

experimentele tumoren van de ratteneus

experimentele tumoren van de ratteneus

swier h. scholte



een
onderzoek
naar de invloed
van enige factoren
op de carcinogenese
door diethylnitrosamine

swier h. scholte

EXPERIMENTELE TUMOREN VAN DE RATTENEUS

Een onderzoek naar de invloed van enige factoren op de
carcinogenese door diethylnitrosamine

VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM

EXPERIMENTELE TUMOREN VAN DE RATTENEUS

Een onderzoek naar de invloed van enige factoren op de
carcinogenese door diethylnitrosamine

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde
aan de Vrije Universiteit te Amsterdam,
op gezag van de rector magnificus mr. J. de Ruiter,
hoogleraar in de faculteit der rechtsgeleerdheid,
in het openbaar te verdedigen
op vrijdag 18 februari 1977 te 15.30 uur
in het hoofdgebouw der universiteit,
De Boelelaan 1105

door

SWIER HARMANNUS SCHOLTE

geboren te Assen

Promotores: Dr. T. BOTTEMA en Prof. Dr. R. DONNER

Coreferent: Prof. Dr. G. DE WIT

Aan de nagedachtenis van mijn vader.

Aan mijn moeder.

*Aan Marijke, Henriette, Hillegonda,
Allard en Clarinde.*

VOORWOORD

Zoals praktisch elke publikatie kon ook deze slechts tot stand komen, dankzij de hulp van zeer velen. Daarom wil ik allereerst allen, die op welke manier dan ook hun medewerking hebben verleend, oprecht dank zeggen en zo uw naam hieronder niet mocht worden genoemd, wees dan toch overtuigd van mijn erkentelijkheid voor de door u geboden hulp.

Met name ben ik veel dank verschuldigd aan:

Dr. T. Bottema, die het onderzoek in zijn geheel begeleidde.

Prof. Dr. R. Donner, wiens adviezen en hulp eveneens onmisbaar waren.

Prof. Dr. G. de Wit, die mij tijdens mijn opleiding tot KNO-arts de gelegenheid gaf tijd aan het onderzoek te besteden.

Prof. Dr. J. Oort, die de „geestelijke” vader van de opzet van het onderzoek genoemd kan worden.

Dr. H. A. Brouwer en zijn medewerkers van het Centraal Laboratorium voor Experimentele Geneeskunde.

Alle medewerkers van het Pathologisch Instituut die bij dit onderzoek betrokken waren.

Mej. G. E. Sap, die zo geweldig veel werk verrichtte. Vele malen typte zij het manuscript en alle voorstadia daarvan.

INHOUD

1.	INLEIDING	1
2.	DE NITROSAMINES, DIETHYLNITROSAMINE, WERKINGSMECHANISME, ENKELE DIEREXPERIMENTELE RESULTATEN	3
2.1.	De nitrosamines algemeen	3
2.2.	DiëthylNitrosamine, N-Nitroso-Diëthylamine (DENA)	4
2.3.	Werkingsmechanisme van de nitrosamines	5
2.4.	Nitrosamines (m.n. DENA) en neustumoren	6
2.4.1.	Druckrey en Thomas	7
2.4.2.	Herrold c.s.	8
2.4.3.	Enkele andere publikaties betreffende DENA en DMNA en neustumoren	8
2.4.4.	Dissertatie Bottema (1971)	9
3.	HET PROEFDIER - DE ALBINO WISTARRAT	11
3.1.	Algemeen	11
3.2.	Macroscopische anatomie ratteneus	11
3.3.	Microscopische anatomie	13
3.4.	Histopathologie van de ratteneus: Spontaan en Experimenteel	16
3.4.1.	Spontane afwijkingen	16
3.4.2.	Experimentele pathologie	18
4.	HUMANE NEUSTUMOREN EN EXPERIMENTELE NEUSTUMOREN	26
4.1.	Inleiding	26
4.2.	Neus- en neusbijholtetumoren bij de mens	26
4.3.	Mogelijke etiologische momenten bij de humane neustumoren	27
4.4.	Benigne neustumoren bij mens en rat: de verschillen	31
4.5.	Maligne neustumoren bij mens en rat: de verschillen	32
4.6.	Mogelijke oorzaken van de verschillen	33
4.6.1.	Sterk carcinogene werking van DENA	33
4.6.2.	Inductietijd	33
4.6.3.	Toestand neusslijmvlies	33
4.6.4.	Het aantal factoren	34
4.6.5.	De anatomische bouw van de neus	34
4.6.6.	De leeftijd	34
5.	CO-CARCINOGENESIS	35
5.1.	Co-carcinogenesis algemeen	35
5.2.	Co-carcinogenesis en nitrosamines (m.n. DENA)	37
5.2.1.	Overzicht van de betreffende literatuur	37
5.2.1.1.	Schmähl c.s.	37
5.2.1.2.	Enkele andere auteurs	37
5.2.2.	Bespreking	39
6.	OVERWEGINGEN, HYPOTHESES EN VRAAGSTELLINGEN	40

6.1.	Overwegingen	40
6.2.	Hypotheses en vraagstellingen	40
6.2.1.	Fysische factoren	40
6.2.1.1.	Irritatie van het neusslijmvlies	41
6.2.1.2.	Röntgenbestraling	41
6.2.2.	Veranderingen in de anatomie en fysiologie van de neus ..	41
7.	PRAKTISCHE UITVOERING VAN DE EXPERIMENTEN	43
7.1.	Co-factoren	43
7.1.1.	Corpus alienum in de neus	43
7.1.2.	Röntgenbestraling van de neus	44
7.1.3.	Afsluiting van één neusgat i.c. het linker	44
7.2.	Dosering DENA en totaal dosis	45
7.3.	De proefdieren, indeling, huisvesting, etc.	46
7.3.1.	De proefdieren	46
7.3.2.	De huisvesting	47
7.4.	Bewerking materiaal	47
8.	BELOOP, BEVINDINGEN EN RESULTATEN VAN DE EXPERIMENTEN	48
8.1.	Inleiding	48
8.2.	Belooop en bevindingen groep I t/m V	49
8.2.1.	Belooop en bevindingen bij uitwendig onderzoek	49
8.2.1.1.	Belooop en bevindingen bij groep I (alleen DENA)	50
8.2.1.2.	Belooop en bevindingen bij groep II (DENA + röntgen)	50
8.2.1.3.	Belooop en bevindingen bij groep III (DENA + corpus alienum)	50
8.2.1.4.	Belooop en bevindingen bij groep IV (alleen röntgen)	51
8.2.1.5.	Belooop en bevindingen bij groep V (alleen corpus alienum) ..	51
8.2.2.	Microscopisch onderzoek van de neus tot en met de 36e week	52
8.2.2.1.	Microscopisch onderzoek van de neus bij groep I (alleen DENA)	58
8.2.2.2.	Microscopisch onderzoek van de neus bij groep II (DENA + röntgen)	58
8.2.2.3.	Microscopisch onderzoek van de neus bij groep III (DENA + corpus alienum)	59
8.2.2.4.	Microscopisch onderzoek van de neus bij groep IV (alleen röntgen)	59
8.2.2.5.	Microscopisch onderzoek van de neus bij groep V (alleen corpus alienum)	59
8.2.2.6.	Beëindiging experiment	59
8.2.3.	Microscopisch onderzoek andere organen bij de groepen I t/m III t/m de 36e week	60
8.2.4.	Bevindingen bij groep I (alleen DENA) na 39 weken	60
8.2.5.	Bevindingen bij groep II (DENA + röntgen) na 39 weken ..	64
8.2.6.	Bevindingen bij groep III (DENA + corpus alienum) na 39 weken	66
8.2.7.	Bevindingen bij groep IV (alleen röntgen) na 39 weken	68

8.2.8.	Bevindingen bij groep V (alleen corpus alienum) na 39 weken	69
8.2.9.	Samenvatting van de bevindingen bij de groepen I t/m V ..	70
8.2.10.	Beantwoording van de vragen gesteld in 6.2.1.1. en 6.2.1.2.	71
8.2.10.1.	Wat is de invloed van irritatie door een corpus alienum op de carcinogenese van DENA in de neus?	71
8.2.10.2.	Wat is de invloed van eenmalige röntgenbestraling (500 Rad) op de carcinogenese van DENA in de neus?	71
8.3.	Belooop en bevindingen groep VI (DENA + afsluiting neusopening L.) en groep VII (alleen afsluiting neusopening L.)	72
8.3.1.	Belooop en bevindingen bij uitwendig onderzoek	72
8.3.2.	Microscopisch onderzoek van de neus t/m de 48e week	73
8.3.3.	Microscopisch onderzoek andere organen t/m de 48e week ..	76
8.3.4.	Bevindingen bij groep VI (DENA + afsluiting linker neusopening) na 52 weken	76
8.3.5.	Bevindingen bij groep VII (alleen afsluiting linker neusopening) na 52 weken	77
8.3.6.	Samenvatting bevindingen bij groep VI en VII	80
8.3.7.	Beantwoording van de vraag in 6.2.2.	83
9.	DISCUSSIE	84
9.1.	Bespreking resultaten	84
9.1.1.	Toediening van alleen DENA	84
9.1.2.	De invloed van röntgenbestraling	85
9.1.3.	De invloed van een corpus alienum in de neus	87
9.1.4.	De invloed van afsluiting van één neusopening	89
9.2.	Histologisch type van de gevonden tumoren	91
9.3.	Resultaten van dit onderzoek in het licht van de humane pathologie	94
	SAMENVATTING	96
	SUMMARY	99
	LITERATUURLIJST	102

LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN

DENA	—	diethylnitrosamine
DMNA	—	dimethylnitrosamine
ENE	—	esthesioneuroepitheliom
ENE's	—	esthesioneuroepitheliomen

1. INLEIDING

Uit publikaties van *Druckrey* en *Thomas* (1964/1967) en *Herrold* (1964) was reeds bekend dat toediening van diethylnitrosamine (DENA) aanleiding geeft tot het ontstaan van neustumoren.

Door deze onderzoekers werden niet alleen plaveiselcel- en adenocarcinomen gevonden, maar ook esthesioneuroepitheliomen (ENE's) in het met reukepitheel beklede gedeelte van de neus (regio olfactoria) van de rat en de Syrische goudhamster.

In 1971 verscheen een publikatie „Experimentele gezwellen in het neusslijmvlies van de rat” (*Bottema* - dissertatie Amsterdam VU).^{*} Hierin werden de resultaten beschreven van proeven waarbij subcutaan DENA aan Wistarratten werd toegediend en waarbij speciaal gelet werd op het ontstaan van afwijkingen in de neus. Het bleek dat bij een groot aantal dieren reeds na een betrekkelijk korte inductietijd histologisch benigne en ook maligne tumoren ontstonden tijdens of na toediening van bovengenoemde stof. De benigne tumoren, die gezien werden in het met respiratoir slijmvlies beklede gedeelte van de neus (regio respiratoria) vertoonden sterke overeenkomst met de benigne neustumoren die ook bij de mens worden aangetroffen, en bekend staan als fungiforme papillomen en „inverted” papillomen.

Behalve een planocellulair carcinoom van de ductus nasolacrimalis werden in genoemd onderzoek geen plaveiselcel- of adenocarcinomen in de neus waargenomen. Echter in de regio olfactoria werden histologisch als maligne imponerende gezwellen gezien die als esthesioneuroepitheliomen werden geduid. In de menselijke pathologie zijn tumoren van neuroepitheliale oorsprong in de neus zeer zeldzaam. *Sisson* (1973) schat het aantal gepubliceerde gevallen op minder dan 150. Bij de mens komen plaveiselcel- en adenocarcinomen het meest frekwent voor. Wat betreft de kwaadaardige gezwellen bleek er dus een duidelijk verschil te bestaan tussen de neustumoren bij de mens en de experimentele neustumoren van de Wistar-rat.

In het dierexperiment werd één carcinogeen agens toegediend in een zodanige dosering dat na een betrekkelijk korte inductietijd tumoren bij de proefdieren ontstonden.

^{*} Bij verwijzing naar deze diss. zal dit in het vervolg worden aangegeven met (*Bottema*), zonder verdere aanduiding.

Hoewel het mogelijk is dat nitrosamines in de menselijke carcinogenese een rol spelen (Fong en Walsh, 1971; Schuller, 1972) lijkt het zeer onwaarschijnlijk dat de mens in een korte tijd met een zo hoge dosis van een zo sterk carcinogeen als DENA in contact komt.

Den Engelse (1972a) noemt een aantal voor de mens carcinogene en mogelijk carcinogene stoffen. Hij acht het mogelijk dat er in de omgeving van de mens een groot aantal onbekende of half bekende factoren zijn die het ontstaan van kanker bij de mens mede zouden kunnen bepalen. Indien tumoren worden veroorzaakt door de werking van meer dan één faktor, dan spreekt men van cocarcinogenese. (Voor een uitgebreidere bespreking van het begrip cocarcinogenese etc. zie hoofdstuk 5.).

Het is denkbaar dat in de menselijke pathologie bij het ontstaan van neustumoren meer dan één faktor een rol speelt. Hierin zou de oorzaak kunnen liggen van het verschil tussen de neustumoren bij de mens en de experimentele neustumoren van de Wistarrat.

Het lijkt daarom zinvol om na te gaan of beïnvloeding van de carcinogenese door DENA in de neus van de Wistarrat door toevoeging van een andere faktor mogelijk is.

Deze beïnvloeding zou zich kunnen uiten in:

1. een verandering van de inductietijd van de tumoren.
2. het voorkomen van andere typen (kwaadaardige) tumoren dan alleen esthesio-neuro-epitheliomen.

In de literatuur over cocarcinogenese (zie hoofdstuk 5.) worden verschillende cofactoren genoemd.

In dit experiment werd als tweede faktor gekozen:

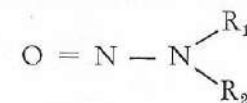
1. een mechanische faktor in de vorm van een corpus alienum in de neus.
2. een fysische faktor te weten röntgenbestraling van de neus van de rat.
3. afsluiting van één neusgat, waardoor respiratie nog slechts door de open neushelft mogelijk is.

In het laboratorium voor Experimentele Geneeskunde van de V.U. waren reeds oriënterende experimenten met toediening van een beperkte totaal hoeveelheid DENA aan Wistarratten gedaan, waarvan de resultaten zijn gepubliceerd (Bottema). Voor dit experiment werd daarom ook DENA als carcinogeen agens en de Wistarrat als proefdier gebruikt.

2. DE NITROSAMINES, DIETHYLNITROSAMINE, WERKINGSMECHANISME, ENKELE DIER-EXPERIMENTELE RESULTATEN

2.1. DE NITROSAMINES ALGEMEEN

Nitrosamines hebben als basis formule



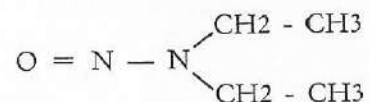
Er zijn een groot aantal stoffen met deze formule als basisstructuur bekend. Vele van deze verbindingen, in totaal bijna 100, zijn onderzocht op hun carcinogene werking. Druckrey en zijn medewerkers publiceerden in 1967 over de organotrope carcinogene werking van 65 verschillende nitrosamines. De meeste van deze nitrosamines hebben een sterk carcinogene werking en worden daarom veel voor de experimentele chemische carcinogenese gebruikt (Lyinsky 1970, Schuller 1972). Opvallend is dat een aantal van deze stoffen al in zeer lage doses een carcinogeen effect heeft. Soms is zelfs al een eenmalige dosering voldoende om een tumor te doen ontstaan (Druckrey 1963). Sommige van deze verbindingen blijken een sterke organotropie te bezitten. Met organotropie wordt hier bedoeld de eigenschap van een verbinding om selectief en regelmatig in een bepaald orgaan nieuwvorming te doen ontstaan (Schuller 1972). Deze organotropie blijkt afhankelijk te zijn van de dosering, van de toedieningswijze, de diersoort, het geslacht en de leeftijd van het proefdier.

Het onderzoek van de nitrosamines is begonnen toen bleek, dat bij mensen, die met dimethylnitrosamine (DMNA) in contact kwamen, levercirrhose ontstond (Hamilton en Hardy 1949, Barnes en Magee 1954). Al spoedig bleek dat in het dierexperiment niet alleen levercirrhose door DMNA kon worden veroorzaakt, maar dat bij toediening van kleinere doses ook levercarcinoom ontstond (Magee en Barnes 1956). Bij grotere doses DMNA is de toxische, en met name de hepatotoxische, werking zo sterk dat het proefdier dood gaat alvorens het tot tumorontwikkeling is gekomen. Door zeer veel onderzoekers zijn de nitrosamine-verbindingen op hun carcinogene

werking nader onderzocht. Sommige nitrosamines zijn zelfs speciaal gesynthetiseerd om een eventueel carcinogene werking te beproeven (Druckrey 1967).

2.2. DIETHYLNITROSAMINE, N-NITROSO-DIETHYLAMINE (DENA)

In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van diëthylnitrosamine. Deze stof heeft de volgende structuurformule



DENA is een lichtgele heldere aromatisch ruikende, brandend smakende vloeistof die goed oplosbaar is in water. De waterige oplossing is stabiel (meer dan 14 dagen). De vluchtigheid bedraagt bij 22°C plm. 80 % verdamping na 10 uur. Het kookpunt bij 1 atmosfeer is 174,5°C, bij 40 cm kwikdruk 67°C. Het soortelijk gewicht bij 20°C bedraagt 0,9428.

2.3. WERKINGSMECHANISME VAN DE NITROSAMINES

Over het werkingsmechanisme van de nitrosamines is reeds door veel onderzoekers gepubliceerd.

Enkele van de belangrijkste publikaties in dit verband zijn van Dutton en Heath (1956), Magee en Farber (1962), Magee en Hultin (1962), Mizrahi en Emmelot (1962), Magee en Schoental (1964), Druckrey (1967), Swann en Magee (1968/1971), Kröger (1968), Lyinski (1968), Den Engelse (1969/1970 en 1971/1972, 1974), Loveless (1969), Krüger (1968, 1970 en 1972), Montesano en Magee (1970a en 1971).

Een kort overzicht wordt gegeven in Food and Cosmetic Toxicology (1971). Druckrey c.s. (1967) nemen aan dat de metabole afbraak van de nitrosamines geschiedt via een enzymatische hydroxylering, waarschijnlijk onder invloed van het enzym Alfa-C-hydroxylase, welk enzym in verschillende organen van het lichaam voorkomt. Na deze C-hydroxylering als eerste stap, zou een afsplitsing van een aldehyde volgen terwijl via een aantal instabiele intermediaire verbindingen uiteindelijk een alkylcarboniumion vrij zou komen. Dit zou op zijn beurt reageren met elektronenrijke

plaatsen in verschillende moleculen (Schuller 1972), zie fig. 2.1. Met name alkylering van guanine (Magee en Farber 1962) en ook van adenine en purine (Den Engelse 1972) treedt op. Deze laatstgenoemde stoffen maken deel uit van het DNA of RNA molecuul.

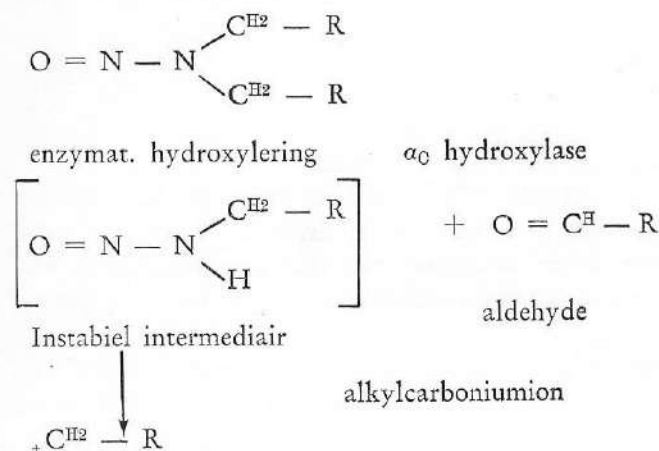


Fig. 2.1. Afbraak van dialkylnitrosamines.
(Naar Druckrey e.a. 1967, Den Engelse 1972).

De alkylering (methylering bij toediening van DMNA en ethylering bij toediening van DENA) van DNA of RNA zou uiteindelijk via een mutageen effect (?) een derailleren van de cel tot een tumorcel bewerkstelligen.

Nader onderzoek gaf als resultaat dat er geen directe correlatie bestaat tussen de mate van alkylering en het optreden van tumoren in een bepaald orgaan (Lyinski 1968, Den Engelse 1969/1970 en 1971/1972, Krüger 1968, 1970 en 1972 en Ross e.a. 1971). C₁₄ gelabeld DMNA gaf bij C₃ Hf muizen en Gr muizen ongeveer gelijke hoeveelheden gelabeld 7-methylguanine in respectievelijk de longen en de levers (Den Engelse 1969/1970). Bij de Gr muizen ontstonden veel longtumoren en weinig levertumoren en bij de C₃ Hf muizen veel levertumoren en weinig longtumoren.

Den Engelse (1969/1970) komt tot de conclusie dat een stof als DMNA in die organen tumoren kan doen ontstaan waar de betreffende stof wordt afgebroken, maar dat er geen direct verband bestaat tussen de vorming van tumoren en de mate van methylering

respectievelijk alkylering. Hij oppert als mogelijkheid dat DMNA evenals andere nitrosamines (en ook bijvoorbeeld urethaan) bij dieren met een spontane tumorneiging in bepaalde organen werkt als een „promoting factor” bij een endogeen genetisch bepaalde neiging tot spontane tumorvorming. Dit effect van een carcinogeen agens zou dan volgens hem tot stand kunnen komen door

1. een immunologisch effect
2. een teweegbrengen van een mitosegolf die de tumor een kans geeft om te gaan uitgroeien, of
3. een eventuele activering van een latent aanwezig virus.

Swann en *Magee* (1968, 1971) komen eveneens tot de conclusie dat er geen duidelijke correlatie bestaat tussen de mate van alkylering van DNA en de productie van tumoren. Alkylering van RNA of nog andere celbestanddelen zou volgens hen van belang kunnen zijn.

Loveless (1969) vond bij zogenaamde T-evenfagen dat er wel een goede correlatie bestond tussen de mutagene werking van een aantal alkylerende agentia en de O-6 alkylering van de-oxyguanosine.

Krüger (1972) vond een goede correlatie tussen de toxiciteit van nitrosamines en de mate van alkylering van RNA.

Wunderlich e.a. (1970) toonden aan dat methyl-nitrosureum ook een alkylering gaf van mitochondriën DNA. In vitro en in vivo gemuteerde mitochondriën in neurospora kunnen het phenotype van de cel bepalen. Indien mitochondriënmutaties een gelijke invloed op zoogdiercellen hebben dan zou het effect van alkylerende agentia op mitochondriën DNA mogelijk een plaats hebben in het carcinogenetisch proces.

Uit bovengenoemde opsomming blijkt wel dat de exacte manier waarop nitrosamines hun carcinogene werking ontplooiën niet duidelijk is.

2.4. NITROSAMINES (m.n. DENA) EN NEUSTUMOREN

Over nitrosamines en neustumoren werd vooral gepubliceerd door *Druckrey* c.s. en *Herrold* c.s. Daarom zullen eerst de publikaties van deze auteurs (2.4.1. en 2.4.2.) worden besproken en daarna nog enkele andere publikaties betreffende DENA (en DMNA) en neustumoren (2.4.3.). Tenslotte zal een samenvatting worden gegeven van het werk van *Bottema* (1971) (2.4.4.).

Hieronder zou ook een bespreking van de experimentele histopathologie op zijn plaats zijn. Voor een goed begrip hiervan is eerst een bespreking van de macroscopische en microscopische anatomie noodzakelijk (zie 3.2. en 3.3.). De experimentele histopathologie wordt daarom besproken in hoofdstuk 3.4.2.

2.4.1. *Duckrey* c.s. (1964, 1967, 1971) berichtten over het ontstaan van neustumoren bij ratten door toediening van verschillende nitrosamines. DENA gaf, vooral wanneer in lage dosering gegeven, aanleiding tot het ontstaan van tumoren in de regio olfactoria. *Thomas* (1965) publiceerde over de histologie van de tumoren uit het materiaal van *Druckrey*. Als typen tumoren werden door hem vermeld esthesioneuro-epitheliomen (ENE's), plaveiselcelcarcinomen, adenocarcinomen en ongedifferentieerde carcinomen. *Thomas* vermeldde met nadruk dat er histologisch gezien „moeilijke” beelden waren die als ENE's imponeerden, maar waarin haarden van metaplastisch plaveiselepitheel en klierbuisstructuren aanwezig waren. Hij spreekt in dit verband van „Kollisionstumoren”. Bij twee ratten die alleen DENA kregen werden na plm. 22 à 23 maanden en een totaaldosis van plm. 47 mg DENA per kg lichaamsgewicht plaveiselcelcarcinomen in de neus gevonden.

Thomas constateerde vooral expansieve en infiltratieve groei van de tumoren naar de schedelholte speciaal van het ENE. Slechts bij één proefdier werd een metastase van een ENE in het gebied van de submandibulaire lymfeklieren aangetoond. Tenslotte werd er nog door hem op gewezen dat ENE's vaak niet als zodanig herkend worden; als mogelijk foutieve diagnoses worden genoemd: ongedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen, adenocarcinomen, vaat tumoren, reticulosarcomen, lymfosarcomen of melanomen. Plaveiselcelmetaplasieën of pre-existent klierweefsel in een ENE of in een zeer ongedifferentieerde tumor als een neuroblastoom kunnen aanleiding geven tot een foutieve diagnose. *Thomas* is van mening dat plaveiselcelcarcinomen en adenocarcinomen in de neus of neusbijholte bij de mens histologisch overeenkomen met de door nitrosamine geïnduceerde tumoren bij ratten.

Druckrey en *Landschütz* (1971) maakten melding van het ontstaan van plaveiselcelcarcinomen in de neus bij ratten na inhalatie gedurende vijf dagen per week van lucht welke methyl-butyl-nitros-

amine bevatte in een concentratie van 0,05 ppm. Van de 20 ratten die aan deze concentratie werden blootgesteld, stierven 7 vroegtijdig en 3 ratten ontwikkelden een plaveiselcelcarcinoom na 11 à 12 maanden. De overige 10 ratten vertoonden een sterke ontstekingsreactie in het cavum nasi. Elders in het lichaam werden bij de dieren in dit experiment geen tumoren gevonden.

2.4.2. *Herrold c.s.* (1963, 1964) beschreven neustumoren in de regio olfactoria bij Syrische goudhamsters na toediening van DENA per voedingssonde en na intratracheale toediening. Histologisch werden de tumoren als ongedifferentieerde carcinomen bestempeld (1963). Beide genoemde toedieningswijzen van DENA gaven ook aanleiding tot het ontstaan van histologisch goedaardige trachea- en bronchustumoren (plaveiselcelpapillomen). Bij de intra-tracheale toediening werden geen levertumoren gevonden. Dit in tegenstelling tot de toediening per voedingssonde, waarbij wel tumoren in lever en nieren werden aangetroffen. De histologische beschrijving van tumoren in de regio olfactoria (1963) doet reeds denken aan tumoren van neuroepitheliale aard. In een latere publicatie (1964) werden door *Herrold c.s.* wel ENE's, evenals adenocarcinomen en plaveiselcelcarcinomen, in de neus beschreven. Ook deze onderzoekers merkten op dat er duidelijk mengbeelden in de tumoren aanwezig waren. In het voorste gedeelte van de neus werden goedaardige plaveiselcelpapillomen gevonden voornamelijk van het zogenaamde „inverted” type.

2.4.3. *Enkele andere publikaties betreffende DENA en DMNA en neustumoren.*

Hoffmann en Graffi (1964) beschreven het ontstaan van neustumoren bij muizen na percutane toediening van DENA, eventueel in combinatie met krotonolie. Op de plaats waar DENA op de geschoren huid werd gedruppeld, ontstonden geen veranderingen. In de neus werden plaveiselcelcarcinomen en afwijkingen zoals hyperplasie en papillomen met inverteringsneiging gevonden. Precancereuze afwijkingen waren aanwezig in de lever, wijzend op een goede resorptie van het op de huid gedruppelde carcinogeen.

Montesano (1968a) vond bij Syrische goudhamsters na toediening

van DENA bij maximaal 75 % van de proefdieren neustumoren. Histologisch werden dezelfde beelden gezien als door *Herrold* (2.4.2.).

Greenblatt en Rysinghani (1969) onderzochten de acute veranderingen in het neusslijmvlies bij intraperitoneale toediening van DENA en van DMNA. Per milligram stof was DENA even toxisch voor het olfactorisch epitheel als DMNA. Echter, wanneer gelet werd op de LD 50 dosis, was DENA veel sterker toxisch voor het olfactorisch epitheel dan DMNA. Het respiratoire epitheel van de neus bleek relatief vrij resistent voor de acute cytotoxische effecten van DENA en DMNA. In het orgaan van Jacobson werden geen afwijkingen geconstateerd.

Noronha en Goodall (1972) beschreven neustumoren door middel van één enkele injectie DMNA bij ratten. Zij zouden geen ENE's gevonden hebben, maar wel plaveiselcelcarcinomen en anaplastische beelden waarvan de beschrijving toch weer sterk aan neuroepitheliale tumoren doet denken.

2.4.4. *Dissertatie Bottema (1971).*

Samenvatting.

Na enige inleidende experimenten betreffende de dosering van DENA vond *Bottema* dat bij een toediening van 2 x 7,5 mg per kg lichaamsgewicht per week de ontstaanswijze van de afwijkingen in de neus bij de door hem gebruikte ratten van de Wistarstam het best te vervolgen waren.

Bij deze dosering ontstonden in de neus de volgende afwijkingen.

1. Regio respiratoria:
 - a. desorganisatie van het trilhaarepitheel
 - b. metaplasie
 - c. papillaire proliferatie van twee verschillende types n.l. van het zogenaamde fungiforme en het „inverted” type.
2. Regio olfactoria:
 - a. verwoesting van het olfactorische epitheel
 - b. proliferatie van de basale laag waar boven nog intact reuk-epitheel. Soms zelfs zeer uitgebreide metaplastische veranderingen met instulping van het prolifererende epitheel of metaplasie en proliferatie uitgaande van de cellen van de klieren van Bowman.

- c. In een later stadium celwoekering met atypische kenmerken in de basale laag en celwoekering met dezelfde kenmerken in de lamina propria.

De tumoren die ontstonden werden door *Bottema* geduid als ENE's. Er werden geen plaveiselcel- of adenocarcinomen gezien zoals deze wel door andere auteurs (zie 2.4.2. en 2.4.3.) werden beschreven. Soms werden haarden metaplastisch plaveiselepitheel aangetroffen in een ENE. *Bottema* achtte het mogelijk dat de diagnoses adenocarcinoom en plaveiselcelcarcinoom van andere onderzoekers op een foutieve interpretatie berustten. Slechts eenmaal werd een plaveiselcelcarcinoom gevonden uitgaande van de ductus nasolacrimalis. In de regio olfactoria werd enkele malen een papillair adenoom gezien, waarschijnlijk uitgaand van respiratoir epitheel. In de sinus maxillares werden geen veranderingen aangetroffen.

Bottema stelde de volgende werkhypothese op over de inwerking van DENA op het neusslijmvlies: DENA of een omzettingsprodukt daarvan wordt door de klieren van Bowman uitgescheiden in het neusslijm en zou daarna vanaf het oppervlak zijn werking uitoefenen.

3. HET PROEFDIER - DE ALBINO WISTARRAT

3.1. ALGEMEEN

Als proefdier werd de albino Wistarrat gebruikt. De dieren waren afkomstig uit het Centraal Proefdierenbedrijf T.N.O. te Zeist. In dit hoofdstuk wordt eerst een beknopt overzicht gegeven van de macroscopische en microscopische anatomie van de ratteneus (resp. in 3.2. en 3.3.) en vervolgens een overzicht van de spontane en experimentele histopathologie van de ratteneus (resp. in 3.4.1. en 3.4.2.).

Voor een meer uitgebreide bespreking zie *Bottema*.

3.2. MACROSCOPISCHE ANATOMIE RATTENEUS

Direct achter de twee kleine aperturae externae begint het vestibulum nasi. Dit gaat over in het langgerekte cavum nasi. De beide neushelften zijn gescheiden door het septum nasi waarin zich even voorbij de overgang van het vestibulum nasi naar het cavum nasi het organon vomeronasale van Jacobson bevindt, het zogenaamde waterreukorgaan. Op de bodem van de neus bevindt zich hier de canalis incisivus, een open verbinding met de mondholte.

In het voorste gedeelte van het cavum nasi, het zogenaamde respiratoire deel, bevinden zich twee neusschelpen: de concha maxillaris en de concha nasalis (zie fig. 3.1. a + b en 3.2.).

Voor in het cavum nasi onder de concha maxillaris mondt de ductus nasolacrimalis uit. In het achterste gedeelte van de neusholte (de regio olfactoria) bevinden zich de conchae ethmoidales: een aantal schelpen, meestal 6, die grotendeels dakpansgewijs over elkaar liggen. De 4 meest mediaal gelegen schelpen bedekken de twee meer lateraal gelegen schelpen, de zogenaamde conchae obtectae (zie fig. 3.3.). Beide neushelften hebben een gemeenschappelijke afvoergang: de ductus pharyngeus, beginnend op de overgang regio respiratoria - regio olfactoria; via deze ductus pharyngeus wordt het neusslijm uit de neusholte afgevoerd naar de keelholte. De ductus pharyngeus loopt dus gedeeltelijk onder het olfactorische deel van het cavum nasi door, hiervan gescheiden door de zogenaamde lamina terminalis, een zijwaartse uitstulping van het neuseptum aan beide zijden tot aan de laterale neuswand. De rat heeft als enige

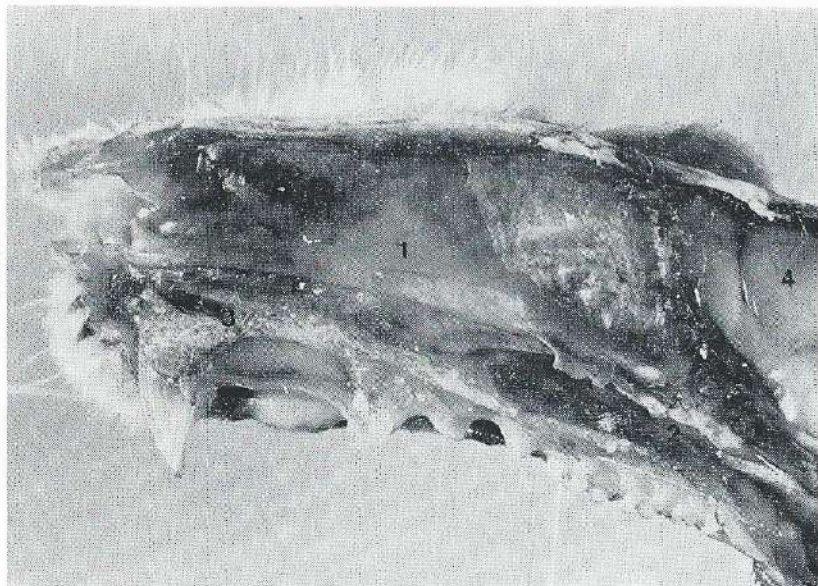


fig. 3.1a. Paramediane doorsnede. 1. neusseptum; 2. ductus pharyngeus; 3. canalis incisivus; 4. cerebrum.

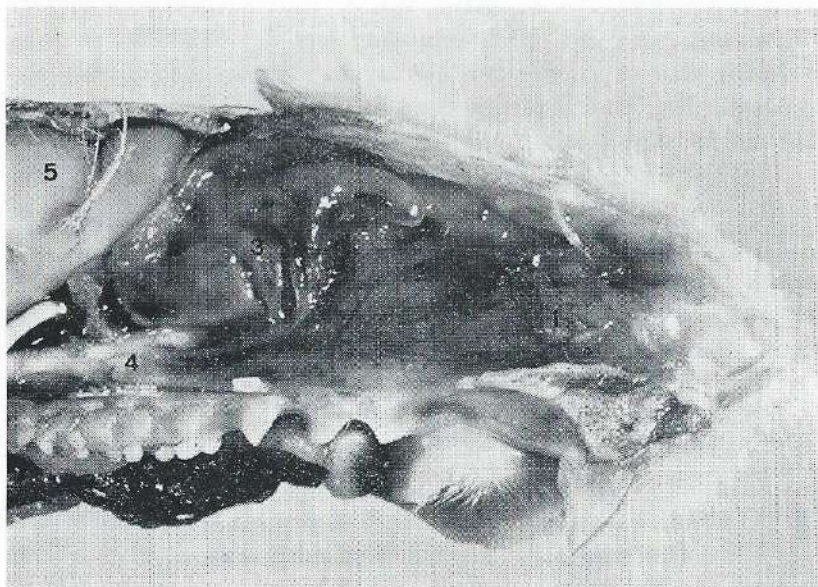


fig. 3.1b. Laterale neuswand. 1. concha maxillaris; 2. concha nasalis; 3. conchae ethmoidales; 4. ductus pharyngeus; 5. cerebrum.

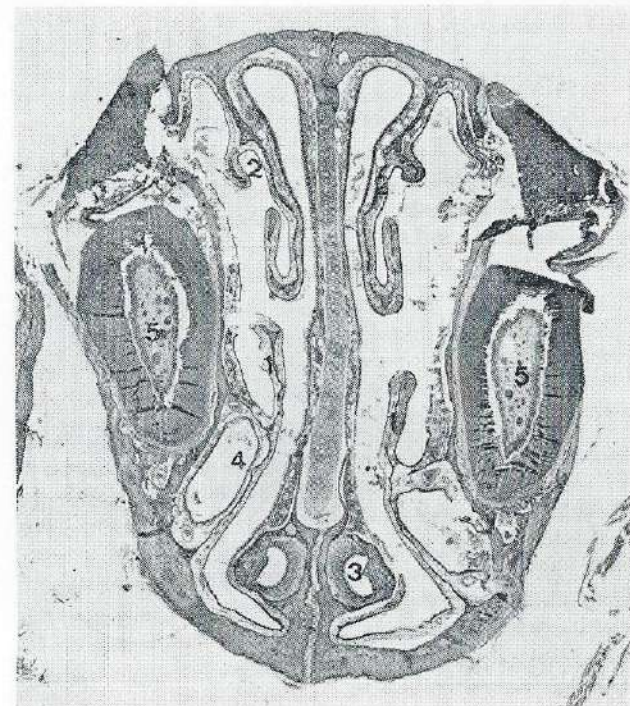


fig. 3.2. Dwarsdoorsnede neus regio respiratoria. 1. concha maxillaris; 2. concha nasalis; 3. organon vomeronasale (Jacobson); 4. ductus nasolacrimalis; 5. gebits-element. (HE obj. 4 x)

echte neusbijholte een sinus maxillaris. Deze heeft een zeer ruime verbinding met het cavum nasi op de overgang regio respiratoria en regio olfactoria. Het neusslijmvlies is rijk aan klierweefsel vooral in het olfactorische gebied waar zich de klieren van Bowman in de lamina propria bevinden.

3.3. MICROSCOPISCHE ANATOMIE

Het vestibulum nasi is bekleed met niet verhoornend plaveisel-epitheel. Het cavum nasi is voor wat betreft het respiratorische deel bekleed met trilhaarepitheel, één cellaag dik, met de celkernen in één of twee rijen. Aan de oppervlakte is het epitheel bekleed met trilharen die het neusslijm in de richting van de pharynx transporteren. Het respiratoire epitheel bekleedt het grootste gedeelte van de



fig. 3.3. Dwarsdoorsnede neus regio olfactoria. 1. conchae ethmoidales; 2. conchae obiectae van de conchae ethmoidales; 3. lamina terminalis; 4. ductus pharyngeus; 5. sinus maxillaris. (HE obj. 4 x)

concha maxillaris, de concha nasalis en het neusseptum. Soms bevindt zich ook aan de laterale kant van de conchae ethmoidales trilhaarepitheel van een respiratoir type, terwijl zich aan de mediale zijde van dezelfde conchae olfactorisch epitheel bevindt (fig. 3.4.). Het gebied van de conchae ethmoidales, het neusdak en bovenste gedeelte van het neusseptum is voornamelijk bekleed met olfactorisch epitheel. Vooral door elektronenmicroscopische onderzoeken zijn meer details bekend geworden over de bouw van het reukslijmvlies (Andres 1966 en Seifert 1970).

Op doorsnee kunnen, enigszins schematisch gezien, een aantal lagen worden onderscheiden. Direct op de basaal membraan treft men de basale cellen aan die volgens Andres en Seifert te onderscheiden zijn in donkere en lichte cellen. De heldere cellen zouden



fig. 3.4. Regio olfactoria. 1. olfactorisch slijmvlies; 2. respiratorisch slijmvlies. (HE obj. 25 x)

op jonge leeftijd een reservoir van neuroblasten vormen waaruit enerzijds donkere basale cellen en anderzijds vooral zintuigcellen zich zouden kunnen ontwikkelen. De donkere basale cellen omhullen de axonen van de zintuigcellen tot aan de basaalmembraan. De heldere cellen, die zich tot zintuigcellen ontwikkelen, nemen geleidelijk het karakter van een volwassen zintuigcel aan. Boven de laag van basale cellen bevinden zich de kernen van de reukcellen. Basaalwaarts ontspringt uit de reukcel een axon die zich tesamen met axonen van andere reukcellen verenigt tot de fila olfactoria.

Aan de andere kant ontstaat uit de reukcel een dendriet die eindigt in een reukknop van waaruit de reukharen ontspringen (fig. 3.5.). De reukharen zijn ingebed in een slijmfilm die het reukepitheel bedekt. De kernen van de steuncellen bevinden zich boven die van de zintuigcellen. De steuncellen zelf lopen van de oppervlakte tot aan de basaalmembraan en vormen het raamwerk voor het reukepitheel. Zij omgeven de zintuigcellen, de dendrieten en de axonen van deze cellen. Aan de oppervlakte eindigen de steuncellen vrij breed en dragen daar talloze microvilli. Het secret dat de steun-

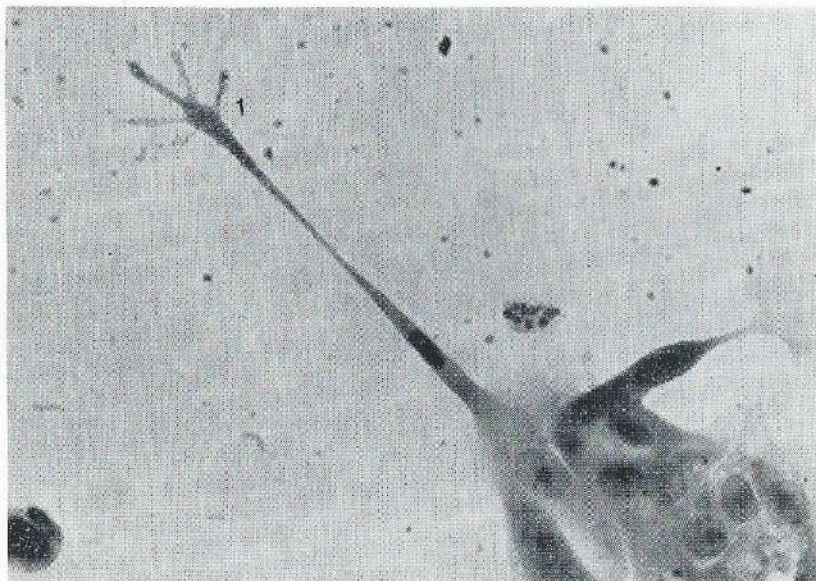


fig. 3.5. Reukcel (in weefselkweek) eindigend in reukknop (1). (HE obj. 100 x)

cellen zelf produceren komt in de intervillieuze ruimten terecht. De lamina propria bestaat uit losmazig bindweefsel met veel tubulo-acineuze klieren, de klieren van Bowman, bloedvaten en zenuwtakjes zowel van de nervus olfactorius, van de nervus trigeminus als van het autonome zenuwstelsel. Volgens Seifert (1970) zijn de klieren van Bowman gemengde klieren, waarin heldere en donkere kliercellen te onderscheiden zijn. De donkere cellen zouden een mucopolysaccharide bevattend secreet produceren. De klieren van Bowman produceren voornamelijk het slijm van de oppervlakkige slijmfilm waarin de reukharen zijn ingebed. Het gedeelte van de uitvoergangen van de klieren van Bowman, dat intra-epitheliaal gelegen is, bevat geen basaalmembraan, hetgeen zou wijzen op een functioneel sterke verbondenheid en eenzelfde oorsprong van zintuig- en klierepithel.

3.4. HISTOPATHOLOGIE VAN DE RATTENEUS: SPONTAAN EN EXPERIMENTEEL

3.4.1. Spontane afwijkingen

Wat betreft de spontane afwijkingen in de ratteneus wordt in de

literatuur veelvuldig verwezen naar de publikatie van Kelemen en Sargent (1946). Zij vonden bij 24 van de 40 uiterlijk gezonde proefdieren uitgebreide afwijkingen in de neus in de zin van ontstekingsinfiltraten, slijmophoping, bloeding en zelfs corpora aliena van plantaardige oorsprong. Een enkele maal werden granulaties op het neusseptum aangetroffen. In de literatuur worden geen spontane gezwellen in de neus vermeld (Kelemen en Sargent 1946, Jaffé 1931, Herrold 1964, Druckrey 1967). Bottema vond slechts bij 5 van de 33 dieren van 5-12 maanden oud, die als controledieren in zijn onderzoek hadden gediend, min of meer belangrijke afwijkingen. Slechts eenmaal vond hij een klein metaplastisch haardje in een gebied met respiratoir neusslijmvlies. Een verklaring voor het grote aantal afwijkingen die Kelemen en Sargent (1946) vonden, moet waarschijnlijk worden gezocht in de volgende factoren:

1. De leeftijd van de proefdieren op het moment dat ze gedood werden voor onderzoek. Oude proefdieren ($> 1\frac{1}{2}$ jaar oud) bleken in eigen onderzoek inderdaad vrij vaak spontane afwijkingen in de neus te hebben, vooral ontstekingsinfiltraten. Dit in tegenstelling tot de bevindingen van Bottema bij jonge dieren.
2. De huisvesting van de proefdieren:
 - a. Het is denkbaar dat ratten in groepsverband levend meer stofpartikeltjes (haren e.d.) inademen dan dieren die afzonderlijk gehuisvest worden.
 - b. Het is goed voorstelbaar dat bij huisvesting in kooien met een dichte vloer waarop b.v. zaagsel aanwezig is, gemakkelijker corpora aliena (b.v. houtstofpartikels) in de neus terecht komen dan bij huisvesting in kooien met metalen roosters als bodem.

In ons onderzoek werden jonge proefdieren gebruikt, die in metalen kooien met een roostervloer waren gehuisvest en geen contact hadden met b.v. zaagsel. Mogelijk is dit de verklaring van het feit dat zowel door Bottema als in eigen onderzoek veel minder spontane afwijkingen werden gevonden dan in het onderzoek van Kelemen en Sargent.

3.4.2. Experimentele pathologie

Uit de publikaties besproken in hoofdstuk 2.4. zal een samenvatting worden gegeven van de experimentele histopathologie van de neus van de rat en van de Syrische goudhamster. (Dit laatste proefdier werd door Herrold gebruikt; de bouw van de neus komt overeen met die van de rat).

Het respiratoire epitheel bleek meer resistent tegen de cytopathogene werking van DENA dan het olfactorisch epitheel. Doses DENA die een complete verwoesting gaven van het olfactorisch epitheel, lieten het respiratoir epitheel veel meer intact. Ook na staken van de toediening van DENA leek het respiratoir epitheel een groter regeneratievermogen te hebben dan het olfactorisch epitheel. Bij tijdelijke toediening van DENA waren de blijvende afwijkingen ook duidelijker in het olfactorische gebied dan in het respiratorische gebied.

De regio respiratoria. Hier werd desorganisatie van het trilhaar-epitheel tijdens de toediening van DENA gevonden: trilharen gingen verloren, de polariteit van de cellen verdween, de cellen gingen te gronde (fig. 3.6.). Vanuit de basale laag ontstond meerlagigheid van het epitheel met het aspect van plaveiselepitheel (metaplasie). (fig. 3.7.).

De proliferatie van het epitheel werd soms zo sterk dat er papilloomvorming optrad; zowel fungiforme als „inverted” papillomen werden waargenomen (fig. 3.8. en 3.9.).

De fungiforme papillomen waren meestal klein met een smalle steel. De „inverted” papillomen waren veel groter en door een uitbundige celvermeerdering leek er een invaginatie van het plaveisel-epitheel op te treden.

In de lamina propria werden meestal ontstekingsverschijnselen aangetroffen.

De regio olfactoria. Ook hier werd desorganisatie van het olfactorisch epitheel gevonden (fig. 3.10.). Bij hoge doseringen DENA trad een volledige verwoesting van het olfactorische epitheel op. Door verschillende onderzoekers werden metaplastische veranderingen gevonden: metaplasieën die leken in te stulpen of zich uit te breiden vanaf het oppervlak tot in de submuceuze klieren van Bowman (fig. 3.11.), soms zelfs met hoornparelvorming. In de lamina propria waren vaak sterke ontstekingsverschijnselen aanwezig.

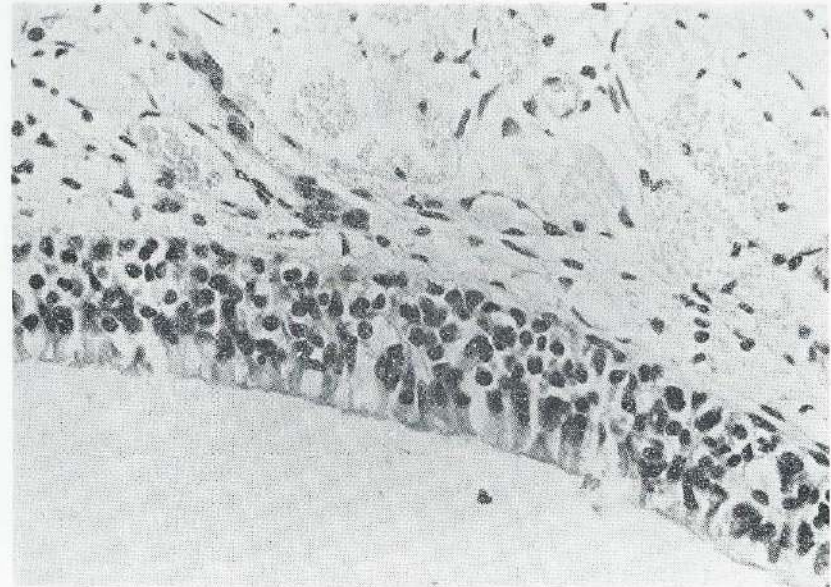


fig. 3.6. Desorganisatie regio respiratoria.

(HE obj. 40 x)

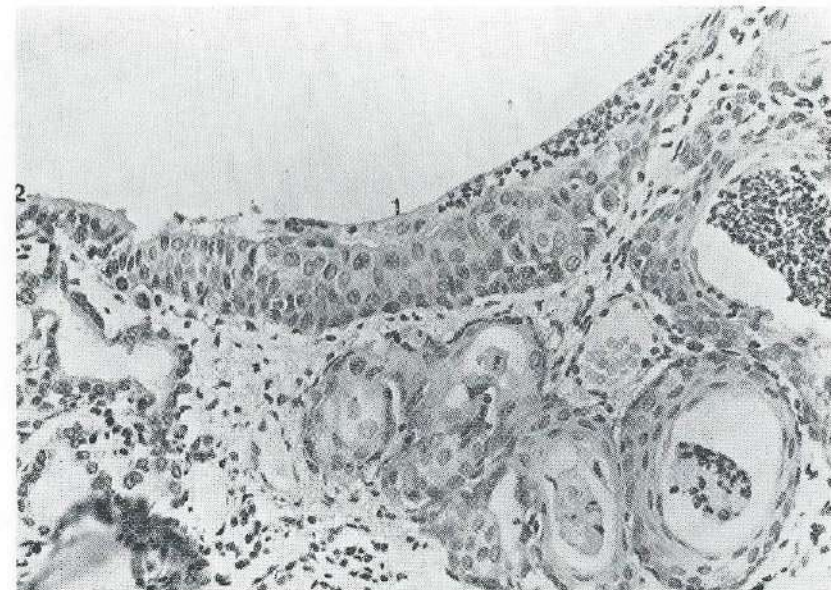


fig. 3.7. Metaplasie regio respiratoria. 1. metaplastisch epitheel; 2. respiratoir epitheel.

(HE obj. 25 x)

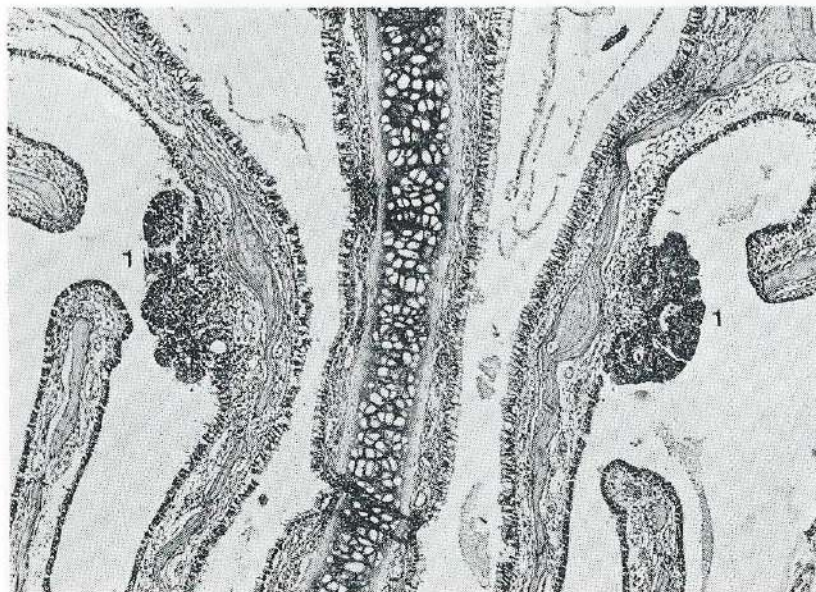


fig. 3.8. Fungiforme papillomen (1) regio respiratoria (opvallend is de symmetrie in lokalisatie). (HE obj. 4 x)

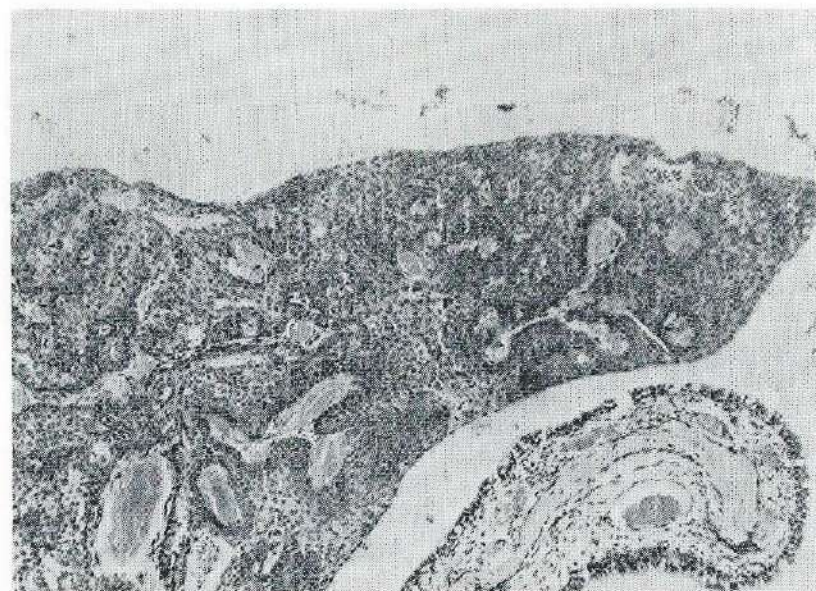


fig. 3.9. Inverted papilloom regio respiratoria. (HE obj. 10 x)

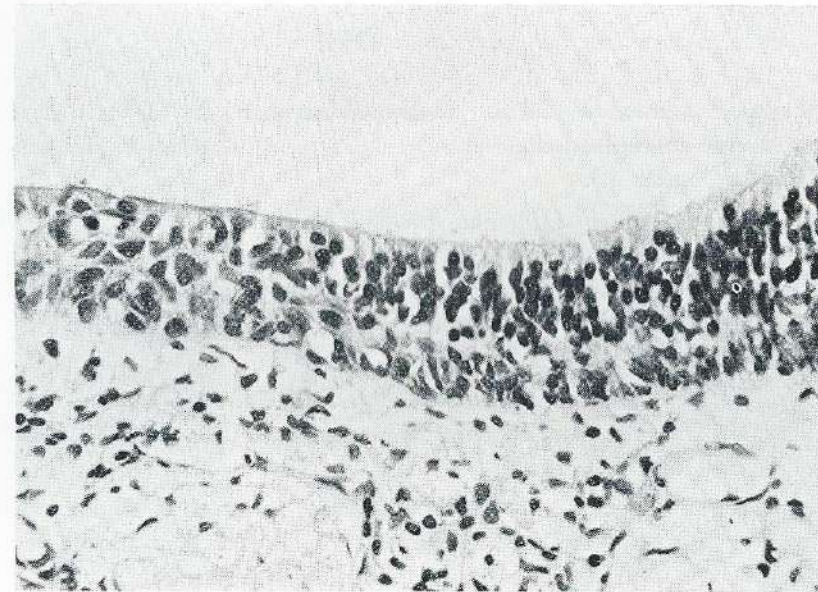


fig. 3.10. Desorganisatie olfactorisch epitheel. (HE obj. 40 x)

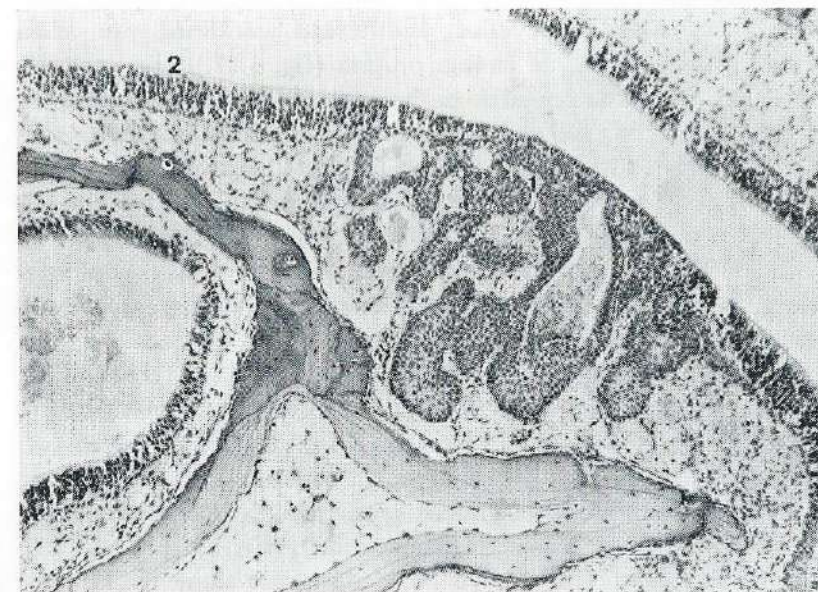


fig. 3.11. Regio olfactoria. Sterke metaplasie. 1. metaplasie oppervlakkig epitheel en klieren van Bowman; 2. olfactorisch epitheel. (HE obj. 10 x)

De volgende tumoren zijn beschreven:

1. *plaveiselcelcarcinomen* (Herrold 1964, Thomas 1965, Mennel e.a. 1974, Cardesa e.a. 1976). Bottema vond alleen een plaveiselcelcarcinoom uitgaande van de ductus nasolacrimalis en verder slechts uitgebreide metaplastische veranderingen, soms temidden van een ENE (zie onder 4.).

2. *adenocarcinomen* (Herrold 1964, Thomas 1965, Mennel e.a. 1974). Ook deze tumor werd niet door Bottema gezien, alhoewel er in de ENE's gedeeltes waren die soms een sterk „adenoachtige” structuur hadden. De cellen bevatten echter geen PAS-positief materiaal.

3. *ongedifferentieerde carcinomen* (Herrold 1963, Thomas 1965, Parviz Pour e.a. 1974). Mogelijk behoorden deze tumoren bij nadere diagnostiek onder 4. thuis.

4. *neuroepitheliale tumoren* (Herrold 1964, Thomas 1965, Druckrey 1967, Bottema 1971, Mennel e.a. 1974). Voorafgaande aan het ontstaan van deze tumoren zag Bottema in de basale laag van het olfactorisch epitheel sterke celwoekering: het optreden van lymfocytachtige cellen met donkere kleine ronde kernen met weinig cytoplasma en gelijktijdig of direct aansluitend woekering van cellen van hetzelfde type in de lamina propria (fig. 3.12.). Uit deze celnesten ontstaan waarschijnlijk de neuroepitheliale tumoren door de meeste auteurs als ENE geduid. Evenals in de menselijke pathologie (Berger 1924-1926, Bergéal 1970) zijn in de experimentele pathologie (Herrold 1964, Thomas 1965) verschillende typen neuroepitheliale tumoren bekend. Herrold onderscheidde twee typen:

1. een tumortype bestaande uit ophopingen van kleine lymfocytachtige cellen, chromatinerijke ronde kernen met weinig cytoplasma, geen mitosen en geen duidelijke architectuur (fig. 3.13).

2. een tumor met een geheel ander celtype, veel grotere cellen, dicht op een gepakt, grotere ronde tot ovale minder chromatinerijke kernen met een wolkig cytoplasma (fig. 3.14). In deze tumoren was vaak meer structuur aanwezig: de cellen bevonden zich in palissade stand, in rosetten (rond een lumen gerangschikt) of in pseudorosetten (rond een imaginair lumen gerangschikt). (fig. 3.15).

Door fibrovasculaire schotjes werd de tumor duidelijk in compartimenten verdeeld. Beide typen tumoren lieten vaak een destruc-

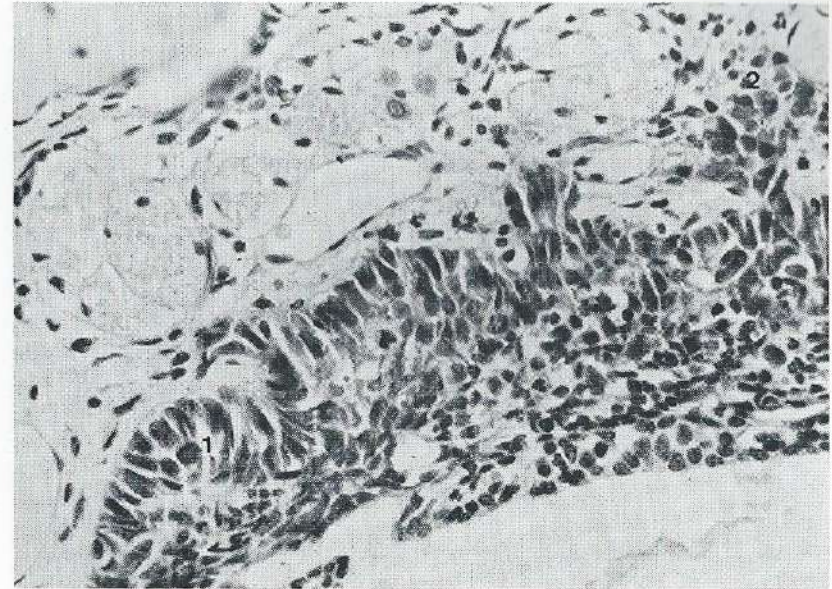


fig. 3.12. Celwoekering en atypie in regio olfactoria, zowel in epitheel (1) als in lamina propria (2). (HE obj. 40 x)

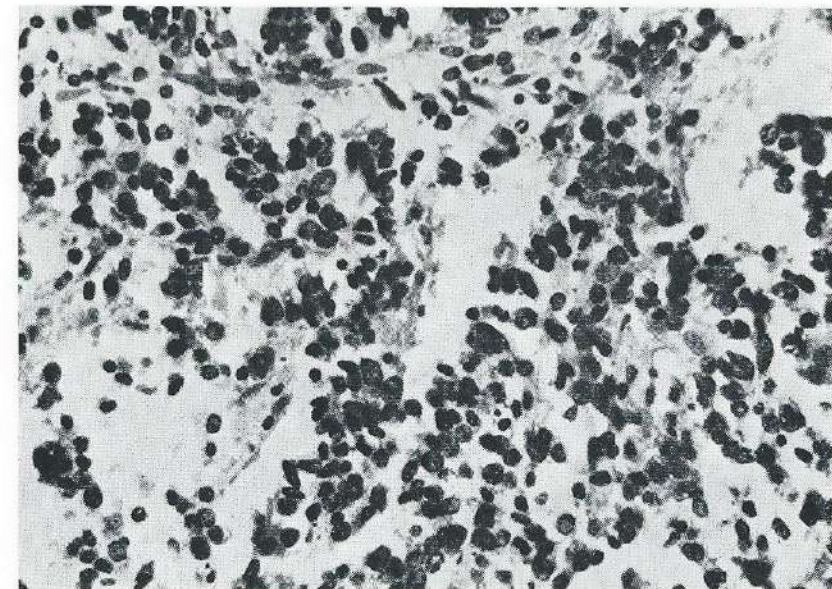


fig. 3.13. ENE - kleincellig type.

(HE obj. 40 x)

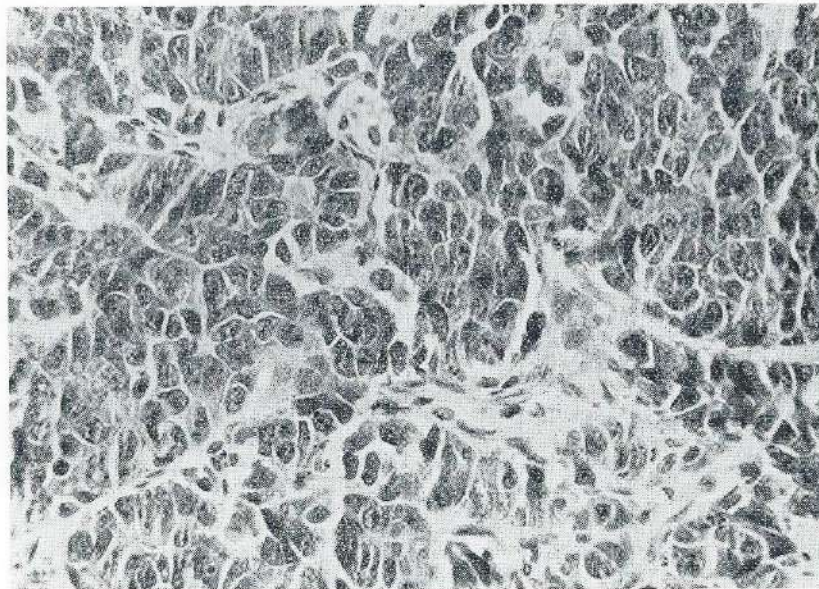


fig. 3.14. ENE - grootcellig type.

(HE obj. 40 x)

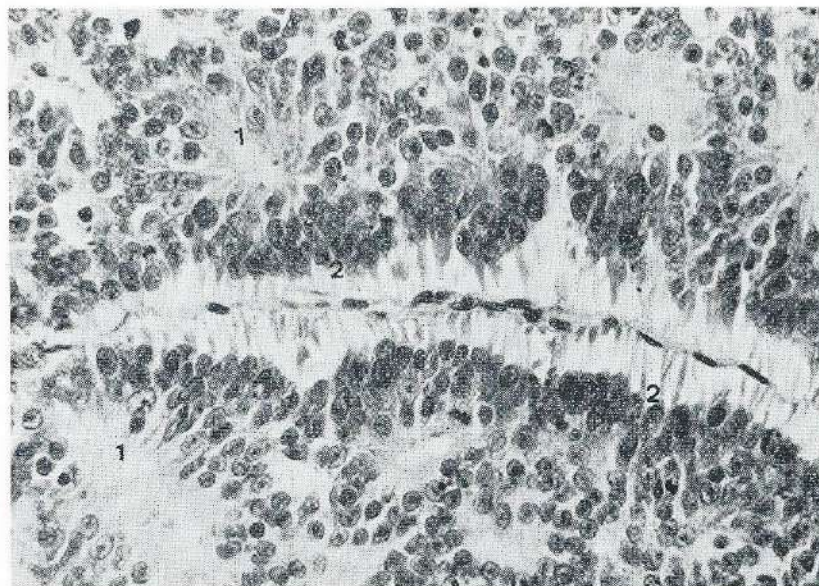


fig. 3.15. ENE. 1. rosetten; 2. cellen in palissaden stand.

(HE obj. 40 x)

tie van de lamina cribiformis zien met infiltratieve groei naar het cerebrum (fig. 3.16.). *Thomas* differentieerde de tumoren in:



fig. 3.16. ENE met een duidelijk infiltratieve groei naar het cerebrum. 1. ENE; 2. hersenweefsel.

(HE obj. 40 x)

a. *esthesioneurocytomen*, tumoren met rosetten en nieuwgevormde neurofibrillen.

b. *esthesioneuroblastomen* met vorming van pseudorosetten.

Bovendien onderscheidde hij een:

c. *ongedifferentieerd neuroblastoom* waarin totaal geen architectuur aanwezig was.

Bij veel dieren waren duidelijk mengbeelden van de verschillende tumortypes aanwezig. *Bottema* vatte de verschillende tumortypes samen onder de diagnose *esthesioneuroepitheliom*. De neuroepitheliale tumoren vertoonden weinig neiging tot metastasering. Slechts *Thomas* vermeldde één metastase in een regionale lymfeklier. Door *Bottema* werden geen metastasen gezien.

4. HUMANE NEUSTUMOREN EN EXPERIMENTELE NEUSTUMOREN

4.1. INLEIDING

Toediening van DENA aan Wistarratten deed in het neusslijmvlies benigne en maligne tumoren ontstaan, die histologisch grote overeenkomst vertonen met de tumoren in de neus die bij de mens worden aangetroffen. Deze overeenkomst blijkt vooral te bestaan tussen de benigne tumoren voornamelijk aanwezig in de regio respiratoria (fungiforme en „inverted” papillomata) en de benigne neustumoren bij de mens. Merkwaardigerwijze is deze overeenkomst wat betreft de maligne tumoren in de neus minder groot. *Bottema* vond in tegenstelling tot andere onderzoekers (zie hoofdstuk 2.4.) geen plaveiselcelcarcinomen en geen adenocarcinomen in de neus van de rat, maar wel neuroepitheliale tumoren. Om de experimentele en humane pathologie beter te kunnen vergelijken volgt hieronder eerst een beknopt overzicht van de oncologie van de neus en neusbijholten in de humane pathologie.

4.2. NEUS- EN NEUSBIJHOLTETUMOREN BIJ DE MENS

In veel leerboeken worden tumoren van de neus zowel als die van de neusbijholten tesamen besproken. Neus- en neusbijholtetumoren zijn vrij zeldzaam in verhouding tot het totaal aantal voorkomende tumoren: 0,2 % *Sisson* en *Goldstein* (1973), 0,5 % *Snow* (1973). Tumoren in dit gebied komen meer voor bij mannen dan bij vrouwen, verhouding 2 : 1 (*Kimmel* 1960). Voor het „inverted” papilloma is de geslachtsverhouding man : vrouw = 4 : 1 (*Osborn* 1970), 3 : 1 (*Hâot* en *Bienfait* 1969), 10 : 1 (*Belonje* en *Oey* 1972). Er zijn zeer veel typen tumoren in dit gebied gevonden. Een fraai overzicht geeft *Sisson* in het boek Otolaryngology van *Paparella* en *Shumrick* (1973)

De meest voorkomende neustumoren van *benigne* aard zijn:

1. plaveiselcelpapillomen.
2. „inverted” papillomen.
3. haemangiomen.

Van *maligne* aard zijn:

1. plaveiselcelcarcinomen.
2. adenocarcinomen.
3. maligne melanomen (*Kimmel* 1960, *Harrison* 1971).

De verhouding tussen het aantal plaveiselcelcarcinomen en adenocarcinomen is wisselend. *Kimmel* vond een verhouding 6 : 1. *Buchanan* en *Slavin* (1972) vonden opvallend veel adeno- c.q. adenocystic carcinomen in de neus en neusbijholten ten opzichte van het aantal plaveiselceltumoren, verhouding 1 : 1. *Harrison* (1971) vond geen adenocarcinomen in de neusholte.

Publikaties over neuroepitheliomen zijn schaars. *Bergéal* (1970) schat het aantal gepubliceerde gevallen op plm. 123. Volgens *Sisson* (1973) zouden minder dan 150 gevallen in de literatuur vermeld zijn. In Nederland is slechts eenmaal melding gemaakt van een geval van een esthesioneuroblastoom (*Broeker* 1955). Recente publikaties betreffende neuroepitheliale tumoren zijn o.a. van *Lewis* e.a. (1965), *Skolnik* e.a. (1966), *Silcox* (1966), *Bradshaw* (1967), *Kolze* (1968), *Cervellera* e.a. (1969), *Rasquin* en *Fiévez* (1970), *Bergéal* (1970), *Bernard* (1970), *Vakil* e.a. (1971), *Schenck* (1972), *Sabéti* e.a. (1973), *Friedmann* (1974), *Baily* e.a. (1975).

De tumor komt mogelijk vaker voor dan het aantal gepubliceerde gevallen doet vermoeden. Waarschijnlijk wordt bij histologisch onderzoek niet altijd de juiste diagnose gesteld.

De prognose van deze tumoren bij de mens is relatief goed, meestal is er een zeer langzame groeineiging. De wijze van groei is te vergelijken met het adenocystic carcinoma (het z.g. cilindroom): de tumor drukt nabijgelegen structuren opzij of infiltreert hierin. Metastasen zijn vrij zeldzaam maar komen voor. Tienjaarsoverlevingen zouden talrijk zijn (*Bergéal* 1970).

Recidieven zijn echter ook na 10 jaar nog mogelijk.

4.3. MOGELIJKE ETIOLOGISCHE MOMENTEN BIJ DE HUMANE NEUSTUMOREN

Shaw, in het boek „The prevention of Cancer” (*Roe* en *Raven* 1967), noemt als factoren:

1. trauma
2. snuifgebruik
3. chemicaliën en stof
4. rook
5. chronische ontsteking
6. bestraling
7. virussen

ad 1. Verschillende auteurs vermelden patienten met een neustrauma in de anamnese (Kimmel 1960, Bourquet e.a. 1971). Uiteraard kan een trauma bij een patient met een tumor in dit gebied een coïncidentie zijn.

ad 2. Keen e.a. (1955) berichten over het grote aantal ethmoidomaxillaire tumoren bij Bantoes en zij menen dat er een relatie bestaat tussen het gebruik van een bepaalde snuif en het ontstaan van tumoren in deze regio. Snuif kan aanzienlijke hoeveelheden koolwaterstoffen bevatten met mogelijk carcinogene werking. Bij sommige Bantoe- en Zoeloestammen in Zuid-Afrika komen in een hoog percentage neusbijholtumoren voor (6 % van het totaal aantal voorkomende tumoren). Bij de Europese bevolking in dat land is dit percentage slechts 0,2 %.

ad 3. Het is reeds lang bekend dat er een verband bestaat tussen langdurige blootstelling aan lucht die chromaten, arseen- of nikkelverbindingen bevat en het ontstaan van neus- of longkanker. Nikkel bleek in al zijn verbindingen bij dieren carcinogeen te werken en veroorzaakte voornamelijk longtumoren. Doll (1958) vermeldt dat van een groep van 200 in de nikkelindustrie werkzame arbeiders er 48 aan long- en 13 aan neustumoren stierven. Dit betekent een 150 x zo groot risico voor het krijgen van een neustumor en een 5 x zo groot risico voor het krijgen van een longtumor.

In de meeste industrieën zijn sinds het bekend worden hiervan afdoende maatregelen genomen om de aldaar werkzame arbeiders te beschermen tegen invloed van mogelijk carcinogene stoffen. Sedert enkele jaren is er weer opnieuw belangstelling ontstaan voor exogene factoren in het ontstaan van neustumoren, sinds er opgemerkt werd dat neustumoren vaker bij mensen voorkwamen met bepaalde beroepen.

Acheson e.a. (1967) berichten over het grote aantal adenocarcinomen in de neus bij arbeiders in de houtindustrie en wel speciaal bij de arbeiders die jaren in een stoffige omgeving hadden gewerkt. Harde houtsoorten en met name het Afrikaanse mahoniehout, zouden voor het ontstaan van deze tumoren verantwoordelijk c.q. mede-verantwoordelijk geweest zijn. Afrikaans mahoniehout werd en wordt ook door Bantoes gebruikt voor het bereiden van hun snuif. Deze houtsoort wordt ook gebruikt bij het maken van vuur

door inboorlingen in Kenya. Bij deze mensen worden vaak plaveiselcelcarcinomen in de nasopharynx gevonden. Adenocarcinomen in de neus zijn bij deze laatste groep zeldzaam.

Gignoux en Bernard (1969) vonden dat van 53 ethmoidtumoren er 17 voorkwamen bij houtbewerkers en wel 16 adenocarcinomen en 1 reticulosarcoom.

Debois (1969) vond bij 30 gevallen van neustumoren in een periode van 10 jaar (1958 - 1968) 14 tumoren bij arbeiders in de houtindustrie werkzaam en 2 bij schoenmakers. Zeer opvallend in zijn serie is het grote aantal adenocarcinomen en wel 20 van de 30 tumoren naast 7 plaveiselcelcarcinomen en 3 ongedifferentieerde tumoren.

Macbeth, Acheson en Hadfield (1969) komen op grond van hun onderzoek tot de conclusie dat er een causale samenhang moet bestaan tussen adenocarcinomen van het ethmoid en het werken in de houtindustrie. Het lijkt hen het meest waarschijnlijk dat het fijne stof vrijkomend bij de behandeling van harde houtsoorten voor de carcinogene werking verantwoordelijk moet worden gesteld. Vernissen, lakken en andere polijststoffen bleken niet bij de carcinogene betrokken te zijn.

Acheson e.a. (1970) namen waar dat ook bij leerbewerkers meer neustumoren voorkwamen: in een serie van 46 patienten met een neuscarcinoom waren er 21 in de lederwarenindustrie werkzaam of werkzaam geweest. In Northamptonshire in Engeland troffen zij neustumoren aan bij arbeiders die in deze industrie in een stoffige omgeving gewerkt hadden. Bij deze arbeiders werden wel adenocarcinomen gevonden, echter plaveiselcelcarcinomen en overgangcelcarcinomen kwamen vaker voor. De auteurs veronderstellen dat mogelijk 2 carcinogene factoren in deze industrie aanwezig zijn. c.q. waren en wel één voor de ontwikkeling van het neusadenocarcinoom met een door hen berekende latentietijd van plm. 54 jaar en één voor het ontstaan van plaveiselcelcarcinomen met een latentietijd van plm. 40 jaar. Van de 26 patienten waarbij dit nog was na te gaan bleken 8 snuifgebruikers te zijn geweest. De rol van het gebruik van snuif bij het ontstaan van tumoren in de neus is (nog) niet duidelijk.

Delemarre en Themans (1971) berichten over een na-onderzoek betreffende het patientenmateriaal van het Antoni van Leeuwen-

hoek Ziekenhuis te Amsterdam tussen 1944 en 1967. In deze periode werden 16 patiënten met een adenocarcinoom in de neus gezien. Indeling naar beroep: 11 patiënten waren houtbewerkers, 3 patiënten waren niet in de houtindustrie werkzaam geweest en van 2 patiënten was het beroep niet na te gaan.

Elders werden in Nederland in dezelfde periode 42 patiënten met een adenocarcinoom in de neus gezien. Van 26 patiënten was het beroep bekend en 13 van deze patiënten waren houtbewerker geweest.

Andrews en Michaels (1967) berichten over 3 nasopharynxcarcinomen bij z.g. bospiloten. Deze piloten maken kleine vluchten op lage hoogte met veel landen en opstijgen. De auteurs zien in de frequente drukwisselingen in de rhinopharynx en tuba Eustachii een mogelijke oorzaak voor het ontstaan van de tumoren in deze drie gevallen.

Bottema en Donner (1973) opperen als mogelijkheid dat het vliegen over bosgebieden een rol zou kunnen spelen bij het ontstaan van deze tumoren. Evenzeer dient overwogen te worden dat ook inademing van uitlaatgassen van deze eenmotorige vliegtuigjes verantwoordelijk zou kunnen zijn.

Nasopharynx tumoren komen betrekkelijk veelvuldig voor in het Chinese district Kanton (*Fong en Walsh* 1971). Een belangrijk bestanddeel van de voeding van de mensen in die streek is gezouten vis. In de gezouten vis werden door genoemde auteurs sporen DMNA en DENA aangetroffen. Mogelijk zijn nitraatreducerende bacteriën in de ingewanden van de vissen, welke vóór het inzouten niet worden geëlimineerd, verantwoordelijk voor de vorming van nitrosamines. Deze nitrosamines zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor het ontstaan van nasopharynx tumoren.

ad 4. *Sisson* (1973) vond dat bijna alle patiënten met neus- en neusbijholtetumoren forse rokers waren. *Clifford* (1960), geciteerd door *Shaw* (1967), vermeldt een tienmaal zo vaak voorkomen van neus en neusbijholtetumoren bij Afrikanen in Kenia als bij Europeanen aldaar. Hij ziet als oorzaak het chronisch inhaleren van benzinedampen en speciaal houtrook in de hutten.

ad 5. In de literatuur wordt vaak vermeld dat een vrij groot aantal patiënten met tumoren in dit gebied een voorgeschiedenis

heeft van een chronische rhinitis c.q. sinusitis. *Frazell* (1963) trof dit in plm. 50 % van de gevallen aan. Andere auteurs betwijfelen de relatie (*Harrison* 1971). Voor de lagere luchtwegen is wel aangetoond dat een chronische ontstekings situatie zoals voorkomend bij CARA-patiënten een duidelijk grotere kans geeft op het ontstaan van een plaveiselcelcarcinoom van de bronchi (*Van der Wal* 1964).

ad 6. Het carcinogene effect van röntgenstralen is sedert lang bekend en behoeft in dit verband geen verdere toelichting.

ad 7. Met name sinds de publikatie van *Burkitt* (1958) betreffende het maligne lymfoom, het z.g. Burkitt-lymfoom in de kaak bij inlandse kinderen in Oeganda en het aantonen van een mogelijke virusetiologie van deze aandoening, is de belangstelling voor virussen als etiologisch moment op het gebied van tumorvorming in de neus en neusbijholten sterk toegenomen. *Miller e.a.* (1971) vonden bij 14 van de 19 patiënten met een nasopharynxcarcinoom een hoge titer antilichamen tegen het zogenaamde Epstein-Barr virus (E.B.-virus).

Door *Hilgers* (1976) werd een verhoging van de antilichaamtiter gevonden bij het nasopharynxcarcinoom tegen alle drie de E.B.V. antigenen.

4.4. BENIGNE NEUSTUMOREN BIJ MENS EN RAT: DE VERSCHILLEN

Van de talrijke benigne tumortypes die bij de mens voorkomen, werden in het dierexperiment eigenlijk alleen de papillomen gezien en wel vooral het „inverted” papilloom. Histologisch zijn de benigne tumoren bij de rat en de mens praktisch identiek. Het is echter wel de vraag of het biologisch gedrag ook gelijk is. De „inverted” papillomata bij de mens hebben sterke neiging tot recidiveren na verwijdering en men moet hier steeds bedacht zijn op maligne ont-aarding. De kans hierop zou liggen, afhankelijk van de geraad-plaagde literatuur, tussen de 4½ en 13 % (*Hâot en Bienfait* 1969).

Bottema had de indruk dat experimenteel opgewekte papillomen in regressie konden gaan. Hij zag n.l. bij de dieren die slechts gedurende een beperkte tijd DENA kregen, enkele maanden na het staken van de toediening hiervan, een teruggang van de papillomen. In eigen onderzoek werd deze indruk bevestigd. Dit bleek niet het geval te zijn bij dieren met een voortgezette toediening van DENA.

Men zou kunnen veronderstellen dat het blijven bestaan van een papilloom soms afhankelijk is van het voortduren van de toediening van het carcinogene agens.

4.5. MALIGNNE NEUSTUMOREN BIJ MENS EN RAT: DE VERSCHILLEN

Dat subcutane toediening van het carcinogene agens DENA (en andere nitrosamines) bij Wistarratten en Syrische goudhamsters in een zo hoog percentage neustumoren doet ontstaan, is op zich reeds een zeer bijzonder feit. DENA vertoont bij de Wistarrat naast een zeer sterke organotropie voor de lever blijkbaar ook een grote voorkeur voor het neusslijmvlies. In de humane pathologie bleek dat bij bepaalde bevolkingsgroepen, waarschijnlijk ten gevolge van exogene factoren, het aantal neustumoren ten opzichte van het totaal aantal voorkomende tumoren sterk kan stijgen (zie 4.3.). Bij de mens wordt dan meestal gedacht aan een direct van buitenaf op het neusslijmvlies inwerkende faktor, terwijl DENA een organotropie voor de neus bezit onafhankelijk van de wijze van toediening.

In tegenstelling tot de menselijke pathologie, waar alle neurogene gezwellen van de neus en neusbijholten tesamen slechts 3 % van het totaal aan tumoren in deze regio uitmaken (*Dibble en Brown 1961*), worden bij de rat onder invloed van DENA veelvuldig ENE's aangetroffen. Andere onderzoekers vermelden (*Druckrey 1964, Herrold 1964, Thomas 1965*) weliswaar ook ENE's maar toch vooral ook plaveiselcel- en adenocarcinomen. Zoal niet uitsluitend, zeker komen neuroepitheliale tumoren in de neus in het dierexperiment in een veel hoger percentage voor ten opzichte van de andere tumoren in dit gebied dan dit bij de mens het geval is.

De lokalisatie van de tumoren is eveneens verschillend. Bij de mens treffen we zowel in het cavum nasi als in de neusbijholten maligne tumoren aan. De verhouding neustumoren / neusbijholtetumoren wisselt enigszins. *Harrison (1971)* vond tweemaal zoveel maligne tumoren in de bijholten als in het cavum nasi. Bij het patiëntenmateriaal dat in het AZVU vanaf 1963 tot en met 1972 is gezien, ligt de verhouding ongeveer 1:1, maar het betreft hier slechts een klein aantal patiënten (26). Het trilhaarepitheel van de sinus maxillaris bij de rat is histologisch praktisch gelijk aan het respiratoire epitheel van het cavum nasi. De sinus maxillaris heeft

bovendien een vrij ruime verbinding met het cavum nasi. Des te opvallender is het dat in de sinus maxillaris geen tumoren ontstaan bij toediening van DENA. *Bottema* veronderstelt dat de oorzaak ligt in het feit dat onder het epitheel van de neusbijholten niet de typische klieren van Bowman aanwezig zijn. Hij neemt immers aan dat het carcinogene agens door deze klieren uitgescheiden wordt en zo in het neusslijm terecht komt, van waaruit het zijn werking op de oppervlakkige cellen van het neusslijmvlies zou uitoefenen.

4.6. MOGELIJKE OORZAKEN VAN DE VERSCHILLEN

Gezien de onder 4.4. en 4.5. besproken verschillen tussen de humane en experimentele pathologie lijkt het zinvol een aantal mogelijke oorzaken van deze verschillen te overwegen.

4.6.1. Sterke carcinogene werking van DENA

DENA bleek in de gebruikte doseringen niet alleen cytotoxisch maar vooral ook sterk carcinogeen voor het neusslijmvlies te zijn. Het is zeer onwaarschijnlijk dat de mens gedurende langere tijd met een zo hoge concentratie van een zó sterk carcinogeen agens in aanraking komt.

4.6.2. Inductietijd

De dosering van het gebruikte agens DENA is zodanig dat er reeds na een korte inductietijd nieuwvorming optreedt met een voorkeur voor het ontstaan van lever- en neustumoren. Deze korte inductietijd zou invloed kunnen hebben op het histologisch type van de tumoren. Zo is het denkbaar dat bij een langere inductietijd eerst histologische veranderingen optreden b.v. uitgebreide metaplasieën, en uiteindelijk geen neuroepitheliale tumor maar een plaveiselcelcarcinoom of een adenocarcinoom ontstaat. Het onderzoek van *Druckrey en Landschütz (1971, zie 2.4.1.)* zou hiervoor pleiten.

4.6.3. Toestand neusslijmvlies

Voor het dierexperiment worden over het algemeen jonge gezonde proefdieren genomen die meestal een gezond neusslijmvlies hebben (zie 3.4.1.). In ieder geval zijn metaplastische veranderingen zeer zeldzaam. (*Bottema*).

In de menselijke pathologie echter zijn mogelijk in veel gevallen al geruime tijd histologische veranderingen aanwezig b.v. een meta-

plasie van respiratoir epitheel alvorens het tot een carcinomateuze degeneratie komt. *Shaw* (1967) is van mening dat in een gebied met metaplasie van het respiratoire slijmvlies een grotere kans bestaat op een maligne degeneratie.

4.6.4. Het aantal factoren

In het dierexperiment wordt één carcinogene factor gebruikt, terwijl in het milieu van de mens - milieu in de ruimste zin van het woord - vermoedelijk nog een groot aantal onbekende en half bekende factoren aanwezig zijn die het ontstaan van kanker bij de mens mede zouden kunnen bepalen (*Den Engelse* 1972). Enkele bekende carcinogene substanties bij de mens zijn: roet, teer, 2-naftylamine, benzidine nikkilverbindingen, asbest, tabaksrook (?). Bij de exogene carcinogene factoren dienen naast de chemische stoffen ook radioactieve straling en tenslotte virussen (?) genoemd te worden.

4.6.5. De anatomische bouw van de neus

De ratten hebben een sterk ontwikkeld reukorgaan (macrosmaat) en relatief een groot oppervlak is bekleed met olfactoïr epitheel. Het ethmoidale gedeelte van de neus bij de rat wordt voornamelijk bekleed met olfactorisch epitheel en is anatomisch van een wezenlijk andere structuur dan het ethmoid van de mens (microsmaat, zie 3.2.).

4.6.6. De leeftijd

De ratten in dit dierexperiment, evenals die in het experiment van *Bottema*, waren jong volwassen, plm. drie maanden oud, toen zij voor het eerst DENA toegediend kregen.

In de menselijke pathologie is bekend dat op jeugdige leeftijd maligne tumoren vaak van een ander type zijn dan op oudere leeftijd. Neus- en neusbijholtetumoren komen bij de mens meestal op oudere leeftijd voor. Het neuroepitheloom komt het meest voor tussen het tiende en veertigste jaar (*Skolnik* e.a. 1966).

Het zou denkbaar zijn, dat, indien men als proefdieren niet ratten van drie maanden oud neemt maar van plm. 1½ jaar oud, deze oudere dieren met een ander type tumorvorming reageren dan jonge proefdieren. (Zie *Reuber* en *Lee* 1968, *Terracini* en *Testa* 1970).

5. CO-CARCINOGENESIS*

5.1. CO-CARCINOGENESIS ALGEMEEN

De term co-carcinogenesis is in 1938 door *Shear* in de oncologie geïntroduceerd. Volgens *Salaman* (1958) wordt de term gebruikt voor het verschijnsel dat een tumor ontstaat door werking van meer dan één agens. De agentia kunnen tegelijkertijd of achtereenvolgens hun werking uitoefenen. *Berenblum* (1969) beschrijft co-carcinogenesis als een proces dat zich uit in een toename van het aantal tumoren of in een verkorting van de latentietijd of in beide. Factoren die een carcinogenetisch proces in positieve zin beïnvloeden, zijn aldus als co-carcinogene factoren aan te merken. De aard van deze factoren kan zeer verschillend zijn. *Berenblum* (1969) noemt een aantal mogelijkheden:**

1. *Additie*: de co-carcinogene factor bezit op zich eveneens een carcinogene activiteit.
2. *Synergisme*: het gezamenlijk effect van twee factoren is groter dan de som van hun afzonderlijke effecten.
3. *Twee factoren vullen elkaar aan*, d.w.z. de twee factoren hebben elk een incomplete carcinogene werking. In dit verband worden vaak de termen initiatie en promotie gebruikt, d.w.z. bepaalde carcinogenen veranderen hun „target cells” in een zogenaamd precarcinomateus stadium. Er ontstaat een latente tumorcel. Een voorbeeld van een dergelijke stof is 3,4-benzpyreen. Na deze initiële verandering van een cel c.q. een celtgroep kan een tweede factor een zogenaamd „promoting” effect hebben. Dat wil zeggen dat de cellen die in een precarcinomateus stadium verkeren geactiveerd worden en een tumor doen ontstaan. Uit dit soort proeven is men gekomen tot de zogenaamde twee-stadia theorie. Als de „promoting-factor” wordt toegediend voor de „initiating factor” dan heeft de eerstgenoemde geen effect. Alleen na of gelijktijdig met een „initiating factor” ontplooit de „promoting factor” zijn werking.

* In de literatuur wordt ook de term syncarcinogenesis gebruikt (b.v. *Schmähl* c.s. zie 5.2.1.1.).

** Terecht merkt *Eulderink* (1971) op dat de door *Berenblum* genoemde manieren van beïnvloeding deels nauwverwant zijn en elkaar soms overlappen.

4. *Preparatie*, d.w.z. voorbereiding van het weefsel. Een voorafgaande a-specifieke faktor maakt het weefsel gevoeliger voor de inwerking van de andere, wèl carcinogene, faktor.
5. *Permissieve werking*. Door de ene faktor wordt de toegankelijkheid van een gebied voor de andere faktor bevorderd, b.v. de ene faktor werkt als oplosmiddel voor de andere faktor, beïnvloedt de snelheid van absorptie van het carcinogeen in de cel of wijzigt het metabolisme van het carcinogeen, waardoor de omzetting en/of uitscheiding van de stof wordt beïnvloed.
6. *Beïnvloeding van virale werking* die eventueel betrokken is bij het carcinogene proces. Bijvoorbeeld door inwerking op het virus (activeren) of door een vermindering van de afweer van het lichaam ten opzichte van het virus.
7. *Invloed op de levensomstandigheden van de tumor*, b.v. een bevordering van de tumorgroei door invloed op de hormonale status bij tumoren die afhankelijk zijn voor hun groei van hormonen, of een groei-bevordering door invloed op de afweer-reaktie van het lichaam ten opzichte van de tumor.

Uit proeven met behulp van co-carcinogenen zowel „initiators” als „promotors” is duidelijk geworden dat bij de tumorontwikkeling zeer waarschijnlijk meer dan één en vaak veel factoren betrokken zijn en dat de overgang van normale cel naar tumorcel niet een eenvoudig alles of niets gebeuren is, maar een polyfasisch proces (*Den Engelse* e.a. 1969/1970). Er zouden verschillende somatische mutaties nodig zijn voordat er een tumorcel ontstaat (*Friedrich-Freksa* 1969).

Voor een overzicht betreffende co-carcinogenesis en co-carcinogenetische proeven zie o.a. *Salaman* (1958), *Clayson* (1962), *Salaman* en *Roe* (1964), *Roe* en *Rowson* (1968), *Berenblum* (1969), *Van Duuren* (1969) en *Van Duuren* en *Melchionne* (1969). Tenslotte zij nog vermeld het werk van *Eulderink* (1971). Hij toonde aan dat twee fysische factoren, n.l. chronische mechanische irritatie in een tandkas door middel van een geïnplanteerde nylon- of staaldraad en röntgenbestraling op dit gebied, tesamen hier meer carcinomen bij muizen deden ontstaan dan één van deze beide factoren afzonderlijk.

5.2. CO-CARCINOGENESIS EN NITROSAMINES (m.n. DENA)

5.2.1. Overzicht van de betreffende literatuur

5.2.1.1. Schmähl c.s.

Over co-carcinogenese en nitrosamines is vooral gepubliceerd door *Schmähl* c.s. (1963, 1964, 1965a + b, 1966, 1970). De onderzoeken van genoemde auteurs betroffen speciaal de beïnvloeding van het ontstaan van levertumoren onder invloed van DENA. Verschillende co-factoren werden gebruikt. 4-dimethylamino-azobenzol gaf tesamen met DENA een positief co-carcinogenetisch effect te zien. Stompe levertraumata beïnvloedden de carcinogenese niet (*Schmähl* 1963).

Urethaan en 9,10 dimethyl 1,2 benzanthraceen hadden geen invloed op de werking van DENA (*Schmähl* 1964).

Aethylalcohol beïnvloedde de tumorvorming in de lever onder invloed van DENA niet. Wel had tetrachloorkoolstof (CCL₄) een sterk co-carcinogeen effect: voor tumorvorming in de lever was een kleinere totaal dosis DENA nodig (*Schmähl* e.a. 1965a).

4-Dimethylaminostilben, een stof die bij ratten plaveiselcelcarcinomen in de gehoorgang kan doen ontstaan, gaf in relatief hoge doseringen een positieve beïnvloeding van de carcinogenese van levertumoren onder invloed van DENA (*Schmähl* e.a. 1965b).

Röntgenbestraling - 320 Rad totale lichaamsdosis bij Wistarratten van plm. 3 maanden oud - beïnvloedde de carcinogene werking van DENA niet (*Schmähl* e.a. 1966).

Toediening van een viertal carcinogenen (4-dimethylaminobenzeen, DMNA, DENA en nitrosomorfolin) gaven, in een zodanige dosering dat ze elk voor zich geen tumoren tijdens een rattenleven doen ontstaan tesamen wel aanleiding tot het ontstaan van levertumoren: een duidelijk additief effect (*Schmähl* e.a. 1970).

5.2.1.2. Enkele andere auteurs

Aethylalcohol bleek een co-carcinogene werking bij ratten op het ontstaan van oesofagus- en voormaagtumoren te hebben bij toediening van DENA, maar bleek geen invloed op de carcinoomvorming in de lever te bezitten (*Gibel* 1967).

Benzpyreen en DENA vertoonden een duidelijk positief effect op de carcinogenese in de luchtwegen bij hamsters (*Montesano* e.a. 1968b).

V. Kordač e.a. (1969) berichtten over een toename van het aantal levercarcinomen onder invloed van DENA en het intraperitoneaal toedienen van het Motol-virus*.

Chlooramfenicol had geen invloed op de levertumorfoming onder invloed van DENA (*Alonso* 1970).

Montesano e.a. (1970b) namen bij hamsters waar dat subcutane injecties van DENA gevolgd door indruppelen in de trachea van ferrioxijde (Fe_2O_3) aanleiding gaf tot een frekwenter voorkomen van broncho-alveolaire tumoren dan toediening van DENA alleen.

Cholesterol pellets operatief geïmplanteerd in de galblaas bij hamsters bleek de vorming van galblaascarcinoom bij toediening van DMNA te bevorderen (*Kowalewski* en *Todd* 1971).

Feron e.a. (1972) namen een co-carcinogene werking van ferrioxijde waar, wanneer deze stof tesamen met DENA in de trachea bij Syrische goudhamsters werd gedruppeld. Er werd een toename van het aantal tumoren in de lagere luchtwegen gezien.

Phorbol, een stof voorkomend in crotonolie en mogelijk verantwoordelijk voor de „promoting action” van het crotonolie bij de vorming van huidtumoren bij muizen, werkte als een „promoting” factor bij de carcinogenese in de lever en longen van jonge muizen waar DMNA als „initiating” factor was gegeven spoedig na de geboorte (*Armuth* en *Berenblum* 1972).

Infectie van de luchtwegen met influenza virus bleek een significante toename te geven van het aantal longtumoren bij muizen vergeleken met het aantal longtumoren gevonden bij toediening van DENA alleen (*Schmidt-Ruppen*, *Papadopulu* 1972).

Tetrachloorkoolstof (CCl_4), gegeven voorafgaande aan de toediening van een eenmalige dosis DMNA, bleek bij ratten het aantal lever- en niertumoren te doen toenemen (*Pound* e.a. 1973).

Bij de interpretatie van al deze gegevens moet de nodige voorzichtigheid worden betracht. Immers, *Stenbäck* e.a. (1973) vonden dat ook na indruppelen van 0,9 % NaCl-oplossing in de trachea

tesamen met subcutane toediening van DENA gedurende 12 weken, een toename van het aantal perifere longtumoren optrad vergeleken met het aantal tumoren dat ontstond bij subcutane toediening van DENA alleen.

In de literatuur werden geen mededelingen aangetroffen betreffende factoren met een co-carcinogene invloed op de vorming van neustumoren onder invloed van DENA.

5.2.2. Bespreking

Op grond van zijn eigen bevindingen komt *Schmähl* (1970) tot de conclusie dat co-carcinogenese alleen plaatsvindt wanneer carcinogenen met gelijksoortige werking gelijktijdig of achtereenvolgens inwerken. Hij vond geen co-carcinogenese wanneer lokaal werkende chemische carcinogenen b.v. koolwaterstoffen, of fysische agentia, zoals ioniserende straling, tesamen met algemeen werkende chemische carcinogenen werden toegediend.

Roe en *Rowson* (1968) daarentegen veronderstellen op grond van onderzoek van *Stoker* (1964) dat de effecten van ioniserende straling op cellen van dezelfde aard zijn als die van chemische carcinogenen. Bij een beoordeling van de co-carcinogenese verdient het aanbeveling de carcinogene prikkelsterkte van elk van beide factoren in aanmerking te nemen. Een totale lichaamsbestraling van 320 Rad, zoals *Schmähl* (1966) gebruikte bij drie maanden oude ratten, is waarschijnlijk een minder sterk carcinogene prikkel dan de toediening gedurende enige tijd van een zeer sterk werkzaam carcinogeen agens als DENA.

Ten opzichte van de invloed van de ene faktor is de invloed van de andere zeer klein en in het eindresultaat niet of niet significant aantoonbaar.

Op grond van deze overweging werd in de eigen experimenten de „sterke” faktor i.c. DENA slechts gedurende een beperkte tijd toegediend (waardoor deze faktor als „verzwakt” kan worden beschouwd). Daarnaast werd de totale röntgendosis verhoogd en deze werd bovendien slechts toegediend op een bestralingsveld dat alleen de neusrug van de rat besloeg (waardoor deze faktor als „versterkt” kan worden beschouwd).

* Het Motol-virus veroorzaakt bij muizen een acute hepatitis.

6. OVERWEGINGEN, HYPOTHESES EN VRAAGSTELLINGEN

6.1. OVERWEGINGEN

Voordat in 6.2. de hypotheses en vragenstellingen zullen worden geformuleerd, wordt eerst nog een samenvatting gegeven van de relevante gegevens uit de voorgaande hoofdstukken die in dit verband van belang zijn.

- DENA is een sterk carcinogeen agens met een uitgesproken organotropie voor de lever en de neus bij de albino Wistar-rat (2.1., 2.2. en 2.4.).
- DENA geeft na een bepaalde tijd in bepaalde doseringen bij ratten aanleiding tot het ontstaan van neustumoren. De tumoren kunnen histologisch zowel benigne als maligne zijn (2.4.4.).
- Het histologische beeld van de benigne neustumoren vertoont gelijkenis met bepaalde histologisch benigne neustumoren die ook bij de mens worden aangetroffen (4.4.).
- Bottema* nam als histologisch maligne neustumoren uitsluitend ENE's waar. Slechts eenmaal werd een plaveiselcelcarcinoom uitgaande van de ductus nasolacrimalis gezien (2.4.4.).
- De dierexperimentele resultaten van *Bottema* verschillen van die van andere auteurs wat het type van de gevormde tumoren betreft. Door andere onderzoekers werden ook plaveiselcel-, adenoma's en anaplastische carcinomen gevonden (2.4.1.-3.).
- Neuro-epitheliale tumoren zijn in de menselijke pathologie uiterst zeldzaam (*Sisson* 1973).
- Er zijn factoren bekend die de carcinogene werking van DENA versterken (co-carcinogenese 5.2.).

6.2. HYPOTHESES EN VRAAGSTELLINGEN

6.2.1. Fysische factoren

Hypothese:

Fysische op zich niet of niet sterk carcinogene factoren beïnvloeden de oncogenese in de ratteneus onder invloed van DENA.

Deze invloed betreft:

- de inductietijd van de tumoren
- het histologische type van de ontstane tumoren.

Bij de keuze van de fysische factoren voor het experiment zijn er een aantal mogelijkheden (5.2.). De twee volgende factoren werden gekozen:

irritatie van het neusslijmvlies door middel van een corpus alienum in het cavum nasi en een eenmalige röntgenbestraling van de neus.

6.2.1.1. Irritatie van het neusslijmvlies

Uit de humane pathologie is bekend dat een corpus alienum in de neus een chronische rhinitis in de omgeving van het corpus alienum doet ontstaan met vaak foetide rhinorrhoe. Bij een aantal ratten werd nagegaan of een corpus alienum, i.c. een nylondraad, in de neus een irritatie gaf van het neusslijmvlies. (Voor de techniek van de implantatie van een corpus alienum in de neus zie 7.1.1.). Rond het corpus alienum ontstond een duidelijke lymfo-plasmocytair infiltratie met desorganisatie van het epitheel en soms waren zelfs lichte metaplastische veranderingen in het epitheel aanwezig.

Vraagstelling: Wat is de invloed van irritatie door een corpus alienum op de carcinogenese van DENA in de neus?

6.2.1.2. Röntgenbestraling

Schmähl e.a. (1966) zagen geen invloed van een totale lichaamsbestraling met 320 Rad op de levercarcinogenese onder invloed van DENA.

Eulderink (1971) nam een co-carcinogeen effect waar van röntgenbestraling tesamen met een mechanische irritatie wat betreft tumorvorming in de tandkassen bij muizen. Daarom werd besloten in dit experiment alleen lokale röntgenbestraling op de neus te geven en wel in een dosering (500 Rad) welke overeenkwam met een door *Eulderink* gebruikte dosering. Deze is veel hoger dan de door *Schmähl* gebruikte dosis röntgenstralen (320 Rad) welke op het gehele lichaam werd gegeven.

Vraagstelling: Wat is de invloed van deze eenmalige röntgenbestraling in een dosis van 500 Rad op de carcinogenese van DENA in de neus?

6.2.2. Veranderingen in de anatomie en fysiologie van de neus

Hypothese:

Veranderingen in de neusademhaling ten gevolge van een eenzijdige belemmering hebben invloed op het ontstaan van tumoren in de ratteneus bij toediening van DENA.

De rat is een macrosmaat, o.a. weerspiegeld in het feit dat een groot deel van zijn neusslijmvlies bestaat uit olfactorisch epitheel (3.3.). DENA, subcutaan toegediend, komt na veneuze c.q. lymfogene afvoer in de longen terecht. Het eerste capillaire bed dat gepasseerd wordt is dat van de longalveoli waar een intensieve gaswisseling plaatsvindt. Alhoewel DENA niet overmatig vluchtig is (2.2.) is het zeer wel mogelijk dat een deel van de ingespoten hoeveelheid uit de bloedbaan in de longalveoli terecht komt en met de uitademingslucht wordt afgevoerd via bronchi, trachea en cavum nasi. In het neusgedeelte van de ademweg is de kans, dat DENA-moleculen in het neusslijm terecht komen, vrij groot. De oppervlakte van het neusslijmvlies is relatief groot door de schelpenstructuur in het cavum nasi (3.2.). Ook is de snelle fase van de trilhaarslag van het neusepitheel grotendeels tegengesteld aan de luchtstroomrichting bij expiratie (*Negus* 1958). Indien operatief één uitwendige neusopening afgesloten wordt, zal de in- en uitademing slechts via de andere neushelft kunnen geschieden. De afgesloten neushelft is een holte met slechts één afvoermogelijkheid via de ductus pharyngeus. In deze helft is slechts een geringe pendeling van lucht denkbaar. Vanuit de uitademingslucht zal nagenoeg geen DENA in deze neushelft terecht kunnen komen.

Uit de publikatie van *Druckrey* en *Landschütz* (1971) is bekend dat inhalatie van lucht, welke slechts 0,05 ppm methyl-butyl-nitrosamine bevatte, bij ratten aanleiding gaf tot zeer sterke beschadiging van het neusslijmvlies en uiteindelijk tot het ontstaan van plaveiselcelcarcinomen in de neus (2.4.1.). Het is denkbaar dat een zeer geringe concentratie van DENA in de uitademingslucht aanleiding kan geven tot tumorvorming in de neus.

Vraagstelling: Wat is de invloed van de afsluiting van één uitwendige neusopening op de carcinogenese van DENA in de neus homoen contralateraal?

7. PRAKTISCHE UITVOERING VAN DE EXPERIMENTEN

7.1. CO-FAKTOREN

7.1.1. *Corpus alienum in de neus*

Na enige inleidende experimenten betreffende het teweegbrengen van een chronische irritatie in de neus leek de volgende techniek goed te voldoen. Met behulp van 0,1 cc hypnorm* subcutaan werd het proefdier in een lichte narcose gebracht. Er werd een mediane lengteincisie over de neusrug gemaakt van 1 - 1½ cm lengte tot op het periost. Met een boor (ronde kop 3/0) werd links paramediaan plm. 0,3 - 0,4 mm voor de lijn die het midden van beide ogen verbindt een gat geboord door het benige dak van de neus. Een proleendraad (polypropyleen van de firma Ethicon) werd aan één uiteinde door hitte afgeplat. Een zo ontstane knopsplendvormige draad van 0,8 - 1 cm lengte werd door het boorgat in het cavum nasi links gelegd met de knop op het boorgat rustend (fig. 7.1.). Ter

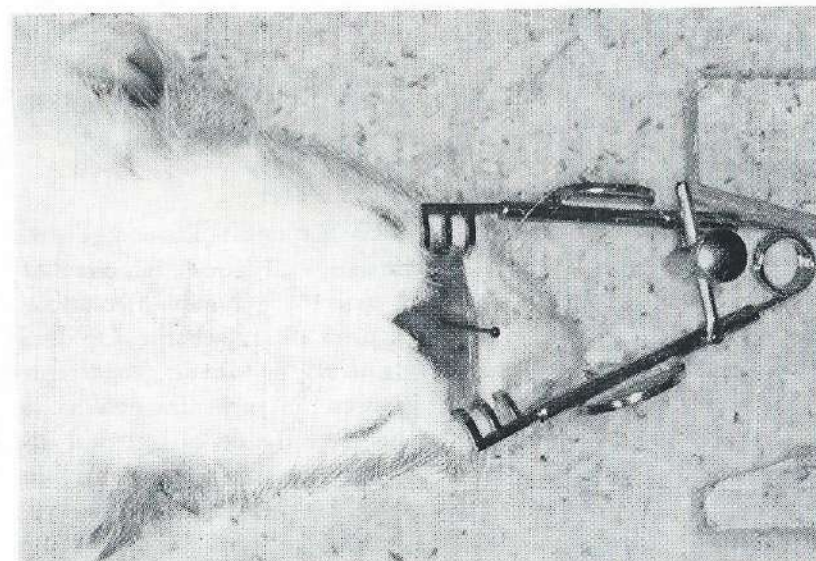


fig. 7.1. Implantatie corpus alienum in linker cavum nasi.

* Hypnorm is een neurolept analgeticum, een combinatie van fluanisone en het analgeticum phentanylcitraat (Philips Duphar).

fixatie werd een druppeltje weefsellijm (Alpha Aron, alkylcyanoacrylaat monomeer) gebruikt en de huidincisie werd hieroverheen gesloten.

7.1.2. Röntgenbestraling van de neus

Gezien de negatieve resultaten van *Schmäbl* (1966) met 320 Rad op het gehele lichaam en de positieve resultaten van een bestraling van de kop van muizen door *Eulderink* (1971) met respectievelijk 500 en 1000 Rad werd als dosis eveneens 500 Rad op een halve centimeter diepte op het voorste gedeelte van de rattekop toegediend, in één zitting. De bestralingsgegevens van de toegepaste dosering zijn als volgt*: 100 kV, 8mA gedurende 35 seconden, een filter werd gebruikt van aluminium met een dikte van 1,7 mm.

De halveringsdikte van aluminium is 2,15 mm. Het bestralingsveld had een oppervlakte van 1,3 cm². De totale velddosis bedroeg 675 Rad. Op 0 cm diepte hiervan 100 %, 1/2 cm 74,1 %, op 1 cm 56,4 %, op 2 cm diepte 34,3 %. De röntgenbestraling geschiedde in een lichte hypnorm anaesthesie (7.1.1.). Met behulp van een plankje met een wigvormige uitsparing waarin de kop van de rat, die onder invloed van de narcose praktisch volledig stil lag, goed paste, werd een voor ieder dier praktisch gelijke stand ten opzichte van het bestralingsapparaat gerealiseerd (fig. 7.2.). Op een totaal van 90 ratten die bestraald werden was de narcosemortaliteit 1 (1,1 %).

7.1.3. Afsluiting van één neusgat i.c. het linker

Onder hypnormnarcose (7.1.1.) werd het meest uitwendige deel van het linker vestibulum nasi geëxcideerd waardoor er een circulair wondvlak ontstond met een breedte van 1 1/2 - 2 mm. Met atraumatisch nylon werden de wondvlakken op elkaar gehecht. Op deze manier gelukte het om in één zitting in 85 % van de geopereerde dieren een vergroeiing van deze „geaviveerde” apertura externa te verkrijgen, met een afsluiting van het betreffende cavum nasi als gevolg. Bij dieren waar toch opnieuw een verbinding van het cavum nasi met de buitenwereld ontstond werd dezelfde procedure herhaald. Een afsluiting van het linker neusgat werd hierna bij alle resterende dieren bereikt.

* Verschaft door drs. W. H. Elsenaar, fysicus van de afdeling Radiotherapie AZVU.

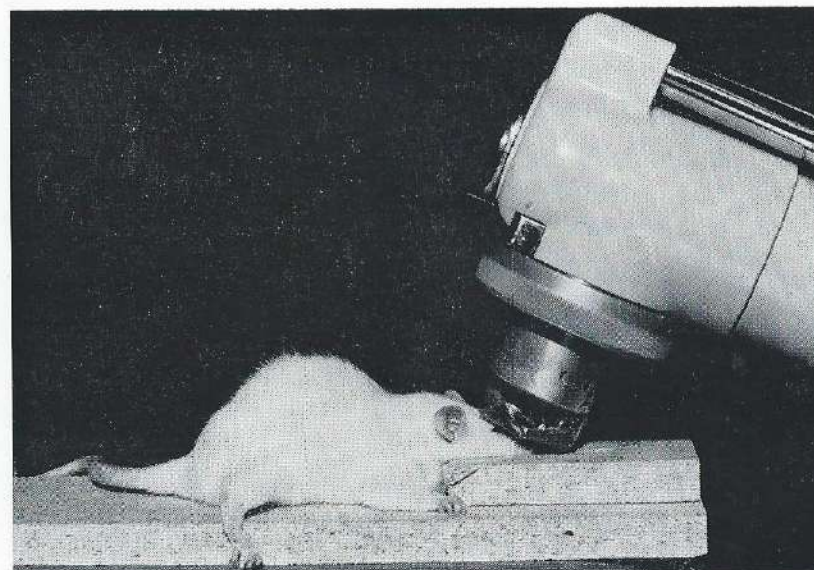


fig. 7.2. Röntgenbestraling van de kop van een rat.

7.2. DOSERING DENA EN TOTAALDOSIS

Per week werd 2 x 7,5 mg DENA per kg lichaamsgewicht subcutaan interscapulair toegediend. Als totaaldosis werd gekozen een hoeveelheid van 180 mg per kg lichaamsgewicht. Dit betekende gedurende 12 weken tweemaal per week een injectie. Deze totaaldosis en toedieningstijd werden gekozen omdat bij een dergelijke opstelling de verschillende afwijkingen achtereenvolgens waargenomen konden worden (*Bottema*).

Eenzijds moest worden gekozen voor een zodanige dosering dat er afwijkingen in de neus te verwachten waren ook al zouden de andere factoren geen invloed op de oncogenese hebben, anderzijds moest de dosering ook weer niet zo hoog zijn dat de invloed van het carcinogene agens de relatief mogelijk veel zwakkere prikkel van de andere faktor volkomen zou overschaduwten. Gebruik werd gemaakt van een oplossing die 7,5 mg van deze stof per cc bevatte. Per 100 gram lichaamsgewicht werd 0,1 cc van de oplossing DENA in aquadest geïnjecteerd. Voor iedere injectie werd het betreffende proefdier gewogen.

Bij het werken met deze uiterst gevaarlijke stof dienen zeer strikte voorzorgen te worden genomen: goede ventilatie in de werkruimte, gebruik van masker en handschoenen.

7.3. DE PROEFDIEREN, INDELING, HUISVESTING, etc.

7.3.1. De Proefdieren

Een overzicht van de groepenindeling geeft tabel 7.1. De proefdieren waren afkomstig uit een kolonie Wistarratten van het centraal proefdierenbedrijf T.N.O. te Zeist.

Bij het begin van de proeven waren de dieren 2½ - 3 maanden oud en hadden een gewicht van 150 - 175 gram.

Tabel 7.1. Overzicht groepenindeling

Groep I	4 x 10 ratten (plm. 3 mnd. oud ♀): alleen DENA
Groep II	4 x 10 ratten (plm. 3 mnd. oud ♀): DENA + röntgen (500 Rad op neus)
Groep III	4 x 10 ratten (plm. 3 mnd. oud ♀): DENA + corp. al. in L. cavum nasi
Groep IV	4 x 10 ratten (plm. 3 mnd. oud ♀): alleen röntgen (500 Rad op neus)
Groep V	4 x 10 ratten (plm. 3 mnd. oud ♀): alleen corp. al. in L. cavum nasi
Groep VI	4 x 10 ratten (plm. 3 mnd. oud ♀): DENA + éénzijdige neusafsluiting L.
Groep VII	4 x 10 ratten (plm. 3 mnd. oud ♀): alleen éénzijdige neusafsluiting L.

DENA-dosering: 2 x 7,5 mg/kg lichaamsgewicht per week gedurende 3 maanden.
Totaal dosering: 180 mg/kg lichaamsgewicht.
Toedieningswijze: Subcutaan interscapulair.

Er werd alleen gebruik gemaakt van vrouwtjesratten daar deze over het algemeen handelbaarder bleken te zijn en ook minder agressief ten opzichte van elkaar. Deze handelwijze lijkt gerechtvaardigd daar de afwijkingen onder invloed van DENA bij mannelijke en vrouwelijke ratten in de proeven van *Bottema* dezelfde waren.

Alvorens in het experiment te worden opgenomen werden de ratten met behulp van a-selectie tabellen over de verschillende groepen verdeeld. Deze a-selectie verdeling was nodig omdat niet gebruik werd gemaakt van ratten van een inteeltstam.

De groepen bestonden uit 40 ratten, verdeeld over vier kooien van tien ratten. Ter voorkoming van mogelijke overloop van ratten van de ene groep naar een andere door technische tekortkomingen werden de ratten van iedere groep subcutaan gemerkt met oostindische inkt, op een voor iedere groep kenmerkende plaats.

Wegens een tekort aan kooiruimte kon het totale experiment niet terzelfder tijd geschieden. Met de groepen I t/m V werd op hetzelfde moment gestart en met de groepen VI en VII in een later stadium. De speciale bewerkingen (inplantatie van een corpus alienum, röntgenbestraling en afsluiting van één neusopening) geschieden enkele dagen voorafgaande aan het begin van de toediening van DENA.

7.3.2. De huisvesting

De huisvesting geschiedde in het laboratorium voor Experimentele Geneeskunde van de Vrije Universiteit (Hoofd: Dr. H. A. Brouwer).

De voeding bestond uit Hopefarmkorrels, type AM II en leidingwater, beide ad libitum. Iedere metalen kooi bevatte 10 ratten. De bodem bestond uit een metalen rooster waardoor de uitwerpselen direkt na de produktie werden afgevoerd. De gemiddelde temperatuur van het rattenverblijf was 20 graden.

7.4. BEWERKING MATERIAAL

De dieren die voor onderzoek op bepaalde tijdstippen werden gedood werden onder aetherbedwelming gedecapiteerd; links paramedisch werd 0,1 cc oostindische inkt subcutaan in de neusrug geïnjecteerd om later in de coupes links en rechts te kunnen onderscheiden. De fixatie zowel van kop, lever, longen en nieren geschiedde in een 4 % formaline-oplossing.

De histologische bewerking vond plaats in het Pathologisch Instituut van de Vrije Universiteit (Hoofd: Prof. Dr. R. Donner).

De koppen werden in formaline gefixeerd gedurende één week, daarna werd de huid van de kop verwijderd en volgde ontkalking in de vloeistof van *Kristensen*. Het neusgedeelte van de kop werd daarna opgesneden in vijf plakken waarna opnieuw werd ontkalkt en vervolgens ontwaterd door middel van alcohol in stijgende concentratie. De weefselplakken werden daarna ingebed in paraffine. Als kleuring werd toegepast hematoxiline-eosine. Zonodig werden speciale kleuringen als PAS-kleuring en Kreybergkleuring gebruikt (zie 9.2.).

De overige organen zoals de lever, de longen en soms de nieren werden eveneens in formaline gefixeerd, met alcohol ontwaterd, in paraffine ingebed, gesneden en gekleurd met hematoxiline-eosine.

8. BELOOP, BEVINDINGEN EN RESULTATEN VAN DE EXPERIMENTEN

8.1. INLEIDING

Het gehele experiment werd uitgevoerd in twee fasen: in de eerste fase de groepen I t/m V, in de tweede fase de groepen VI en VII. (Voor de groepenindeling zie 7.3.1. en tabel 7.1.).

Het beloop bij de verschillende groepen werd beoordeeld door observatie. Na acht weken werden om de vier weken twee dieren van elke groep gedood om de ontwikkeling van de afwijkingen in de verschillende organen en met name in de neus zowel macroscopisch als microscopisch te kunnen vervolgen.

In tabellen zal van iedere groep een overzicht worden gegeven van de afwijkingen welke op de verschillende tijdstippen werden gevonden. Ter verduidelijking volgt eerst een beschrijving van de verschillende histologische benamingen.

Hierbij worden goeddeels de criteria en beschrijvingen van *Bottema* gevolgd.

Regio respiratoria.

1. *Desorganisatie*: verlies van trilharen, verstoring in de regelmatige opbouw, depolarisatie van cellen en te gronde gaan van cellen. (fig. 3.6.).
2. *Meerlagigheid en metaplasie*: het cilinderepitheel wordt meerdere cellagen dik, soms met het aspect van plaveiselepitheel (fig. 3.7.).
3. *Papilloomvorming*: een verschijnsel dat een uitbundige vorm lijkt te zijn van het voorgaande. Er ontstaat een sterke proliferatie van epitheel in twee verschillende typen:
 - a. *het fungiforme type*: het epitheel heeft het aspect van plaveiselepitheel gekregen. Er ontstaat een gesteelde tumor met soms nog trilhaarepitheelgedeelten. Het fungiforme papilloom heeft meestal een smalle steel en is van geringe afmetingen (fig. 3.8.).
 - b. *het „inverted” type*: sterke proliferatie van metaplastisch epitheel dat de indruk maakt in te stulpen. Het lijkt histologisch zeer sterk op het bij de mens voorkomende „inverted” papilloom (*Belonje en Oey, 1972*). De inverted papillomen zijn vaak veel groter dan de fungiforme papillomen (fig. 3.9.).

Regio olfactoria.

1. *Desorganisatie*: de regelmatige opbouw van het epitheel is verstoord; de kernen zijn niet meer in 6-8 rijen gerangschikt, maar liggen wanordelijk door elkaar. Het epitheel wordt meerlagig en er is een afname van het aantal cellen (fig. 3.10.).
2. *Proliferatie en metaplasie*: de basale cellaag wordt verschillende lagen dik; de cellen aan de oppervlakte van de prolifererende plek gaan afplatten en krijgen het aspect van plaveiselepitheel (fig. 3.11.).
3. *Atypie in de basale laag*: vermeerdering van cellen in de basale laag, de cellen hebben weinig cytoplasma en kleine donkere kernen, zijn chromatinerijk met soms kernpolymorfie (fig. 3.12.).
4. *Atypie in de lamina propria*: dezelfde afwijkingen als onder 4. maar dan in de lamina propria optredend (fig. 3.12.).
5. *Afwijkingen in de klieren van Bowman*: atrofie van de klieren, afname van het functionele klierparenchym, ontstekingsverschijnselen rondom de klieren.
6. *Histologisch maligne tumoren*. Zie hoofdstuk 3.4.2.

De notering van de verschillende afwijkingen is als volgt:

niet aanwezig:	—
in zeer geringe mate aanwezig:	±
duidelijk aanwezig:	+
zeer duidelijk aanwezig:	++

Gezien de fasering in de uitvoering van de experimenten zullen het beloop en de bevindingen van de groepen I t/m V tesamen worden besproken, daarna van de groepen VI en VII.

8.2. BELOOP EN BEVINDINGEN GROEP I t/m V

8.2.1. *Beloop en bevindingen bij uitwendig onderzoek*

De injecties DENA bij de groepen I t/m III werden goed verdragen. Zowel lokaal als algemeen waren er geen directe reacties. Na ongeveer 4 weken ontstond er bij veel ratten van deze 3 groepen een pleksgewijze haaruitval. De intensiteit hiervan nam geleidelijk toe gedurende de periode van de injecties. Na beëindiging van de injecties verdween deze afwijking weer.

8.2.1.1. Beloop en bevindingen bij groep I (alleen DENA)

Gedurende de periode van de toediening van DENA (de eerste 12 weken van het experiment) succumbeerde 1 dier. Door kannibalisme en autolyse was deze rat niet geschikt voor obductie en microscopisch onderzoek. De algemene conditie van de overige dieren bleef goed tot ongeveer de 24e week. Hierna ging deze geleidelijk achteruit. De neusademhaling werd duidelijk hoorbaar, terwijl bij sommige dieren een bloederige rhinorrhoe werd geconstateerd. Na 28 weken werd bij 1 rat een lichte verbreding van de neusrug opgemerkt, welke naderhand op de aanwezigheid van een ENE bleek te berusten.

Omstreeks de 36e week waren bij praktisch alle dieren zwellingen in de leverstreek palpabel.

8.2.1.2. Beloop en bevindingen bij groep II (DENA + röntgen)*

Van deze groep gingen 6 dieren te gronde gedurende de eerste 12 weken. Dit was beduidend meer dan bij groep I (8.2.1.1.) en bij groep III (8.2.1.3.). De oorzaak van de hogere sterfte bij groep II werd niet duidelijk, daar ook deze ratten evenals die van groep I, niet geschikt waren voor nader onderzoek. Ook bij deze groep ging de algemene conditie van de dieren na de 24e week geleidelijk achteruit, terwijl eveneens een bloederige rhinorrhoe bij verschillende beesten werd geconstateerd en de neusademhaling duidelijk hoorbaar werd. Na 36 weken waren bij alle dieren zwellingen in de leverstreek palpabel.

8.2.1.3. Beloop en bevindingen bij groep III (DENA + corpus alienum)

De meest opvallende afwijkingen bij de dieren van deze groep waren in het begin van het experiment uitwendig waar te nemen.

Op de neusrug ontstond een vrij sterke ontstekingsreactie. Volledig herstel trad pas op na ongeveer 6 weken. Bij de inleidende experimenten was het wondje na ongeveer 2 weken volledig genezen. De verklaring voor het verschil in genezingsduur is waarschijnlijk te

* Met de term: röntgen bij een groep wordt in het vervolg bedoeld: een röntgenbestraling van 500 Rad. op de neus.

zoeken in een combinatie van factoren, n.l. het gebruik van weefsellijm en de huisvesting van de dieren*. Bij de inleidende experimenten werden de proefdieren gehuisvest in kooien met gladde plastic wanden en slechts 2 of 3 ratten per kooi. Bij de definitieve proefopstelling was de huisvesting in metalen traliekooien met 10 ratten per kooi. Waargenomen werd dat de ratten in de metalen kooien met hun kop langs deze tralies wreven, waardoor de wondgenezing vertraagd werd. Bij de obductie van de dieren van deze groep bleek later dat slechts bij in totaal 4 van de 39 ratten het corpus alienum in situ was gebleven (zie tabel 8.4. en 8.7.). Waarschijnlijk is tegelijkertijd met het afvallen van de wondkorst van de neusrug na ongeveer 5 weken het corpus alienum uit de neus verwijderd. De prikkeling van het neusslijmvlies door het proleendraadje heeft derhalve slechts 4 à 5 weken bestaan bij 35 van de 39 dieren. Slechts 1 rat succumbeerde gedurende de periode van de injecties.

8.2.1.4. Beloop en bevindingen bij groep IV (alleen röntgen)

Gedurende het gehele experiment werden bij de dieren van deze groep geen bijzonderheden waargenomen. Spontaan verlies van dieren kwam niet voor.

8.2.1.5. Beloop en bevindingen bij groep V (alleen corpus alienum)

De ontstekingsreactie op de neusrug bij de dieren van deze groep was geheel overeenkomstig met die bij groep III. Na ongeveer 6 weken was het wondje ook hier volledig genezen. Bij obductie bleek later dat het corpus alienum bij 7 van de 40 dieren nog in situ was (tabel 8.2. en 8.2.2.5. en 8.2.8.). Spontaan verlies van dieren kwam ook bij deze groep niet voor.

8.2.2. Microscopisch onderzoek van de neus tot en met de 36e week

Na 8 weken werden van iedere groep om de 4 weken 2 ratten gedood om zo het ontstaan van de afwijkingen bij de verschillende groepen te kunnen vervolgen. Een samenvatting van de microscopische bevindingen wordt gegeven in tabel 8.1.-4. In tabel 8.1. en 8.2. worden de bevindingen weergegeven bij de groepen I t/m V na

* DENA was waarschijnlijk niet van invloed op de wondgenezing, daar deze bij de controle groep met alléén een corpus alienum ongeveer even lang duurde.

Tabel 8.1. Bevindingen groep I t/m V van 8e — 20e week.

		regio respiratoria										regio olfactoria											
		papillomen																					
		desorganisatie		meerlagigheid		fungiform		inverted		ontsteking		desorganisatie		proliferatie en metaplasie		atypie basale laag		atypie lamina propria		afwijkingen klieren van Bowman		esthesioneuroepithelium	
8 wk	I	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	II	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
	III*	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
12 wk	I	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	
	II	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
	III	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
16 wk	I	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	—	
	II	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	
	III	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
20 wk	I	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	II	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
	III	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

* N.B. Bij groep III aparte notitie voor de afwijkingen in het linker en rechter cavum nasi. L R

Tabel 8.2. Bevindingen groep I t/m V van 24e — 36e week.

regio respiratoria												regio olfactoria											
papillomen																							
		desorganisatie		meerlagigheid		fungiform		inverted		ontsteking		desorganisatie		proliferatie en metaplasie		atypie basale laag		atypie lamina propria		afwijkingen klieren van Bowman		esthesioneuroepithelium	
24 wk	I	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	
	II	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—		
	III*	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—		
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
28 wk	I	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—		
	II	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—		
	III	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—		
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	V	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
32 wk	I	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—		
	II	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	III	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
36 wk	I	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	II	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
	III	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
	V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

* N.B. Bij groep III aparte notitie voor de afwijkingen in het linker en rechter cavum nasi. L R

" Bij deze dieren van groep III en groep V was het corpus alienum nog in situ.

Tabel 8.3. Bevindingen per groep van de 8e t/m de 36e week, groep I en II.

	regio respiratoria					regio olfactoria				
	desorganisatie	meerlagigheid	fungiform	inverted	ontsteking	desorganisatie	proliferatie en metaplasie	atypie basale laag	atypie lamina propria	afwijkingen klieren van Bowman
groep I										
8 wk	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—
12 wk	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—
16 wk	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—
20 wk	+	+	—	+	—	+	+	—	—	—
24 wk	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
28 wk	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—
32 wk	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
36 wk	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—
groep II										
8 wk	+	—	—	—	—	+	+	—	+	—
12 wk	+	+	—	+	—	+	+	—	—	—
16 wk	—	+	—	+	—	+	+	—	—	—
20 wk	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—
24 wk	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—
28 wk	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—
32 wk	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—
36 wk	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—

Tabel 8.4. Bevindingen groep III van de 8e t/m de 36e week.

	regio respiratoria					regio olfactoria				
	desorganisatie	meerlagigheid	fungiform	inverted	ontsteking	desorganisatie	proliferatie en metaplasie	atypie basale laag	atypie lamina propria	afwijkingen klieren van Bowman
groep III										
8 wk	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12 wk	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
16 wk	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
20 wk	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
24 wk	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
28 wk	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
32 wk	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
36 wk	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—

N.B. Het proleedraadje was in situ bij 1 van de 2 ratten gedood na resp. 24 en 28 weken.

De bevindingen in de 1e kolom hebben betrekking op de afwijkingen die gevonden werden bij de rat met het corpus alienum nog in situ.

respectievelijk 8, 12, 16, etc. weken; in tabel 8.3. en 8.4. de bevindingen per groep voor de groepen I, II en III. Bij elk criterium worden steeds twee notaties gegeven overeenkomend met de afwijkingen bij elk van beide ratten van de betreffende groep. Bij groep III (DENA + corpus alienum) zijn steeds de bevindingen voor het linker en rechter cavum nasi nog weer apart genoteerd. Bij groep V (alleen corpus alienum) waren de links/rechts verschillen niet van zodanige aard dat een aparte notatie voor links en rechts noodzakelijk was, behalve bij 1 rat van groep V waar na 28 weken het corpus alienum links in situ was en een duidelijke ontstekingsreactie links aanwezig was.

8.2.2.1. Microscopisch onderzoek van de neus bij groep I (alleen DENA)

Desorganisatie in het epitheel zowel in de regio respiratoria als regio olfactoria, begon al na plm. 8 weken op te treden. Rond de 12e tot de 16e week werd de neiging tot proliferatie in de basale laag van de regio respiratoria zichtbaar. Er ontstond een laag van gedepolariseerde cellen waarboven zich een nog min of meer normaal uitzijende celrij bevond met een polaire rangschikking van de celkernen.

Na 24 weken werden fungiforme papilloompjes waargenomen bij beide gedode dieren. Bij 1 van de 2 ratten die na 28 weken werden gedood werd een ENE gevonden. Na resp. 32 en 36 weken werd wel atypie in de basale laag en in de lamina propria aangetroffen, er was echter geen ENE aanwezig.

8.2.2.2. Microscopisch onderzoek van de neus bij groep II (DENA + röntgen)

Na 8 weken viel bij de ratten van groep II (DENA + röntgen) een hyperemie in de lamina propria op. Na 12 weken was dit niet meer duidelijk. De overige afwijkingen kwamen overeen met die bij groep I. De verschillende afwijkingen leken in het verloop van het experiment bij de dieren van groep II eerder op te treden dan bij de dieren van groep I, maar dit is slechts een indruk op grond van de microscopische preparaten. Fungiforme papillomen werden pas na 32 weken gezien. Atypie in de basale laag en in de lamina propria van de regio olfactoria was meer uitgesproken dan bij groep I. Na

32 weken werd bij 1 rat en na 36 weken werd bij beide ratten van groep II een ENE gevonden.

8.2.2.3. Microscopisch onderzoek van de neus bij groep III (DENA + corpus alienum)

De afwijkingen bij deze groep kwamen overeen met die welke bij groep I werden waargenomen. Wel leken deze bij groep III eerder op te treden dan bij groep II en I.

Bij 1 rat van groep III werd na 24 weken een „inverted” papiloma gevonden. Vanaf de 32e week werd atypie in de basale laag en de lamina propria gezien, terwijl het eerste ENE bij deze groep na 36 weken werd gevonden. Bij de dieren van groep III waar het corpus alienum niet meer in situ was, bleek er geen duidelijk links/rechts verschil in de bevindingen te bestaan. Dit was slechts in lichte mate het geval bij 2 ratten van groep III welke na 24 resp. 28 weken werden gedood en waar het corpus alienum nog wel in situ was.

8.2.2.4. Microscopisch onderzoek van de neus bij groep IV (alleen röntgen)

Na 8 weken werd evenals bij de ratten van groep II (DENA + röntgen) een hyperemie in de lamina propria waargenomen, terwijl dit ook bij deze groep na 12 weken niet meer duidelijk was. Verder werden er bij deze groep t/m de 36e week geen afwijkingen van betekenis in de neus gezien.

8.2.2.5. Microscopisch onderzoek van de neus bij groep V (alleen corpus alienum)

Slechts bij 1 rat was na 28 weken nog het corpus alienum in situ. Bij dit dier werd een lichte ontstekingsreactie en desorganisatie rond het gebied van het corpus alienum waargenomen. Overigens werden er bij deze dieren geen afwijkingen van enige betekenis in de neus gezien.

8.2.2.6. Beëindiging experiment

Zo spoedig mogelijk na het constateren van de bevindingen bij de groepen I t/m III na 36 weken werden de overgebleven ratten van de groep I t/m V op 2 per groep na, tegelijkertijd gedood. Dit vond plaats 39 weken na het begin van het experiment.

Deze handelwijze werd gevolgd om de volgende redenen:

De 2 overgebleven dieren van deze groep (nr. 22 en 23 van tabel 8.5.) succumbeerden resp. na 44 en 51 weken. Bij het eerste dier was reeds teveel autolyse opgetreden om nog een betrouwbaar histologisch onderzoek te doen. Het dier dat na 51 weken stierf had eenzijdig een ENE, terwijl naast fungiforme papillomen een sterke metaplasie in de regio respiratoria werd gezien. Atypie in de basale laag en de lamina propria van het olfactorisch epitheel was zeer duidelijk. Er was een grote levertumor aanwezig.

zeer groot plav. ca.,
uitgaande van regio olf.
met doorbraak door neus-
dak (fig. 8.2. en 8.3.).

8.2.5. Bevindingen bij groep II (DENA + röntgen) na 39 weken

Een overzicht van de bevindingen na 39 weken wordt gegeven in tabel 8.6. Voor onderzoek waren op dit moment nog 18 dieren over, 16 dieren werden na 39 weken gedood.

Meerlagigheid en metaplasie van het respiratoire epitheel werd bij alle dieren aangetroffen. Slechts enkele „inverted” papillomen (3/16) werden gevonden. Fungiforme papilloompjes kwamen meer voor (8/16). Het respiratoire epitheel was meestal vrij goed intact, bij 12 van de 16 dieren werden in de lamina propria min of meer uitgesproken ontstekingsverschijnselen gevonden (lymfocyttaire en plasmocyttaire infiltratie). In het olfactorische gebied werden bij alle dieren metaplastische en proliferatieve veranderingen aangetroffen. De uitgebreidheid en intensiteit hiervan wisselden sterk.

De afwijkingen in de glandulae van Bowman kwamen overeen met die van groep I. Atypie in de basale laag werd bij 15 van de 16 dieren gevonden. Atypie in de lamina propria bij 13 van de 16 dieren. Een ENE werd gevonden bij 9 van de 16 ratten. Bij 6 dieren

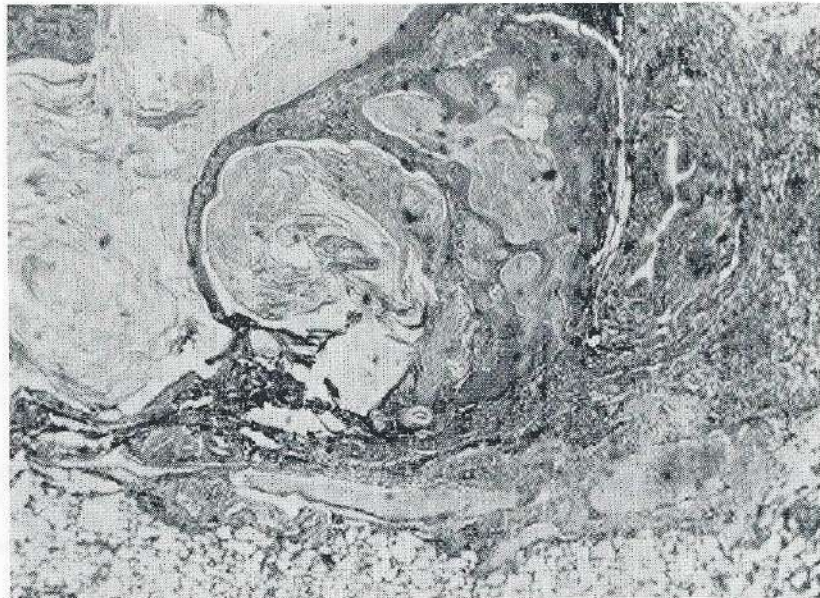


fig. 8.1. Sterk metaplastisch bronchusepitheel met hoornparelvorming.
(HE obj. 10 x)

was de tumor beiderzijds in de neus aanwezig. Bij één dier breidde de tumor zich uit tot in de schedel. Bij 1 van de 16 dieren was een tumor alleen links aanwezig, terwijl ook bij 1 van de 16 dieren een tumor alleen rechts werd aangetroffen. Er werden geen metastasen van de tumoren gezien, noch regionaal, noch in de longen en lever.

Leverafwijkingen; celdegeneratie, vacuolisatie van het cytoplasma, necrose en tumoren werden bij alle dieren gevonden. Een galgangcarcinoom werd bij 1 dier waargenomen.

In de longen van 1 rat werd een grote metaplastische haard gevonden met sterke hyperplasie en hoornparelvorming, zonder dat duidelijk sprake was van een maligne tumor. (fig. 8.1.).

Van de 2 ratten die van deze groep na 39 weken nog in leven waren gelaten, ontwikkelde 1 dier omstreeks de 45e week een tumor,

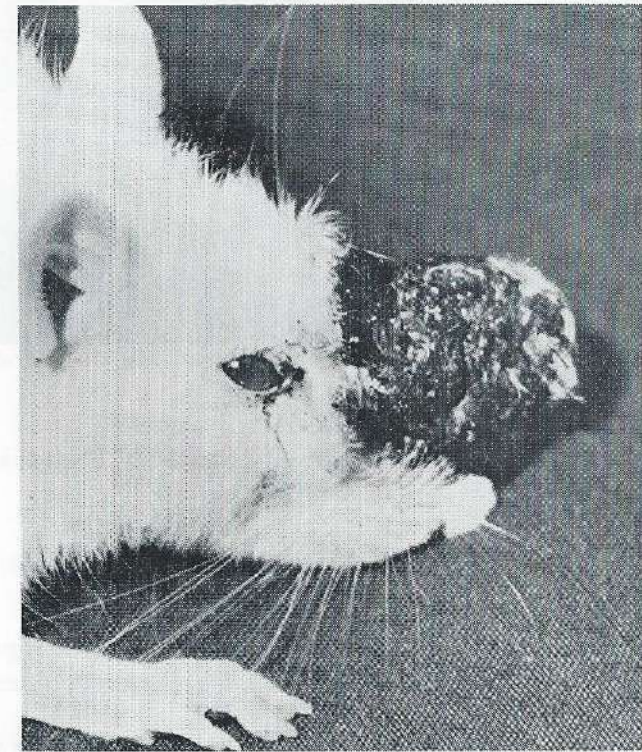


fig. 8.2. Rat, met een plaveiselcarcinoom uitgaande van de neus, welke zich als een soort „neushoorn” op de neusrug presenteerde. Dier van groep II (DENA + röntgen) † na 48 wk.

A black and white micrograph showing a histological section of tissue. The image displays glandular structures, likely from the prostate, with various cellular details and architectural patterns. The glands are irregular in shape and size, with some showing prominent nuclei and others appearing more compressed. The surrounding stroma is dense and fibrous, with some areas showing more cellular detail than others. The overall appearance is characteristic of a histological section used for diagnostic purposes.

Het andere overgebleven dier stierf vrij plotseling na 51 weken. Ondanks autolyse was histologisch een groot ENE beiderzijds zeer duidelijk zichtbaar.

Een overzicht van de bevindingen na 39 weken wordt gegeven in tabel 8.7. Voor onderzoek waren nog 23 dieren over, 21 ratten werden na 39 weken gedood.

66

regio respiratoria				regio olfactoria	
L	R	papillomen		L	R
meerlagigheid en metaplasie		inverted		proliferatie en metaplasie	
		fungiform		afwijkingen klieren van Bowman	
		ontsteking		atypie basale laag	
				atypie lamina propria	
				esthesioneuroepithelioma	

67

bleven te zijn. Links/rechts verschil was bij deze dieren duidelijk aanwezig. *Rat nr. 1* had links een „inverted” en een klein fungiform papilloom. Ontstekingsverschijnselen waren links meer uitgesproken dan rechts. Atypie in de lamina propria kwam alleen links voor, zelfs zodanig dat het leek of zich hier een ENE aan het ontwikkelen was. Bij *rat nr. 12* werd links een „inverted” papilloom gevonden. Ontstekingsverschijnselen werden links meer dan rechts gezien. Bovendien werd in het linker cavum nasi een ENE gevonden.

Bij alle dieren werd meerlagigheid en metaplasie in de regio respiratoria waargenomen. Bij 5 van de 21 ratten waren „inverted” papillomen aanwezig, bij 3 alleen links en bij 2 alleen rechts. Fungiforme papilloompjes werden bij 11 van de 21 ratten gevonden, alleen links bij 4 en alleen rechts eveneens bij 4. Ontstekingsverschijnselen werden bij 17 van de 21 dieren waargenomen. Bij 7 dieren werden alleen links (dus aan de kant waar het corpus alienum geïmplanteerd geweest was) ontstekingsverschijnselen waargenomen. Dit was in beide neushelften bij 10 dieren het geval, terwijl uitsluitend rechts geen ontstekingsverschijnselen werden gezien. Proliferatie en metaplasie waren bij alle dieren aanwezig in het olfactorische gebied, evenals afwijkingen in de klieren van Bowman.

Bij 19 van de 21 dieren werd atypie in de basale laag en lamina propria gevonden. Deze atypie was zowel links als rechts in het cavum nasi aanwezig. Bij 2 ratten kwam atypie in de lamina propria alleen links voor.

Bij 12 van de 21 ratten werden ENE's gevonden; alleen links bij 3 en alleen rechts bij 4 en beiderzijds bij 5 ratten. Er werden geen metastasen van de tumoren waargenomen, noch regionaal noch in longen en levers. Bij alle dieren, na 39 weken gedood, werden leverafwijkingen gevonden zoals celdegeneratie, vacuolisatie van het cytoplasma, necrosehaarden; 20 van de 21 dieren hadden een lever-tumor, terwijl bij 1 dier ook een galgangcarcinoom werd gevonden.

In de longen werden behalve lichte ontstekingsverschijnselen geen afwijkingen waargenomen.

De 2 overgebleven ratten werden moribund gedood na resp. 42 en 54 weken. Beide hadden een ENE in de neus.

8.2.7. Bevindingen bij groep IV (alleen röntgen) na 39 weken

Van de 40 dieren waarmee het experiment was begonnen, werden

16 gedood t/m de 36e week, zodat voor onderzoek na 39 weken 24 ratten waren overgebleven. Van deze groep waren geen dieren spontaan gesuccumbeerd. 22 ratten werden gedood en 2 ratten werden in leven gelaten.

In de regio olfactoria van 1 rat werd een klein gebied met metaplasie van het reukslijmvlies aangetroffen, terwijl tevens vrij sterke ontstekingsverschijnselen aanwezig waren.

Bij geen van de dieren werd celwoekering, atypie of nieuwvorming gevonden. Wel viel een lichte desorganisatie van het epitheel van de klieren van Bowman op. Slechts bij 2 van de 22 dieren werden duidelijke ontstekingsverschijnselen zowel in epitheel als lamina propria gevonden. Duidelijke links/rechts verschillen werden niet gezien. De 2 ratten die in leven gelaten waren, werden na 82 weken gedood. Bij deze 2 dieren werden de volgende afwijkingen gevonden: verwoesting van zowel het respiratorische als het olfactorische epitheel en uitzetting van de klieren van Bowman. Ook hier was geen links/rechts verschil aanwezig.

8.2.8. Bevindingen bij groep V (alleen corpus alienum) na 39 weken

Ook van deze groep dieren waren er t/m de 36e week 16 dieren gedood, zodat voor onderzoek 24 ratten waren overgebleven. Van deze groep waren evenmin dieren spontaan gesuccumbeerd. 22 dieren werden gedood en 2 dieren werden in leven gelaten. Bij 16 van de 22 ratten was het proleendraadje niet meer in het linker cavum nasi aanwezig. 15 van deze 16 dieren hadden geen afwijkingen van enige betekenis in de neus. Bij 1 rat werd links een ontstekingsreactie en een lichte metaplasie van het slijmvlies in het respiratorische deel waargenomen.

Bij 6 van de 22 dieren was het corpus alienum nog in situ. Bij 5 van deze 6 ratten waren in de linker neushelft ontstekingsverschijnselen aanwezig, terwijl dit rechts niet het geval was. Ter plaatse van het corpus alienum in het neusdak was het trilhaarepitheel te gronde gegaan en waren lichte metaplastische veranderingen zichtbaar.

In lever en longen werden bij deze groep geen afwijkingen gevonden. 2 ratten, die in leven waren gelaten, werden na 82 weken gedood. Bij 1 rat was het corpus alienum in situ, bij de tweede rat was het corpus alienum afwezig. Histologisch bleek bij beide ter plaatse

van het corpus alienum of waar het corpus alienum geïnplanteerd was geweest, een ontstekingsreactie aanwezig te zijn met desorganisatie en verwoesting van olfactorisch epitheel en uitgezette klierbuisen van de glandulae van Bowman en lichte metaplastische veranderingen.

8.2.9. Samenvatting van de bevindingen bij de groepen I t/m V

Na 28 weken werd voor het eerst een ENE gevonden bij een rat van groep I, na 32 weken voor het eerst een levertumor. De overige microscopische bevindingen in de neus t/m de 36e week (zie tabel 8.1.-4.) leken iets eerder op te treden bij de groepen II en III dan bij groep I.

Tot en met de 36e week waren geen essentiële verschillen in de afwijkingen bij de groepen met DENA (groep I, II en III) aanwezig.

In tabel 8.8. wordt een samenvatting gegeven van de bevindingen na 39 weken voor de groepen I t/m III. Het aantal neustumoren dat per groep werd gevonden liep sterk uiteen.

Tabel 8.8. Samenvatting bevindingen bij groep I t/m III na 39 weken.
regio respiratoria regio olfactoria

groep	aantal	meerlagigheid + metaplasie	inverted papilloma	fungiform papilloma	ontsteking	proliferatie + metaplasie	afwijkingen klieren van Bowman	celwoekering + atypie basale laag	celwoekering + atypie lamina propria	esthesioneuroepithelioma	
I	21	21	2	11	15	21	21	21	20	3	aantal
	100	100	10	52	71	100	100	100	95	14	%
II	16	16	3	8	12	16	16	15	13	9	aantal
	100	100	19	50	75	100	100	94	81	56	%
III	21	21	5	11	17	21	21	19	19	12	aantal
	100	100	24	52	81	100	100	91	91	57	%

Bij groep I was bij 3 van de 21 dieren (14 %) een tumor aanwezig, bij groep II en III was bij resp. 9 van de 16 (56 %) en 12 van de 21 dieren (57 %) een tumor aanwezig. Dit verschil tussen groep I (alleen DENA) aan de ene kant en groep II (DENA + röntgen) en groep III (DENA + corpus alienum) aan de andere kant bleek statistisch significant te zijn: $P < 0,01$, d.w.z. de tweezijdige overschrijdingskans is $< 0,01$.

Opvallend was dat in percentage het aantal tumoren bij groep II en III praktisch gelijk was. Alle maligne neustumoren toonden histologisch het beeld van een ENE. Bij de dieren van groep I t/m III, welke na 39 weken nog in leven waren gelaten, werd een maligne tumor waargenomen. Slechts bij 1 rat van groep I was wegens autolyse een histologische beoordeling niet meer mogelijk. Bij 1 rat van groep II (DENA + röntgen) bleek zich na 48 weken een goed gedifferentieerd plaveiselcelcarcinoom in de neus te bevinden dat naar buiten was doorgebroken. Bij de groepen IV (alleen röntgen) en V (alleen corpus alienum) werden tot 39 weken geen afwijkingen van betekenis gezien.

8.2.10. Beantwoording van de vragen gesteld in 6.2.1.1. en 6.2.1.2.

8.2.10.1. Wat is de invloed van irritatie door een corpus alienum op de carcinogenese van DENA in de neus? (6.2.1.1.)

Bij groep III (DENA + corpus alienum) werd na 39 weken in 57 % een ENE gevonden. Daarentegen werd bij groep I na dezelfde inductieperiode slechts in 14 % een ENE gevonden. Dit verschil bleek statistisch significant te zijn. Derhalve kan worden geconcludeerd dat bij eenzelfde inductieperiode de carcinogenese in de neus door een corpus alienum in de beschreven opstelling in positieve zin wordt beïnvloed.

Verder bleek dat het histologische type van de ontstane tumoren door de irritatie van het neusslijmvlies niet werd beïnvloed.

8.2.10.2. Wat is de invloed van eenmalige röntgenbestraling (500 Rad) op de carcinogenese van DENA in de neus? (6.2.1.2.)

Bij groep II (DENA + röntgen) werd na 39 weken in 56 % een ENE gevonden. Daarentegen werd bij groep I na dezelfde inductie-

periode slechts in 14 % een ENE gevonden. Dit verschil bleek statistisch significant te zijn. Derhalve kan worden geconcludeerd dat bij een zelfde inductieperiode de carcinogenese in de neus in de beschreven opstelling door een eenmalige dosis van 500 Rad op de neus in positieve zin wordt beïnvloed.

Wat het histologische type van de ontstane tumoren betreft was het opmerkelijk dat bij één proefdier na een inductieperiode van 48 weken een plaveiselcelcarcinoom in de neus werd gevonden (tabel 8.6.), terwijl de overige gevonden tumoren ENE's waren.

Hoewel slechts bij één van de bestraalde dieren een plaveiselcelcarcinoom in de neus werd aangetroffen, kan deze bevinding toch van belang zijn daar bij geen van de andere dieren die DENA toegediend kregen een dergelijke bevinding werd gedaan. *Bottema* nam in de neus geen plaveiselcelcarcinoom waar.

8.3. BELOOP EN BEVINDINGEN GROEP VI (DENA + afsluiting neusopening L.) EN GROEP VII (alleen afsluiting neusopening L.)

8.3.1. Beloop en bevindingen bij uitwendig onderzoek

Nadat het wondje, gemaakt bij de operatieve afsluiting van het linker neusgat, was genezen, bleef de obstructie van de apertura externa van de neus bestaan. Ondanks het feit dat slechts respiratie door één i.c. de rechter neushelft mogelijk was, leek het gedrag van de ratten niet af te wijken van het normale. De injecties met DENA werden goed verdragen: lokaal en algemeen werden geen directe reacties waargenomen.

Evenals bij de groepen I t/m III (zie 8.2.1.) werd bij groep VI gedurende de periode van DENA-toediening pleksgewijze haaruitval geconstateerd. Na het staken van de injecties herstelde deze haaruitval geleidelijk. De algemene conditie van de dieren van groep VI ging na plm. 24 weken achteruit.

Tevens was bij veel dieren een soms bloederige rhinorrhoe en een duidelijk hoorbare neusademhaling te constateren. Bij de dieren van groep VII werden geen afwijkingen waargenomen. Voortijdig, na plm. 12 weken, gingen twee dieren van groep VI verloren welke ten gevolge van kannibalisme niet meer geschikt waren voor nader onderzoek. Van groep VII gingen geen dieren in het verloop van het experiment verloren. Na plm. 50 weken werd de algemene con-

ditie van de dieren van groep VI zo slecht dat met het doden van de overgebleven dieren niet langer gewacht kon worden. Een vaste zwelling in de leverstreek was toen bij praktisch alle ratten palpabel.

8.3.2. Microscopisch onderzoek van de neus t/m de 48e week

Een overzicht van de microscopische bevindingen in de neus wordt gegeven in tabel 8.9. Na 12 weken werden de eerste twee ratten van groep VI en VII gedood, de volgende twee na 18 weken en daarna om de vier weken twee ratten van beide groepen. In de eerste 24 weken werden bij groep VI en VII minder ratten gedood voor microscopisch onderzoek dan bij groep I t/m V, daar uit het microscopisch onderzoek bij de groepen I t/m III (8.2.2.) duidelijk was geworden dat er voor die tijd zeer waarschijnlijk geen afwijkingen van belang te vinden zouden zijn. Bij alle dieren van groep VI waren duidelijke ontstekingsverschijnselen in de neus aanwezig. Deze ontstekingsinfiltraten waren of alleen rechts (aan de open zijde) of beiderzijds aanwezig, maar nooit alléén aan de linker kant (de afgesloten neushelft, fig. 8.4.). Wanneer infiltratieve ver-

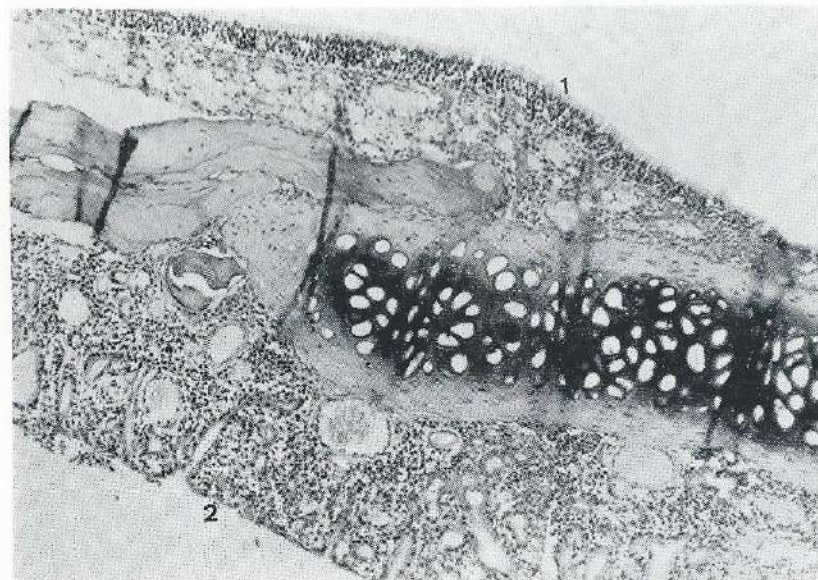


fig. 8.4. Rat met een zeer duidelijk links/rechts verschil wat betreft ontstekingsverschijnselen. Dier uit groep VII (alleen afsluiting L.neusgat). 1. Links: weinig of geen ontstekingsverschijnselen; 2. Rechts: uitgebreide infiltratieve veranderingen. (HE obj. 10 x)

Tabel 8.9. Bevindingen groep VI (DENA + afsluiting L. neusgat) en groep VII (alleen afsluiting L. neusgat).

regio respiratoria												papillomen												regio olfactoria												afwijkingen klieren												esthesioneuroepithelioma																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
desorganisatie												meelagigheid en metaplasie												fungiform												inverted												ontsteking												desorganisatie en necrose												metaplasie												atypie basale laag												atypie lamina propria												afwijkingen klieren												van Bowman												esthesioneuroepithelioma																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
groep	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R

: alleen desorg. waar flinke ontstekingsreactie aanwezig was; respirat. gedeelte van epitheel intact.

: blz. olf. + resp. epitheel grotendeels necrotisch.

: bdz. olf. epitheel vernietigd.

: bdz. een adenoom L > R.

: olf. epitheel grotendeels vernietigd.

anderingen beiderzijds aanwezig waren, dan was de ontsteking aan de rechter zijde veel sterker dan aan de linker zijde.

Bij groep VII waren eveneens ontstekingsverschijnselen aanwezig, tot 36 weken niet constant, daarna wel. Deze verschijnselen waren meestal rechts aanwezig en soms beiderzijds. Ook bij deze groep kwamen ontstekingsinfiltraten, alléén in de afgesloten linker neushelft, niet voor. Op plaatsen met een sterke ontstekingsreactie was het olfactorisch epitheel vaak geheel of gedeeltelijk verwoest (bij groep VI meer dan bij groep VII). Metaplastische en hyperplastische veranderingen waren in groep VI slechts in geringe mate aanwezig, zelfs in een later stadium van het experiment. Zo werden slechts enkele fungiforme papilloompjes gevonden na 28 weken. Deze waren ook na 36 weken duidelijk aanwezig, maar daarna geen constant verschijnsel meer. „Inverted” papillomen werden in het geheel niet gevonden. Afwijkingen in de klieren van Bowman waren bij groep VI na 24 weken op een enkele uitzondering na steeds aanwezig.

Na 32 en 36 weken werd bij één van de twee ratten van groep VI een atypie in de basale laag en de lamina propria gevonden; daarna werd dit niet meer waargenomen. Na 48 weken werd bij één rat van groep VI een opvallend sterke benigne klierbuishyperplasie gevonden.

8.3.3. *Microscopisch onderzoek andere organen t/m de 48e week*

De afwijkingen in de lever bij de dieren van groep VI namen geleidelijk toe en waren van dezelfde aard als die bij de groepen I t/m III. Een levertumor werd voor het eerst gezien na 36 weken en werd daarna steeds waargenomen.

In de longen werden geen afwijkingen van betekenis gevonden.

8.3.4. *Bevindingen bij groep VI (DENA + afsluiting linker neusopening) na 52 weken*

Tot de 48e week waren 18 dieren gedood en twee dieren spontaan gesuccumbeerd, zodat 20 ratten voor onderzoek waren overgebleven. In tabel 8.10. wordt een overzicht gegeven van de afwijkingen in de neus.

Desorganisatie van het epitheel was rechts bij alle dieren aanwezig, zowel in de regio respiratoria als olfactoria. Links was bij 17 van de

20 dieren desorganisatie van het respiratoir epitheel aanwezig en bij 19 van de 20 dieren desorganisatie van het olfactorisch epitheel. Metaplastische veranderingen werden niet bij alle dieren aangetroffen. Indien deze veranderingen werden aangetroffen dan vaak beiderzijds, indien éénzijdig aanwezig dan alleen aan de rechter kant.

Links werd eenmaal een beginnend fungiform papilloompje en rechts tweemaal een duidelijk fungiform papilloom gezien.

De ontstekingsfaktor was bij alle dieren aanwezig, rechts veel sterker dan links. Soms waren zelfs aan de linker kant geen of praktisch geen ontstekingsverschijnselen waarneembaar.

Opvallend was dat infiltratieve veranderingen in de buurt van het neusdak sterker waren dan in de buurt van de neusbodem. De intensiteit van de ontstekingsverschijnselen (vooral lymfocyttaire en plasmocyttaire infiltratie in de lamina propria) correspondeerde vrij sterk met de mate van verwoesting van het olfactorisch epitheel. Afwijkingen in de klieren van Bowman waren links bij 17 van de 20 en rechts bij alle dieren aanwezig.

Atypie in de basale laag en de lamina propria werd betrekkelijk weinig gevonden, slechts bij 3 van de 20 dieren rechts en bij 1 van de 20 dieren links. Bij een vijftal dieren werd een zeer sterke klierbuishyperplasie gevonden zonder tekenen van maligniteit (4 maal rechts en 1 maal links) (fig. 8.5.). Bij geen der dieren werd een ENE aangetroffen.

19 van de 20 dieren hadden een duidelijke levertumor.

8.3.5. *Bevindingen bij groep VII (alleen afsluiting linker neusopening) na 52 weken*

Tot de 48e week waren 18 dieren gedood, zodat 22 dieren voor onderzoek waren overgebleven. Een overzicht van de bevindingen in de neus wordt gegeven in tabel 8.11. In deze tabel zijn, in tegenstelling tot tabel 8.10. de ontstekingsverschijnselen voor de regio respiratoria en olfactoria apart genoteerd. Zoals uit de tabel blijkt kwamen de ontstekingsverschijnselen in het respiratorische gebied overeen met die in het olfactorische gebied. Bij alle dieren was er rechts een matige tot zeer sterke lymfocyttaire c.q. plasmocyttaire infiltratie. Bij zeer intensieve ontstekingsverschijnselen was vaak het olfactorisch epitheel geheel of grotendeels verwoest. Bij 16 van de

Tabel 8.10. Bevindingen groep VI (DENA + afsluiting L. neusgat) na 52 weken.

regio respiratoria				regio olfactoria				opmerkingen												
No.	papillomen		desorganisatie	ontsteking regio resp. en olfact.		desorganisatie		verwoesting olf. epitheel		metaplasie		afwijkingen klieren van Bowman		atypic basale laag		atypic lamina propria		esthesioneuroepithelioma		opmerkingen
	L	R		L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	
1	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	+	—	—	Klierbuishyperpl. R.
2	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	
3	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	
4	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	
5	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	
6	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
7	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	Klierbuishyperpl. L.
8	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
9	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
10	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
11	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	
12	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	Klierbuishyperpl. R.
13	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	
15	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	
16	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
17	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	
18	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	Klierbuishyperpl. R.
19	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
20	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	

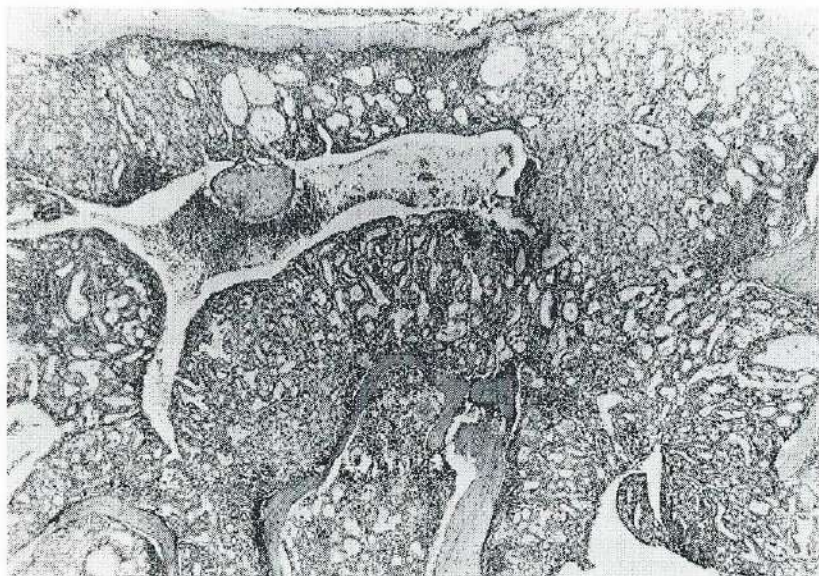


fig. 8.5. Zeer sterke klierbuishyperplasie R. bij een rat van groep VI (DENA + afsluiting linker neusgat) na 52 wk. (HE obj. 4 x)

22 dieren waren aan de afgesloten kant van de neus (links) geen afwijkingen van betekenis aanwezig.

Desorganisatie kwam altijd in combinatie met een ontstekingsreactie voor; metaplasie werd bij 10 van de 22 dieren in de open neushelft gevonden, slechts bij 2 van de 22 dieren in de afgesloten neushelft. Hyperplasie en nieuwvorming werden niet gevonden. In lever en longen werden geen afwijkingen gezien.

8.3.6. Samenvatting bevindingen bij groep VI en VII

In de tabellen 8.12.a en b wordt een samenvatting gegeven van de bevindingen in groep VI en VII na 52 weken. Zowel bij groep VI als bij groep VII waren vaak sterke ontstekingsreacties in de open neushelft aanwezig. Reeds vanaf de 12e week was dit bij alle dieren van groep VI het geval en vanaf de 40e week was dit ook een constant verschijnsel bij groep VII. De overige afwijkingen bij groep VI, zoals proliferatieve veranderingen, kwamen wel voor maar waren weinig frekwent. Dit gold ook voor de ratten die na 52 weken werden onderzocht.

Tabel 8.11. Bevindingen groep VII (alleen afsluiting L. neusgat) na 52 weken.

No.	regio respiratoria						regio olfactoria					
	desorganisatie		metaplasie		ontsteking		desorganisatie		metaplasie		ontsteking	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
2	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
3	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+
4	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
5	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
6	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
7	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
8	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+
9	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
10	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
11	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
12	—	+	—	—	—	+	—	+	—	+	+	+
13	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
14	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+
16	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
17	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
18	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
19	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
22	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+

Tabel 8.12a. Samenvatting bevindingen groep VI na 52 weken.
Regio respiratoria

		papillomen											
		Totaal 20		desorganisatie		metaplasie		fungiform		inverted		ontsteking	
		L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Aantal		17	20	11	17	1	2	0	0	13	20		
%		85	100	55	85	5	10	0	0	65	100		

Regio olfactoria

		Totaal 20		desorganisatie		metaplasie		verwoesting olf. ep.		afwijkingen klieren van Bowman		atypie basale laag		atypie lamina propria		esthesioneuroepithelioma	
		L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Aantal		19	20	17	20	13	18	17	20	1	3	1	3	0	0	0	0
%		95	100	85	100	65	90	85	100	5	15	5	15	0	0	0	0

Tabel 8.12b. Samenvatting bevindingen groep VII na 52 weken.
regio olfactoria regio respiratoria

		Totaal 22		desorganisatie		metaplasie		ontsteking		desorganisatie		metaplasie		ontsteking	
		L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Aantal		6	22	2	10	6	22	6	16	1	5	6	17		
%		27	100	9	46	27	100	27	73	5	23	27	77		

Fungiforme papilloompjes werden slechts in een gering aantal gezien, ze kwamen zowel links als rechts voor. Na 48 weken werd bij één van de twee ratten rechts in de neus een benigne klierbuis-hyperplasie gevonden. Deze afwijking was ook aanwezig bij 5 van de 20 ratten na 52 weken, vier maal rechts en eenmaal links. Atypie in de basale laag en in de lamina propria van de regio olfactoria werd ook na 52 weken slechts bij weinig dieren van groep VI (DENA + afsluiting van de neusopening links) gezien: bij 1 van de 20 links en bij 3 van de 20 rechts. Maligne nieuwvormingen in de neus waren na 52 weken niet aanwezig. Levertumoren werden bij groep VI na 36 weken waargenomen en waren daarna bij praktisch alle dieren van deze groep zeer duidelijk aanwezig.

8.3.7. Beantwoording van de vraag in 6.2.2.: Wat is de invloed van afsluiting van één uitwendige neusopening op de carcinogenese van DENA in de neus homo- en contralateraal?

Voor de beantwoording van deze vraag zullen de bevindingen van groep VI vergeleken worden met die van groep I.

Hoewel beide experimenten niet tegelijkertijd werden uitgevoerd lijkt een dergelijke handelwijze toch wel verantwoord en wel om de volgende redenen:

- De proefdieren waren afkomstig uit dezelfde kolonie en waren van dezelfde leeftijd en gewicht bij het begin van de experimenten.
- De dosering van DENA was bij beide groepen dezelfde; de toediening geschiedde op dezelfde manier en werd door dezelfde personen verricht.
- Huisvesting, voeding en milieu-omstandigheden waren voor beide groepen gelijk.
- Levertumoren werden bij groep I en groep VI na een praktisch gelijke inductietijd waargenomen.

Bij groep VI waren na 52 weken (d.w.z. na een langere inductieperiode dan bij groep I) geen maligne tumoren en met name geen ENE's in de neus aanwezig. Daarentegen was bij groep I na 39 weken reeds in 14 % een ENE aanwezig.

Op grond hiervan moet worden geconcludeerd dat een eenzijdige afsluiting van de neus in deze opstelling de carcinogenese door DENA in de neus sterk negatief beïnvloedt.

9. DISCUSSIE

9.1. BESPREKING RESULTATEN

Het doel van het onderzoek was na te gaan of de carcinogenese in de neus van de Wistarrat, geïnduceerd door toediening van DENA, door bijkomende factoren beïnvloed kon worden. In de literatuur werden geen gegevens hierover aangetroffen.

De bijkomende faktor zou, indien al van invloed, een versterking of een verzwakking van de carcinogenetische werking van DENA kunnen inhouden. Deze invloed zou zich kunnen uiten in een verandering van de inductietijd van de tumoren en/of in het ontstaan van een ander histologisch type van de tumoren.

Uit het onderzoek van *Bottema* was bekend welke afwijkingen na toediening van een beperkte totaal hoeveelheid DENA te verwachten zouden zijn. Voor het onderzoek was dit van uitermate belang. Indien immers het sterk werkzame carcinogene agens DENA de invloed van de tweede faktor volledig zou overschaduwden, dan zou waarschijnlijk de werking van de bijkomende faktor in het resultaat niet (duidelijk) meer aantoonbaar zijn.

Die dosering DENA werd dan ook gekozen, waarbij op grond van bovengenoemd onderzoek, enerzijds de verschillende afwijkingen in de neus te verwachten zouden zijn, tot en met tumorvorming, terwijl anderzijds de mogelijkheid aanwezig zou kunnen zijn dat de invloed van een tweede faktor duidelijk zou kunnen worden.

9.1.1. Toediening van alleen DENA

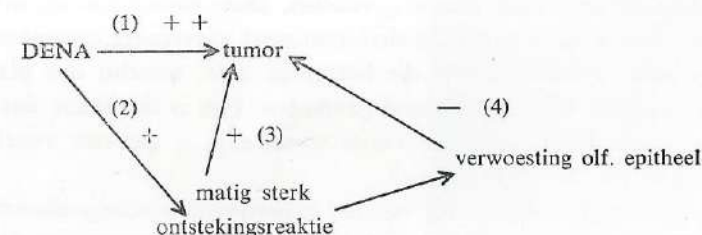
De bevindingen in het verloop van het onderzoek kwamen overeen met die van *Bottema*. Op het moment van de beëindiging van het experiment werd bij 14 % van de dieren een ENE in de neus gevonden.

Evenals in het onderzoek van *Bottema* werden geen plaveiselcellen adenocarcinomen waargenomen. Wel was er een atypie in de basale laag en in de lamina propria aanwezig. Het is waarschijnlijk dat zich uit de atypische cellen in de basale laag en mogelijk ook uit die van de lamina propria esthesioneuroepitheliomen ontwikkelen. Indien de inductietijd bij deze dieren langer was geweest, zouden waarschijnlijk een groter aantal gezwellen zijn ontstaan.

Naast het carcinogene effect heeft DENA nog andere werkingen die van invloed zouden kunnen zijn op de tumorvorming. In fig. 9.1. is getracht de carcinogenetische en de andere effecten in één schema weer te geven.

Te noemen zijn naast het carcinogene (1) het cytotoxisch effect (2) (*Greenblatt* en *Rysinghani* 1969) en daardoor een ontstekingsbevorderende werking. Een matige ontstekingsreactie (3) zou een bevorderende invloed kunnen hebben op het ontstaan van tumoren (*Eulderink* 1971). Het is echter ook goed voorstelbaar dat een zeer uitgesproken ontstekingsreactie een totale verwoesting van het epitheel teweegbrengt, zodat de cellen, waaruit een tumor zou kunnen ontstaan, te gronde zijn gegaan, voordat de carcinogene werking van DENA tot uiting kan komen (4). Een dergelijke, nagenoeg gehele verwoesting van het reukepitheel werd inderdaad door *Bottema* waargenomen bij die dieren die hoge doses DENA toegediend hadden gekregen.

De + en — tekens in fig. 9.1. geven de aard van de invloed op de tumorvorming weer.



++ duidelijk aantoonbare bevorderende werking
+ bevorderende werking waarschijnlijk
— remmende werking waarschijnlijk

fig. 9.1.

9.1.2. De invloed van röntgenbestraling

Röntgenbestraling (500 Rad) op de neus gaf tot ongeveer de achtste week een hyperemie in de lamina propria bij zowel de groep met als zonder DENA te zien.

Daarna waren er bij de controlegroep (alleen röntgenbestraling) geen duidelijke afwijkingen meer aanwezig. Wel werd bij de dieren

van deze groep, die na beëindiging van het experiment werden gedood, een lichte atrofie van de klieren van Bowman waargenomen. Mogelijk functioneerden deze slijmproducerende klieren minder sterk ten gevolge van de röntgenbestraling.

Voortijdig, reeds tijdens de periode van de toediening van DENA, gingen bij de groep met DENA + röntgenbestraling een 6-tal ratten te gronde. Bij de groep met alleen DENA en de groep met DENA + corpus alienum in de neus bedroeg dit in dezelfde periode slechts één dier per groep. Wegens autolyse en/of kannibalisme in de groepen met DENA was de doodsoorzaak helaas niet na te gaan bij de gestorven dieren. Het is voorstelbaar dat de DENA-toediening tesa-men met de röntgenbestraling een verminderde weerstand tegen infecties gaf, met name tegen infecties van de bovenste luchtwegen.

Bij de beëindiging van het experiment werden er significant meer tumoren gevonden bij de dieren met DENA + röntgenbestraling (nl. bij 56 %) dan bij de groep met alleen DENA (nl. bij 14 %). Alle maligne tumoren waren hier esthesioneuroepitheliomen.

Bij één van de dieren van de groep met DENA + röntgenbestraling, die in leven was gelaten, werd later een grote door het dak van de neus gegroeide tumor gevonden. Deze tumor toonde histologisch het beeld van een goed gedifferentieerd plaveiselcelcarcinoom. In het gehele experiment was dit het enige dier, waarbij een plaveiselcelcarcinoom in de neus werd gevonden. Het is denkbaar dat de röntgenbestraling hier mede verantwoordelijk is geweest voor het ontstaan van dit type gezwel.

In de proefopstelling van dit experiment is röntgenbestraling van de neus met 500 Rad duidelijk van invloed geweest op de carcinogenese door DENA in de neus.

De stelling van *Schmähl* (1970, zie 5.3.) dat co-carcinogenese alleen dan wordt waargenomen als carcinogenen van gelijke aard gelijktijdig of achtereenvolgens inwerken, kon niet worden bevestigd. De bevindingen in dit experiment lijken meer de veronderstelling van *Roe en Rowson* (1968) te steunen, dat ioniserende straling op cellen uiteindelijk dezelfde effecten teweegbrengt als een chemisch carcinogeen. Bovendien lijkt de röntgenbestraling van 320 Rad op het gehele lichaam zoals *Schmähl* die gebruikte te laag om hiervan enige invloed te verwachten. Immers DENA is een zo sterk carcinogeen, dat een tweede faktor wel een sterke invloed moet hebben om

zijn invloed op de carcinogenese manifest te doen worden. Hierom ook werd in ons experiment slechts gedurende een beperkte tijd (3 maanden) het carcinogeen toegediend, terwijl *Schmähl* DENA bleef toedienen tot aan de spontane dood van het proefdier.

In fig. 9.2. is weer getracht in een schema de invloed van DENA + röntgenbestraling op de carcinogenese in de neus weer te geven. DENA heeft enerzijds een carcinogeen effect met als gevolg tumorvorming in de neus (1), anderzijds is het cytotoxisch en veroorzaakt het een ontstekingsreactie in de neus (2). Röntgenstralen hebben aan de ene kant een mutageen en daardoor ook een carcinogeen effect (3), aan de andere kant geven zij echter ook een ontstekingsreactie (4). Een chronische ontstekingsreactie kan op zijn beurt van „positieve” invloed zijn op het ontstaan van tumoren in het gebied van de ontsteking (5). Het co-carcinogenetische effect van DENA + röntgenbestraling zou kunnen berusten op een carcinogeen effect van elk van beide factoren terwijl daarnaast een door beide factoren veroorzaakte ontstekingsreactie de carcinogenese versterkt.

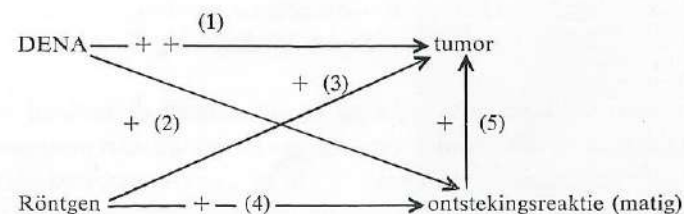


fig. 9.2.

9.1.3. De invloed van een corpus alienum in de neus

Het in dit onderzoek gebruikte corpus alienum (een proleendraadje) in het cavum nasi veroorzaakte een duidelijke ontstekingsreactie in het neusslijmvlies. Uiteraard was het de bedoeling, dat het corpus alienum gedurende het gehele experiment in de neusholte aanwezig zou blijven. In het beloop van het experiment echter bleek dat het proleendraadje slechts bij 4 van de 39 ratten van de groep met DENA en bij 8 van de 40 ratten van de groep zonder DENA in situ was gebleven. Ongeveer 6 weken na het begin van het experiment, toen het wondje op de neusrug was genezen, kon dit door

palpatie worden geconstateerd. De vraag op dat moment was of deze ontstekingsprikkels gedurende de eerste 4-5 weken van het experiment voldoende was geweest om het carcinogenetisch proces te beïnvloeden. Besloten werd om het experiment toch voort te zetten en het resultaat af te wachten, waarbij uiteraard de mogelijkheid aanwezig was, dat in het eindresultaat de invloed van de cofactor niet aantoonbaar zou zijn.

Bij de beëindiging van het experiment werden bij 57 % van de dieren met DENA + corpus alienum ENE's in de neus gevonden, terwijl bij de groep met alleen DENA na eenzelfde inductieperiode slechts bij 14 % van de dieren deze tumoren werden waargenomen. Bij de 2 ratten van de groep met DENA, waar het corpus alienum nog in de neus aanwezig was, werd bij beide een matig links/rechtsverschil gezien en bij één van beide dieren een ENE links.

De irritatie had geen invloed op het histologisch type van de ontstane tumoren.

Uit dit onderzoek blijkt dat in deze opstelling de irritatie van het neusslijmvlies door het corpus alienum gedurende het begin van de toediening van DENA de carcinogene werking van deze stof „versterkt” heeft, voorzover dat tot uitdrukking kwam in de inductietijd.

In fig. 9.3. is weer gepoogd in een schema de invloed van DENA en het corpus alienum weer te geven op de carcinogenese. DENA heeft een carcinogeen effect (1) en tevens een cytotoxisch effect met als gevolg een ontstekingsreactie van het neusslijmvlies (2). Het corpus alienum geeft een ontstekingsreactie van lichte aard (3). Beide factoren tezamen geven een matige ontstekingsreactie, zodat het reukepitheel niet geheel verwoest wordt. Deze ontstekingsreactie blijkt van positieve invloed te zijn op de tumorvorming in de neus (4).

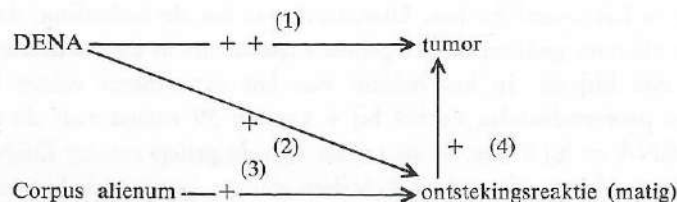


fig. 9.3.

9.1.4. De invloed van afsluiting van één neusopening

Bij de dieren van de groep met afsluiting en DENA en de groep met alleen afsluiting was een matige tot sterke ontstekingsreactie van het neusslijmvlies, vooral in de niet-afgesloten helft van de neus, een zeer opvallende bevinding. Deze ontstekingsreactie was bij de groep met DENA + afsluiting sterker en eerder aanwezig dan bij de groep zonder DENA. Bij de groep met DENA was deze reactie vanaf de 12e week reeds een constant verschijnsel.

Vaak waren de ontstekingsreacties bij de groep met DENA zo sterk dat het olfactorisch epitheel zelfs geheel of grotendeels verwoest was, vooral in de niet-afgesloten (rechter) neushelft. In de afgesloten (linker) neusholte daarentegen waren bij deze groep wel ontstekingsverschijnselen aanwezig, maar veel minder intensief.

Waarom afsluiting van één neusopening vaak een ontstekingsreactie aan de open kant geeft is niet duidelijk; het is echter een constant fenomeen, dat na enige tijd bij alle dieren optreedt. Denkbaar is dat door de verdubbelde luchtstroom het slijmvlies te „droog” wordt en daarom meer tot ontsteking neigt.

Bij de groep met DENA werd vaak een sterke klierbuishyperplasie gezien. Viermaal werd dit in de open neushelft waargenomen en eenmaal in de gesloten neushelft. Deze sterke klierbuishyperplasie werd bij de andere groepen met DENA niet waargenomen.

De meest opvallende bevinding echter bij de groep met DENA en afsluiting van één neushelft was, dat zelfs na een inductieperiode van 52 weken bij geen van de dieren een maligne tumor in de neus noch in de afgesloten noch in de open neusholte werd gevonden.

Bij de andere groepen welke DENA toegediend kregen, werden na een veel kortere inductieperiode tumoren in de neus gevonden.

Levertumoren daarentegen werden bij de dieren met DENA + afsluiting na een praktisch gelijke inductietijd waargenomen als bij de controle-groep met alleen DENA.

Mogelijk is een combinatie van factoren verantwoordelijk voor de negatieve invloed op de carcinogenese door DENA in de neus.

De volgende overwegingen zouden hier van belang kunnen zijn:

- DENA is sterk cytotoxisch met name voor het neusslijmvlies (2.4.3.) (Greenblatt en Rysinghani 1969). Hoge doseringen

DENA (20-40 mg per kg lichaamsgewicht per week) geven na enige tijd een totale verwoesting van het olfactorisch epitheel (*Bottema*).

- b. Indien wordt aangenomen dat de uitademingslucht DENA bevat, nadat deze stof subcutaan is toegediend (6.2.2.), dan is het denkbaar dat bij afsluiting van één neushelft, meer DENA op het neusslijmvlies terecht komt in de open helft. Deze grotere hoeveelheid DENA die aldus op het neusslijmvlies terecht komt, zou met name de cytotoxische verschijnselen van deze stof meer manifest doen worden.
- c. De afsluiting van één neushelft gaf bij de groep zonder DENA in de open neushelft na enige tijd een flinke ontstekingsreactie te zien.

Het is denkbaar dat de onder a., b. en c. genoemde factoren tezamen een situatie doen ontstaan als bij hoge doseringen DENA nl. een totale of bijna totale verwoesting van het olfactorisch epitheel in de open neushelft. Door deze verwoesting van het olfactorisch epitheel gaan ook de cellen, waaruit de esthesioneuroepitheliomen zouden zijn ontstaan, te gronde.

Bij de groep met afsluiting en DENA werden ook in de afgesloten neushelft geen tumoren waargenomen. Ontstekingsverschijnselen in de afgesloten neushelft werden wel gezien maar niet bij alle dieren, terwijl van een verwoesting van het olfactorisch epitheel zeker geen sprake was.

Het zou heel wel mogelijk kunnen zijn, dat de organotropie van DENA voor de neus berust op het feit dat DENA, althans voor een deel, door de neus wordt uitgeademd (zie hierboven onder b.). In de afgesloten linker neushelft vindt echter geen luchtpassage plaats en daardoor zou dan ook veel minder DENA op het slijmvlies terecht kunnen komen. Indien DENA alleen via de bloedbaan het neusslijmvlies zou bereiken na subcutane toediening, dan zouden tumoren in de afgesloten neushelft te verwachten zijn.

Wat betreft de afgesloten neusholte is een situatie ontstaan vergelijkbaar met die van de sinus maxillaris. Bij de groepen met DENA werden, zowel in eigen onderzoek als in dat van *Bottema* geen nieuwvormingen in de sinus maxillaris gevonden.

In fig. 9.4. is weer in een schema getracht de invloed weer te

geven van de afsluiting van één neushelft op de carcinogenese van DENA in de open neushelft. DENA heeft een carcinogeen effect op het neusslijmvlies (1). Afsluiting van één neushelft veroorzaakt een ontstekingsreactie met name in de open neushelft (2). Door de afsluiting wordt meer DENA via de uitademingslucht door de open neushelft gevoerd en mogelijk in contact gebracht met het neusslijmvlies: de dosis DENA wordt als het ware lokaal verhoogd (3). DENA heeft een cytotoxisch effect (4) met als gevolg een ontstekingsreactie. Door deze combinatie van factoren wordt de ontstekingsreactie in de neus versterkt (2, 3 en 4) waardoor er een verwoesting van het olfactorisch epitheel optreedt. Deze verwoesting van epitheel heeft een negatieve invloed op de tumorvorming in de neus (5).

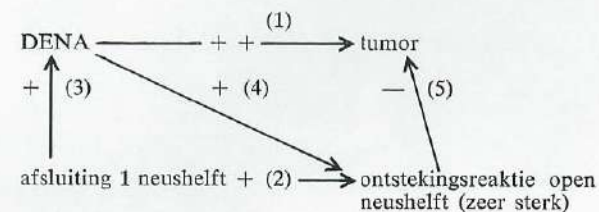


fig. 9.4.

9.2. HISTOLOGISCH TYPE VAN DE GEVONDEN TUMOREN

Alle maligne tumoren die gevonden werden in de neus hadden op één na histologisch een neuro-epitheliale structuur.

Zoals reeds in hoofdstuk 3.4.1. (Histopathologie) besproken, zijn er van de neuroepitheliale gezwellen bij de mens verschillende typen beschreven. *Berger* (1924/1926) onderscheidt het esthesioneuroepitheliom, het esthesioneurocytoom en het esthesioneuroblastoom.

In de tumoren bij de proefdieren in dit onderzoek waren soms velden van een verschillend celtype aanwezig. Vrij veelvuldig werden tumoren gezien van een grootcelig type met grote, ronde tot ovale kernen met een fijnkorrelig chromatine patroon en een wolkig cytoplasma. De cellen (neurocyten?) waren dikwijls in de palissade-stand gerangschikt, met veel rosetten c.q. pseudorosetten. Dit kan de indruk geven van een adeno-carcinoom. Met behulp van de P.A.S.-kleuring was het echter niet mogelijk intracellulair P.A.S. positief

materiaal aan te tonen. (Met de *Periodic Acid Schiff* kleuring kunnen o.a. mucopolysacchariden aanwezig in secernerend klierweefsel gekleurd worden.) Dit maakte de diagnose adenocarcinoom steeds onwaarschijnlijk. Zeer opvallend was vaak het grote aantal mitoses in de grootcellige tumoren (fig. 9.5.).

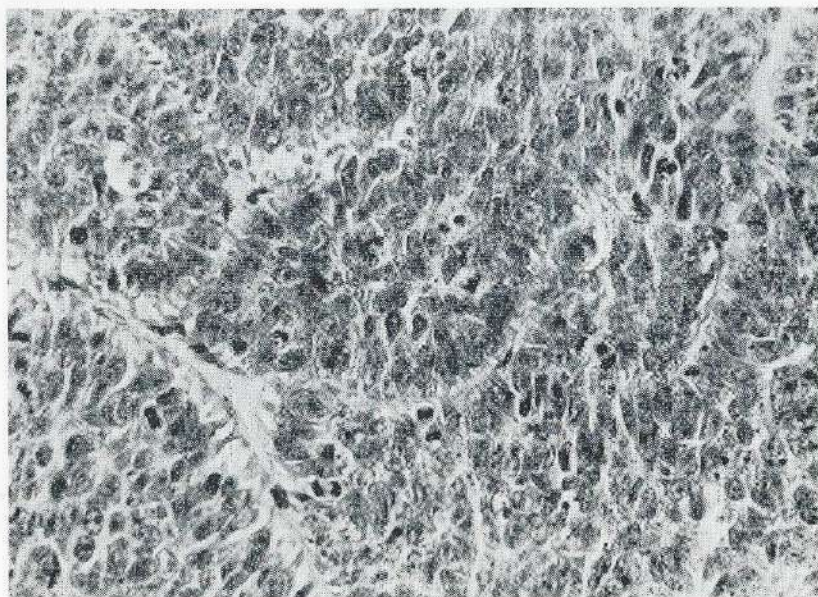


fig. 9.5. Veel mitoses in een ENE. (HE obj. 25 x)

Naast deze grootcellige werden ook tumoren gevonden van een kleincellig type (neuroblasten?). Soms groeiden deze temidden van preëxistent klierweefsel, waardoor ook hier een vergissing met een adeno-carcinoom mogelijk zou kunnen zijn.

De verschillen in histologie van de door DENA in de ratteneus geïnduceerde tumoren lijken te bevestigen hetgeen *Bergé* (1970) reeds stelde: de verschillende aspecten verraden wel de gradering in tumorrijping, maar corresponderen niet met verschillen in herkomst van de cellen. De reukplacode bestaat immers uit neuroectoderm, dat zich differentieert in epitheliale steuncellen en in neurale cellen. De tumoren kunnen daarom een epitheliaal of neurale beeld vertonen of zelfs overgangsbeelden. *Bergé* stelde als samenvattende histologische benaming voor: esthesioneuroom.

De coupes van de experimentele ENE's lieten vaak een sterk infiltratieve groei zien. Soms vond zelfs doorgroei naar het cerebrum met doorbreking van de schedelbasis plaats. In andere gevallen groeide de tumor in strengen en sprieten via lymfbanen, bloedvaten en zenuwscheden (fig. 3.16. en 9.6.). Dit gaf tesamen met de sterke mitose-activiteit de indruk van een zeer maligne tumor. In tegenstelling hiermee is meestal het gedrag van de neuroepitheliomen bij de mens. Hiervan wordt beweerd dat de prognose relatief goed is. Er zijn patiënten beschreven met een overlevingsduur van meer dan tien jaar (*Bergé* 1970).

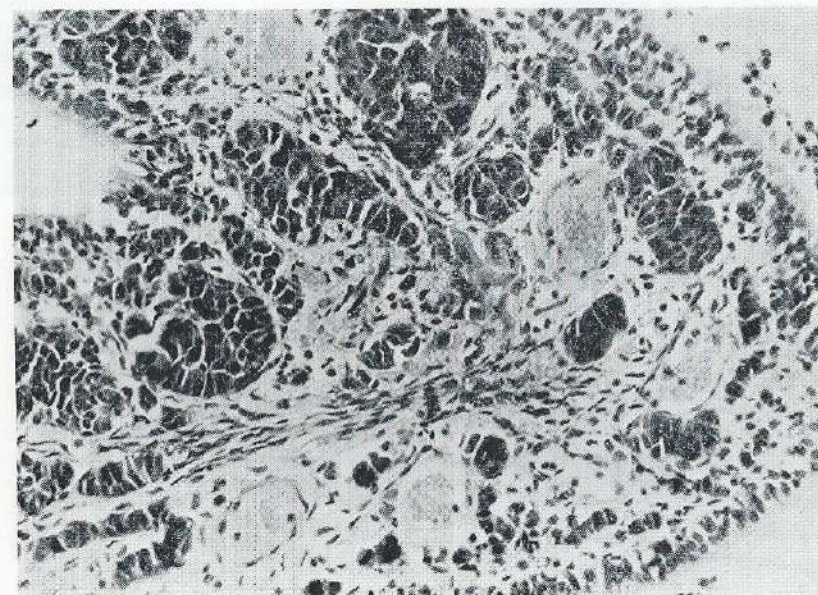


fig. 9.6. Een ENE dat zich vooral d.m.v. „sprieten” uitbreidt. (HE obj. 25 x)

Slechts eenmaal werd in het experiment een tumor gezien van niet-neuroepitheliale aard en wel een hooggedifferentieerd plaveiscelcarcinoom (rat van groep II (DENA + röntgen), die na 39 weken nog in leven was gelaten). Deze eenmalige bevinding laat ons inziens geen verdere conclusies toe.

9.3. RESULTATEN VAN DIT ONDERZOEK IN HET LICHT VAN DE HUMANE PATHOLOGIE

In hoofdstuk 4.3. zijn een aantal etiologische momenten genoemd die bij het ontstaan van de neus- of neusbijholtetumoren bij de mens betrokken zouden kunnen zijn. De resultaten van dit onderzoek maken aannemelijk dat een aantal van de daar genoemde factoren niet een direkt carcinogene werking hebben maar van cocarcinogene aard zijn (mechanische irritatie, röntgenbestraling). Deze invloed kwam in dit onderzoek met name tot uiting in een verkorting van de inductietijd. Na een beperkte inductietijd werden in de neus meer maligne tumoren gevonden indien naast toediening van een chemisch carcinogeen tevens sprake was van aanwezigheid van een cofactor (corpus alienum en röntgenbestraling). Ook voor de humane pathologie is de inductietijd een zeer belangrijk gegeven. Een carcinogeen met een zeer lange inductietijd c.q. een zodanige dosering van een carcinogeen dat slechts na een zeer lange inductietijd een tumor ontstaat, kan slechts dan voor de menselijke pathologie van belang zijn als deze inductietijd binnen de levensspan van de mens komt te liggen.

Indien deze inductietijd echter door een tweede faktor wordt verkort en het ontstaan van tumoren wel binnen de levensspan komt, dan is niet slechts het carcinogeen maar ook het cocarcinogeen van belang.

Gaat men er met (*Den Engelse* 1972) vanuit dat er tal van bekende en halfbekende of onbekende carcinogenen in ons milieu aanwezig zijn, dan is het zeker aangewezen om naast vermindering van contact met de carcinogene faktor zelf, ook de invloed van cocarcinogene factoren zo klein mogelijk te maken. Met behulp van een dergelijk denkmodel zou het ontstaan van de tumoren in de hierna te noemen voorbeelden meer begrijpelijk worden.

Neus- en neusbijholtetumoren komen meer voor bij mensen die werkzaam zijn of werkzaam geweest zijn in de hout- en leerbewerkingsindustrie (*Hadfield* 1969, *Debois* 1969, *Acheson* 1970, *Delemarre* en *Themans* 1971). Speciaal de mensen werkzaam in een stoffige omgeving en in de houtindustrie de bewerkers van de harde houtsoorten zouden een grotere kans hebben op het krijgen van een neustumor. Op grond van het onderzoek in dit proefschrift lijkt de veronderstelling gewettigd dat stof c.q. houtpartikeltjes in het werk-

milieu een irritatie geven van het neusslijmvlies, waardoor dit neusslijmvlies gevoeliger wordt voor de invloed van carcinogenen in het milieu. Deze carcinogenen kunnen van een geheel andere aard en origine zijn zoals: tabaksrook, het gebruik van snuif, produkten aanwezig in een rokerige omgeving zoals dit voorkomt bij bepaalde bevolkingsgroepen in Afrika (zie 4.3. ad 4. en *Acheson* 1970). Als steun voor deze veronderstelling kan gelden dat tot nu toe geen carcinogene faktor in de houtsoorten zelf is aangetroffen.

Een ander voorbeeld in de menselijke pathologie van deze relatie is het bronchuscarcinoom. Dit komt meer voor bij mensen met CARA (*v. d. Wal*, 1964). De exogene carcinogene faktor zou hier o.a. geleverd kunnen worden door de aanwezigheid van een carcinogene faktor in tabaksrook en de cocarcinogene door de chronische aspecifieke ontsteking van het slijmvlies van de bronchiën.

SAMENVATTING

Dit proefschrift beschrijft een onderzoek naar de mogelijkheid om de carcinogenese in de neus van de Wistarrat, geïnduceerd door diëthylnitrosamine (DENA), door andere factoren te beïnvloeden.

DENA - één van de vele nitrosamine-verbindingen - doet bij ratten en hamsters na een betrekkelijk korte inductietijd zowel benigne als maligne neustumoren ontstaan (o.a. *Druckrey* 1964, *Herrold* 1964, *Bottema* 1971).

De benigne tumoren komen histologisch overeen met die welke ook in de humane pathologie in de neus worden waargenomen, n.l. fungiforme papillomen en „inverted” papillomen (3.4.2. en 4.2. en 4.4.).

De maligne tumoren in de neus zijn volgens *Bottema* uitsluitend esthesioneuroepitheliomen (ENE's).

Andere auteurs (o.a. *Thomas* 1965) menen ook plaveiselcel-, adeno- en anaplastische carcinomen te hebben waargenomen. In de menselijke pathologie zijn neuroepitheliale tumoren in de neus zeer zeldzaam (*Sisson* 1973).

In de dierexperimenten werd één carcinogeen toegediend in een waarschijnlijk relatief zeer hoge dosering. Vermoedelijk speelt in de humane pathologie meer dan één faktor een rol in de carcinogenese (*Den Engelse* 1972).

Het is waarschijnlijk dat het ontstaan van een tumor bij de mens uiteindelijk het resultaat is van de samenwerking van een aantal factoren. Indien een tumor ontstaat door de werking van meer dan één faktor, spreekt men van co- of syncarcinogenese (*Shear* 1938) (Zie hoofdstuk 5.).

Het leek daarom zinvol na te gaan of de carcinogenese van DENA in de neus door een tweede faktor te beïnvloeden is. Deze invloed zou kunnen blijken uit:

- a. een verandering van de inductietijd van de tumoren.
- b. het voorkomen van andere typen tumoren.

In dit experiment werd als tweede faktor gekozen:

1. een chronische irritatie d.m.v. een corpus alienum in de neus.
2. röntgenbestraling van de neus met 500 R.
3. een afsluiting van één neusopening, waardoor respiratie nog slechts door de open neushelft mogelijk is.

De DENA-dosering was $2 \times 7,5$ mg/kg lichaamsgewicht/week gedurende 12 weken. Deze dosering gedurende 12 weken werd gekozen op grond van de resultaten van het onderzoek van *Bottema*.

De ratten werden in 7 groepen verdeeld; iedere groep bestond uit 40 dieren.

Groep I	—	alleen DENA
Groep II	—	DENA + röntgen
Groep III	—	DENA + corpus alienum
Groep IV	—	alleen röntgen
Groep V	—	alleen corpus alienum
Groep VI	—	DENA + afsluiting linker neusopening
Groep VII	—	alleen afsluiting linker neusopening

Het dierexperiment werd in 2 fasen uitgevoerd, te weten eerst de groepen I t/m V en daarna de groepen VI en VII.

Om de vier weken werden twee dieren van elke groep gedood om de ontwikkeling van afwijkingen in de neus te kunnen vervolgen. T/m de 36e week werden geen duidelijke verschillen in de bevindingen in de neus van de ratten van groep I, II en III waargenomen. Na 39 weken werd het experiment voor de groepen I t/m V beëindigd op 2 dieren per groep na, daar bij de dieren welke na 36 weken gedood waren alle te verwachten afwijkingen gezien waren (zie 8.2.2.6. en tabel 8.2.).

a. Invloed van röntgenbestraling en corpus alienum.

Het bleek dat in dit experiment het type van de ontstane tumoren bij groep II (DENA + röntgen) en groep III (DENA + corpus alienum) niet verschilde van die bij groep I (alleen DENA). Wel werd later bij 1 van de 2 dieren van groep II (DENA + röntgen), die na de 39e week nog in leven was gelaten, na 48 weken een plaveiselcelcarcinoom in de neus gevonden. Het is denkbaar dat de bestraling hier mede verantwoordelijk is geweest voor het ontstaan van dit type gezwel.

Na een inductietijd van 39 weken was het aantal maligne tumoren bij groep II en groep III significant groter dan bij groep I.

Bij groep I werd bij 3 van de 21 dieren (14 %) een tumor in de neus gevonden, terwijl bij groep II bij 9 van de 16 dieren (56 %) en bij groep III bij 12 van de 21 dieren (57 %) een tumor in de neus

aanwezig was. Zowel röntgenbestraling als irritatie door een corpus alienum in één neushelft bleek in deze opstelling de carcinogenese door DENA in de neus positief te beïnvloeden.

b. Invloed van afsluiting van één neusopening.

Bij groep VI (DENA + afsluiting linker neusopening) en groep VII (alleen afsluiting linker neusopening) was de zeer sterke ontstekingsreactie in de open neushelft een zeer opvallende bevinding. Bij groep VI met name waren de ontstekingsinfiltraten vaak zo sterk, dat het olfactorisch epitheel geheel of nagenoeg geheel verwoest was. Bij enkele dieren van groep VI werd een sterke klierbuishyperplasie waargenomen. De meest verrassende bevinding was het feit dat zelfs na een inductieperiode van 52 weken geen maligne tumoren in de neus werden gevonden.

In deze opstelling bleek, in dit experiment, dat afsluiting van één neusopening een sterk negatieve invloed had op de carcinogenese van DENA in de neus.

In hoofdstuk 9., Discussie, worden de resultaten van het onderzoek nader besproken. Aan de hand van een aantal schematische figuren (fig. 9.1.-4.) is getracht de, deels onverwachte, effecten van de bijkomende factoren duidelijk te maken.

In dit hoofdstuk worden tevens nog enige opmerkingen gemaakt met betrekking tot de resultaten van dit onderzoek en de humane pathologie. Carcinogenen met een zeer lange inductietijd of in een zodanige dosering dat slechts na een lange inductietijd een tumor ontstaat, zijn slechts dan van belang voor de menselijke pathologie als deze inductietijd binnen de levensspan van de mens komt te liggen. Indien echter door een tweede faktor de inductietijd wordt verkort en daardoor het ontstaan van de tumor binnen de levensspan van het individu komt, dan is niet slechts het carcinogeen maar evenzeer ook de tweede faktor (het co-carcinogeen) van groot belang.

Tenslotte worden enkele mogelijke voorbeelden van deze relatie gegeven (9.3.).

SUMMARY

This thesis describes an investigation into the possibility of influencing carcinogenesis, induced in the nose of the Wistar rat by diethylnitrosamine (DENA), by some other factors.

DENA - one of the many nitrosamine compounds - causes benign as well as malignant tumours in the nose of rats and hamsters after a relatively short induction time (see *Druckrey* 1964, *Herrold* 1964, *Bottema* 1971).

The benign tumours are histologically similar to those found in the pathology of the human nose, that is, fungiform papillomata and "inverted" papillomata (3.4.2. and 4.2. and 4.4.).

According to *Bottema* the malignant tumours of the nose are exclusively esthesioneuroepitheliomata (E.N.E.'s).

Other authors (e.g. *Thomas* 1965) claim to have found squamous-cell, adeno- and anaplastic carcinomas as well. In human pathology neuroepithelial tumours in the nose are very rare (*Sisson* 1973).

In the animal experiments one carcinogen was given in what is possibly a relatively very high dosage. It is likely that more than one factor plays a role in carcinogenesis in human pathology (*Den Engelse* 1972). It is possible that the occurrence of a tumour in a human being is the eventual result of the interaction of a number of factors.

If a tumour appears through the action of more than one factor one speaks of co-carcinogenesis or syncarcinogenesis (*Shear* 1938, see chapter 5).

It seemed therefore suitable to investigate whether carcinogenesis in the nose caused by DENA might be influenced by a second factor. This influence could appear through

- a. an alteration in the induction-time of the tumours,
- b. the appearance of other types of tumours.

In this experiment the following were chosen as second factor:

1. a chronic irritation by means of a corpus alienum in the nose,
2. irradiation of the nose with X-rays at 500 R.,
3. the closing of one nostril, so that respiration is possible only through the open nasal passage.

The dosage of DENA was $2 \times 7,5$ mg/kg of bodyweight per week during 12 weeks. This dosage during 12 weeks was chosen on the grounds of the results of the investigation by *Bottema*.

The rats were divided in 7 groups; each group comprised 40 animals.

- Group I — DENA alone.
- Group II — DENA and X-rays.
- Group III — DENA and corpus alienum.
- Group IV — X-rays only.
- Group V — corpus alienum only.
- Group VI — DENA and closing of the left nostril.
- Group VII — closing of the left nostril only.

The animal experiment was carried out in two phases: firstly examining Groups I to V inclusive; and thereafter Groups VI and VII.

Every four weeks two animals from each group were killed to allow examination of the development of deteriorations in the nose. Up to the 36th. week, no obvious differences were found in the noses of rats from Groups I, II and III. After 39 weeks the experiments on Group I to V were concluded, but for 2 animals per group, for all the anticipated deteriorations had been observed in all the animals which were killed after 36 weeks (see Table 8.2. and chapter 8.2.2.6.).

a. Influence of X-rays and corpus alienum

It appeared that in this experiment the types of tumours in Group II (DENA and X-rays) and Group III (DENA and corpus alienum) were no different from those in Group I (DENA alone). But after 48 weeks a squamous-cell carcinoma was found in the nose of one of the two animals from Group II (DENA and X-rays) which was still alive after the 39th week.

It is conceivable that the X-rays were partly responsible for the onset of this type of tumour.

After an induction-time of 39 weeks the number of malign tumours in Groups II and III was significantly greater than in group I. In Group I a tumour was found in the nose of 3 of the 21 animals (14 %), while in Group II a tumour was present in the nose of 9 of the 16 animals (56 %) and in Group III in 12 of the 21 animals (57 %).

Under the circumstances in this experiment X-rays as well as a

corpus alienum in one nasal cavity proved to have a positive influence on carcinogenesis in the nose by DENA.

b. Influence of the closing of one nostril.

In Group VI (DENA and closing the left nostril) and Group VII (closing of the left nostril only), severe inflammation of the open nasal cavity was a very remarkable occurrence. Especially in Group VI the intensity of the inflammation was so severe that the olfactory epithelium was completely or almost completely ruined. In some animals of Group V a severe hyperplasia of glandular ducts was found. The most surprising feature was the fact even after an induction period of 52 weeks no malign tumours of the nose were found.

Under these circumstances it appeared in this experiment that the closing of one nostril had a strong negative influence on carcinogenesis in the nose induced by DENA.

In chapter 9, Discussion, the results of the investigation are considered further. By means of some diagrams, it is attempted to clarify the partly unexpected results of the additional factors (fig. 9.1.-4.).

In this chapter also some comments are made with respect to the application of the results of this investigation to human pathology. Carcinogens with a prolonged induction-time or in such a dosage that a tumour occurs only after a long induction-time are important for human pathology only if this induction-time should come to lie within the lifespan of the human being. If, however the induction-time were shortened by a second factor, and thereby the occurrence of a tumour comes within the lifespan of the individual, then not only the carcinogen but likewise the second factor is of great importance.

Finally some examples of these relationships are given (9.3.).

LITERATUURLIJST

- ACHESON, E. D., E. H. HADFIELD and R. G. MACBETH (1967). Carcinoma of the nasal cavity and accessory sinuses in woodworkers. *The Lancet* 311-312.
- ACHESON, E. D., R. H. COWDELL and B. JOLLES (1970). Nasal cancer in the Northamptonshire boot and shoe industry. *British Med. J.* 1, 385-393.
- ALONSO, A. and G. HERRANZ (1970). Der Einfluss von Chloramphenicol auf die Leber-Cancerisierung durch Diäthylnitrosamin. *Die Naturwissenschaften* 57, 240.
- ANDRES, K. H. (1966). Der Feinbau der Regio olfactoria von Makrosmatikern. *Z.für Zellforschung* 69, 140-154.
- ANDREWS, P. A. J. and L. MICHAELS (1968). Nasopharyngeal carcinoma in canadian bush pilots. *The Lancet*, ii, 85-87.
- ARTICLES OF GENERAL INTEREST (1971). Nucleic-acid alkylation in relation to nitrosamine carcinogenesis and mutagenesis. *Food Cosmet. Tox.* 9, 442-444.
- ARMUTH, V. and I. BERENBLUM (1972). Systemic Promoting action of phorbol in liver and lung carcinogenesis in AKR mice. *Cancer Res.* 32, 2259-2262.
- BAILEY, B. J. en S. BASTON (1975). Olfactory neuroblastoma. *Arch. of Otolaryng.* 101, 1.
- BARNES, J. M. and P. N. MAGEE (1954). Some toxic properties of dimethylnitrosamine. *Brit.J.Ind.Med.* 11, 167-174.
- BELONJE, E. C. en H. B. OEY (1972). Het papilloma inversum van de neus. *N.T.v.G.*, 116, 598-603.
- BERENBLUM, I. (1969). A re-evaluation of the concept of cocarcinogenesis. *Prog. exp. tumor res.* 11, 21-30.
- BERGEAL, A. (1970). Esthésioneuromes de la placode olfactive. (A propos de 5 nouveaux cas.) Thèse.
- BERGER, L., LUC et RICHARD (1924). l'Esthésioneuroepitheliome Olfactif. *Bull. Ass. France Cancer.* 13, 410-421.
- BERGER, L. et H. COUTARD (1926). L'esthésioneurocytome olfactif. *Bull. Ass.France Cancer* 15, 404.
- BERNARD, Ph. A. (1970). Les tumeurs nerveuses des fosses nasales. *J.Fr. O.R.L.* 19, 793-803.
- BOTTEMA, T. (1971). Experimentele gezwollen in het neusslijmvlies van de rat. Diss. A'dam VU.
- BOTTEMA, T. en R. DONNER (1973). On the aetiologic factors in nasal cancer. *Rhinology*, XI, 17-22.
- BRADSHAW, R. B. (1967). Olfactory neuroblastoma, an uncommon nasal tumour. *J. of Laryng.* 81, 1177.
- BROEKER, J. (1955). Aesthesioneuroblastoom van het cavum nasi bij een man van 19 jaar. *N.T.v.G.* 99, 1958.
- BOURQUET, J., J. BOURDINIÈRE, J. JÉZÉQUEL, Y. du PLESSIS, J. L. DITVIAL, Ph. DUMEYNIU (1971). De 237 observations de tumeurs malignes ethmoïdo-maxillaires. *Ouest-Méd.* 24, 395-398.
- BUCHANAN, G. and G. SLAVIN (1972). Tumours of the nose and sinuses. A clinico pathological study. *J.Laryng.* 86/7, 685-696.
- CARDESA, A. e.a. (1976). Histogenesis of tumors from the nasal cavities induced by diethylnitrosamine. *Cancer*, Vol. 37, 1, 1976.
- CERVELLERA, G., D. BELLOMO (1969). Tumori del placode olfattivo e neoplasie indifferenziate delle fosse nasali: considerazioni anatomo-cliniche. *Il Valsalva*, 45, 223-241.
- CLAYSON, D. B. (1962). Incomplete carcinogens and the two-stage theory of carcinogenesis. In: Chemical carcinogenesis, 290-314. J. & A. Churchill Ltd, London.
- DEBOIS, J. M. (1969). Tumoren van de neusholte bij houtbewerkers. *Tijdschr. v. Gen.* 25 jg. 92-93.
- DELEMARRE, J. F. M. en H. H. THEMANS (1971). Het adenocarcinoom van de neusholten. *N.T.v.G.* 115, 688-690.
- DIBBLE, P. A. and A. K. BROWN (1961). Esthesioneuroepithelioma. *The Laryngoscope* 71, 192-199.
- DOLL, R. (1958). Cancer of the lung and nose in nickel workers. *Brit.J.Industr. Med.* 15, 217-223.
- DRUCKREY, H. and R. PREUSSMANN (1962). Zur Entstehung carcinogener Nitrosamine am Beispiel des Tabakrauchs. *Die Naturwissenschaften* 49, 498.
- DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, R. PREUSSMANN und S. IVANKOVIC (1963). Krebszeugung durch einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen. *Die Naturwissenschaften*, 50, 735.
- DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC, H. D. MENNEL und R. PREUSSMANN (1964). Selektive Erzeugung von Carcinomen der Nasenhöhle bei Ratten durch N-N-Di-Nitroso-piperazin, Nitrosopiperidin, Nitrosomorpholin, Methyl-allyl, Dimethyl- und Methyl-vinyl-nitrosamin. *Z.für Krebsforschung* 66, 138-150.
- DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und D. SCHMÄHL (1967). Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z.für Krebsforschung* 69, 103-201.
- DRUCKREY, H. und Ch. LANDSCHÜTZ (1971). Carcinome der Nase bei Ratten nach chronischer Inhalation von 0.05 ppm Methyl-butyl-nitrosamin. *Z.für Krebsforschung* 75, 221-224.
- DUTTON, A. H. and D. F. HEATH (1956). Demethylation of dimethylnitrosamine in rats and mice. *Nature* 178, 644.
- DUUREN, B. L. van (1969). Tumor-promoting agents in two-stage carcinogenesis. *Progr.exp.Tumor Res.* 11, 31.
- DUUREN, B. L. van and S. MELCHIONNE (1969). Inhibition of tumorigenesis. *Progr.exp.Tumor Res.* 12, 55-94.
- ENGELSE, L. DEN, P. A. J. BENTVELZEN and P. EMMELOT (1969/70). Methylation of deoxyribonucleic acid and tumour formation following administration of dimethyl-nitrosamine to mice. *Chem.Biol.Interactions*, 1, 395-406.
- ENGELSE, L. DEN and P. EMMELOT (1971/72). Effects of feeding the carcinogen dimethylnitrosamine on its metabolism and methylation of DNA in the mouse. *Chem.Biol.Interactions*, 4, 321-327.
- ENGELSE, L. DEN (1972). Biochemische aspecten van chemische carcinogenese, toegespitst op aflatoxines en nitrosamines. *Voeding* 33/1, 17-39.
- ENGELSE, L. DEN (1972). Methylering van DNA en het ontstaan van tumoren in de muis onder invloed van dimethylnitrosamine (DMNA). 13e Fed. Verg. van Med. Biol. Ver. t.b.v. het klinisch wetenschappelijk onderzoek, Amsterdam.
- ENGELSE, L. DEN (1974). The formation of methylated bases in DNA by dimethylnitrosamine and its relation to differences in the formation of tumours in the livers of GR and C₅₇Hf mice. *Chem. Biol. Interactions*, 8, 329-338.
- EULDERINK, F. (1971). Kaakgezwollen bij muizen na röntgenbestraling en langdurige mechanische irritatie. Diss. Leiden 1971.
- FERON, V. J., P. EMMELOT and T. VOSSENAAR (1972). Lower respiratory tract tumours in syrian golden hamsters after intratracheal instillations of diethylnitrosamine alone and with ferric oxide. *Europ. J. Cancer*, 8, 445-449.
- FITZ-HUGH, G. S., M. S. ALLEN Jr., T. N. RUCKER and P. M. SPRINKLE (1965). Olfactory Neuroblastoma (Esthesioneuroepithelioma). *Arch.Otolaryng.* 81, 161-168.
- FONG, Y. Y. and E. O. F. WALSH (1971). Carcinogenic nitrosamines in cantonese salt-dried fish. *The Lancet* 11, 1032.

- FRAZELL, E. L. and J. S. LEWIS (1963). Cancer of the nasal cavity and accessory sinuses. *Cancer*, 16, 1293-1301.
- FRIEDMANN, I. - D. A. OSBORN (1974). The ultrastructure of the olfactory neuroblastoma. *Minerva Otorinolaringologica* Vol. 24, nr. 1, 66-74.
- FRIEDRICH-FREKSA, H., W. GÖSSNER, und P. BÖRNER (1969). Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin. *Z. Krebsforsch.* 72, 226-239.
- FRIEDRICH-FREKSA, H., G. PAPADOPULU und W. GÖSSNER (1969). Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von Diäthylnitrosamin. *Z. Krebsforsch.* 72, 240-253.
- GIBEL, W. (1967). Experimentelle Untersuchungen zur Synekaryogenese beim Ösophaguskarzinom. *Archiv f. Geschwulstforschung* 30, 181-189.
- GIGNOUX, M. et Ph. BERNARD (1969). Tumeurs malignes de l'ethmoïde chez les travailleurs du bois. *Le J. de Med. de Lyon*, 50, 731-736.
- GREENBLATT, M. and K. RIJSENGHANI (1969). Comparative cytopathologic alterations induced by alkyl nitrosamines in nasal epithelium of the Syrian hamster. *J. Nat. Cancer Institute* 42, 421-433.
- GRONHOVD, R. G. (1968). Olfactory neuroblastoma. *Rev. Bras. Med.* 1968, 25/1, 38-41.
- HADFIELD, E. (1969). Tumours of the nose and sinuses in relation to woodworkers. *J. Otol. and Lar.* 83, 417-423.
- HAMILTON, A. and H. L. HARDY (1949). *Industrial Toxicology*. P. Hoeber, New York.
- HAOT, J. et J. C. BIENFAIT (1969). Les papillomes inversés des cavités nasosinusiennes. *Path.europ.*, 4, 222-234.
- HARRISON, D. F. N. (1971). Tumours of the Nose and Paranasal sinuses in Scott-Brown's Diseases of the Ear, Nose and Throat. Butterworth 1971.
- HERROLD, K. M. and L. J. DUNHAM (1963). Induction of tumors in the syrian hamster with diethylnitrosamine (N-nitrosodiethylamine). *Cancer Res.* 23, 773-777.
- HERROLD, K. M. (1964). Induction of olfactory neuroepithelial tumors in Syrian hamsters by diethylnitrosamine. *Cancer* 17, 114-121.
- HERROLD, K. M. (1964). Effect of route of administration on the carcinogenic action of diethylnitrosamine (N. nitrosodiethylamine). *Brit.J. of Cancer* 18, 763-767.
- HERROLD, K. M. (1964). Epithelial papillomas of the nasal cavity. *Arch. of Path.* 78, 189-195.
- HILGERS, F. J. M. (1976). Immunological aspects of herpesviruses in human neoplasia. Diss. A'dam.
- HOFFMANN, F. und A. GRAFFI (1964). Nasenhöhlektumoren bei Mäusen nach percutaner Diäthylnitrosaminapplikation. *Archiv für Geschwulstforschung* 23/4, 274-288.
- JAFFÉ, R. (1931). Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. J. Springer, Berlin.
- KEEN, P. (1955). The Bantu and the aetiology of cancer. *S.A. Med.J.*, 29, 1198-1199.
- KELEMEN, G. and F. SARGENT (1946). Nonexperimental pathologic nasal findings in laboratory rats. *Arch. of Otolar.* 44, 24-42.
- KIMMEL, H. J. C. Over maligne tumoren in de neus en neusbijholten. Proefschrift Amsterdam 1960, G. U.
- KOLZE, V. (1968). Olfactory esthesioneuroma. *Acta Oto-Lar.* 65, 397-402.
- KORDAC, V., E. SCHÖN and A. BRAUN (1969). Hepatocarcinogenesis in mice with the simultaneous administration of diethylnitrosamine and the virus Motol. *Neoplasma* 16, 5, 485-490.
- KOWALEWSKI, K. and E. F. TODD (1971). Carcinoma of the gallbladder induced in hamsters by insertion of cholesterol pellets and feeding Dimethylnitrosamine (35293). *Proc. of the Soc. for Exp. Biol. & Med.* 136, 482-486.
- KRÖGER, H., P. KAHLE und H. KESSEL (1968). In-vivo-Methylierung von Rattenleber-RNA unter Einfluss von Diäthylnitrosamin. *HoppeSeyler's Z. Physiol. Chem.*, 349, 1725-1732.
- KRÜGER, F. W., H. BALLWEG und W. MAIER-BORST (1968). Untersuchungen über die alkylierende Wirkung von C¹⁴-Methylnitrosaminstoff und 1-C¹⁴-Äthylnitrosaminstoff. *Experientia* 26, 520.
- KRÜGER, F. W., W. KUNZ, K. PETERSEN und B. SCHNIEDERS (1970). Charakterisierung der durch Dimethylnitrosamin in vivo methylierten RNS-Fractionen der Leber. *Archiv für Pharm.* 266, 383-384.
- KRÜGER, F. W. (1972). Zum biochemischen Wirkungsmechanismus carcinogener N-Nitroso-Verbindungen. *Ärztliche Forschung* 26/6, 197-202.
- LEWIS, J. S., R. V. P. HUTTER, H. RANDAL TOLLEFSEN and F. W. FOOTE Jr. (1965). Nasal tumours of olfactory origin. *Arch. Otolaryng.*, 81, 169-174.
- LIJINSKY, W., J. LOO and A. E. ROSS (1968). Mechanism of alkylation of nucleic acids by nitrosodimethylamine. *Nature*, 218, 1174-1175.
- LIJINSKY, W. and S. S. EPSTEIN (1970). Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature (London)* 225, 21-23.
- LOVELESS, A. (1969). Possible relevance of 0-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature*, 223, 206-207.
- MACBETH, R. G., E. D. ACHESON and E. N. HADFIELD (1969). Ethmoidal cancer in woodworkers in the furniture industry. *Proc. of the 9 Int. Congress. Mexico Exc. Med. A'dam* 1970, 840-842.
- MAGEE, P. N. and J. M. BARNES (1956). The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Brit. J. of Cancer* 10, 114-120.
- MAGEE, P. N. and E. FARBER (1962). Toxic liver injury and carcinogenesis. *Biochem. J.* 83, 114-124.
- MAGEE, P. N. and T. HULTIN (1962). Toxic liver injury and carcinogenesis. *Biochem. J.* 83, 106-114.
- MAGEE, P. N. and R. SCHOENTAL (1964). Carcinogenesis by nitroso compounds. *Brit. med. Bull.*, 20, 102-106.
- MENNEL, H. D., W. WECHSLER und K. J. ZÜLCH (1974). Morphologie und Morphogenese der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Nasenhöhlektumoren beim Goldhamster. *Beitr. Path. Bd.* 151, 134-156 (1974).
- MILLER, D., J. M. GOLDMAN, M. L. GOODMAN (1971). Etiologic study of nasopharyngeal cancer. *Arch. Otolaryng.* 94, 104-108.
- MIZRAHI, I. J. and P. EMMELOT (1962). The effect of cysteine on the metabolic changes produced by two carcinogenic N-nitrosodialkylamines in rat liver. *Cancer, Res.* 22/1, 339-351.
- MIZRAHI, I. J. and P. EMMELOT (1963). Counteraction by sulphhydryl compounds of the enzymic conversion of and the metabolic lesions produced by two carcinogenic N-nitrosodialkylamines in rat liver. *Biochem. Pharmacology* 12, 55-63.
- MONTESANO, R. and U. SAFFIOTTI (1968a). Carcinogenic Response of the respiratory tract of Syrian golden hamsters to different doses of diethylnitrosamine. *Cancer.Res.* 28, 2197-2210.
- MONTESANO, R. and U. SAFFIOTTI (1968b). Synergistic effect of diethylnitrosamine (DEN) and benzo (a) pyrene (BP) on respiratory carcinogenesis in hamsters. Division of oncology, The Chicago Medical School, Chicago, Illinois. *Proc. Am. Assoc. Cancer Research* 9, 51.
- MONTESANO, R. and P. N. MAGEE (1970a). Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices in vitro. *Nature (London)*, 228, 173-174.

- MONTESANO, R., U. SAFFIOTTI and P. SHUBIK (1970b). The role of topical and systemic factors in experimental respiratory carcinogenesis. Proc. Inhalation Conference, 353-371, A.E.C. Series No. 18.
- MONTESANO, R. (1970). Systemic carcinogens (N-Nitroso compounds) and synergistic or additive effects in respiratory carcinogenesis. *Tumori* 56, 335-344.
- MONTESANO, R. and P. N. MAGEE (1971). Metabolism of nitrosamines by rat and hamster tissue slices in vitro. Proc. of the American Ass. for Cancer Res. 12, 14, 1971.
- NEGUS, V. (1958). The comparative anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. E & S Livingstone Ltd, Edinburgh and London.
- NORONHA, R. F. X. and C. M. GOODALL (1972). Nasal tumours in starved rats injected once with dimethylnitrosamine. *New Zealand Med. J.* 75, 374-375.
- OSBORN, D. A. (1970). Nature and behaviour of transitional tumours in the upper respiratory tract. *Cancer* 25, 50-60.
- PARVIZ POUR, A. CARDESA, J. ALTHOFF and U. MOHR (1974). Tumorigenesis in the Nasal Olfactory Region of Syrian Golden Hamsters as a result of Di-n-propylnitrosamine and related Compounds. *Cancer Res.* 34, 16-26 (1974).
- POUND, A. W., T. A. LAWSON and L. HORN (1973). Increased carcinogenic action of dimethylnitrosamine after prior administration of carbon tetrachloride. *Br. J. Cancer*, 27, 451-459.
- RASQUIN, P., Cl. FIEVEZ (1970). Propos sur une tumeur de la placode olfactive. *Cahiers d'O.R.L.*, 5, 625-631.
- REUBER, M. D. and C. W. LEE (1968). Effect of age and sex on hepatic lesions in buffalo strain rats ingesting diethylnitrosamine. *J. Nat. Cancer Inst.* 41, 1133-1140.
- ROE, F. J. C. and R. W. RAVEN (1967). The Prevention of Cancer.
- ROE, F. J. C. and K. E. K. ROWSON (1968). The induction of cancer by combinations of viruses and other agents. *Int. Rev. of Exp. Path.* 6, 181-227.
- ROSS, A. E., L. KEEFER and W. LIJINSKY (1971). Alkylation of nucleic acids of rat liver and lung by deuterated N-Nitrosodiethylamine in vivo. *J. Nat. Cancer Institute* 47, 789-795.
- SABETI, H., A. R. PASHMI (1973). Olfactory Neuroblastoma. *J. Lar. & Otol.* 87, 507-512.
- SALAMAN, M. H. (1958). Cocarcinogenesis. *Brit. Med. Bull.* 14, 116-120.
- SALAMAN, M. H. and F. J. C. ROE (1964). Cocarcinogenesis. *Brit. Med. Bull.* 20, 139.
- SCHENCK, N. L. and J. H. OGURA (1972). Esthesioneuroblastoma. *Arch. Otolaryng.* Vol. 96, 322-324.
- SCHMÄHL, D., C. THOMAS and K. KÖNIG (1963). Experimentelle Untersuchungen zur „Syncarcinogenese“. *Z. für Krebsforschung* 65, 342-350.
- SCHMÄHL, D. and C. THOMAS (1963). Krebs erzeugung durch Applikation von Diäthylnitrosamin und Röntgenstrahlen an Ratten. *Die Naturwissenschaften* 50, 308-309.
- SCHMÄHL, D., C. THOMAS and H. BRUNE (1964). Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. *Z. für Krebsforschung* 66, 297-302.
- SCHMÄHL, D., C. THOMAS, W. SATTler and G. F. SCHELD (1965a). Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. *Z. für Krebsforschung* 66, 526-532.
- SCHMÄHL, D. and C. THOMAS (1965b). Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. *Z. für Krebsforschung* 67, 135-140.
- SCHMÄHL, D., E. STUTZ and C. THOMAS (1966). Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. *Z. für Krebsforschung* 68, 68-72.
- SCHMÄHL, D. (1970). Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese. *Z. für Krebsforsch.* 74, 457-466.
- SCHMIDT-RUPPIN, K. H. and G. PAPADOPULU (1972). Zur Wirkung von Diäthylnitrosamin (DAENA) und Influenza-Viren auf die Entstehung von Lungencarcinomen bei Mäusen. *Z. für Krebsforschung* 77, 150-154.
- SCHULLER, P. L. (1972). N-Nitrosaminen, feiten en ficties. *Voeding* 33/2, 76-92.
- SEIFERT, K. (1970). Die Ultrastruktur des Riechepithel beim Makromatiker. G. Thieme Verlag, Stuttgart.
- SHAW, H. J. (1967). in „The Prevention of Cancer“. Roe and Raven, London.
- SHEAR, M. J. (1938). Studies in carcinogenesis. *A. J. of Cancer*, 33, 499.
- SILCOX, L. E. (1966). Olfactory neuroblastoma. *Laryngoscope* 76, 665-673.
- SISSON, G. A. and GOLDSTEIN, J. C. (1973). Otolaryngology, part 2, chapter 6, tumours of the nose, paranasal sinus and nasopharynx, blz, 123-173.
- SKOLNIK, E. M., F. S. MASSARI, L. T. TENTA (1966). Olfactory neuroepithelioma. *Arch. Otolaryng.* 84, 84-93.
- SNOW, G. B. (1973). Tumoren van epipharynx, neus en neusbijholten in Oncologie. Uitgave van het Kon. Wilhelmina Fonds.
- STENBACK, Frl. G., A. FERRERO and P. SHUBIK (1973). Synergistic Effects of Diethylnitrosamine and Different Dusts on Respiratory Carcinogenesis in Hamsters. *Cancer Res.* 33, 2209-2214.
- SWANN, P. F. and P. N. MAGEE (1968). Nitrosamine-induced carcinogenesis. *Biochem. J.* 110, 39-47.
- SWANN, P. F. and P. N. MAGEE (1971). Nitrosamine-induced carcinogenesis. *Biochem. J.* 125, 841-847.
- TERRACINI, B. and M. C. TESTA (1970). Carcinogenicity of a single administration of N-Nitrosomethylurea: a comparison between newborn and 5-week-old mice and rats. *Brit. J. of Cancer* 24, 588-598.
- THOMAS, C. (1965). Zur Morphologie der Nasenhöhle-tumoren bei der Ratte. *Z. für Krebsforschung* 67, 1-10.
- TOMATIS, L. and F. CEFIS (1967). The effects of multiple and single administration of dimethylnitrosamine to hamsters. *Tumori* 53/5, 447-451.
- VAKIL, R. E., V. P. VAISHNAV (1971). Olfactory neuroblastoma. *J. of Lar. and Otol.* 85, 407-410.
- WAL, A. M. v. d. (1964). CARA als voorwaarde voor het ontstaan van het bronchuscarcinoom. Diss. Groningen.
- WEISSBERG, M. (1972). Hemmung der cancerogenen und toxischen Wirkung von Diäthylnitrosamin auf die Rattenleber. *Experientia* 28, 682-683.
- WUNDERLICH, V. (1970). M. SCHÜTT, M. BÖTTGER and A. GRAFFI. Preferential Alkylation of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid by N-Methyl-N-nitrosurea. *Biochem. J.* 118, 99-109.

STELLINGEN

I

De carcinogenese door diëthylnitrosamine in de ratteneus is, voor zover het de inductietijd betreft, te beïnvloeden door bijkomende factoren, zoals röntgenbestraling en mechanische irritatie.

II

De stelling van Schmähl dat cocarcinogenese alleen dan wordt waargenomen als stoffen van gelijke organotropie en cytotropie gelijktijdig of achtereenvolgens inwerken is in zijn algemeenheid niet juist.

Schmähl, D. e.a. (1966) *Z. für Krebsforschung* 68, 68 en Schmähl, D. (1970) *Z. für Krebsforschung* 74, 457.

III

Bij experimenten die tot doel hebben de carcinogene werking van één faktor te beïnvloeden d.m.v. een tweede faktor, dient m.n. gelet te worden op de relatieve „sterkte” van beide factoren.

IV

De diagnose neuroepitheliom in de neus wordt in Nederland te weinig gesteld.

V

Bij een patient met een tumor in de neus dienen naast de werk-omstandigheden van de patient ook de privé-omstandigheden te worden nagegaan.

Acheson, E. D., e.a. (1970), *Brit. Med. Journal*, 385.

VI

Bij alle ooroperaties dient pre-operatief een bacteriologisch onderzoek van een uitstrijk van de uitwendige gehoorgang gedaan te worden.

VII

Wanneer bij een plaveiselcelcarcinoom van het mobiele gedeelte van de tong of van de mondbodem een electieve behandeling van de regionale halskliergebieden geïndiceerd wordt geacht, verdient een (functionele) „neck dissection” de voorkeur boven bestraling.

VIII

De door Wu e.a. bij ratten aangetoonde groeivertraging tijdens fototherapie wordt niet veroorzaakt door een teveel aan licht maar door een tekort aan water.

Wu, P. Y. K., e.a. *Biology of the Neonate* Vol. 26 blz. 146-158 (1975).

IX

Het is waarschijnlijk dat het postpericardiotomiesyndroom wordt veroorzaakt door een primaire virusinfectie of een reactivering van cytomegalovirusinfectie.

Beekhuis, J. W., *Cytomegalovirus en pericarditis*, diss. 1976, Groningen.

X

Het huidige „gevecht” tussen verschillende regionale ziekenhuizen over de aanschaf van een computertomograaf lijkt eerder gebaseerd op onderlinge wedijver dan op medisch-wetenschappelijke overwegingen.

XI

Een staatssecretaris van volksgezondheid dient bij voorkeur een medicus te zijn.