	triosefosfaatisomerase		5.3.1.1
	fosfoglyceraatkinase	PK	1.1.1.95
	pyruvaatkinase		2.7.1.40
	2,3-difosfaatglyceromutase		
pentose-fosfaatshunt en GSH-systeem	glucose-6-fosfaatdehydrogenase	G6PD	1.1.1.49
	glutathionreductase	GR	1.6.4.2
	glutathionperoxidase	GPx	1.11.1.9
	γ -glutamylcysteïnesynthase		6.3.2.2

Tabel 11 Stoffen die aanleiding kunnen geven tot hemolytische anemie bij patiënten met glucose-6-fosfaatdehydrogenase-(G6PD)-deficiëntie.

aceetanilide	primaquine
fenylazodiaminopyridine	sulfanilamide
methyleen blauw	sulfacetamide
nalidixinezuur	sulfapyridine
naftaleen	sulfamethoxazol
nitrofurantoïne	thiazolsulfon
fenylhydrazine	toluidine blauw
pamaquine	trinitrotolueen (TNT)
pentaquine	



Figuur 24. Het glutathionsysteem. Glutathion (GSH) is opgebouwd uit drie aminozuren. Bij oxydatie ontstaan dimeren (GS-SG); bij deze oxydatiereacties vervult het glutathionperoxydase vaak een rol. Door het enzym glutathionreductase kan GSSG weer gereduceerd worden tot GSH. Hierbij worden de reducerende equivalenten geleverd door NADPH.

glucose-6-fosfaatdehydrogenase (G6PD) betrokken. Voor al deze enzymen zijn deficiënties beschreven, die alle in verband gebracht worden met hemolyse, veroorzaakt door oxydantia.

Bij de mens is G6PD-deficiëntie een zeer frequent voorkomend fenomeen. Er zijn ten minste 80 G6PD-varianten bekend. Het antimalariamiddel primaquine is wel een der bekendste stoffen die bij de genoemde enzym-deficiënties hemolyse kan veroorzaken. Tabel 11 geeft andere voorbeelden. Patiënten met G6PD-deficiëntie lijden ook aan hemolytische anemie na het nuttigen van bonen (o.a. de bonen van *Vicia faba*). Dit verschijnsel wordt daarom wel favisme genoemd. In de zaadhuid van verse tuinbonen komen een of meer voor hitte ongevoelige toxische stoffen voor, waaronder vicine en divicine. Koken van de bonen vermindert de toxiciteit dus niet, drogen en langer bewaren wel.

6 Toxicologie van bloed- en beenmergcellen in vitro

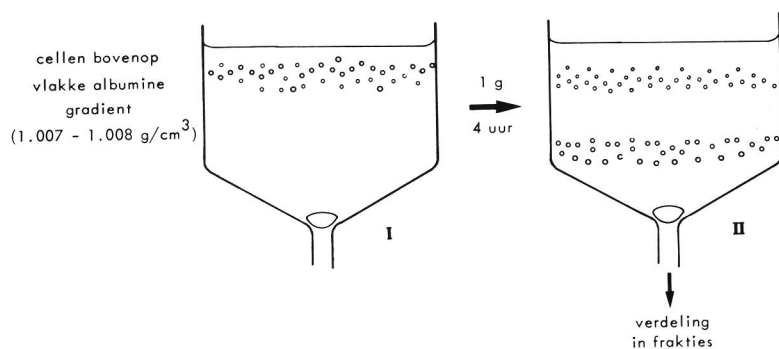
6.1 Inleiding

Het onderzoek naar de effecten van toxische stoffen op levende organismen kan men onderverdelen in:

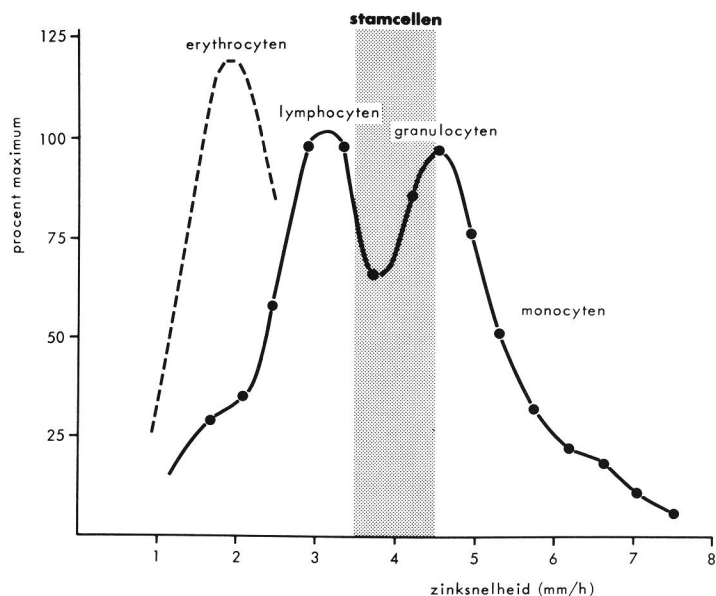
- experimenten met levende (intacte) organismen (in vivo onderzoek);
- experimenten met geïsoleerde cel- of orgaansystemen (in vitro onderzoek);

In de voorafgaande hoofdstukken zijn de resultaten beschreven van onderzoek met levende, intacte organismen. Deze in vivo experimenten geven antwoord op de vraag of een lichaamsvreemde stof interfereert met het bloed of de bloedvormende organen. Als dit zo is blijkt dat uit de samenstelling van het bloed of het beenmerg van het proefdier. De in vivo experimenten geven in het algemeen geen direct inzicht in het werkingsmechanisme van een stof. In vitro onderzoek biedt meer mogelijkheden om het werkingsmechanisme van een stof op te helderen. In dit hoofdstuk worden enkele voorbeelden gegeven van de toepassing van cultures van bloed- of beenmergcellen voor het bestuderen van de toxische effecten van lichaamsvreemde stoffen op cellulair niveau.

In principe kan men elk celtype dat in het bloed c.q. beenmerg voorkomt, isoleren en in vitro gedurende een beperkte tijd in leven houden. Daarbij maakt men gebruik van celscheidingstechnieken die gebaseerd zijn op de aanname dat cellen die in functionele eigenschappen verschillen wellicht ook verschillen in fysisch opzicht. Voor het scheiden van de verschillende beenmergcellen of bloedcellen maakt men gebruik van parameters als grootte (Figuur 25), membraanlading (Figuur 26), dichtheid (Figuur 27) en lichtverstrooiing door de cel (Figuur 28).



Figuur 25a. Scheiding van cellen op basis van zinksnelheid. De cellen worden in een dunne laag op een vloeistofkolom gebracht, waarna ze enige uren de tijd krijgen om 'uit te zakken'. De cellen met de hoogste zinksnelheid kunnen het eerste worden afgetapt.



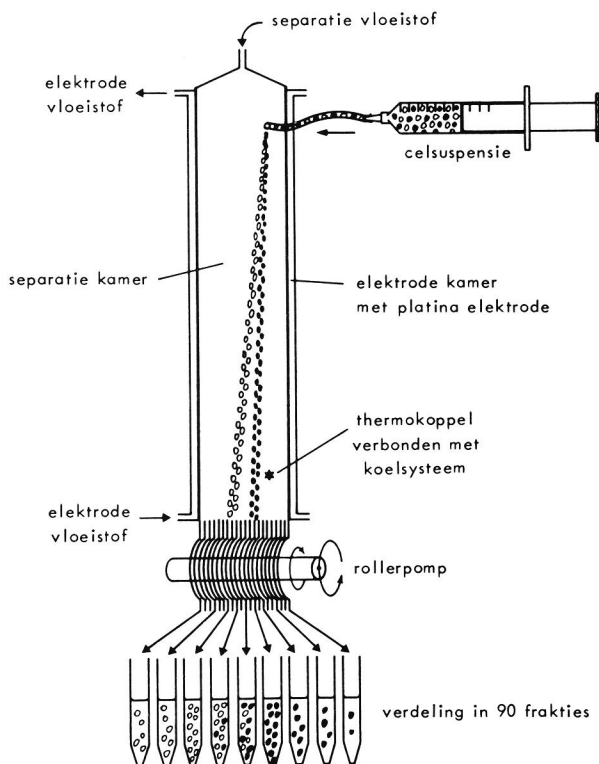
Figuur 25b. De zinksnelheidsverdeling van beenmergcellen. De volle lijn geeft de verdeling van de kernhoudende cellen weer.

Het meeste toxiciteitsonderzoek is uitgevoerd met suspensies van rode bloedcellen, maar men gebruikt ook cultures van lymfocyten, monocysten of macrofagen en granulocyten of suspensies van bloedplaatjes om in vitro de toxische effecten van lichaamsvreemde stoffen te bestuderen.

6.2 Oxydatieve hemolyse

In paragraaf 5.5 zijn de oorzaken beschreven van intravasculaire lysis van de rode bloedcel (hemolyse). Bij personen met een normale enzym samenstelling van de erytrocyt zal intravasculaire lysis alleen optreden bij blootstelling aan extreem hoge doseringen van een toxische stof. In het algemeen is het mogelijk om hemolytische eigenschappen van chemische stoffen op te sporen door ze gedurende 2–4 weken toe te dienen aan ratten en vervolgens bloed van de dieren te onderzoeken op een groot aantal parameters zoals aantal rode bloedcellen, hematocriet, aantal reticulocyten, vorming van ferrihemoglobine of lichaampjes van Heinz. Anders is het voor mensen met een aangeboren afwijkende enzym samenstelling van de erytrocyt, zoals de in paragraaf 5.5.2 besproken G6PD-deficiëntie. Mensen met een dergelijke erfelijke enzymafwijking zijn buitengewoon gevoelig voor stoffen met hemolytische eigenschappen. Er is nog geen betrouwbaar diermodel ontwikkeld om lichaamsvreemde stoffen op te sporen met zulke geringe hemolytische eigenschappen dat ze alleen voor patiënten met een G6PD-deficiëntie problemen opleveren. Erythrocyten van schapen en geiten hebben wel een lage G6PD-activiteit maar ze zijn niet extra gevoelig voor lichaamsvreemde stoffen. Bij het schaap zijn twee erfelijke afwijkingen bekend die een lage glutathion-concentratie in de erytrocyt veroorzaken. Men is erin geslaagd

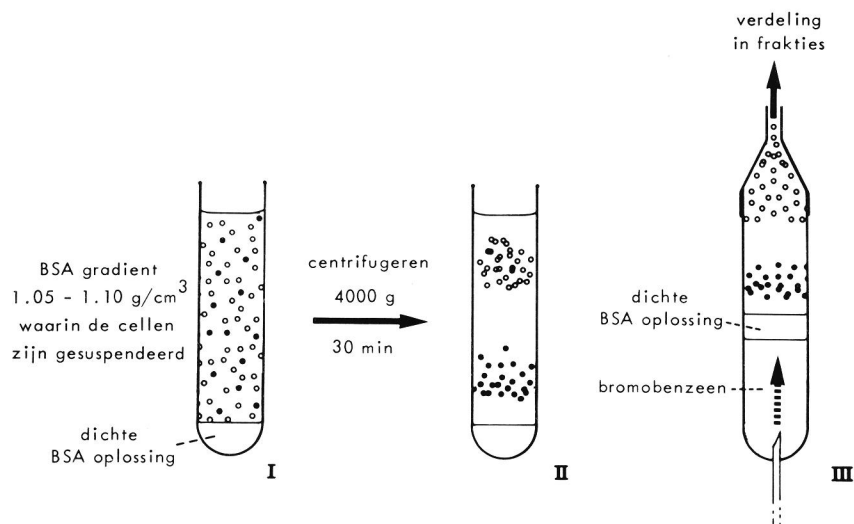
SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN DE KONTINUE
"FREE FLOW" ELEKTROFORESE



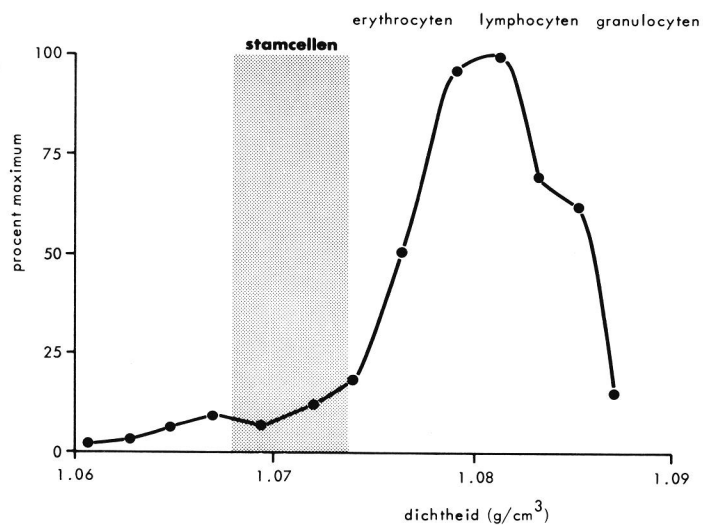
Figuur 26. Het scheiden van cellen naar membraanlading. De cellen bewegen in een vloeistofstroom tussen twee elektrodes, waartussen een spanningsverschil van 1200 V bestaat. De sterkst negatief geladen cellen migreren het snelst naar de anode zodat de fracties die onderaan opgevangen worden cellen bevatten met verschillende membraanlading.

een schaperas te fokken dat beide erfelijke afwijkingen heeft. De erythrocyten van deze schapen bezitten heel weinig glutathion en lyseren daardoor buitengewoon snel. Bloed van deze dieren wordt wel gebruikt om een eventuele hemolytische werking van een lichaamsvreemde stof aan te tonen.

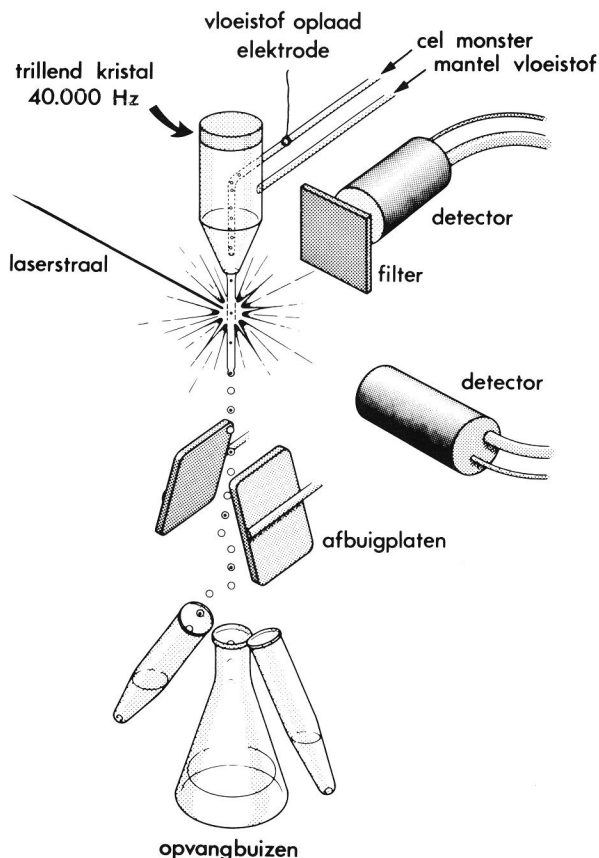
Er kleven echter enkele bezwaren aan het gebruik van rode bloedcellen van het schaap als in vitro model: bij het schaap wordt de grote gevoeligheid voor hemolyse veroorzaakt door een erg laag glutathion-gehalte terwijl de gevoeligheid bij de mens meestal veroorzaakt wordt door enzymdeficiënties. Bovendien zijn rode bloedcellen van sommige schaperassen aanzienlijk gevoeliger voor de peroxydatieve werking van toxische stoffen dan erythrocyten afkomstig van mensen met erfelijke enzymatische afwijkingen. De situatie is dus niet goed vergelijkbaar. Daarom wordt voor onderzoek naar het mechanisme van de toxische hemolyse meestal gebruik gemaakt van suspensies van erythrocyten afkomstig van ratten.



Figuur 27a. Het scheiden van cellen naar dichtheid. De cellen worden gesuspendeerd in een albumine-(BSA)-gradiënt. Na centrifugeren wordt de gradiënt in fracties verdeeld. De cellen ondervinden geen nadelige gevolgen van deze manipulatie en behouden hun vitaliteit. Het is dus mogelijk om het aantal stamcellen per fractie in de 'miltkolonietoets' (Paragraaf 6.5) of in weefselkweek te bepalen.

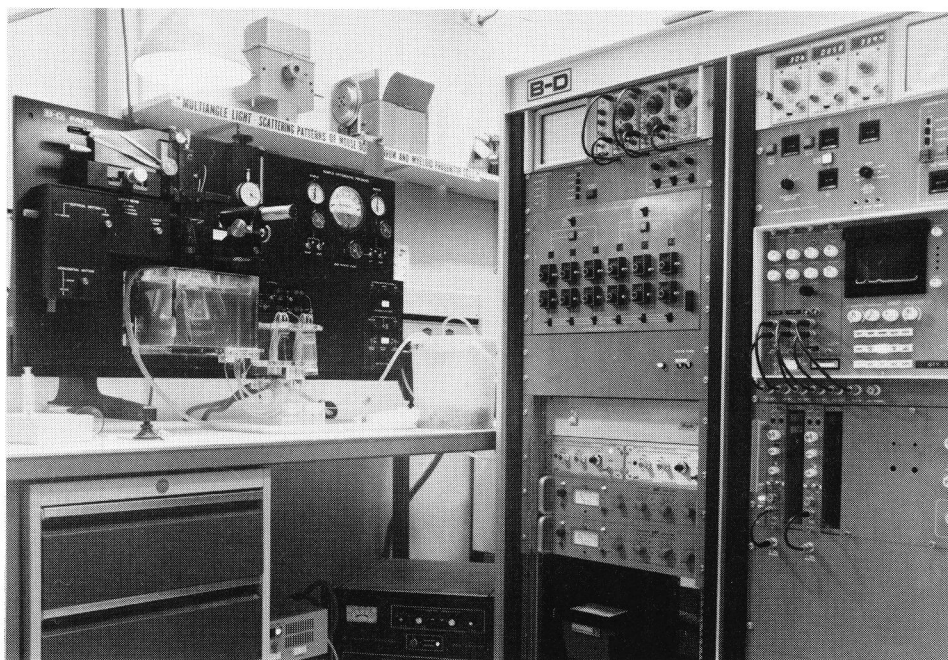


Figuur 27b. Dichtheidsverdeling van beenmergcellen. De lijn stelt de verdeling van de kernhoudende cellen voor.

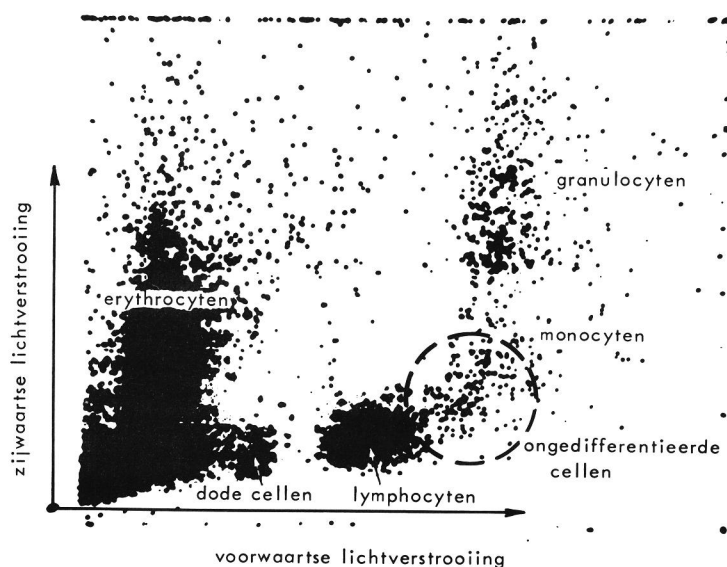


Figuur 28a. Het principe van 'flow cytofluorometrie'. De cellen bevinden zich in een vloeistofstraal die door een spuitstuk met een nauwe opening ($50\ \mu\text{m}$) geperst wordt. Met een piëzo-elektrisch kristal wordt de vloeistofstraal in gelijkmatige druppeltjes gebroken. Voor het breekpunt passeren de cellen een laserbundel. De lichtflitsjes kunnen met elektronische detectoren waargenomen worden. De vloeistofdruppels kunnen van een elektrische lading worden voorzien en met twee afbuigplaten van de hoofdstroom worden afgebogen en in aparte buizen worden opgevangen.

Mogelijk zijn oude menselijke erythrocyten ook bruikbaar als in vitro model, omdat deze veel minder anti-oxydantia bezitten dan jonge cellen, waardoor ze gevoeliger worden voor de hemolytische werking van toxische stoffen. Met de in paragraaf 6.1 genoemde celscheidingstechnieken is het mogelijk om op basis van grootte, jonge en oude erythrocyten van elkaar te scheiden. In vitro onderzoek heeft aangetoond dat anti-oxydantia van essentieel belang zijn voor het behoud van de integriteit van de erythrocyt. Diverse lichaamsvreemde stoffen geven aanleiding tot de vorming van zuurstofradicalen zoals het waterstofperoxyde, het superoxyde-radicaal, singlet-zuurstof of het hydroxylradicaal. Onder normale omstandigheden voorkomt de hoge concentratie aan anti-oxydantia (zoals catalase, superoxyde dismutase, glutathion



Figuur 28b. De celscheider ('cell sorter') in het Radiobiologisch Instituut TNO te Rijswijk. Dit apparaat kan cellen scheiden op grond van verschillen in fluorescentie en lichtverstrooiing. Als lichtbron gebruikt men een gefocusserde argonlaser ($P=4$ W).



Figuur 28c. Resultaat van de scheiding van beenmergcellen met de celscheider. Iedere stip geeft de lichtverstrooiing in voorwaartse en zijwaartse richting van een cel weer. De stamcellen worden in het omcirkelde gebied aangetroffen.

e.d.) in de erythrocyt dat deze actieve vormen van zuurstof de celmembraan beschadigen. Maar als, door wat voor oorzaak dan ook, de concentratie aan beschermende stoffen in de cel laag is, zal er hemolyse optreden (zogenaamde peroxydatieve hemolyse). Dit verschijnsel komt in de volgende paragraaf aan de orde.

6.3 Effecten van fototoxische stoffen op erythrocyten in vitro; fotohemolyse

6.3.1 Inleiding

Bij mens en dier komt overgevoeligheid voor licht voor, die ontstaat door de aanwezigheid van een fototoxische stof in het bloed. Onder fototoxiciteit wordt het verschijnsel verstaan dat bepaalde chemische verbindingen toxisch zijn in aanwezigheid van licht. Stoffen met een fototoxische werking absorberen in het algemeen licht met een golflengte in het langgolvlige UV-gebied (320–420 nm). Door deze absorptie van energie ontstaat er een reactief tussenproduct dat:

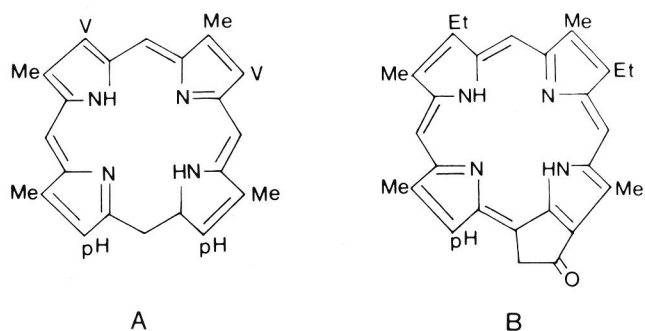
- zich bindt aan celbestanddelen (DNA, eiwitten en dergelijke) waardoor een antigeen ontstaat; in dit geval is het immuunsysteem bij het ontstaan van de lichtovergevoeligheid betrokken (fotoallergie);
- zijn energie overdraagt op moleculaire zuurstof waardoor vormen van actief zuurstof zoals singletzuurstof en het superoxyde-anionradicaal ontstaan (fotodynamische reactie). In afwezigheid van zuurstof kan een dergelijke reactie niet optreden.

Het werkingsmechanisme van de fototoxiciteit is uitgebreid bestudeerd met erythrocytensuspensies.

6.3.2 Fototoxiciteit bij mens en dier

Fototoxische verbindingen kunnen van exogene en endogene oorsprong zijn. Planten behorend tot de familie der schermbloemigen, de Umbelliferae zoals dille, peterselie, bereklauw, pastinaak, engelwortel en wilde peen zijn bekend om hun vermogen om onder invloed van zonlicht lichtovergevoeligheid te veroorzaken. Ook sommige cosmetica (bepaalde parfums, zepen en zonnebrandcrèmes) en farmaca (antibacteriële sulfonamides, tetracyclines, fenothiazines) en industriële chemicaliën (sommige polycyclische koolwaterstoffen) (Tabel 12) kunnen aanleiding geven tot lichtovergevoeligheid. Een stof die in veterinaire opzichts van belang is en die ook fototoxische eigenschappen heeft is het fyloërytrine. Dit is een microbieel afbraakproduct van chlorofyl dat bij herkauwers in de pens ontstaat. Bij leverbeschadiging ontstaat er een verstoring van de excretie van het fyloërytrine (Figuur 29) waardoor dit zich ophoopt in de lever en in de bloedcirculatie terecht komt. Hierdoor ontstaat bij runderen die aan zonlicht zijn blootgesteld 'zonnebrand': de witbehaarde gedeelten van de huid zwellen op en vertonen na verloop van tijd necrose. Ook bij schapen wordt dit verschijnsel wel waargenomen, met name op de dunbehaarde hoofdhuid en uitstekende delen als lippen, oren en oogleden. Als dit gepaard gaat met icterus (geelzucht) spreekt men van geeldikkopziekte.

De verschijnselen die door fyloërytrine kunnen ontstaan zijn te vergelijken met de huidafwijkingen die veroorzaakt worden door andere endogene fototoxische stoffen, de porfyrynes (Figuur 29). Onder normale omstandigheden komen deze stoffen



Figuur 29. Structuur van protoporfyrine (A) en fylloërytrine (B).

Tabel 12 Stoffen die lichtovergevoeligheid veroorzaken.

A. primaire fototoxiciteit/fotosensitiviteit

geneesmiddelen en industriële stoffen

een aantal sulfonamides
tetracyclines
fenothiazines
stoffen in koolteer

plantaardige oorsprong

fylloëritryne, afkomstig van alle chlorofyl-bevattende plantedelen
hypericine van *Hypericum* spp.
fucocoumarines
psoralenen uit diverse plantesoorten (o.a. Umbelliferae)

endogene oorsprong

porfyrines zoals het protoporfyrine

B. secundaire fototoxiciteit

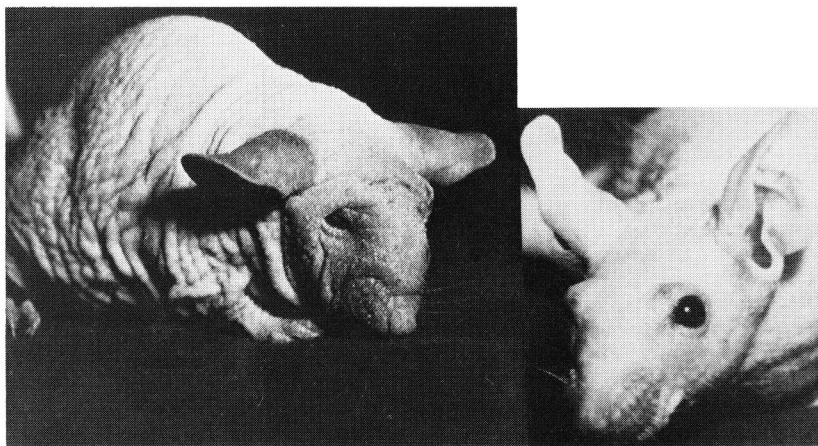
stoffen die fylloëritryne-ophoping veroorzaken door leverbeschadiging

icterogenine/deoxyicterogenine en mogelijk ook andere terpenen
sporidesmine afkomstig van de schimmel *Pithomyces chartarum*

porfyrinogene stoffen zoals

lood?
griseofulvine
hexabroombenzeen
PCB's

slechts in zeer lage concentraties in het bloed voor. Door een verstoring in de heem-synthese kunnen zich porfyrines in het lichaam ophopen. Bij voorbeeld bij erythropoietische protoporfyrie, een ziekte die door een erfelijke afwijking wordt veroorzaakt en waarbij door een verminderde ferrochelatase-activiteit (Figuur 11) een



Figuur 30. Een haarloze muis die via het voer DDC toegediend heeft gekregen waardoor porfyrynes (lichtgevoelige voorstadia van heem) in het lichaam zijn geaccumuleerd. Bestraling van deze muizen met kortgolvig licht ($\lambda = 400$ nm) veroorzaakt ernstige oedeemvorming (vergelijk kop en oren van de porfyrische muis, links, met die van het controledier, rechts). Dezelfde verschijnselen, maar minder ernstig, neemt men ook waar bij patiënten met bepaalde erfelijke afwijkingen in de vorming van heem (o.a. patiënten met erythropoietische protoporfyrie).

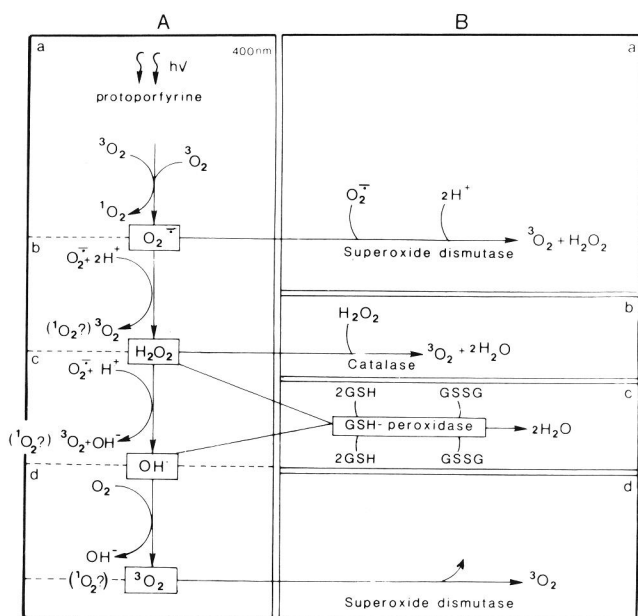
ophoping plaats vindt van de lichtgevoelige stof protoporfyrine. Door aan muizen griseofulvine of 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine toe te dienen ontstaat een experimentele vorm van protoporfyrie, waarbij zich protoporfyrine ophoopt in het bloedplasma. Zowel bij de porfyriepatiënt als bij experimenteel porfyrisch gemaakte muizen ontstaat huidirritatie na bestraling met licht met een golflengte van 400 nm (Figuur 30).

6.3.3 *Werkingsmechanisme van fototoxische stoffen: fotohemolyse*

Bestraling van suspensies van rode bloedcellen met langgolvig UV-licht in aanwezigheid van zuurstof en een lichtgevoelige (fototoxische) stof veroorzaakt een zodanige beschadiging van de membraan dat de cel lyseert. Men noemt dit verschijnsel fotohemolyse. Dergelijke in vitro experimenten zijn met een tamelijk eenvoudige opstelling uit te voeren. Enige voorwaarde voor het slagen van de experimenten is dat er licht wordt gebruikt met een golflengte die door de te onderzoeken stof kan worden geabsorbeerd. Suspensies van rode bloedcellen worden geïncubeerd met de te onderzoeken stof en vervolgens bestraald met langgolvig UV-licht. Het percentage hemolyse wordt vervolgens bepaald door na centrifugering, de hemoglobineconcentratie in de bovenstaande vloeistof te meten. Het werkingsmechanisme van een aantal fototoxische stoffen is o.a. door dergelijke fotohemolyse-experimenten opgehelderd.

Fenothiazines

Fenothiazine-derivaten zijn bekend om hun lichtovergevoelighedsreacties. De belangrijkste vertegenwoordiger van deze groep is chloorpromazine dat vroeger veel-

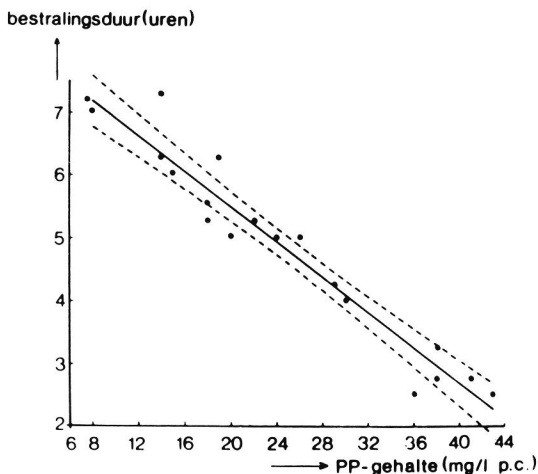


Figuur 31. Schema van de weg waarlangs de verschillende vormen van actieve zuurstof na belichting van protoporfyrine kunnen worden gevormd (A) en de relatie met de intracellulaire beschermingsmechanismen (B). 3O_2 grondtoestand van zuurstof; 1O_2 singletzuurstof; $O_2^{\cdot -}$: superoxydeanionradicaal; $OH^{\cdot}$: hydroxylradicaal; H_2O_2 : waterstofperoxyde.

vuldig werd gebruikt als neurolepticum. Behandeling van patiënten met deze stof ging soms gepaard met fototoxische bijverschijnselen, die zowel het gevolg van foto-allergische als van fotodynamische reacties kunnen zijn (toename van de gevoeligheid voor zonnebrand, hyperpigmentatie van de huid en ooglensbeschadiging). Bij bestraling van chloorpromazine in aanwezigheid van zuurstof ontstaan er kationradicalen (chloorpromazine⁺) en vormen van actief zuurstof zoals het superoxyde en het singletzuurstof. Uit in vitro onderzoek met erythrocyten bleek dat de vorming van het singletzuurstof niet noodzakelijk is om fotohemolyse te veroorzaken. De lysis van de rode bloedcellen door het chloorpromazine zou het gevolg zijn van aggregatie van membraaneiwitten (zoals spectrine; een belangrijke component van de erythrocyt-membraan) door het kationradicaal dat door de belichting van chloorpromazine wordt gevormd. Actieve vormen van zuurstof lijken niet noodzakelijk voor het optreden van de fototoxische reactie.

Porfyrines

De structuur van in de natuur voorkomende porfyrines bestaat uit vier pyrroolkernen die door even zovele methineresten (CH-) onderling zijn verbonden. Centraal in het porfyrinemolecuul kan een metaalion (bij voorbeeld Zn, Fe, Mg of Mn) zijn ingebouwd. Dit zijn de zogenaamde metalloporfyrines. Een belangrijke eigenschap van metalloporfyrines is de opname van energie in de vorm van licht (denk aan chlorofyl). Metalloporfyrines zijn betrokken bij essentiële levensprocessen van plant en



Figuur 32. Verband tussen de protoporfyrine-concentratie van een erythrocytensuspensie en de bestralingsduur die nodig is om 50% hemolyse te veroorzaken; $n=18$; correlatiecoëfficiënt: 0,96. De stippellijnen geven de boven- en benedengrenzen van de 95%-betrouwbaarheidsintervallen aan.

dier. Ze worden in vrijwel alle levende organismen aangetroffen. Een voorbeeld van met ijzer gecomplexed porfyriene is heem, dat in o.a. hemoglobine, myoglobine, cytochromen en catalase voorkomt. Een voorbeeld van met magnesium gecomplexed porfyriene is chlorofyl. Voorbeelden van vrije, niet gecomplexed porfyrienes zijn uroporfyrine, coproporfyrine, protoporfyrine en het fyllöerytrine (Figuur 29).

Bij de belichting van protoporfyrine ontstaan actieve vormen van zuurstof zoals singletzuurstof, superoxyde-radicaal, waterstofperoxyde en het hydroxyl-radicaal. In een normaal functionerende erythrocyt wordt de concentratie aan actief zuurstof laag gehouden door de enzymen superoxyde-dismutase, catalase en glutathion-peroxydase en -reductase (Figuur 31). Naast deze enzymen bevat de cel nog andere wegvangers van actief zuurstof: antioxydantia zoals vitamine E, vitamine C en β -caroteen. Als er echter, zoals bij de erythrocyten afkomstig van een patiënt met erythropoietische protoporfyrine het geval is, te hoge concentraties van de lichtgevoelige stof in de cel aanwezig zijn dan ontstaan er tijdens de bestraling te hoge concentraties van actieve vormen van zuurstof, waardoor de membraan wordt beschadigd en er lysis ontstaat (Figuur 32).

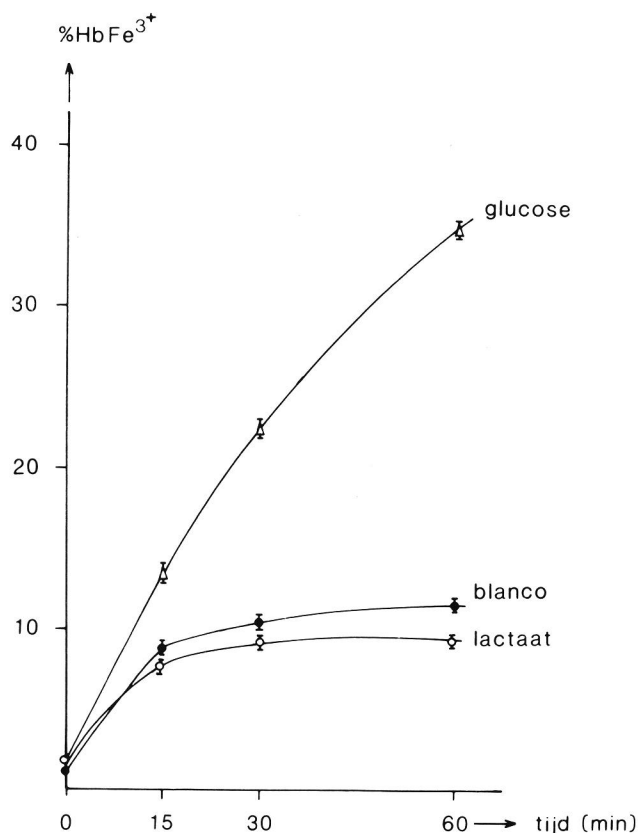
Aangezien intravasculaire fotohemolyse nagenoeg niet voorkomt, fungeren fotohemolyse-experimenten als modelsysteem voor het bestuderen van de reacties die door fototoxische stoffen plaats vinden in de bestraalde huid.

6.4 Vorming en reductie van ferrihemoglobine in vitro

De vorming en reductie van ferrihemoglobine zijn behandeld in hoofdstuk 5. Gegevens over de bij dit proces betrokken werkingsmechanismen en fysiologische processen zijn veelal verkregen door experimenten met erythrocytensuspensies of hemoglobineoplossingen (in vitro). Dergelijke experimenten hebben als voordeel dat

nauwkeurige waarnemingen aan de betrokken processen mogelijk zijn onder goed in de hand te houden omstandigheden, bij voorbeeld met hogere concentraties van ferrihemoglobinevormende stoffen dan in vivo verkregen kunnen worden. In vitro is het vrij eenvoudig om alle aanwezige hemoglobine in de rode bloedcel te oxyderen tot ferrihemoglobine. Door de cellen bij voorbeeld te incuberen met nitriet en ze vervolgens enkele malen te wassen met fysiologisch zout, verkrijgt men een suspensie die 100% ferrihemoglobine bevat en waarin processen van de ferrihemoglobinereductie goed zijn te bestuderen.

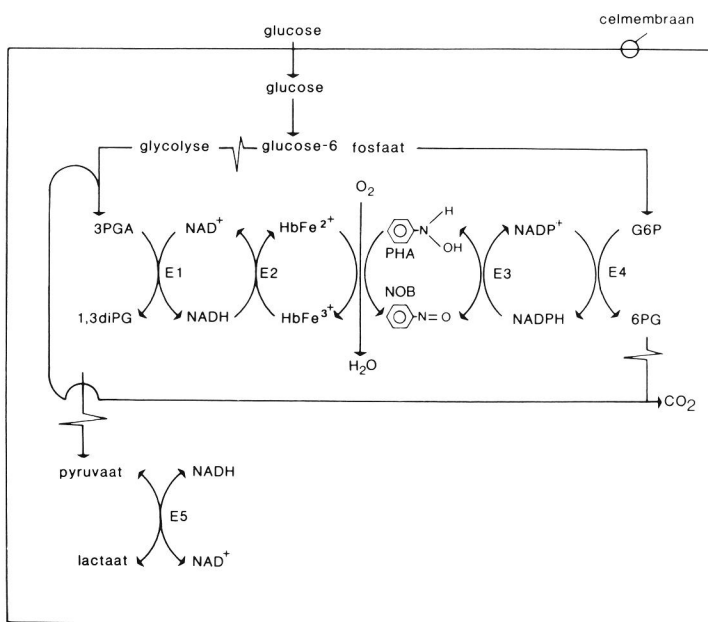
Suspensies van erythrocyten worden wel gebruikt voor het testen van de ferrihemoglobinevormende werking van stoffen, waarmee mens en dier in aanraking kunnen komen. Hier moet echter gewaarschuwd worden voor verschillen in effecten in vitro en in het intacte dier. In vivo kunnen stoffen worden omgezet in verbindingen die actiever zijn dan de oorspronkelijke stof (zogenaamde bioactivering). Een voorbeeld is de omzetting van aromatische amines in N-hydroxylamines (zoals aniline-fenylhydroxylamine). Op grond van in vitro experimenten is veel bekend geworden



Figuur 33. Vorming van ferrihemoglobine door 5 $\mu\text{mol/l}$ fenyhydroxylamine in erythrocyten van geiten. Gemiddelde $\pm$ SEM, $n=5$. Hemoglobineconcentratie ongeveer 300 $\mu\text{mol/l}$. De ferrihemoglobineconcentraties zijn weergegeven als percentages van de totale hoeveelheid hemoglobine. Zie verder paragraaf 6.4.

over de werking van fenylhydroxylamine (PHA). In Figuur 33 is weergegeven hoeveel ferrihemoglobine er wordt gevormd door PHA toe te voegen aan een erythrocyten-suspensie van de geit: er wordt in aanwezigheid van PHA meer ferrihemoglobine gevormd dan men zou mogen verwachten. Toevoeging van glucose aan de suspensie doet de hoeveelheid ferrihemoglobine zelfs nog aanzienlijk oplopen. In aanwezigheid van lactaat wordt echter een lagere ferrihemoglobinespiegel gevonden, maar toch wordt ook in dat geval een meer dan evenredige hoeveelheid ferrihemoglobine gevormd. Op grond van deze gegevens kan het reactieschema worden opgesteld zoals weergegeven in Figuur 34. PHA reageert met hemoglobine alleen in aanwezigheid van zuurstof, onder vorming van ferrihemoglobine, water en nitrosobenzeen. Uit experimenten met gelyseerde erythrocyten (hemolysaten) is gebleken dat nitrosobenzeen, via een enzymatische reactie weer kan worden gereduceerd tot PHA. Hierbij treedt NADPH op als elektronendonor. Dit betekent, dat in de intacte erythrocyt een kringproces kan ontstaan, dat pas eindigt als of hemoglobine, of zuurstof, of NADPH opraakt. NADPH-spiegels kunnen verhoogd worden door metaboliseren van glucose (via de zgn. hexosemonofosfaat-shunt). PHA veroorzaakt dus ferrihemoglobinevorming, stimulering van glucoseopname en glucosemetabolisering en zuurstofverbruik.

Anderzijds is komen vast te staan dat ferrihemoglobine voornamelijk gereduceerd wordt via NADH-afhankelijke reacties. Ook hier is er een relatie met het koolhydraatmetabolisme via NADH-vormende reacties in de glycolyse en, via LDH, uit lactaat. We kunnen dus spreken van een ingrijpen in het celmetabolisme op verschillende punten (Figuur 34).

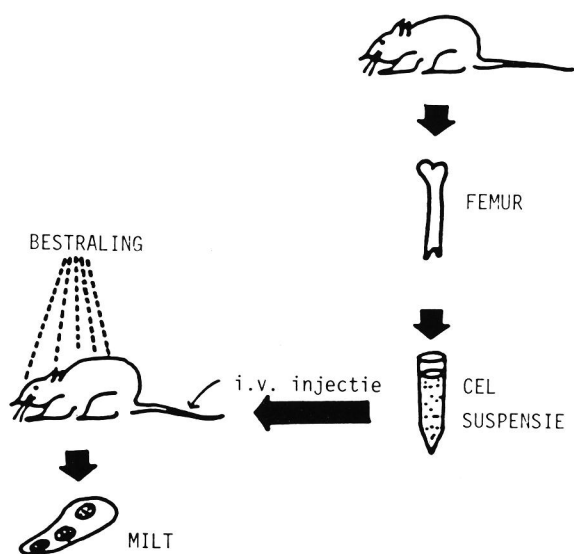


Figuur 34. Metabole processen in rode bloedcellen in relatie tot ferrihemoglobinevorming door N-hydroxyarylamines en ferrihemoglobinereductie.

6.5 Effecten van toxische stoffen op beenmergcellen in vitro

In Hoofdstuk 4 zijn enkele stoffen genoemd die, hetzij met de rijping, hetzij met het metabolisme van de bloedcellen interfereren. Door gebruik te maken van in vitro technieken is het werkingsmechanisme van een aantal stoffen gedeeltelijk opgehelderd. In deze paragraaf zullen een paar van deze technieken worden besproken.

Tabel 6 geeft een overzicht van stoffen waarvan bekend is dat ze aanleiding geven tot een tekort aan rode bloedcellen (anemie), witte bloedcellen (leukopenie) of bloedplaatjes (trombocytopenie). Deze stoffen interfereren op de een of andere manier met de ontwikkeling van de stamcellen tot uitgerijpte bloedcellen. Bekende voorbeelden zijn benzeen, chlooramfenicol en methylkwik. Dit zijn stoffen die pancytopenie en aplastische anemie, e.d. veroorzaken. Om te onderzoeken of een lichaamsvreemde stof een effect heeft op het aantal vitale stamcellen wordt de volgende techniek toegepast (Figuur 35). Proefdieren worden gedurende enkele dagen blootgesteld aan de te onderzoeken stof, waarna de dieren worden gedood en het beenmerg uit de pijpbeenderen wordt verzameld. De kernhoudende cellen worden uit de beenmergcellususpensie geïsoleerd door centrifugeren en vervolgens onder standaardcondities 'gekweekt'. Vervolgens wordt een bekend aantal van deze cellen ingespoten in 'totaal bestraalde' muizen. Bij deze muizen zijn de bloedvormende organen door de bestraling uitgeschakeld. De geïnjecteerde kernhoudende beenmergcellen kunnen in de milt uitgroeien tot knobbels (Figuur 36). Deze knobbels, zogenaamde miltkolonies, bestaan uit diverse cellen van het hematopoietische systeem. Hun aantal is een maat voor het



Figuur 35. Schematische voorstelling van de 'miltkolonietoets'. Beenmergcellen van een gezonde muis worden verzameld uit het femur, gesuspendeerd en ingespoten bij een muis die met een zodanige dosis straling is behandeld dat alle stamcellen gedood zijn. De in de celsuspensie aanwezige beenmergcellen vormen kolonies van nakomelingen die als lichte knobbels op de milt te zien zijn. Het aantal knobbels is een maat voor het aantal geïnjecteerde stamcellen (Figuur 36).



Figuur 36. Een uitgeprepareerde muizemilt met lichte knobbels die de plaatsen aangeven waar zich kolonies van beenmergcellen hebben gevormd bij de 'miltkolonietoets'.

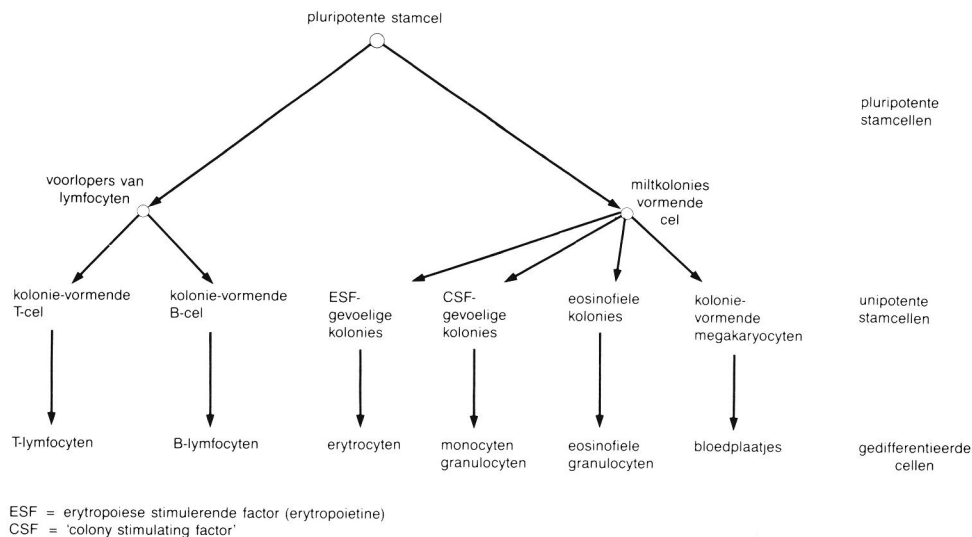
aantal vitale pluripotente stamcellen dat in het ingespoten monster beenmergcellen aanwezig was.

Beenmergcellen kunnen buiten het lichaam tot rijping en deling gebracht worden. Hiertoe worden beenmergcellen van muizen gesuspenderd in een groeimedium waarin agar aanwezig is. Door aan het kweekmedium bepaalde stoffen toe te voegen, die specifieke unipotente stamcellen stimuleren tot celdeling, ontstaan in het kweekmedium kolonies van unipotente stamcellen. Welke factoren de overgang van een rust- naar een delingstoestand beïnvloeden is nog niet voor alle unipotente beenmergcellen opgehelderd. Het hormoon erythropoetine stimuleert de erythrocytencel lijn. Andere regulatoren zoals het CSF (Colony Stimulating Factor) en het trombopoetine reguleren respectievelijk de cellijn van monocyt en granulocyten en de trombocytenlijn (Figuur 37). Als de cellen gaan delen ontstaan er kolonies van dochtercellen (Figuur 38). Door aan het kweekmedium de te onderzoeken lichaamsvreemde stof in verschillende concentraties toe te voegen, kan een effect op de deling of rijping worden bestudeerd. Een andere, vaker toegepaste, methode is om muizen gedurende enkele weken in vivo bloot te stellen aan vrij hoge concentraties van de te onderzoeken stof en vervolgens de effecten op de vitaliteit van de beenmergcellen in vitro te bestuderen. Met deze methode kunnen effecten van toxische stoffen op de ontwikkeling van unipotente stamcellen worden aangetoond.

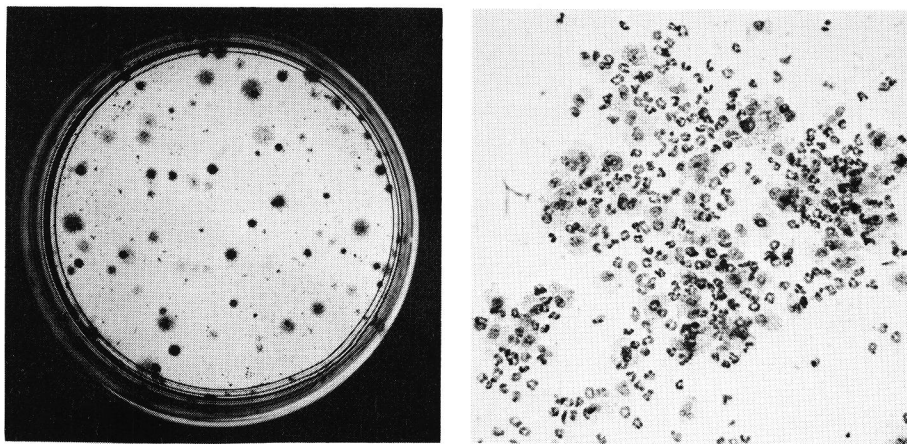
In het kader van onderzoek naar een mogelijk immunotoxisch effect van een stof wordt deze techniek soms toegepast (Hoofdstuk 9).

Bloedcel- en beenmergcellen kunnen onder de juiste kweekcondities uitgaande van glycine en succinaat (of een andere precursor in de heemsynthese) porfyriines vormen. Met deze techniek heeft men de biosyntheseweg van heem opgehelderd (Figuur 11). Interferentie van een toxische stof met de heemsynthese kan in dit in vitro systeem op twee manieren worden aangetoond: bepaling van de activiteiten van de enzymen die betrokken zijn bij de heemsynthese, of bepaling van de hoeveelheid en het type heemprecursor dat zich onder invloed van een toxische stof in de cellen en het medium ophoopt.

Naast bloed- en beenmergcellen worden ook wel lymfocyten en macrofagen in vitro gekweekt voor het ontrafelen van het werkingsmechanisme van toxische stoffen. Met cultures van macrofagen is bij voorbeeld aangetoond dat lood invloed heeft op de immuunrespons.



Figuur 37. Schema van de bloedcelvorming vanuit de pluripotente stamcel volgens de in vivo en in vitro methoden om beenmergcellen aan te tonen.



Figuur 38. Een weefselkweek van muizebeenmergcellen. Door een nog niet nader geïdentificeerde factor (CSF=colony stimulating factor) ontstaan kolonies van granulocyten en monocyten in een kweekmedium met agar. Op de linker foto is een kweekplaatje te zien met één week oude kolonies. De rechter foto toont een kolonie in detail. De kolonies kunnen enkele duizenden cellen bevatten.

7 Toxicologie van bloedplasma

7.1 Inleiding

In de voorgaande hoofdstukken werd aandacht besteed aan de effecten van lichaamsvreemde stoffen op samenstelling en functie van de corpusculaire component van het bloed. In dit hoofdstuk zal aandacht worden geschonken aan effecten van toxische stoffen op samenstelling en functie van het niet-corpusculaire deel van het bloed, het bloedplasma.

Bloedplasma bevat diverse eiwitten, vitaminen, mineralen en andere voedingsfactoren die een belangrijke rol spelen bij de hematopoïese, de bloedstolling, de afweer tegen infecties en vele andere processen in het lichaam (Hoofdstuk 3).

De effecten van lichaamsvreemde stoffen op plasmafactoren die niet betrokken zijn bij de bloedstolling komen in dit hoofdstuk aan de orde. In Hoofdstuk 8 zal de invloed van toxische stoffen op de bloedstolling worden behandeld.

7.2 Plasma-eiwitten

7.2.1 Enzymen en hormonen

Bloedplasma bevat veel verschillende eiwitten (Hoofdstuk 3). De huidige gevoelige bepalingsmethoden maken het mogelijk om de concentratie van de meeste van deze eiwitten in het plasma vrij nauwkeurig te bepalen, waardoor directe of indirecte effecten van toxische stoffen snel kunnen worden waargenomen.

Stijgingen van enzymactiviteiten in het plasma worden veelal veroorzaakt door beschadiging van weefsels of organen. Bekende enzymen die in het plasma aangetroffen kunnen worden zijn het aspartaat-aminotransferase (ASAT) en het alanine-aminotransferase (ALAT). Deze enzymen komen in het plasma doordat in het hart, de lever, de skeletspier of de nieren cellen beschadigd worden, waardoor de enzymen naar buiten 'lekker' en in het bloed terecht komen. Bij de mens wijst een toename van de ASAT-concentratie in het bloed (mits het ALAT-gehalte niet veranderd is) op een beschadiging van de hartspeer. Als zowel ASAT- als GPT-waarden in het bloed verhoogd zijn, is een beschadiging van de lever de meest waarschijnlijke oorzaak.

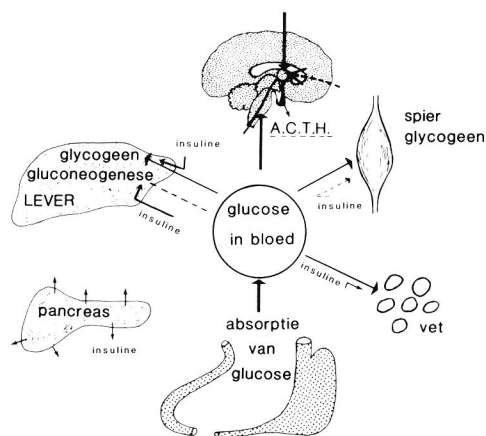
Een ander in het plasma voorkomend enzym, dat toxicologisch gezien van betekenis is, is het alkalische fosfatase (AF). Een afwijking in de activiteit van dit enzym wijst op leverbeschadiging of op botafwijkingen. Als behalve van het AF ook de activiteit van het γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) in het plasma is verhoogd, is er sprake van leverbeschadiging, terwijl er bij een onveranderd γ -GT en een verhoogde AF sprake kan zijn van een botafwijking (meestal veroorzaakt door een tumor). Bij de rat speelt AF een belangrijke rol bij het transport van vetten en calcium door de darmwand. Veranderingen in de activiteit van dit enzym wijzen bij de rat eerder op

veranderingen in het dieet of op een gestoorde darmfunctie dan op leverbeschadiging. Doordat dit enzym betrokken is bij de resorptie van voedsel in de darm, varieert de concentratie in het plasma sterk met de omstandigheden waaronder het bloed is verzameld. De AF-concentratie in het bloed van nuchtere dieren verschilt aanzienlijk van die van dieren die kort vóór de bloedafname gegeten hebben. Dit illustreert hoe belangrijk het is om bloed zo gestandaardiseerd mogelijk te verzamelen, wat wordt onderstreept door de waarneming dat de enzymactiviteit in het bloed sterk wordt beïnvloed door:

- het tijdstip van de dag waarop het bloed verzameld wordt;
- de manier van bloed verzamelen (zo is de ASAT-activiteit in oogpunctiebloed ongeveer tweemaal zo hoog als in decapitatiebloed, en bloed verzameld via de abdominale aorta heeft weer een andere enzymactiviteit);
- de methode die wordt gebruikt om de enzymactiviteit te bepalen.

Als de enzymbepalingen worden uitgevoerd onder gestandaardiseerde omstandigheden kunnen de resultaten een indicatie geven van een toxische werking van een lichaamsvreemde stof. Maar het is pas mogelijk om definitieve uitspraken hierover te doen nadat de resultaten van het klinisch-chemisch onderzoek gecorreleerd zijn met de overige toxicologische parameters. De interpretatie van de gevonden resultaten hangt bij voorbeeld nauw samen met de algehele lichamelijke toestand van het proefdier. Als blijkt dat de dieren sterk in gewicht zijn achtergebleven, wat o.a. kan optreden als de dieren het voer waaraan de teststof is toegevoegd niet lekker vinden, dan zullen de meeste klinisch-chemische parameters ernstige afwijkingen vertonen van de normaalwaarden. Hetzelfde wordt wel waargenomen bij dieren die lijden aan sterke uitdroging.

Hormonen spelen een essentiële rol bij vele fysiologische processen zoals het metabolisme van calcium en glucose, de zout- en waterhuishouding, de thermoregulatie, de spijsverteringsprocessen, de voortplanting en groei. In Figuur 39 is een voorbeeld



Figuur 39. Het metabolisme van glucose na een koolhydraatrijk dieet. Insuline stimuleert de synthese van vet en de vorming van glycogeen in lever en spier. Bovendien remt insuline de afbraak van glycogeen (gluconeogenese). Naar: P.C. Clegg en A.G. Clegg, 1969. *Hormones, cells and organisms*, Stanford University Press, California.

gegeven van de regulerende werking van hormonen op het glucosemetabolisme in het lichaam. Ontregeling van de hormonale huishouding heeft meestal ernstige gevolgen voor het voortbestaan van het organisme. Verandering van een hormoonspiegel in het bloed wordt zelden direct veroorzaakt door een lichaamsvreemde stof. Er is meestal sprake van:

- competitie van de toxische stof met het hormoon voor een bindingsplaats op het transporteiwit;
- een effect van de stof op het doelwitorgaan;
- een effect van de toxische stof op de vorming van het hormoon op centraal (hypothalamus-hypofyse) niveau.

In tegenstelling tot verschillende plasma-enzymen, worden hormonen hoogst zelden routinematig (als standaardparameter van een toxiciteitsonderzoek) bepaald en wel om de volgende redenen:

- hormoonbepalingen in plasma zijn relatief tijdrovend;
- hormoonspiegels in bloed vertonen in het algemeen grote verschillen tussen dag- en nachtwaarden;
- de hormoonconcentraties in het bloed van proefdieren worden beïnvloed door licht, manier van huisvesting, voeding en leeftijd, temperatuur en de mate van stress (lawaaï).

Het is daarom alleen mogelijk om betrouwbare, reproduceerbare waarden te krijgen als de hormoonbepalingen worden uitgevoerd in bloed dat gedurende een bepaalde periode van de dag verzameld is volgens een gestandaardiseerde (stressarme) procedure. De grote spreiding in de hormoonspiegels in het plasma maakt dat er niet volstaan kan worden met een eenmalige hormoonbepaling aan het einde van een toxiciteitsexperiment. Als er op verschillende tijdstippen gedurende een experiment hormoonbepalingen zijn gedaan, die in de proefgroepen consistent blijken af te wijken van die in de controlegroep, is er zeer waarschijnlijk sprake van een interferentie van een lichaamsvreemde stof met de hormonale huishouding.

Naast genoemde technische redenen maakt ook de moeilijke interpretatie van de waargenomen afwijkingen een routinematige bepaling van de hormoonconcentraties weinig aantrekkelijk, vooral als het erom gaat de relevantie voor de mens vast te stellen.

Door stress, levercirrhose, nierinsufficiëntie en cardiovasculaire afwijkingen veranderen de hormoonspiegels in het bloed ook zonder dat er sprake is van een toxisch effect van een lichaamsvreemde stof op een endocrien gereguleerd orgaan.

Hoe groot de interpretatieproblemen kunnen zijn toont het volgende voorbeeld: de hoeveelheid schildklierhormoon in het serum is een maat voor de schildklierfunctie. Bij de rat is dit hormoon echter aan een ander transporteiwit gebonden dan bij de mens. De rat is dus eigenlijk geen geschikt proefdier in dit geval. De hond zou een beter model zijn, omdat bij dit proefdier het schildklierhormoon wel aan hetzelfde transporteiwit is gebonden als bij de mens. Bij dit proefdier komt een verminderde schildklieractiviteit (hypothyroïdie) echter zelden voor, terwijl dit bij de mens juist een frequent waargenomen effect van lichaamsvreemde stoffen op de schildklier is. Dit maakt ook de hond ongeschikt als proefdier voor dergelijk onderzoek.

In de praktijk blijkt echter dat het toxicologisch routineonderzoek veelal voldoende aanwijzingen oplevert over een mogelijk effect van een lichaamsvreemde stof op de hormonale huishouding in het lichaam.

Enkele voorbeelden kunnen dit verduidelijken:

- Als het toxicologisch onderzoek veranderingen aantoonde in de concentraties glucose, vrij vetzuur en cholesterol in het bloed, is dit een aanwijzing dat de onderzochte stof interfereert met groeihormoon, prolactine of schildklierstimulerend hormoon.
- Veranderingen in elektrolytenconcentraties (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) in plasma of urine en afwijkingen in waterverbruik of groei duiden op een mogelijke interactie van de lichaamsvreemde stof met aldosteron of paraathormoon.
- Als een lichaamsvreemde stof interfereert met de werking van de bijniere, gaat dat meestal gepaard met een afname van het lichaamsgewicht, een toename van het aantal granulocyten, een ontregeling van de elektrolytenbalans, thymusatrofie en daarmee gepaard gaande een afname van het aantal lymfocyten en een verhoogde kans op infecties.
- Effecten op de schildklierfunctie kunnen bij de rat eenvoudig worden herkend door een toename van de voedselconsumptie, die gepaard gaat met een afname van het lichaamsgewicht.

De resultaten van het toxicologisch routineonderzoek leveren meestal geen inzicht in het werkingsmechanisme. Als er aanwijzingen worden gevonden voor een mogelijk hormonaal effect van een stof, dan zal aanvullend onderzoek noodzakelijk zijn om het mechanisme op te helderen. In de meeste gevallen zal dan volstaan kunnen worden met enkele uitgebalanceerde experimenten met een beperkt aantal proefdieren.

7.2.2 *Transporteiwitten*

Veel lichaamseigen en lichaamsvreemde stoffen zijn in het bloed gebonden aan transporteiwitten. Dit is met name het geval voor slecht in water oplosbare stoffen, die zonder binding aan een eiwit nauwelijks door het lichaam vervoerd zouden kunnen worden.

De belangrijkste transporteiwitten die in het bloed voorkomen zijn: albumine, sommige globulinen en glycoproteïnen. Albumine bindt verreweg de meeste stoffen; naast vetzuren en bilirubine bindt dit eiwit ook metalen, kleurstoffen en diverse lichaamsvreemde stoffen (waaronder geneesmiddelen). Specifieke metaalbindende eiwitten zijn het ceruloplasmine (koper) en het transferrine, ferritine en hemoglobine (ijzer).

Veel geneesmiddelen zijn voor het vervoer door het lichaam afhankelijk van plasma-eiwitten. Het complex van eiwit-geneesmiddel vervult een dubbele rol: het fungeert als transportsysteem en tevens als depot. Via het transporteiwit wordt het geneesmiddel naar zijn specifieke werkingsplaats vervoerd wat vooral voor slecht in water oplosbare geneesmiddelen van essentieel belang is. Zo'n geneesmiddel-eiwitcomplex gedraagt zich als een eiwit waardoor het de bloedbaan niet kan verlaten. Omdat in het algemeen alleen het vrije (niet aan eiwit gebonden) geneesmiddel therapeutisch werkzaam is, fungeert de hoeveelheid aan eiwit gebonden geneesmiddel als depot. De concentratie vrij (werkzaam) geneesmiddel in het bloed is zelden erg hoog. Bovendien verlengt de eiwitbinding de tijdsduur dat een geneesmiddel in het lichaam aanwezig is aanzienlijk, wat mede bepalend is voor de effectiviteit en de toxiciteit.

Er is nog weinig bekend over de interactie tussen toxische stoffen en plasma-eiwitten. Weliswaar is de kennis over de affiniteit van lichaamsvreemde stoffen voor bepaalde bindingsplaatsen en over competitiefenomenen de laatste jaren sterk toegenomen, zeker ten aanzien van geneesmiddelen. Desondanks is er nog nauwelijks iets bekend over de effecten van toxische stoffen op deze processen.

Hoe lichaamsvreemde stoffen de werking van de transporteiwitten nadelig kunnen beïnvloeden kan worden geïllustreerd aan de hand van albumine:

- Lichaamsvreemde en lichaamseigen (endogene) stoffen worden op enkele specifieke plaatsen aan albumine gebonden. Het aantal bindingsplaatsen is beperkt. Daardoor kan er competitie ontstaan tussen lichaamsvreemde stoffen onderling en tussen lichaamsvreemde stof en endogene stof voor bepaalde bindingsplaatsen op het eiwit. Als een geneesmiddel verdrongen wordt uit het bindingscomplex met het transporteiwit, wordt de concentratie vrij (therapeutisch werkzaam) geneesmiddel in het bloed hoger, wat ongewenste effecten kan veroorzaken. Bovendien zal de eliminatie van de lichaamsvreemde stof, via metabolisme of uitscheiding, versneld plaats vinden. Aspirine bij voorbeeld, bevat een acetylgroep die covalent kan binden aan een lysineresidu van het albumine. Daardoor verandert de configuratie van het albumine, en zijn bepaalde bindingsplaatsen niet meer bereikbaar voor andere stoffen. Dit soort interacties tussen lichaamsvreemde stof en transporteiwit kan van belang zijn bij gebruik van een aantal verschillende geneesmiddelen door dezelfde persoon. Bij een roker of alcoholgebruiker kan dit soort interacties ernstige vormen aannemen omdat zowel sigarettenrook als alcohol de concentraties van een aantal transporteiwitten in het bloed veranderen.
- Competitie voor een bindingsplaats op een transporteiwit kan ook optreden tussen een lichaamsvreemde stof en een endogene stof. Bilirubine bij voorbeeld, bindt sterk, maar reversibel, aan albumine. Ongebonden bilirubine dringt vrij snel het centraal zenuwstelsel binnen en kan ernstige hersenbeschadiging veroorzaken, vooral bij pasgeborenen. Diverse geneesmiddelen kunnen het bilirubine verdringen van de bindingsplaats op het albumine met genoemd gevolg.
- Bepaalde ziekten hebben invloed op de binding van lichaamsvreemde stoffen aan plasma-eiwitten. Albumine afkomstig van patiënten met een nierinsufficiëntie, heeft een lagere affiniteit voor een aantal geneesmiddelen dan het albumine van gezonde individuen. Dit verschijnsel kan als volgt worden verklaard: door de nierinsufficiëntie worden de concentraties van endogene stoffen in het bloed hoger dan normaal, waardoor er meer bindingsplaatsen op het albumine bezet zijn; er hopen zich niet-fysiologische stoffen op in het bloed, zoals organische zuren of toxische metabolieten van geneesmiddelen. Bovendien kan er een tekort aan albumine ontstaan zoals bij het nefrotisch syndroom (een afwijking die wordt gekenmerkt door een hoog eiwitverlies). Leverbeschadiging, zoals ten gevolge van overmatig alcoholgebruik, gaat vaak gepaard met een verminderde albuminesynthese en daardoor met een daling van de concentratie hiervan in het bloed.

Hieruit blijkt dat toxische stoffen die een beschadiging van de nieren of de lever veroorzaken, indirect verantwoordelijk kunnen zijn voor een ernstige verandering van de eiwitbindende capaciteit van het bloed.

7.3 Nutriëntensamenstelling

In Hoofdstuk 1 is als één van de belangrijkste functies van bloed genoemd het transport van diverse stoffen (voedingsstoffen, afvalstoffen, zuurstof, etc.) van de plaats van opname of vorming naar de plaats van werking of uitscheiding. In deze paragraaf zullen de effecten die lichaamsvreemde stoffen kunnen hebben op de concentraties van voedingsstoffen in het bloed, worden besproken. Alleen die voedingsfactoren die van belang zijn voor een adequate hematopoïese zullen aan bod komen.

De term nutritionele anemie wordt gebruikt om aan te duiden dat bepaalde typen anemie samenhangen met de voedingstoestand van een individu. Elke nutritionele anemie hangt samen met een of meer van de volgende oorzaken:

- onvoldoende voeding;
- onvoldoende opname of beschikbaarheid van een voedingscomponent;
- toegenomen behoefte waar niet aan wordt voldaan;
- toegenomen excretie of metabole afbraak van de voedingscomponent.

7.3.1 Vitaminen

In de geïndustrialiseerde landen komen avitaminosen (ernstige tekorten aan bepaalde vitamines) nog maar zelden voor. Alleen bij zieken en bejaarden worden nog wel hypovitaminosen waargenomen. Die blijken dan vaak terug te voeren op het gebruik van geneesmiddelen, al dan niet in combinatie met een eenzijdige, onvolwaardige voeding.

Een aantal vitamines (B_6 , B_{12} , foliumzuur en riboflavine) speelt een essentiële rol bij de vorming van erythrocyten uit stamcellen in het beenmerg. Een tekort aan deze vitamines veroorzaakt dan ook anemie.

Lichaamsvreemde stoffen kunnen bepaalde vitaminetekorten veroorzaken door interferentie met de opname in de darm of met de binding aan het transporteiwit. Het is overigens pas bewezen dat een toxische stof verantwoordelijk is voor het ontstaan van een anemie als beëindiging van de blootstelling aan de toxische stof tot gevolg heeft dat de anemie verdwijnt en toediening van de voedingsfactor in kwestie de anemie opheft.

Het vitamine B_6 speelt als pyridoxaalfosfaat een essentiële rol bij de vorming van de hemoglobineprecursor δ -aminolevulinezuur (ALA, Figuur 11). Een tekort aan ALA komt zelden voor, maar kan door verschillende geneesmiddelen geïnduceerd worden. Voorbeelden daarvan zijn bloeddrukverlagende middelen (o.a. hydralazine), chelerende stoffen (zoals penicillamine), geneesmiddelen tegen de ziekte van Parkinson (L-DOPA), diverse contraceptiva en geneesmiddelen tegen TBC (o.a. cycloserine).

Een interessant fenomeen wordt waargenomen met de kleurstof ammoniacaramel, die veel wordt toegepast bij de produktie van alcoholica (met name bier), frisdranken, suikergoed, sauzen en kant-en-klare levensmiddelen. Toediening van deze stof aan proefdieren veroorzaakt een acute daling van het aantal lymfocyten in het bloed en in een later stadium tevens van de vitamine- B_6 -concentratie in het plasma. Jarelang onderzoek heeft tenslotte geleid tot opheldering van de chemische verbinding die verantwoordelijk is voor dit effect, maar over het mechanisme tast men nog in

het duister. Het is bovendien onduidelijk welk verband er bestaat tussen daling van het aantal lymfocyten in het bloed en de afname van de concentratie van vitamine B₆.

Bij een ernstige vitamine-B₂-deficiëntie ontstaat een sterke erythrocytendepletie in het beenmerg: een aplastische anemie. Dit wordt zeer waarschijnlijk veroorzaakt door een effect op de produktie van het hormoon erythropoietine door de nieren. Een gebrek aan vitamine B₂ kan worden veroorzaakt door boorzuur. Vitamine B₂ is in het bloed gebonden aan albumine, maar kan daarvan verdrongen worden door boorzuur, waardoor een overmatige uitscheiding van dit vitamine ontstaat in urine en faeces, met als gevolg een tekort in het lichaam.

Vitamine K speelt een belangrijke rol bij de bloedstolling. Effecten van lichaamsvreemde stoffen op deze stollingsfactor worden behandeld in Hoofdstuk 8.

Er zijn enkele geneesmiddelen bekend die de absorptie of het metabolisme van vitamine D beïnvloeden. Daartoe behoren laxeremiddelen, middelen tegen epilepsie en kalmeringsmiddelen. Vitamine D heeft een functie bij de calciumhuishouding in het lichaam. Een tekort leidt tot een daling van de calcium- en fosfaatconcentratie in het plasma en een stijging van de alkalische-fosfatase-activiteit in het bloed.

7.3.2 Mineralen

De mineralen ijzer, zink en magnesium zijn essentiële spooorelementen. Diverse geneesmiddelen beïnvloeden de absorptie of excretie van deze mineralen zodanig dat er een tekort in het lichaam ontstaat. IJzer is een essentieel onderdeel van het hemoglobine. Antagonisten van vitamine B₆ interfereren op de een of andere manier met de inbouw van het ijzer in het protoporfyrine, wat tot anemie kan leiden.

Figuur 40 geeft een overzicht van de gevolgen die een sterke daling van de zinkconcentratie in het bloed kan hebben op een aantal ingewikkelde biochemische processen die in het lichaam plaatsvinden, en geeft tevens aan welke centrale rol het bloed hierbij vervult.

7.4 Water- en zouthuishouding

De water- en zouthuishouding vervult een belangrijke rol bij de homeostase van organismen. De opname van water via het maagdarmkanaal en de water- en zoutuitscheiding in de nieren (en via het darmkanaal) zijn de voornaamste hierbij betrokken processen. Toxische beïnvloeding van deze processen op het niveau van maagdarmkanaal en nieren kan op vele manieren plaatsvinden, maar dat onderwerp valt buiten het kader van dit boek. De consequenties van deze toxische stoffen voor de samenstelling van plasma en het functioneren van het orgaan bloed komen in deze paragraaf wel aan bod.

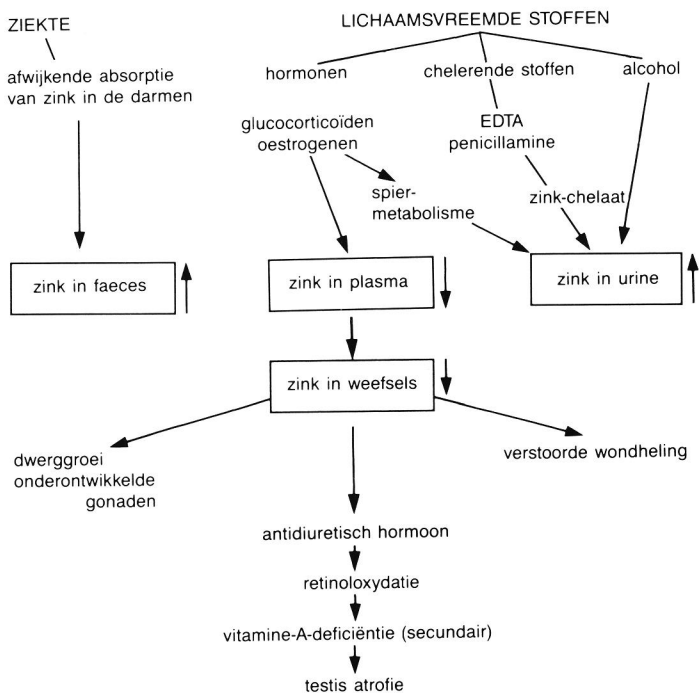
Bijna alle celmembranen zijn permeabel voor water. Dit betekent dat alle waterbewegingen in een organisme een gevolg zijn van verschillen in osmolariteit van de verschillende vloeistofcompartimenten (intracellulair, extracellulair, transcellulair). Deze waterbewegingen zullen 'erop gericht zijn' eventuele verschillen in osmolariteit op te heffen. In een evenwichtstoestand is de osmolariteit dus bijna overal in het lichaam gelijk (uitzonderingen zijn bij voorbeeld de nieren, de urineblaas en de longen).

Een tekort aan water in het organisme kan een gevolg zijn van een verminderde opname of een te grote uitscheiding van water. Veel lichaamsvreemde verbindingen kunnen de waterbalans beïnvloeden (o.a. diuretica). Een te grote opname van water of een overmatig eiwitverlies kan leiden tot oedeem.

In de extracellulaire vloeistof (interstitiële vloeistof en bloedplasma) wordt meer dan 90% van de osmolariteit veroorzaakt door natriumzouten. Intracellulair is de K^+ -concentratie belangrijker; er zijn echter grote verschillen in de te onderscheiden celorganellen. De verdeling van ionen over de compartimenten van het lichaam wordt in stand gehouden door veel processen. Vele ervan betreffen actief transport maar ook passieve diffusie over elektrochemische gradiënten speelt een rol. Verstoringen hiervan door lichaamsvreemde stoffen veroorzaken o.a. veranderingen in de zenuwgeleiding (Hoofdstuk 3.2).

Wanneer er via het maagdarmkanaal vloeistofverlies optreedt, uit zich dit in een waterige ontlasting (diarree). Hierbij verliest het lichaam zowel water als zouten in isotone verhoudingen. Een aantal bacteriële toxinen kunnen diarree veroorzaken. Een klassiek voorbeeld is choleratoxine, maar ook sommige *Salmonella*-infecties hebben diarree tot gevolg.

Verlies van water en zouten leidt tot vermindering van het plasmavolume en dus tot een relatieve toename van de celconcentratie in bloed (hemoconcentratie). Dit heeft gevolgen voor de water- en zoutconcentratie in andere delen van het lichaam. Ook zal het bloed minder vloeibaar zijn en dit kan de bloedstolling nadelig beïnvloeden (Hoofdstuk 8).



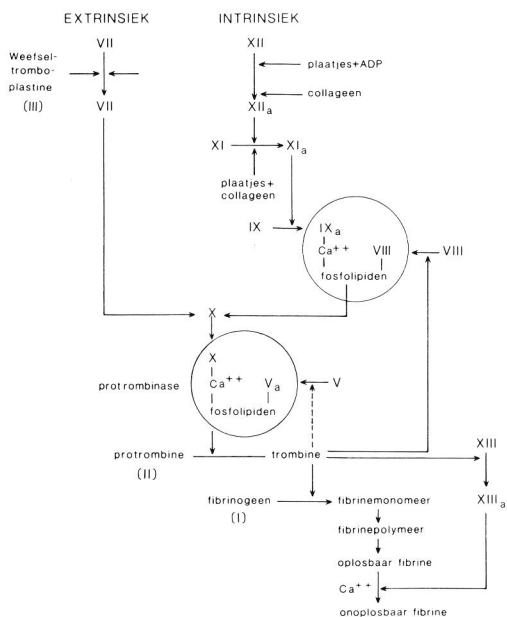
Figuur 40. Oorzaken en gevolgen van een te geringe hoeveelheid zink in het lichaam.

8 Toxicologie van de bloedstelping

8.1 Inleiding

Beschadiging van een bloedvat zal leiden tot bloedverlies; een deel van het bloed treedt dan buiten de bloedbaan. In ernstige gevallen zal dit leiden tot het verlies van alle functies van bloed in de homeostase. Het zuurstoftransport komt in gevaar, evenals de vocht- en zoutbalans, de thermoregulatie, etc.

Om bloedingen zo veel mogelijk tegen te gaan zal bij beschadiging van een bloedvat het proces van de bloedstelping (hemostase) in werking treden. Hierbij verliest het bloed plaatselijk zijn vloeibaarheid. Er is dus een subtiel evenwicht tussen vloeibaarheid en stolling van bloed. Zo nodig slaat de balans door naar de vaste toestand, maar het is wél van belang dat dit slechts dáár gebeurt waar het nodig is.



Figuur 41. Schema van de bloedstolling. Via een cascade van factoren die kunnen overgaan van een inactieve in een actieve vorm (a), en die in de actieve vorm weer volgende factoren kunnen activeren, wordt uiteindelijk fibrinogeen omgezet in onoplosbaar fibrine. Het systeem kan gestart worden door beschadiging van de vaatwand (de extrinsieke weg), maar ook zonder dat beschadigd weefsel een rol speelt (de intrinsieke weg). Beide wegen leiden tot activatie van factor X.

Tabel 13 Nummer en naam van de stollingsfactoren.

Nummer	Naam
I	fibrinogeen
II	protrombine
III	weefseltromboplastine
IV	calcium-ionen
V	proaccelerine
VII	proconvertine
VIII	anti-hemofiliefactor
IX	Christmas-factor
X	Stuart-factor
XI	plasma-tromboplastine-antecedent (PTA)
XII	Hageman-factor
XIII	fibrine-stabiliserende factor (FSF)

Voor een goed verloop van het bloedstelpingsproces zijn bloedplaatjes (trombocyten) en een groot aantal stollingsfactoren nodig. In Hoofdstuk 3 is reeds kort ingegaan op de rol van bloedplaatjes en stollingsfactoren. Figuur 41 geeft weer hoe in een aaneenschakeling van reacties deze factoren bij het proces zijn betrokken (Tabel 13). De meeste stollingsfactoren zijn eiwitten of eiwit-fosfolipide-complexen. Daarnaast zijn calciumionen van belang. Het eindresultaat is de vorming van een plaatjes-aggregaat, dat dan verstevigd wordt met een fibrinenetwerk.

Toxische beïnvloeding van het bloedstelpingssysteem kan plaatsvinden door interferentie met één of meer van de volgende processen: de vorming van plaatjes in het beenmerg, het functioneren van plaatjes en de aanmaak en het functioneren van stollingsfactoren.

Op de plaatjesvorming is reeds ingegaan in Hoofdstuk 2. Daar werd besproken dat de trombocytenvorming uit stamcellen via een aantal stadia verloopt. Als dit proces beïnvloed wordt, zal het aantal circulerende trombocyten veranderen (Hoofdstuk 4). Dit resulteert in een minder goed verlopende bloedstelping.

8.2 Bloedstelpingstesten

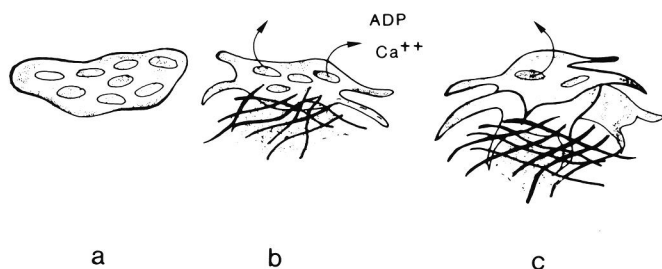
Met een aantal toetsen kan het functioneren van het hemostase-systeem worden onderzocht. Hiermee kan dus ook het effect van lichaamsvreemde stoffen op de bloedstelping worden bepaald. Tot deze toetsen behoren o.a. het bepalen van de bloedingsstijd na het aanbrengen van een wond in de huid, het bepalen van de samenklontering van bloedplaatjes in vitro en het bepalen van de stollingstijd in vitro, zoals de protrombintijd, de trombinetijd, enz. Bij deze laatste toetsen worden alle noodzakelijke componenten, die voor stolling nodig zijn, minus één, samengevoegd. Na toevoeging van de ontbrekende factor wordt de tijd bepaald, waarin een stolsel wordt gevormd. Zo kan de activiteit van de betrokken factor worden gemeten, evenals het effect van een lichaamsvreemde verbinding hierop.

8.3 Functioneren van plaatjes

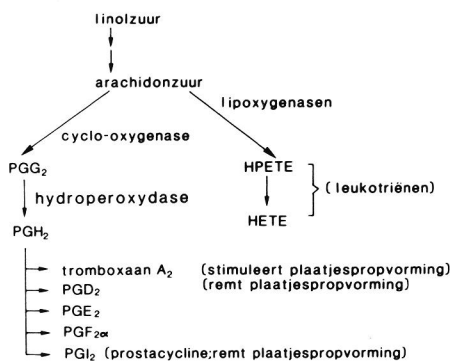
Bij een vaatwandbeschadiging komen collageenvezels en andere onder het endoteel liggende structuren in contact met het bloed. De plaatjes verkleven aan de collageenvezels en daarna ook aan elkaar en veranderen van vorm. Bovendien ledigen ze hun granula, waardoor het hierin aanwezige ADP vrijkomt. Dit bevordert de samenklontering van meer plaatjes, die op hun beurt ook weer ADP uitstoten, enzovoort (Figuur 42). De zo ontstane bloedplaatjesprop kan het gat in de vaatwand afdichten. Deze prop wordt vervolgens verder verstevigd door een fibrinenetwerk.

De uitstoot van de plaatjesgranula wordt o.a. beïnvloed door een aantal prostaglandines en verwante verbindingen. Deze stoffen kunnen in de plaatjes en in de bloedvatwand gesynthetiseerd worden uit linolzuur. De voor het stollingsproces belangrijkste prostaglandines zijn: PGG_2 , PGH_2 , tromboxaan A_2 , PGD_2 en prostacycline (Figuur 43). PGG_2 en PGH_2 kunnen in de plaatjes worden omgezet in tromboxaan A_2 , een krachtige stimulator van de granula-uitstoot en de plaatjesverkleving. Ook kunnen PGG_2 en PGH_2 worden omgezet in PGD_2 , een remmer van de aggregatie. In de bloedvatwand wordt prostacycline gevormd, een nog krachtiger remmer van de plaatjesverkleving. PGD_2 en prostacycline spelen hierdoor een rol bij het beëindigen en begrenzen van de propvorming. Uit arachidonzuur (Figuur 43) kan in bloedplaatjes o.i.v. lipoxygenasen ook een andere groep verbindingen ontstaan: de leukotriënen. Via een hydroperoxyvetzuur (HPETE) kan een hydroxyvetzuur (HETE) gevormd worden. HETE zou een eenmaal gestarte plaatjesverkleving irreversibel maken en helpt zo mee het aggregatieproces voortgang te doen vinden.

Stoffen die het prostaglandine-metabolisme beïnvloeden kunnen het stollingsproces verstoren. Acetylsalicylzuur (aspirine) is een remmer van het enzym cyclooxygenase. Als gevolg van deze remming zal de produktie van tromboxaan A_2 geremd worden. Hierdoor wordt de plaatjesklontering en de uitstoot van granula vertraagd. Een gestoorde propvorming is het gevolg. Er zijn enkele andere geneesmiddelen bekend, die de plaatjesverkleving remmen en hierom gebruikt worden als antitrombosemiddelen (o.a. dipyridamol). Cadmium remt het prostaglandine-metabolisme eveneens.



Figuur 42. Schematische weergave van de bloedplaatjesverkleving. Bloedplaatjes zijn 'in rust' (a) min of meer schijfvormig en bevatten o.a. granula die ADP (adenosinedifosfaat) bevatten. Als plaatjes in contact komen met collageenvezels (b), dan hechten ze hieraan, veranderen van vorm en ledigen de granula. Het vrijgekomen ADP bevordert de verkleving (aggregatie) met andere bloedplaatjes (c), waardoor de plaatjesprop ontstaat.

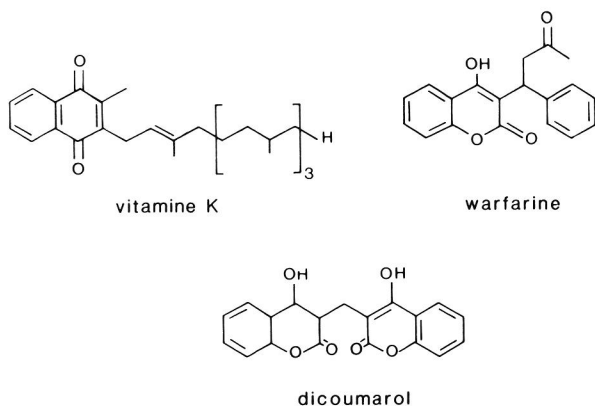


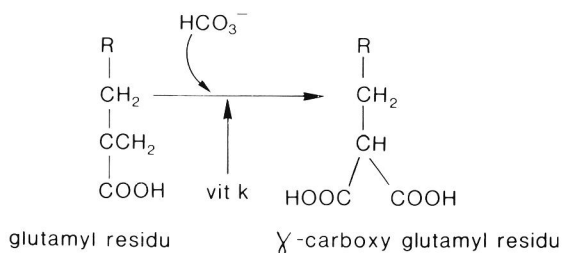
Figuur 43. Het metabolisme van prostaglandines en leukotriënen. Uit arachidonzuur kunnen onder invloed van het enzym cyclo-oxygenase de prostaglandines (PG's) gevormd worden. Voor de bloedstelping zijn PGG_2 , PGH_2 , tromboxaan A_2 , PGD_2 en PGI_2 (prostacycline) van belang. Ook kan uit arachidonzuur onder invloed van lipoxygenasen een aantal leukotriënen gevormd worden, waarvan HETE ook een rol speelt bij de plaatjesverkleaving.

8.4 Aanmaak en functioneren van stollingsfactoren

De meeste stollingsfactoren worden gevormd in de lever, enkele andere worden door endoteelcellen aangemaakt. Bij vier van de in de lever gesynthetiseerde factoren (prothrombine, VII, IX en X) is vitamine K nodig (Figuur 44). Bij een tekort aan dit vitamine hopen inactieve voorstadia van de stollingsfactoren zich op (zgn. PIVKA's = 'proteins induced in vitamin K absence'). Vitamine K is noodzakelijk bij de carboxylering van glutaminezuurresten in de PIVKA's (Figuur 45). De γ -carboxyglutaminezuurrestiden zijn essentieel voor de werking van deze factoren, omdat zij de binding aan fosfolipidenoppervlakken (o.a. de membranen van geactiveerde plaatjes) mogelijk maken.

Tekort aan vitamine K kan een gevolg zijn van een verminderde beschikbaarheid





Figuur 45. De carboxylering van glutaminezuurresten in voorstadia van enkele stollingsfactoren is een proces waarbij vitamine K noodzakelijk is.

in het voedsel, een verminderde opname of een verminderde werking ervan, bij voorbeeld door vitamine-K-antagonisten. Tot deze antagonisten behoren coumarine en een aantal derivaten hiervan. Deze stoffen lijken sterk op vitamine K en kunnen hierdoor de werking ervan antagoneren: ze nemen de plaats van vitamine K in zonder de werking over te nemen. Deze stoffen worden wel toegepast als antitrombosemiddelen, bijv. synton en warfarine. Coumarines, met name warfarine (Figuur 44), worden ook toegepast als rattengif. Aangezien de remming van de werking van vitamine K door warfarine op een competitief antagonisme berust, kan men vitamine K ook toepassen bij de behandeling van een acute intoxicatie met dit rattengif.

Enkele andere stoffen, waaronder cholestyramine, remmen de resorptie van vitamine K. Omdat vitamine K zeer goed in vet oplosbaar is, zullen stoornissen in vetresorptie aanleiding geven tot een vitamine-K-tekort.

Enkele schimmels, vooral enkele *Aspergillus*-soorten, produceren toxinen (mycotoxinen) die een verminderde concentratie van stollingsfactoren in het plasma veroorzaken. Ochratoxinen veroorzaken een daling van de fibrinogeenspiegels. Aflatoxinen hebben verminderde gehalten aan protrombine tot gevolg. Of hier sprake is van een verminderde aanmaak of van een versnelde afbraak is niet bekend.

Specifieke wegvang van stollingseiwitten zal de werking ervan verminderen. Trombine wordt weggevangen door antitrombine. Heparine kan antitrombine sterk activeren, waardoor deze stof goed gebruikt kan worden als antistollingsmiddel. Heparine is een polysaccharide met een molecuulgewicht van ca 20 000 en wordt geproduceerd door darmepiteelcellen. Stoffen die tweewaardige ionen binden (zgn. chelatoren) kunnen calciumionen wegvangen. Het gevolg is een gestoorde bloedstelping.

9 Toxicologie van het immuunsysteem

9.1 Inleiding

De laatste jaren is er een sterke toename te constateren in de belangstelling voor de effecten van toxische stoffen op het immuunsysteem, wat mede veroorzaakt wordt door de snelle ontwikkeling die de kennis van de immunologie doormaakt. Recente studies hebben bovendien onomstotelijk aangetoond dat diverse chemische verbindingen kunnen interfereren met de immuunrespons.

In dit hoofdstuk wordt de rol van bloed en bloedvormende organen in het immuunsysteem aangegeven. Er wordt een kort overzicht gegeven van de celtypen die betrokken zijn bij de afweerreacties van het lichaam. Vervolgens wordt een aantal methoden beschreven die in de immunotoxicologie worden toegepast om een effect van een toxische stof op het immuunsysteem te kunnen vaststellen en tenslotte worden enkele voorbeelden gegeven van stoffen met een immunotoxische werking.

9.2 Het immuunsysteem

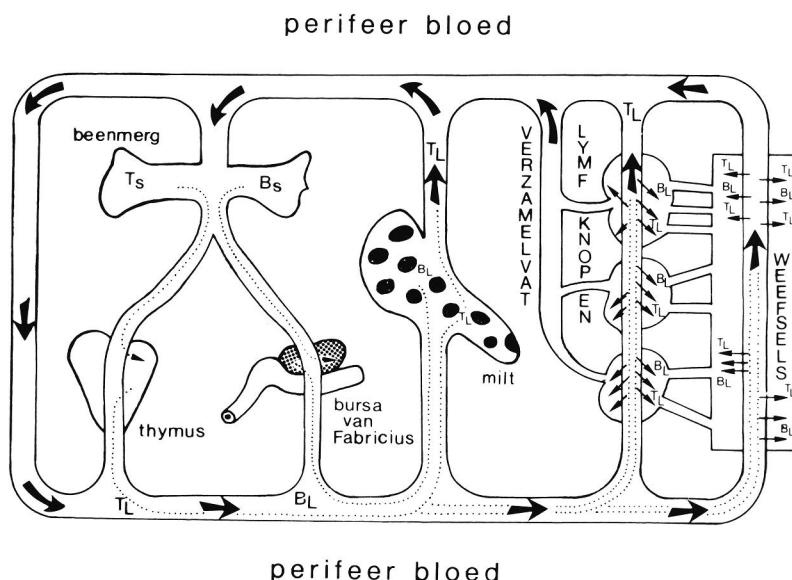
De in het bloed voorkomende lymfocyten (Hoofdstuk 2) vormen een onderdeel van het zogenaamde lymfoïde systeem. Dit systeem omvat de centrale lymfoïde organen:

- het beenmerg;
 - de thymus;
 - de bursa van Fabricius;
- en de perifere lymfoïde organen:
- de milt;
 - de lymfknoopen;
 - het lymfoïde weefsel langs de bronchiën en het spijsverteringskanaal.

Figuur 46 geeft schematisch de relaties tussen het bloed en de bloedvormende organen enerzijds en de lymfe en de lymfklieren anderzijds. Stamcellen afkomstig uit het beenmerg migreren via de bloedbaan naar de thymus (Ts) en naar de bursa van Fabricius (Bs), een bij vogels voorkomend orgaan waarin de B-lymfocyten gevormd worden; een dergelijk orgaan is bij zoogdieren nog niet gelokaliseerd (waarschijnlijk functioneert het beenmerg en de foetale lever als zodanig). In deze lymfoïde organen differentiëren de stamcellen tot respectievelijk T- en B-lymfocyten, die vandaar migreren naar het bloed, de milt, de lymfknoopen en de weefsels van het lichaam.

Een fundamentele eigenschap van het immuunsysteem is het opbouwen van een mechanisme om bepaalde antigenen waaraan het lichaam al eerder is blootgesteld te herkennen (via zgn. 'memory-lymfocyten') waardoor, bij een volgende blootstelling aan hetzelfde antigeen, de afweer sneller en efficiënter op gang kan komen.

De immunologische reactiemechanismen staan niet alleen in hun taak om het



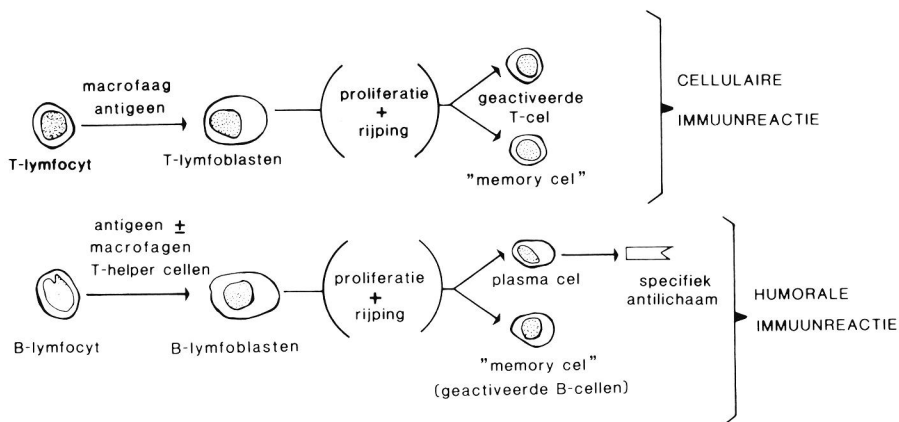
Figuur 46. Relatie tussen het bloed en de bloedvormende organen enerzijds en het lymfoïde systeem anderzijds. In het beenmerg gevormde stamcellen (T_s en B_s) migreren naar respectievelijk de thymus en de bursa van Fabricius (bij vogels) of het zoogdierequivalent. In deze organen worden stamcellen (T_s en B_s) tot respectievelijk T-lymfocyten (T_L) en B-lymfocyten (B_L) die via de bloedbaan in de milt, de lymfklieren en de weefsels en organen terecht komen.

lichaam te beschermen tegen een verstoring van de homeostase. Een van de meest algemene reacties op een verstoring van de homeostase van het lichaam is de ontstekingsreactie, die wordt gekenmerkt door het optreden van vasculaire veranderingen en door de aanwezigheid van ontstekingscellen zoals macrofagen en granulocyten (o.a. werkzaam bij fagocytose van bacteriën). Het afweermechanisme van het lichaam omvat verder nog het interferonsysteem als afweer tegen virussen en het complementsysteem.

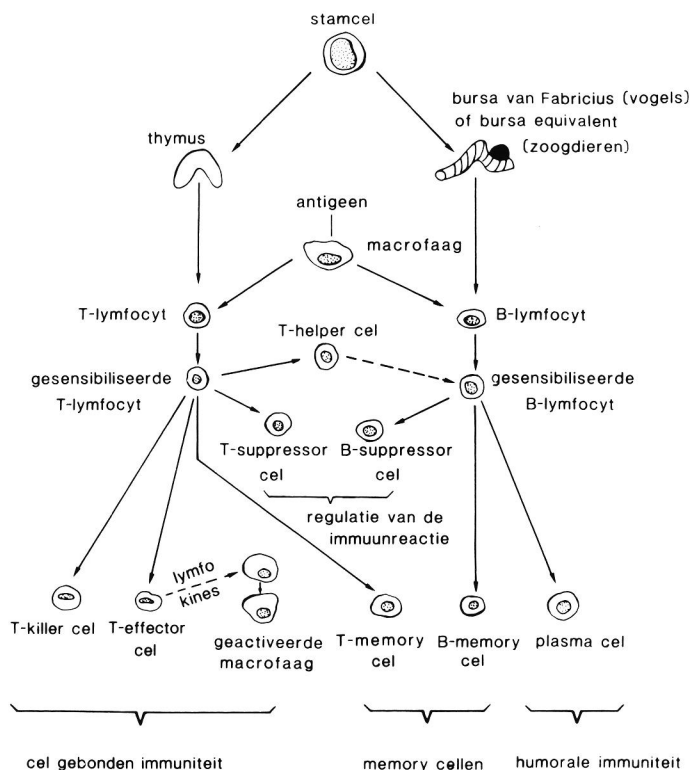
Het lichaam reageert op de blootstelling aan een antigeen (een stof die als lichaamsvreemd wordt herkend) met de vorming van specifieke antistoffen door B-lymfocyten (de humorale immuunreactie) of de vorming van bepaalde specifieke (gesensibiliseerde) T-lymfocyten, die de cellulaire immuniteit verzorgen (Figuur 47). De celgebonden immuniteit speelt een rol bij de afweer van het lichaam tegen verschillende schimmel- en bacterie-infecties, de vertraagd type overgevoelighedsreacties en de afweer tegen tumoren en lichaamsvreemde weefsels zoals transplantaten.

Deze tweedeling in de immunologische afweer, de celgebonden immuniteit en de humorale immuniteit, betekent niet dat deze onafhankelijk van elkaar werkzaam zijn. Voor de meeste antigenen geldt dat er een samenwerking tussen de twee afweersystemen moet zijn om een adequate afweer te bewerkstelligen.

De volgende cellen zijn betrokken bij de immunologische reacties (Figuur 48):



Figuur 47. Reacties van lymfocyten op antigenen. Gesensibiliseerde T-lymfocyten verzorgen de celgebonden immuniteit en de immunoglobulinen-producerende plasmacellen zijn betrokken bij de humorale immuniteit.



Figuur 48. Overzicht van de cellen die bij de immunologische reacties zijn betrokken. Zie voor de verklaring de tekst.

Macrofagen

Een zeer belangrijke functie van macrofagen is bescherming van het lichaam tegen micro-organismen door (niet-specifieke) fagocytose en afbraak door zgn. lysosomale enzymen. Daarnaast spelen deze cellen een essentiële rol bij de regulatie van de immuunreactie. Macrofagen kunnen antigeen op hun celmembraan binden door middel van diverse receptoren, waarna het antigeen ofwel als zodanig aan lymfocyten wordt aangeboden, ofwel na fagocytose een chemische verandering ondergaat waardoor het veel sterker immunogeen is geworden en een sterke stimulatie van lymfocyten veroorzaakt, een proces dat wordt aangeduid met antigeenactivatie.

Macrofagen kunnen worden 'geactiveerd' door zogenaamde lymfokines, stoffen die door gesensibiliseerde lymfocyten worden gevormd. De geactiveerde macrofagen vertonen een verhoogde activiteit tegen micro-organismen en tumorcellen.

T-lymfocyten

Stimulatie van T-lymfocyten geschiedt meestal na activatie van het antigeen door macrofagen. De gesensibiliseerde T-cellen kunnen werkzaam zijn als helpercellen, memory-cellen, effectorcellen, killercellen en suppressorcellen. Killercellen kunnen celdodend (cytotoxisch) zijn en spelen een sleutelrol bij de afstoting van tumorcellen en transplantaten. Effectorcellen produceren biologisch actieve producten (lymfokines), die macrofagen kunnen activeren. De helpercellen werken samen met B-cellen bij de vorming van antilichamen. De suppressorcellen onderdrukken de werking van de B-cellen. De helper- en suppressorcellen zijn essentieel voor de regulatie van zowel de humorale als de cellulaire immuunreactie. De T-cellen kunnen verder een specifieke celgebonden immuniteit ontwikkelen, wat wil zeggen dat de immuniteit via de cellen zelf overdraagbaar is. Het klassieke voorbeeld is de Mantoux-reactie, waarbij men na sensibilisatie met *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) met tuberculine een huidreactie van het vertraagde type kan opwekken.

B-lymfocyten (plasmacellen)

Na antigeenstimulatie zullen de B-lymfocyten die specifiek zijn voor dat bepaalde antigeen, gaan prolifereren en zich ontwikkelen tot plasmacellen, die antilichamen (immunoglobulinen) produceren of als memory-cellen gaan functioneren. De belangrijkste klassen immunoglobulinen (Ig) zijn: IgG, IgA, IgM en IgE. De immunoglobulinen vormen de basis voor de humorale immuniteit, zo genoemd omdat de immuniteit via het serum op een niet-immuun individu kan worden overgedragen. Antigeen kan na contact met het antilichaam door fagocyterende cellen worden opgenomen. Men spreekt in zo'n geval van opsonisering. De immunoglobulinen dragen ook op een indirecte wijze bij tot de immunologische afweer. Zo kunnen diverse cellen zoals macrofagen, basofiele granulocyten en mestcellen een cytotoxische werking bezitten, die celgebonden is en antistof-afhankelijk.

Naast de specifieke immuniteit wordt het lichaam beschermd tegen lichaamsvreemde organismen en partikels door een niet-specifieke afweer. Dit afweermechanisme omvat diverse cellen die bij de ontstekingsreactie zijn betrokken (granulocyten en mestcellen) en ook het complementsysteem.

Granulocyten

De neutrofiele granulocyten lijken wat hun werking betreft erg veel op macrofagen; ze zijn ook in staat tot fagocytose en intracellulaire afbraak via lysosomale ei-

witten. De basofiele granulocyten vervullen o.a. een functie bij bepaalde celgebonden immuunreacties in de huid. Ze bezitten granula die na stimulatie door bepaalde antistoffen (IgE, IgG) de cel verlaten (degranulatie), waardoor vasoactieve stoffen zoals histamine vrijkomen. Eosinofiele granulocyten komen in verhoogde aantallen voor in het bloed bij bepaalde T-cel afhankelijke immunologische reacties waarbij ook antigeen/antilichaam-complexen betrokken zijn.

Mestcellen

Mestcellen hebben veel gemeen met de basofiele granulocyten; ze zijn morfologisch moeilijk van elkaar te onderscheiden. Vermoedelijk hebben beide celtypen dezelfde stamcel en kunnen ze zich afhankelijk van de diersoort of de lokalisatie anders manifesteren. Deze gedachte wordt ondersteund door de waarneming dat cavia's erg veel basofiele granulocyten bezitten en nauwelijks mestcellen terwijl dit bij muizen precies andersom is. Beide typen cellen bezitten specifieke receptoren voor IgE op hun celmembraan. Gedurende het sensibilisatieproces binden antigeen-specifieke IgE-moleculen zich met de receptoren. Na contact met het antigeen vindt degranulatie van de mestcellen plaats. Degranulatie kan ook gestimuleerd worden door niet-immunologische prikkels. Bij de degranulatie komen vasoactieve stoffen vrij o.a. histamine, heparine en een stof die eosinofiele granulocyten aantrekt (een eosinofiele chemotactische factor). Onder bepaalde omstandigheden, zoals bij een worminfectie in de darm, neemt het aantal mestcellen in de darmwand toe.

Het complementsysteem

Het complementsysteem vormt ook een belangrijk onderdeel van het afweersysteem van het lichaam. De verschillende eiwitten van het complementsysteem zijn onder normale omstandigheden in inactieve vorm in het plasma aanwezig. Activatie van het complementsysteem vindt o.a. plaats door antigeen-antilichaamcomplexen (met name IgM en IgG zijn in staat tot complementactivatie) en leidt tot een cytotoxische reactie (cellulysis) als het antigeen een cel is. Complement kan lysis veroorzaken van erythrocyten, bloedplaatjes, bacteriën, virussen en lymfocyten doordat het complement zich hecht aan de lipidelaag van de celmembraan, waardoor de cel 'lek' raakt, opzwelt en uit elkaar barst.

9.3 Methoden voor detectie van een immunotoxisch effect

Stoffen die interfereren met het immuunsysteem veroorzaken de ernstigste effecten als een dier aan de stof wordt blootgesteld tijdens de ontwikkelingsfase van het lymfoïde systeem. Vandaar dat een nauwkeurig onderzoek van het lymfoïde systeem in een reproductie- en teratogeniteitsproef belangrijke aanwijzingen kan geven over een mogelijk immunotoxisch effect van een stof. In de praktijk wordt echter niet met elke stof dit soort onderzoek uitgevoerd. De resultaten van een sub-acute (28-dagen)-proef of een sub-chronische (90-dagen)-proef geven meestal toch voldoende aanwijzingen over een mogelijk immunotoxisch effect van een stof.

Door bepaling van parameters als groei, voedselopname, gewicht of histopathologie van milt, beenmerg, thymus en lymfknoopen (mesenteriale, mediastinale en cervicale), tellingen van de aantallen cellen in het perifere bloed en concentraties van IgG en IgM in het serum, kan vaak al vastgesteld worden of een stof met het immuun-

systeem interfereert. Een dergelijk effect kan direct zijn of indirect. Een indirect effect op het immuunsysteem wordt bij voorbeeld veroorzaakt door ondervoeding. Een interactie van een lichaamsvreemde stof met het endocriene systeem kan indirect leiden tot een veranderde immunrespons; het is bekend dat corticosteroiden de immunologische reacties beïnvloeden. Als tijdens het toxiciteitsonderzoek een effect wordt waargenomen op het immuunsysteem dat niet kan worden gerelateerd aan een indirect effect, dan is het gewenst om meer functioneel immunotoxisch onderzoek te doen, om het werkingsmechanisme vast te kunnen stellen.

Tabel 14 vat een aantal toetsen samen waarmee het mogelijk is om een effect van een stof op het immuunsysteem te karakteriseren. Voor de in de tabel genoemde 'miltkolonietoets' en de 'beenmergcelkolonietoets' wordt verwezen naar paragraaf 6.5.

Tabel 14 In vivo en in vitro functietoetsen van het immuunsysteem.

Celgebonden immuniteit

In vivo

- weerstandsvermogen tegen *Listeria monocytogenes*
- afstoting van huidtransplantaten
- vertraagd type overgevoeligheid tegen tuberculine

In vitro

- transformatie van lymfocyten door fytohemagglutine (PHA) en concanavaline A (Con A)

Humorale immuniteit

In vivo

- immunoglobulineconcentraties in het serum (IgA, IgG, IgM)
- thymus-afhankelijke antilichaamsynthese tegen het tetanustoxine
- thymus-onafhankelijke antilichaamsynthese tegen het lipopolysaccharide (LPS) van *E. coli*

In vitro

- transformatie van lymfocyten door lipopolysacchariden (LPS)

Macrofagen functietoetsen

In vivo

- 'clearance' van koolstofpartikels (fagocytose-capaciteit)
- 'clearance' van *Listeria monocytogenes* (fagocytose en doden)

In vitro

- bepaling van de fagocytose-activiteit

Beenmergstamcellen

In vivo

- bepaling van het aantal pluripotente stamcellen met de 'milt-kolonie-assay'

In vitro

- bepaling van het aantal vitale unipotente stamcellen via de 'beenmergcel-kolonie-assay'
-

9.4 Stoffen met een immunotoxische werking

9.4.1 Meervoudig gechloreerde bifenylen (PCB's)

De eerste aanwijzingen dat PCB's een effect zouden kunnen hebben op de immunrespons is afkomstig van routinematig toxicologisch onderzoek. De milten van kippen die PCB's via het voer kregen toegediend, waren erg klein en bovendien werd er atrofie van het lymfoïde weefsel waargenomen. Lymfoïde atrofie werd ook gevonden bij het konijn en de cavia. Konijnen die gedurende 38 dagen aan PCB's werden blootgesteld via de huid, vertoonden lymfopenie, atrofie van de thymuscortex en een afname van het aantal lymffollikels in de milt en de lymfknoopen. Toediening van PCB's aan muizen verminderde hun weerstandsvermogen tegen *Listeria monocytogenes* en cavia's die chronisch aan PCB's werden blootgesteld via het voer vertoonden een onderdrukking van de vertraagd type overgevoelighedsreacties tegen tuberculine. Al deze waarnemingen wijzen op een invloed van PCB's op de celgebonden immuniteit (Tabel 14). Bovendien is gebleken dat aan PCB's blootgestelde muizen gevoeliger zijn voor een endotoxineshock dan controledieren. Dit kan betekenen dat de werking van macrofagen onder invloed van PCB's is geremd omdat de detoxificatie van endotoxine primair verloopt via een macrofaag-afhankelijk proces.

Behalve de celgebonden immuniteit blijken PCB's ook de humorale immuniteit te beïnvloeden: langdurige blootstelling aan PCB's leidt tot een verminderde concentratie immunoglobulinen in het bloed en daardoor tot een verminderde weerstand tegen tetanustoxoid en een onderdrukking van de antilichaamrespons tegen schape-rode bloedcellen.

9.4.2 2,3,7,8-Tetrachloordibenzo-p-dioxine (TCDD)

De meeste laboratoriumdieren die aan subletale doses TCDD worden blootgesteld vertonen ernstige thymusatrofie, wat een indicatie is voor immuunsuppressie. De thymus van proefdieren die aan TCDD zijn blootgesteld wordt microscopisch gekenmerkt door een ernstige afname van het aantal lymfocyten in de cortex. Deze thymusatrofie blijkt niet veroorzaakt te worden door een indirect effect op bij voorbeeld de functie van de hypofyse of bijniere; de corticosteroidenconcentratie in het bloed van met TCDD behandelde cavia's is normaal en verder vertonen de dieren geen verminderde voedselopname, wat vaak aanleiding kan geven tot ernstige thymusatrofie. Het histopathologisch onderzoek wijst er dus op dat TCDD een direct effect heeft op de immunrespons. Met de in Tabel 14 genoemde functietoetsen is dit effect van TCDD nader bestudeerd.

Effecten van TCDD op de *celgebonden immuniteit* zijn bij diverse proefdieren aangetoond en worden gekenmerkt door:

- een onderdrukking van de vertraagd type overgevoelighedsreacties tegen tuberculine;
- een vertraagde afstoting van huidtransplantaten;
- een toename van de gevoeligheid voor een *Salmonella*-infectie;
- een verminderde stimulatie van lymfocyten door fytohemagglutinine (PHA) en concanavale A (ConA).

Effecten van TCDD op de *humorale immuniteit* worden pas gevonden bij proef-

dieren die aan relatief hoge concentraties worden blootgesteld en omvatten:

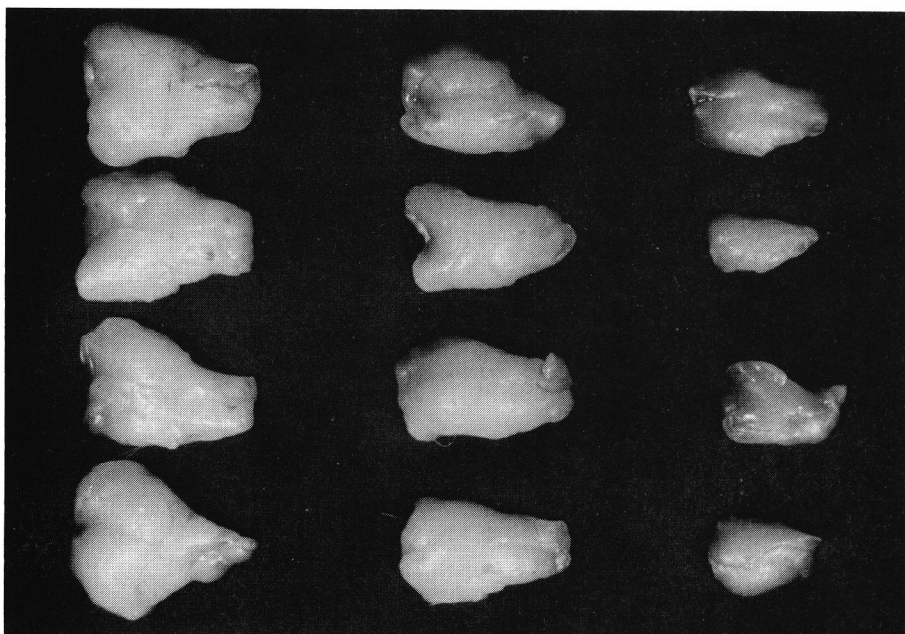
- een verlaging van de immunoglobulineconcentraties in het bloed;
- een vermindering van de antilichaamreactie op tetanustoxoïd;
- een onderdrukking van de T-cel-onafhankelijke antilichaamsynthese tegen lipopolysaccharide (LPS), een specifieke B-cel-activator.

Het weerstandsvermogen tegen infecties met diverse soorten micro-organismen, zowel endotoxine-producerende als niet-endotoxine-producerende, is afgenomen, maar deze effecten worden over het algemeen pas waargenomen bij relatief hoge TCDD-concentraties.

TCDD blijkt geen ernstig effect te hebben op het functioneren van macrofagen; de clearance van koolstofdeeltjes of van *Listeria monocytogenes* blijkt niet door TCDD beïnvloed.

Vrij recent zijn de effecten van TCDD bestudeerd in de 'miltkolonietoets' en de 'beenmergcelkolonietoets' (zie 6.5). Het aantal miltkolonies was door TCDD verminderd, evenals het aantal (door 'colony stimulating factor' geïnduceerde) beenmergcelkolonies. Beide effecten werden echter pas gevonden na blootstelling van de proefdieren aan (sub)letale doses TCDD.

De resultaten van de tot nu toe met TCDD uitgevoerde specifieke functietoetsen van het immuunsysteem duiden erop dat de onderdrukking van de immuunreactie, die door deze stof wordt veroorzaakt, waarschijnlijk terug te voeren is op een verminderde proliferatie en rijping van de thymocyt en dat het effect is gelokaliseerd in het thymusepiteel.



Figuur 49. Thymusatrofie bij ratten door de toediening van di-n-octyltinchloride via het voer. Links 0 ppm, midden 50 ppm en rechts 150 ppm. (H&E, $\times 60$).

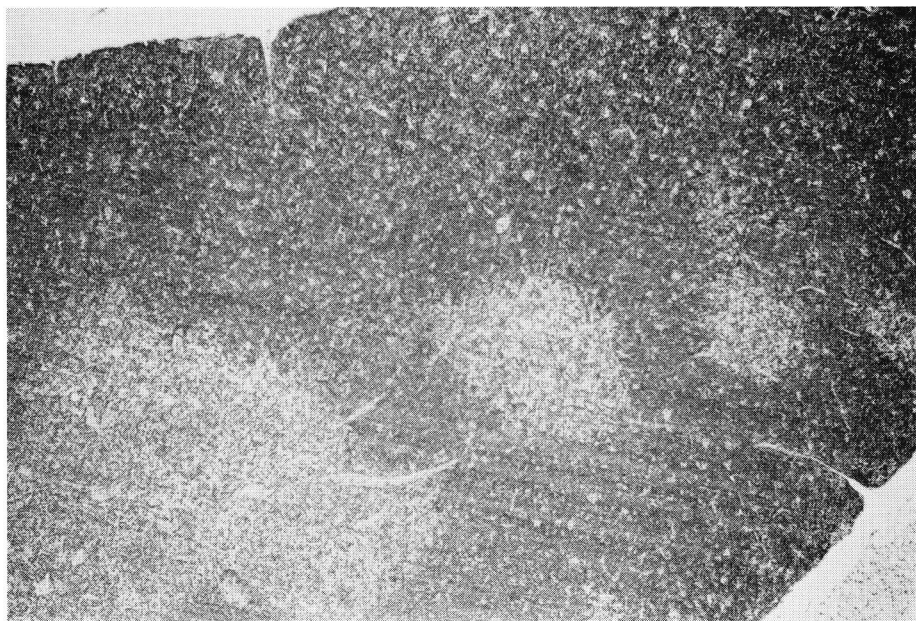
9.4.3 Organotinverbindingen

Dialkyltinverbindingen, zoals di-n-butyltin en di-n-octyltin, veroorzaken bij proefdieren een sterke afname van het gewicht van de thymus, de milt en de lymfknoepen. Thymusatrofie is het meest karakteristieke toxische effect van de dialkyltinverbindingen (Figuur 49). Histologisch blijkt de afname van het aantal lymfocyten hoofdzakelijk gelokaliseerd in de thymuscortex (Figuur 50); er zijn geen aanwijzingen voor destructie van lymfocyten zoals door stress of na behandeling met corticosteroiden kan optreden.

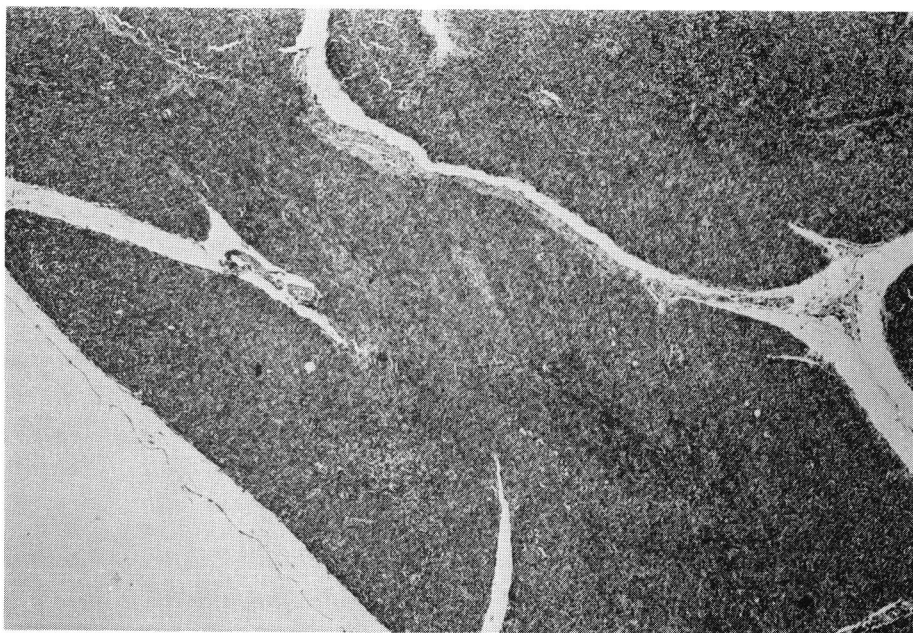
Om de waargenomen effecten van deze organotinverbindingen op de gewichten van de lymfoïde organen beter te karakteriseren zijn diverse immuunfunctietoetsen uitgevoerd. Deze experimenten tonen aan dat dialkyltinverbindingen voornamelijk de immuunreacties onderdrukken waarbij T-lymfocyten zijn betrokken, zonder dat de humorale immuniteit of het mononucleaire-fagocytenstelsel wordt beïnvloed. De onderdrukking van de celgebonden immuunfunctie uit zich door een effect van deze verbindingen op:

- de overgevoelighedsreactie tegen tuberculine;
- de afstoting van huidtransplantaten;
- het weerstandsvermogen tegen bacteriële infecties;
- de transformatie van lymfocyten door PHA.

Het belangrijkste immunotoxische effect van de dialkyltinverbindingen blijkt gelokaliseerd in de thymus. Het ontbreken van duidelijke aanwijzingen voor destructie



Figuur 50a. Gedeelte van de thymus van een controlerat waarin de cortex (donkere gebied) goed ontwikkeld is en duidelijk te onderscheiden van de medulla (lichte gebieden).



Figuur 50b. Gedeelte van een thymus van een rat die gedurende 6 weken via het voer 150 ppm di-n-octyltinchloride toegediend heeft gekregen. Het aantal lymfocyten in de cortex is sterk verminderd. Bij deze vergroting is de cortex niet meer te onderscheiden van de medulla (vgl. met Figuur 50a).

van lymfocyten in de atrofische thymus heeft geleid tot de hypothese dat de dialkyltinverbindingen mogelijk de proliferatie en rijping remmen van stamcellen afkomstig uit het beenmerg die zich onder normale omstandigheden in de cortex van de thymus ontwikkelen tot immuuncompetente T-cellen. Dit leidt dan tot een afname van het aantal rijpe T-cellen die vanuit de thymus naar de perifere lymfknoopen migreren, wat resulteert in depletie van lymfocyten in de T-cel-afhankelijke gebieden in de milt en lymfknoopen met als gevolg een verminderde van T-cel-afhankelijke immuunfunctie. Dialkyltinverbindingen beïnvloeden noch het aantal beenmergcellen, noch de mitotische activiteit daarvan. De stoffen hebben geen effect op het aantal pluripotente stamcellen in de 'miltkolonietoets'; het aantal miltkolonies in met dialkyltin behandelde proefdieren is gelijk aan het aantal kolonies in de controledieren. De levensvatbaarheid (viabiliteit) en het aantal T-lymfocyten is in deze dieren echter wel verminderd. Deze waarnemingen wijzen erop dat er wel voldoende stamcellen worden gevormd in het beenmerg, maar dat de ontwikkeling van de T-lymfocyten in de thymus door de aanwezigheid van dialkyltinverbindingen ontregeld is. De afwezigheid van duidelijke verschijnselen van celdestructie wijst bovendien eerder in de richting van een cytostatisch dan van een cytotoxisch effect.

9.5 Slot

Er zijn momenteel voldoende aanwijzingen dat bepaalde chemische stoffen kunnen interfereren met de immuunreactie. Het onderzoek naar de immunotoxiciteit van lichaamsvreemde stoffen staat nog in de kinderschoenen. Er wordt nog steeds onderzoek gedaan naar de beste en gevoeligste methoden om een mogelijk immunotoxisch effect van een stof op te kunnen sporen. In dit hoofdstuk is slechts een globaal overzicht gegeven van deze tak van de toxicologie. Er is getracht om de samenhang aan te geven tussen het bloed en de bloedvormende organen enerzijds en het lymfoïde systeem anderzijds zonder daarbij te streven naar volledigheid.

Literatuur

Hoofdstuk 1

- Irons, R.D., (Editor), 1985. Toxicology of the blood and the bone marrow, Raven Press, New York, p. 179.
- Lucier, G.W. en G.E.R. Hook, 1981. Conference on target organ toxicity: blood. Proceedings of a conference co-sponsored by the National Institute of Environmental Health Sciences and the Society of Toxicology, Arlington, Virginia, February 27–28, 1980. Environmental Health Perspectives 39: 157.
- Smith, R.P., 1980. Toxic responses of the blood. In: J. Doull, C.D. Klaassen en M.O. Amdur (Editors): Caserett and Doull's Toxicology, the basic science of poisons, 2nd edition, Macmillan Publishing Co., New York, p. 311–331.

Hoofdstuk 2

- Altman, P.L., 1961. Blood and other body fluids. In: D.S. Dittmer (Editor): Federation of American Societies for Experimental Biology, prepared under the auspices of the committee on biological handbooks, Washington DC, 540 pp.
- Bloom, W. en D.W. Fawcett, 1975. A textbook of histology. Tenth edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 136-157 en p. 209-233.
- Engh, G.J. van den, J.W. Visser en S.J.L. Bol, 1978. De vorming van bloedcellen. Natuur en Techniek, 46: 537-554.
- Hardisty, R.M. en D.J. Weatherall, 1974. Blood and its disorders, Blackwall Scientific Publications, London, 1540 pp.
- Schermer, S., 1968. The blood morphology of laboratory animals, third edition. F.A. Davis Company, Philadelphia, 200 pp.
- Spector, W.S. (Editor), 1961: Handbook of Biological Data, prepared under the direction of the committee on the handbook of biological data, the National Academy of Sciences, the National Research Council, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 584 pp.

Hoofdstuk 3

- Dittmer, D.S., 1961. Blood & other body fluids. Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington DC, USA.
- Russell Elkinton, J. en Donowski, T.S., 1955. The body fluids, basic physiology and practical therapeutics. The Williams & Wilkins company, Baltimore, USA.
- Zandee, D.I. en R.E. Ballieux, 1978. Inwendige milieu- en lichaamsvloeistoffen. In: S. Dijkstra en D.I. Zandee (Editors): Vergelijkende dierfysiologie. Bohm, Scheltema & Holkema, Utrecht. Hst 5, pp 96–127.

Hoofdstuk 4

- Braier, L., 1983. A hypothesis for the induction of leukemia by benzene. In: P.L. Chambers, S. Gitter en C.M. Chambers (Editors): *Toxicology in the use, misuse and abuse of food, drugs and chemicals*, Proceedings of European Society of Toxicology Meeting, Tel Aviv, March 21-24, 1982. *Archives of Toxicology*, Supplement 6: 42-46.
- Canonico, P.G., M.D. Castello, C.T. Spears, J.R. Brown, E.A. Jackson en D.E. Jenkins, 1984. Effects of ribavirin on red blood cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 74: 155-162.
- Canonico, P.G., M.D. Castello, T.M. Cosgriff, J.C. Donovan, P.E. Ross, C.T. Spears en E.L. Stephen, 1984. Hematological and bone marrow effects of ribavirin in Rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 74: 163-172.
- Elwood, P.C., J.E.J. Gallacher, K.M. Phillips, B.E. Davies en C. Toothill, 1984. Greater contribution to blood lead from water than from air. *Nature*, 310: 138-140.
- Goldstein, A., L. Aronson en S.M. Kalman, 1969. Drug toxicity. In: *Principles of drug action, the basis of pharmacology*. Harper en Row Publishers, New York, p. 343-429.
- Heddle, J.A. en M.F. Salamone, 1981. Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 39: 23-27.
- Rapport inzake grenswaarde benzeen, 1984. Werkgroep van deskundigen van de nationale MAC-commissie, 3e versie.
- Snyder, R., S.L. Longacre, C.M. Witmer, J.J. Kocsis, L.S. Andrews en E.W. Lee, 1981. Biochemical toxicology of benzene. In: E. Hodgson, J.R. Bend & R.M. Philpot (Editors): *Reviews in Biochemical Toxicology*, Vol. 3, Elsevier North-Holland Publishing Co., New York p. 123-153.
- Tice, R.R. en J.L. Ivett, 1985. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: R.D. Irons (Editor): *Toxicology of the blood and bone marrow*, Raven Press, New York p. 119-138.
- Woutersen, R.A., 1978. Porfyrieën, ontregelingen in de heemsynthese. *Natuur en Techniek* 46: 464-484.

Hoofdstuk 5

- Blaauboer, B.J., 1978. Formation and reduction of ferrihemoglobin in red cells. Effects of phenylhydroxylamine and monoaminophenols in avian and mammalian erythrocytes. Proefschrift, Utrecht.
- Harris, J.W. en R.W. Kellermeyer, 1970. The red cell, production, metabolism and destruction: normal and abnormal. Harvard University Press, Cambridge, Mass., USA.
- Hultquist, D.E. en P.G. Passon, 1971. Catalysis of methemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b_5 and cytochrome b_5 reductase. *Nature New Biology*, 229: 252-254.
- Kiese, M., 1974. Methemoglobinemia, a comprehensive treatise. CRC Press, Cleveland.
- Perutz, M.F., 1970. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Nature*, 228: 726-739.
- Perutz, M.F., 1971. Hemoglobin: genetic abnormalities. *New Scientist*, 50: 376-388.
- Rachmilewitz, E.A., 1974. Denaturation of the normal and abnormal hemoglobin molecule. *Seminars in Hematology*, 11: 411-462.
- Smith, R.P., 1980. Toxic responses of the blood. In: J. Doull, C.D. Klaassen en M.O. Amdur (Editors): *Casarett and Doull's Toxicology, the basic science of poisons*. Macmillan Publishing Co, New York, Ch. 14, p. 311-331.
- Smith, R.P. en M.V. Olson, 1973. Drug-induced methemoglobinemia. *Semin. Hematol.* 10: 253-268.

Hoofdstuk 6

- Blaauboer, B.J., 1978. Formation and reduction of ferrihemoglobin in red cells. Effects of phenylhydroxylamine and monoaminophenols in avian and mammalian erythrocytes. Proefschrift, Utrecht.
- Blaauboer, B.J. en M. van Graft, 1983. Photosensitization in ruminants: porphyrins and phylloerythrin. In: Y. Ruckebusch, P.L. Toutain en G.D. Koritz (Editors): *Veterinary Pharmacology and Toxicology*, MTP Press, Lancaster p. 671-680.
- Engel, G.J. van de, J.W.M. Visser en S.J.L. Bol, 1978. De vorming van bloedcellen. *Natuur en Techniek* 46: 537-554.
- Mangalik, A. en W.A. Robinson, 1981. Stem cell assays in the evaluation of myelotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 39: 51-58.
- Tice, R.R. en J.L. Ivett, 1985. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: R.D. Irons (Editor): *Toxicology of the blood and bone marrow*, Raven Press, New York, p. 119-138.
- Wang, Yeu-Ming, 1977. Drug-induced hemolysis. *Genetic Pharmacology* 8: 13-19.
- Wang, Yeu-Ming, E. Lantin en J. Van Eys, 1976. Erythrocytic enzyme activities and drug induced hemolysis in rabbits. *Genetic Pharmacology* 7: 49-52.
- Woutersen, R.A., 1979. Experimentele protoporfyrie bij muizen en Japanse kwartels. Een onderzoek met loodacetaat, 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine (DDC) en griseofulvine. Proefschrift, Utrecht.
- Young, J.D., C. Crowley en E.M. Tucker, 1981. Haemolysis of normal and glutathione-deficient sheep erythrocytes by selenite and tellurite. *Biochemical Pharmacology* 30: 2527-2530.

Hoofdstuk 7

- Belpaire, F.M., 1981. Serumeiwitbinding van geneesmiddelen. *Pharmaceutisch Weekblad* 116: 865-870.
- Belpaire, F.M., 1981. Serumbinding en ziekteprocessen. *Pharmaceutisch Weekblad* 116: 876-879.
- Croughe, R.J.M. en H.C. Hemker (Editors), 1979. De fysiologische basis van klinisch laboratoriumonderzoek, Bohm, Scheltema & Holkema, Utrecht, 507 pp.
- Gruchy, G.C. de, 1975. Drug-induced blood disorders. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 197 pp.
- Lindenbaum, J., 1979. The haematopoietic system. In: R.E. Hodges (Editor): *Nutrition, metabolic and clinical applications*, Plenum Press, New York, p. 1-51.
- Roe, D.A., 1976. Drug-induced nutritional deficiencies. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 237 pp.
- Schreurs, W.H.P. en H. van den Berg, 1980. Vitaminen, onmisbare nutriënten voor het menselijk lichaam. *Pharmaceutisch Weekblad* 115: 1493-1505.
- Thomas, J.A. en J.W. Bell, 1982. Endocrine toxicology. In: A. Wallace Hayes (Editor): *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, p. 487-507.

Hoofdstuk 8

- Akkerman, J.W.N., B.N. Bouma, J.J. Sixma, 1979. Hemostase Atlas. Een uitgave van Boehringer-Ingelheim, Haarlem.
- Caprino, L., N. Dolci, G. Togna, P. Villa, R. Buca en V. Carunchio, 1982. Effect of cadmium on platelet thromboxane and vascular prostacyclin production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 65: 185–188.
- Doerr, J.A., W.E. Huff, P.B. Hamilton, en E.B. Lillihøj, 1981. Severe coagulopathy in young chickens produced by ochratoxin A. *Toxicology Applied Pharmacology*, 59: 157–163.
- Hemker, H.C., 1979. De bloedstolling; het reactiemechanisme. In: *De bloedstolling, Trombose, atherosclerose en het hartinfarct. Natuur en Techniek*, Maastricht, p. 17–43.
- Hornstra, G., 1979. Prostaglandines; hun betekenis voor de bloedstelping en de thrombusvorming. In: *De bloedstolling. Trombose, atherosclerose en het hartinfarct. Natuur en Techniek*, Maastricht, p. 68–83.
- Sixma, J.J., 1979. De bloedstelping; bloedplaatjes en de vorming van de hemostatische prop. In: *De bloedstolling. Trombose, atherosclerose en het hartinfarct. Natuur en Techniek*, Maastricht, p. 45–63.
- Smith, J.B., 1980. The prostanoids in hemostasis and thrombosis. *American Journal of Pathology*, 99: 743–804.
- Ulrich, M., 1983. Het belang van vitamine K. *Chemisch Magazine*, augustus 1983, 353–357.

Hoofdstuk 9

- Dean, J.H., M.I. Luster, G.A. Boorman en L.D. Lauer, 1982. Procedures available to examine the immunotoxicity of chemicals and drugs. *Pharmacological Reviews* 34: 137-148.
- Dean, J.H., M.I. Luster en G.A. Boorman, 1982. Immunotoxicology. In: P. Sirois en M. Rola-Pleszcynski (Editors): *Immunopharmacology*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p. 349-397.
- McConnell, I., 1976. Structure and function of lymphoid tissue. In: M.J. Hobart en I. McConnell (Editors): *The immune system, a course on the molecular and cellular basis of immunity*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 206-224.
- Ruitenbergh, E.J., 1977. Immunologische afweer en ontsteking. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 102: 1073-1083.
- Seinen, W., 1983. Immunologische reactie, ontstekingsreactie, weefselherstelreactie. *Collegedictaat. Vakgroep Pathologie afd. Algemene Ziektekunde*, 86 pp.
- Vos, J.G., 1977. Immune suppression as related to toxicology. *CRC Critical Reviews Toxicology* 5: 67-101.
- Vos, J.G., R.E. Faith en M.I. Luster, 1980. Immune alterations. In: V. Kimbrough (Editor): *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products*. Elsevier/North Holland, Biomedical Press, p. 245-265.
- Vos, J.G., 1984. Dioxin induced thymic atrophy and suppression of thymus-dependent immunity. In: *Banbury Report 18: Biological Mechanisms of Dioxin Action*. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., p. 401-410.

Index

- acetylfenylhydrazine 39
- acetylsalicylzuur 70
- aflatoxinen 72
- afweer 10, 11, 16, 60, 73, 74, 76, 77
- alkalisch fosfatase 60, 66
- aminofenol 36–38
- δ -aminolevulinezuur (ALA) 24–26, 65
- ammoniacaramel 65
- anemie 20, 23, 24, 27, 28, 35, 39, 40, 43, 57, 65, 66
- aniline 37
- anti-oxydantia 42, 46, 48
- antigeen 50, 73, 74, 76, 77
- antilichaam 76, 77
- arylhydroxylamines 36
- ascorbinezuur 35, 39
- aspirine 64, 70
- auto-oxydatie 35

- B-lymfocyten 22, 73–76
- beenmergcelkolonietoets 78, 80
- benzeen 18–23, 38, 57
- bicarbonaat 7, 14–16
- bifenylen 79
- bilirubine 16, 41, 63, 64
- bloedbeeld 4, 10, 18
- bloedcelvorming 4, 18, 23
- bloedingstijd 69
- bloedplaatjes 4, 12, 16, 20, 22, 45, 57, 69, 70, 77
- Bursa van Fabricius 73, 75

- cadmium (Cd) 41, 70
- calcium (Ca) 13, 14, 41, 60, 61, 66, 68, 69
- catalase 33, 48, 53, 54
- celscheidingstechnieken 44–49
- chinon-imine 38
- chlooramfenicol 57
- chloorpromazine 52, 53
- chromosoom 28–32
- complementsysteem 12, 16, 74, 77
- coumarine 72

- creatinine 15, 16
- cyanide 38
- cytochroom P-450 20

- degranulatie 77

- eiwitbinding 63, 64
- eosinofiele granulocyten 10, 11, 77
- erythrocyten 4, 7–9, 11, 16, 19, 20, 22–24, 33–43, 45, 48, 49, 52, 54–57, 66, 77
- erythropoietine 18, 22, 24–27, 58, 66

- fagocyten/fagocytose 10–12, 74, 76, 77
- favisme 43
- fenothiazines 50–52
- fenylhydrazine 39
- fenylhydroxylamine 55, 56
- ferricyanide 36
- ferrihemoglobine (HbFe^{3+}) 33, 35–39, 45, 54–56
- ferrochelataze 25, 26, 51
- fibrine 16, 17, 68, 68
- fibrinogeen 13, 16, 17, 72
- fototoxiciteit 50–54
- fylloërytrine 50, 51, 54

- geeldikkopziekte 50
- geneesmiddel-eiwitcomplex 63
- geneesmiddelen 18, 26, 63–66, 70
- genotoxisch 19, 28
- globulinen 13, 16
- glucose-6-fosfaat dehydrogenase 42, 43, 45
- glutathion (GSH) 33–36, 42, 43, 46, 48
- glutathion peroxydase 42, 43, 54
- glutathion reductase 42, 43, 54
- glycolyse 34, 42, 56
- granulocyten 7–11, 18, 22, 26, 45, 47, 58, 63, 74, 76, 77

- haptoglobine 16, 41
- heem-heem interactie 34, 35
- heemsynthese 24, 25, 51, 58

- Heinz-lichaampjes 39–41, 45
 hematocriet 45
 hematopoïese 7, 57, 65
 hemoglobine (Hb) 7, 16–18, 24, 27, 33–41, 52–56, 63, 65
 hemolyse 16, 18, 40–43, 45, 46, 52, 52–54
 hemostase 68, 69
 heparine 72, 77
 hexose-monofosfaat shunt 42, 56
 hormonen 2, 13, 15, 18, 22, 24, 58, 60, 62
 humoraal 74–76, 79, 81
 hydroxylradicaal 48, 53

 ijzer (Fe) 16, 17, 26, 33, 53, 54, 63, 66
 immunoglobuline 11, 12, 16, 17, 76–79

 kalium (K) 13–15, 24, 33, 34, 40, 41, 63, 67
 koolhydraatmetabolisme 14, 33, 56
 Kupffer-cellen 4, 11

 leukemie 21–23
 leukocyten 4, 8, 10, 20, 28
 leukotriënen 70, 71
 lever 4, 7, 11, 15, 16, 20, 27, 41, 50, 60, 64, 71, 73
 lichtgevoeligheid 50–54
 lipoproteïnen 15–17
 lood (Pb) 18, 23–26, 28, 58
 lymfocyten 4, 8, 9, 11, 22, 28, 45, 47, 49, 58, 63–65, 73–82
 lymfokines 12, 76
 lymfopenie 79

 macrofagen 4, 10–12, 45, 58, 74–76, 79, 80
 magnesium (Mg) 13–15, 53, 54, 66
 megakaryocyten 7, 12
 memorycellen 73, 75, 76
 mestcellen 11, 76, 77
 metalloporfyrines 53
 micronuclei 28, 31, 32
 miltkolonietoets 57, 78, 80, 82
 monocyten 4, 11, 45, 58

 natrium (Na) 13–15, 23, 34, 63, 67
 N-hydroxylamines 55
 nitraat 37, 38
 nitriet 36–38, 53
 nitrosobenzeen 56
 nitroverbindingen 37, 39
 normoblasten 18, 22

 ontsteking(sreacties) 10–12, 74, 76
 organotinverbindingen 79–82
 osmoregulatie 13, 41
 oxydatie 20, 33, 37, 39, 40, 42

 pancytopenie 23, 28, 57
 penicillamine 65
 PIVKA's 71
 plaatjes (zie bloedplaatjes)
 plasma-eiwitten 16, 60, 63, 64
 plasmacellen 11, 16, 26, 76
 polychloorbifenylen (PCB's) 79
 profyrines 24, 26, 50, 51, 53, 54, 58
 primaquine 43
 prostaglandines 12, 70, 71
 protoporfyrine 24, 25, 51, 52, 54, 66
 protrombine(tijd) 16, 68, 71, 72

 reticulocyten 6–8, 28, 45

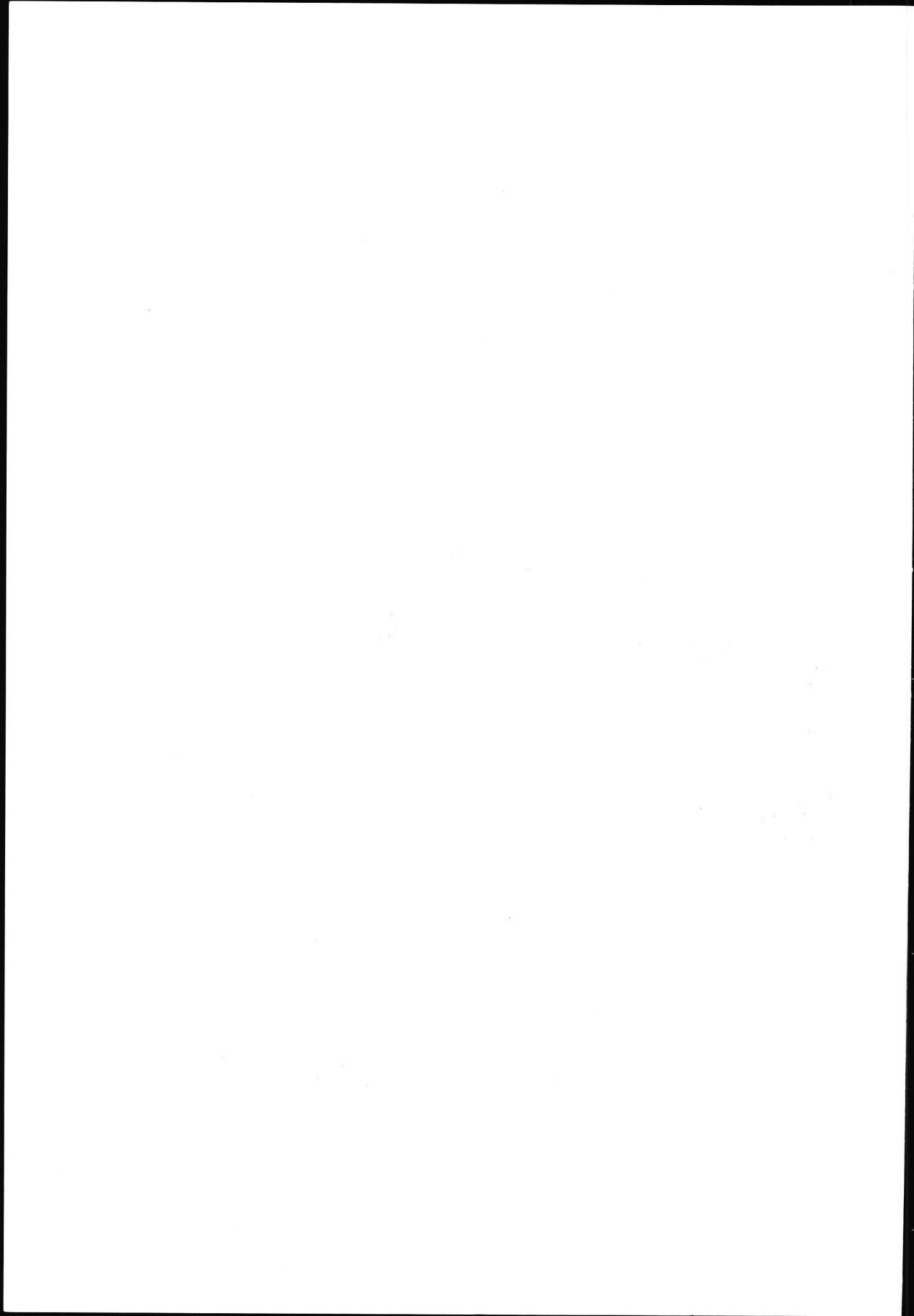
 singlet zuurstof 48, 50, 53, 54
 sister-chromatid exchange 28, 29
 spoorelementen 13, 14, 66
 stamcellen 4–6, 18, 22–26, 57
 sulfonamides 37, 50
 superoxyde 7, 48, 50, 53, 54
 superoxyde dismutase (SOD) 48, 53, 54
 syntron 72

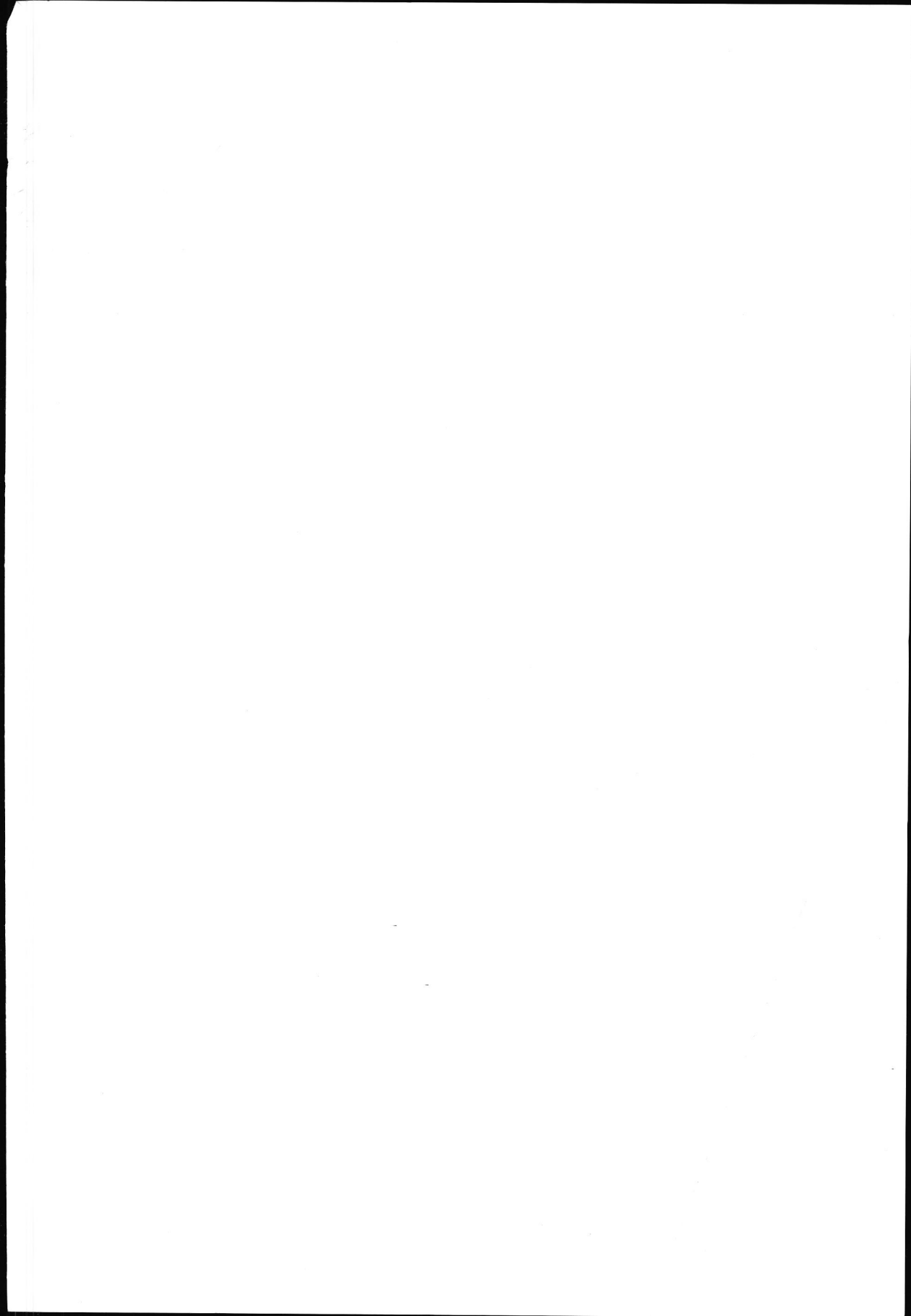
 T-lymfocyten (T-cellen) 11, 12, 22, 74–77, 80–82
 TCDD 79, 80
 tetra-alkyllood 23
 tetracyclines 50, 51
 thymus 4, 22, 63, 73–75, 77, 79–82
 transferrine 16, 63
 transporteiwitten 16, 17, 62–65
 trombine 16, 69, 72
 trombocyten (zie bloedplaatjes)
 trombocytopenie 20, 57

 vitaminen 13, 14, 35, 39, 54, 60, 65, 66, 71, 72

 warfarine 71, 72
 waterstofperoxyde 36, 39, 48, 53, 54
 wondafsluting 16

 zink (Zn) 14, 53, 66, 67
 zuurstof 2, 7, 18, 33–38, 40, 48, 53, 54, 56, 68





geschenk R. Woutersen
(Mouben)

Bloed speelt in vele opzichten een centrale rol bij het functioneren van dierlijke organismen. Bloedverlies en veranderingen in de bloedsamenstelling hebben vaak gevolgen voor het voortbestaan van het organisme. In het toxicologisch onderzoek neemt bloed een belangrijke plaats in. Veranderingen in het zgn. bloedbeeld worden als indicatie voor vergiftigingen gebruikt. Het in verhoogde concentratie voorkomen in bloedplasma van bepaalde eiwitten, die normaal in hoge concentraties in cellen van andere organen dan bloed te vinden zijn, is een diagnostisch criterium voor het vaststellen van beschadigingen van dat orgaan. De gemakkelijke bereikbaarheid van bloed maakt het mogelijk veelvuldig bloedmonsters te nemen. Dit is van belang bij de studie naar de kinetiek van toxische stoffen. Frequentie monsternamen en bepaling van de te onderzoeken stof in plasma geven een beeld van de hoeveelheid opgenomen stof, de snelheid van verdeling en uitscheiding en van de biologische beschikbaarheid van de stof. Dit boekje wil de lezer een beeld geven van de invloeden van lichaamsvreemde stoffen op de vorming, samenstelling en functies van bloed, waarbij onder meer ingegaan zal worden op verschillen tussen diersoorten. Bij de bespreking van de toxische effecten van stoffen zullen veelal de verstoringen van het functioneren van bloed centraal staan; bij uitzondering wordt een stof of groep stoffen als voorbeeld behandeld.

Reeds verschenen in de Toxicologische Reeks

1. Algemene inleiding in de toxicologie. J.H. Koeman. 1983, 78 blz., ISBN 90 220 0824 X
2. Chemische carcinogenese. L. den Engelse, V.J. Feron en C.A. van der Heijden. 1984, 112 blz., ISBN 90 220 0828 2
3. Ioniserende straling: effecten, risico's en bescherming. H.P. Leenhouts. 1985, 72 blz., ISBN 90 220 0874 6
4. Neurotoxische stoffen. J.M.M. van den Bercken, H. van Genderen en M. de Vlieger. 1986, 100 blz., ISBN 90 220 0829 0
6. Klinische toxicologie. B. Sangster. 1987, 124 blz, ISBN 90 220 0929 7

In voorbereiding zijn delen over: Toxicologie van de lever, Geschiedenis van de toxicologie, Moleculaire werkingsmechanismen, Biotransformatie en toxicokinetiek, Immunotoxicologie, Celtoxicologie en Toxicologisch onderzoek met celcultuurtechnieken.



Pudoc Wageningen

ISBN 90 220 0914
NUGI 743