

Experimentele gezwellen in het neusslijmvlies van de rat



T. Bottema

EXPERIMENTELE GEZWELLEN IN HET NEUSSLIJMVLIES
VAN DE RAT

Experimentele gezwellen in het neusslijmvlies van de rat

Een histologisch onderzoek over het ontstaan en de groei van gezwellen, geïnduceerd door diacethylnitrosamine

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. W. F. de Gaay Fortman, hoogleraar in de faculteit der rechtsgeleerdheid, in het openbaar te verdedigen op vrijdag 26 november 1971 des namiddags te 13.30 uur in het Woestduincentrum, Woestduinstraat 16 te Amsterdam

door

TEUNIS BOTTEMA

geboren te Klundert

Promotor: Prof. Dr. R. DONNER

Co-promotor: Prof. Dr. G. DE WIT

Aan de nagedachtenis van mijn vader

Aan mijn moeder

Dit proefschrift kon alleen tot stand komen door de hulp van anderen aan wie ik veel dank verschuldigd ben.

Aan Prof. Dr. R. Donner die me begeleidde op een voor mij weinig bekend terrein.

Aan Prof. Dr. G. de Wit die me aanspoorde tijdens de bekende inzinkingen en mij tijd en gelegenheid gaf om dit onderwerp te bewerken.

Aan Prof. Dr. J. Oort die mij waardevolle adviezen gaf bij de samenstelling van het proefschrift.

Aan Dr. H. A. Brouwer die gastvrijheid verleende in het gebouw van de Experimentele Geneeskunde.

Aan de heer W. D. Verrijk die altijd een oplossing wist voor allerlei praktische problemen.

Aan mej. J. K. Bos en de heren J. L. Hof en E. Boots die het histologische laboratoriumwerk deden.

Aan de heren C. Koolen, C. H. Stoffer, W. Dekker en J. A. Grimbergen die de proefdieren verzorgden.

Aan de heren G. J. Oskam en A. Lobbes die mij terzijde stonden bij het maken van de microfoto's.

Aan de Medische Foto-, Film- en Illustratiedienst (Hoofd: C. J. van Stuyvenberg) en in het bijzonder aan de heer G. J. Lijnzaad die de omslag ontwierp.

En niet in de laatste plaats aan mej. G. E. Sap die de literatuur aandroeg, het manuscript vele malen typte, kortom alles deed wat bij de voorbereiding van een publicatie nodig is.

INHOUD

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Inleiding | 1 |
| 2. | De organische N-nitrosoverbindingen | 3 |
| 2.1. | Enige opmerkingen over structuur, voorkomen e.d. | 3 |
| 2.2. | Geschiedenis van het onderzoek naar de oncogene werking | 4 |
| 2.3. | Huidige opvatting over het werkingsmechanisme | 7 |
| 3. | De anatomie van de ratteneus | 9 |
| 3.1. | De macroscopische anatomie | 9 |
| 3.2. | De microscopische anatomie | 13 |
| 3.3. | De pathologische anatomie | 18 |
| 3.3.1. | Eigen onderzoek | 18 |
| 4. | Histopathologie van de experimentele gezwellen in het neusslijmvlies | 20 |
| 5. | Voorlopige vraagstellingen | 23 |
| 5.1. | De oncogene stof, de toedieningswijze | 23 |
| 5.2. | De dosering | 24 |
| 5.3. | De histopathologie van de experimentele gezwellen | 24 |
| 6. | Materiaal en methoden | 25 |
| 6.1. | Proefdieren | 25 |
| 6.2. | Uitvoering van de experimenten | 25 |
| 6.3. | Diaethylnitrosamine | 26 |
| 6.4. | Bewerking van het materiaal | 26 |
| 7. | Oriënterende experimenten | 27 |
| 7.1. | Methodiek | 27 |
| 7.2. | Algemene bevindingen | 27 |
| 7.2.1. | Gemiddelde overlevingsduur | 27 |
| 7.2.2. | Uitwendig onderzoek | 29 |
| 7.2.3. | Microscopisch onderzoek van interne organen | 29 |
| 7.3. | Microscopisch onderzoek van de neus | 30 |
| 7.3.1. | Vestibulum nasi | 30 |
| 7.3.2. | Regio respiratoria | 30 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 7.3.2.1. | Respiratoir epitheel | 30 |
| 7.3.2.2. | Submucosa | 33 |
| 7.3.2.3. | Klieren | 33 |
| 7.3.2.4. | Orgaan van Jacobson | 34 |
| 7.3.2.5. | Sinus maxillaris | 34 |
| 7.3.3. | Regio olfactoria | 34 |
| 7.3.3.1. | Olfactor epitheel | 34 |
| 7.3.3.2. | Lamina propria | 37 |
| 7.3.3.3. | Gezwellvorming | 38 |
| 7.4. | Onderzoek controledieren | 40 |
| 7.5. | Beantwoording der vragen | 41 |
| 7.5.1. | Oncogene stof, de toedieningswijze, de dosering | 41 |
| 7.5.2. | De histopathologie van de experimentele gezwellen | 42 |
| 7.5.2.1. | Regio respiratoria | 42 |
| 7.5.2.2. | Regio olfactoria | 42 |
| 7.6. | Overige bevindingen | 43 |
| 8. | Definitieve vraagstellingen, proefopstellingen | 44 |
| 8.1. | De vragen | 44 |
| 8.2. | Proefopstellingen | 45 |
| 8.2.1. | Cytologisch onderzoek | 45 |
| 8.2.2. | Histologisch onderzoek | 45 |
| 9. | Experimenten met beantwoording van de vragen | 47 |
| 9.1. | Experiment met voortgezette toediening van diaethyl- nitrosamine | 47 |
| 9.1.1. | Methodiek | 47 |
| 9.1.2.-8. | Bevindingen | 49 |
| 9.1.9. | Samenvatting van de bevindingen | 60 |
| 9.1.9.1. | Regio olfactoria | 61 |
| 9.1.9.2. | Regio respiratoria | 62 |
| 9.1.9.3. | Overige bevindingen | 62 |
| 9.2. | Experiment met verschillende toedieningsduur van diaethylnitrosamine | 62 |
| 9.2.1. | Methodiek | 62 |
| 9.2.2.-5. | Bevindingen | 65 |
| 9.2.6. | Samenvatting van de bevindingen | 71 |
| 9.2.6.1. | Regio respiratoria | 71 |
| 9.2.6.2. | Regio olfactoria | 71 |
| 9.2.6.3. | Overige bevindingen | 72 |
| 9.3. | Beantwoording van de vragen | 72 |

| | | |
|---------|--|----|
| 10. | Discussie | 74 |
| 10.1. | Bespreking van de resultaten | 74 |
| 10.1.1. | Het ontbreken van carcinomen | 74 |
| 10.1.2. | Ontstaan en groei van de papillomen | 76 |
| 10.1.3. | Ontstaan en groei van het esthesioneuroepithelioma | 77 |
| 10.1.4. | Wijze van inwerking van het diaethylnitrosamine op het neusslijmvlies | 78 |
| 10.2. | Beschouwingen in relatie tot de menselijke pathologie | 79 |
| 10.2.1. | De papillomen | 79 |
| 10.2.2. | Het esthesioneuroepithelioma | 80 |
| 10.2.3. | Uitwendige oorzaken van gezwellen in neus en neusbijholten | 81 |
| 11. | Samenvatting | 84 |
| 12. | Summary | 87 |
| | Geraadpleegde literatuur | 89 |

1. INLEIDING

In 1964 beschreven HERROLD en DRUCKREY, onafhankelijk van elkaar, experimentele gezwellen van het neusslijmvlies bij respectievelijk hamsters en ratten. De gezwellen waren verkregen na toediening van bepaalde organische N-nitrosoverbindingen waarvan de oncogene werking op verscheidene andere organen dan de neus reeds bekend was.

Volgens bovengenoemde onderzoekers betrof het gezwellen van verschillend histologisch type namelijk papillomen, plaveiselcelcarcinomen, adenocarcinomen en neuro-epitheliale gezwellen. Zij zouden niet te onderscheiden zijn van de zogenaamde spontane gezwellen van het slijmvlies van de neus en neusbijholten bij de mens.

Deze vondst was van groot belang omdat het nu voor het eerst mogelijk was vergelijkingen te maken tussen de eigenschappen van gezwellen in het menselijk neusslijmvlies en experimenteel opgewekte gezwellen. Na 1964 zijn meerdere publicaties over dergelijke experimentele gezwellen verschenen. Hierin werd vooral aandacht besteed aan de chemische eigenaardigheden van de gebruikte organische N-nitrosoverbindingen, het mogelijke werkingsmechanisme en in mindere mate aan het histologisch beeld van de gezwellen.

Een onderzoek naar de ontstaanswijze en de groei van experimenteel opgewekte gezwellen in het neusslijmvlies werd, voor zover in de literatuur was na te gaan, nog niet gedaan. Juist een dergelijk onderzoek zou interessant zijn, omdat over de ontstaanswijze en de groei van gezwellen in het slijmvlies van neus en neusbijholten van de mens en over eventuele precancereuze afwijkingen niets met zekerheid bekend is. De moeilijke toegankelijkheid van neus en neusbijholten voor onderzoek maakt dit begrijpelijk.

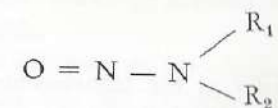
In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven waarin het ontstaan en de groei van experimentele gezwellen in het neusslijmvlies van ratten wordt bestudeerd. Wellicht levert dit gezichtspunten op die bij het onderzoek van de gezwellen in neus en neusbijholten van de mens gebruikt kunnen worden. De rat werd als proefdier gekozen onder andere, omdat bij het begin van het onderzoek in het Pathologisch Instituut een proefdierenstal met fokmateriaal van deze diersoort aanwezig was.

Voordat tot het beschrijven van de proeven wordt overgegaan, worden in de volgende hoofdstukken enige relevante feiten vermeld over de organische N-nitrosoverbindingen en over de macroscopische, microscopische en pathologische anatomie van de ratteneus.

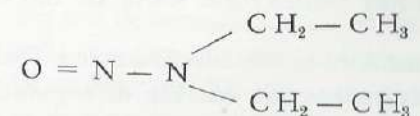
2. DE ORGANISCHE N-NITROSOVERBINDINGEN

2.1. ENIGE OPMERKINGEN OVER STRUCTUUR, VOORKOMEN E.D.

De verbindingen kunnen in het algemeen worden voorgesteld door de volgende formule:



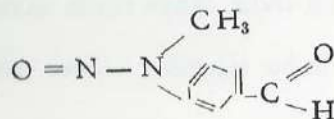
In deze formule kunnen R_1 en R_2 allerlei organische groepen voorstellen. De bij dit onderzoek gebruikte verbinding was het diaethylnitrosamine:



De bereiding van de verschillende organische N-nitrosoverbindingen gebeurt meestal door de inwerking van salpeterigzuur op de betreffende alkyl-amino-verbindingen. Een van de eersten die een dergelijke bereiding aangaf was N. E. A. KLOBBIE en wel in een proefschrift dat in 1890 in Leiden werd uitgegeven. Sindsdien zijn vele organische N-nitrosoverbindingen gesynthetiseerd en in de chemische literatuur beschreven.

Pas enige tientallen jaren geleden zijn verschillende van deze verbindingen voor praktische toepassing uit hun laboratoriumbestaan gehaald. Zo staat het vast dat zij gebruikt zijn als middel tegen corrosie van metalen. Verschillende andere toepassingen zijn voorgesteld, bijvoorbeeld als onkruidverdelger, als toevoeging aan smeermiddelen en motorbenzine, als insecticide enz. In hoeverre deze toepassingen doorgang hebben gevonden is moeilijk na te gaan.

Tot voor kort werd gedacht dat de organische N-nitrosoverbindingen alleen in het laboratorium konden worden gemaakt en niet in de natuur voorkwamen. HERRMANN (1960) vond echter bij een onderzoek naar de bestanddelen van basidiomyceten dat een van deze paddestoelen, *clitocybe suaveolens*, een typische organische N-nitrosoverbinding bevatte, het 4-nitrosomethylaminobenzaldehyde.



Deze verbinding was reeds eerder in het laboratorium gesynthetiseerd en beschreven. Proeven van DRUCKREY (1967) toonden aan dat de stof, ook in grote hoeveelheden via orale weg toegediend, bij ratten geen oncogene werking had. Bovendien was de stof zeer weinig giftig (acute LD 50 2000 mg). De *clitocybe suaveolens* (de kleine anijstrechterzwam) geldt terecht als een eetbare paddestoel.

2.2. GESCHIEDENIS VAN HET ONDERZOEK NAAR DE ONCOGENE WERKING

HAMILTON en HARDY vermeldten in hun boek *Industrial Toxicology* (1949) voor het eerst de giftige eigenschappen van één van de organische N-nitrosoverbindingen, het dimethylnitrosamine. Zij zagen in een automobielfabriek, waar dimethylnitrosamine als middel tegen corrosie van metalen werd gebruikt, twee patiënten met geelzucht en ascites waarschijnlijk tengevolge van levercirrhose waarvoor geen duidelijke oorzaak kon worden gevonden. Bovengenoemde onderzoekers toonden in proeven met honden aan dat de stof ernstige leverbeschadiging kan veroorzaken. Details over de wijze van toediening, het microscopisch onderzoek van de leverbeschadiging en dergelijke zijn in het boek niet te vinden. De volgende publicatie kwam van BARNES en MAGEE (1954). Zij zagen bij twee

van drie laboranten die gedurende tien maanden met dimethylnitrosamine werkten levercirrhose optreden. De stof werd in het laboratorium als oplosmiddel gebruikt. Naar aanleiding van deze waarneming beproefden zij het dimethylnitrosamine bij ratten, konijnen, muizen, cavia's en honden. Bij voldoende hoge dosering bleken alle dieren tenslotte te gronde te gaan aan ernstige levernecrose. Het maakte weinig verschil of de stof oraal, subcutaan, intraveneus of intraperitoniaal werd toegediend. Bij percutane applicatie kon geen levernecrose worden verwekt. Dezelfde onderzoekers zetten hun onderzoek met lagere doseringen van het dimethylnitrosamine bij ratten voort, kennelijk met het doel levercirrhose te veroorzaken.

Enkele jaren later publiceerden zij de resultaten van hun proeven (MAGEE en BARNES 1956). Het bleek dat langdurige toediening van kleine doses van dimethylnitrosamine leidde tot het ontstaan van levercarcinoom, soms met longmetastasen. Ook bij deze proeven was de toedieningswijze van het middel van weinig belang, de afwijkingen ontstonden zowel na orale, intraveneuze als subcutane toediening. Bij subcutane toediening ontstonden op de plaats van inspuiting geen veranderingen. De stof werkt op afstand en had kennelijk een voorkeur voor de lever (organotropie).

DUTTON en HEATH (1956) kwamen tot de conclusie dat deze organotropie een gevolg was van de afbraak van het dimethylnitrosamine in de lever. Hierbij zouden afbraakproducten ontstaan die een oncogene werking hebben. Een van de eerste fasen in dit proces zou volgens deze onderzoekers een enzymatische demethylering zijn. Bij de daarop volgende verdere afbraak zou onder andere diazomethaan ontstaan.

MAGEE en SCHOENTAL (1964) veronderstelden dat dit diazomethaan alkylerend werkt op de nucleinezuren waardoor een verandering in de genetische informatie tot stand zou komen. Dit zou de oorzaak van de maligne ontaarding zijn.

Bij voortgezet onderzoek met het dimethylnitrosamine ontdekten MAGEE en BARNES (1959, 1962) dat de lever niet het enige orgaan was waar gezwellen optraden, maar dat ook in de nieren gezwellen primair konden ontstaan.

Na de eerste publicatie van MAGEE en BARNES in 1956 waren vele onderzoekers zich gaan bezighouden met de studie van de organische N-nitrosoverbindingen. Van deze onderzoekers moeten vooral de namen van DRUCKREY en medewerkers, verbonden aan het Max Planckinstitut für Immunbiologie in Freiburg, worden genoemd (1961, 1963a, 1964a, 1964b, 1967). Zij beproefden een groot aantal organische N-nitrosoverbindingen, voornamelijk bij ratten. Uit hun proeven bleek al spoedig dat, behalve in de lever en in de nieren, op vele andere plaatsen

primaire gezwellen konden ontstaan, zoals in de blaas, de longen, de oesophagus, het centrale zenuwstelsel, de perifere zenuwen enz. Dikwijls ontstond meer dan één primair gezwel.

Aanvankelijk leek het dat de organotropie uitsluitend afhankelijk was van de chemische samenstelling van de gebruikte verbinding, maar al spoedig bleek dat ook de toedieningswijze invloed kon hebben. Zo veroorzaakte het diamylnitrosamine langs orale weg toegediend levercarcinoom, terwijl door subcutane toediening longcarcinoom kon worden verwekt.

In 1964 vermeldde DRUCKREY en medewerkers voor het eerst het optreden van gezwellen in het neusslijmvlies bij ratten na toediening van onder andere dimethylnitrosamine. In hetzelfde jaar publiceerde HERROLD het resultaat van haar experimenten met diaethylnitrosamine, waarmee zij gezwellen in het neusslijmvlies van Syrische hamsters kon verwekken.

In een zeer omvangrijke publicatie in 1967 beschreven DRUCKREY en medewerkers de resultaten van experimenten met 65 verschillende organische N-nitrosoverbindingen. Bij de experimenten werden voornamelijk ratten als proefdier gebruikt. Van de 65 verbindingen bleken 9 niet oncogeen te zijn. Van de overige 56 veroorzaakten 13 gezwellen in het neusslijmvlies, meestal in een laag percentage. Geen van de stoffen gaf uitsluitend gezwellen in het neusslijmvlies. Altijd waren er daarnaast andere primaire localisaties.

Intussen was het vooral de organotropie van de organische N-nitrosoverbindingen die vele onderzoekers fascineerde. Het onderzoek leerde dat de samenhang zeer ingewikkeld was en niet alleen afhankelijk van de chemische samenstelling van de toegediende stof en de toedieningswijze (oraal, per inhalatie, subcutaan, intraveneus enz.). Ook de wijze van dosering (hoge doses gedurende korte tijd, lage doses gedurende langere tijd enz.) bleek van invloed te zijn op de primaire localisatie van de gezwellen (DONTENWILL en MOHR 1962a, HERROLD 1964a, DRUCKREY 1967). Verder werd aangetoond dat de leeftijd van de proefdieren een rol kan spelen bij de localisatie (THOMAS en BOLLMANN 1968). Tenslotte bleek een bepaalde orgaan-dispositie te kunnen bestaan die afhankelijk is van de diersoort. Zo reageren bijvoorbeeld bij de goudhamsters vooral de trachea, bronchi en longen met gezwelvorming (DONTENWILL en MOHR 1962b).

Het werk van de verschillende onderzoekers toonde verder aan dat de inductietijd bij het optreden van de gezwellen, binnen bepaalde grenzen, afhankelijk was van de hoogte van de doses in die zin dat bij toename de inductietijd afneemt en omgekeerd. De hierdoor gewekte verwachting dat met een enkele dosis gezwellen zouden kunnen worden opgewekt werd door verschillende onderzoekers

bevestigd (MAGEE en BARNES 1962, SCHOENTAL en BENSTEDT 1963, DRUCKREY e.a. 1963b, 1964a, MOHR, WIESER en PIELSTICKER 1966, TOMATIS en CEFIS 1967). Beproeving van de organische N-nitrosoverbindingen bij zwangere dieren bracht een diaplacentaire werking aan het licht. Toediening van kleine hoeveelheden tijdens de zwangerschap gaf aanleiding tot het optreden van maligne gezwellen bij nagenoeg alle nakomelingen. Deze gezwellen traden meestal op in hersenen, ruggemerg en perifere zenuwen. De gevoeligheid voor deze verbindingen gedurende de foetale ontwikkeling bleek minstens tien maal zo groot te zijn als bij volwassen dieren (MOHR en ALTHOFF 1965, DRUCKREY e.a. 1967).

Zoals te verwachten was toonden verschillende organische N-nitrosoverbindingen behalve oncogene, ook mutagene eigenschappen. PASTERNAK (1964) kon met diaethylnitrosamine mutaties bij de drosophila tot stand brengen.

2.3. HUIDIGE OPVATTING OVER HET WERKINGSMECHANISME

De huidige opvatting over de oncogene werking van de organische N-nitrosoverbindingen is gebaseerd op de resultaten van verschillende onderzoekers: DUTTON en HEATH (1956), DRUCKREY e.a. (1961), MAGEE en FARBER (1962), MIZRAHI en EMMELOT (1962), MAGEE en SCHOENTAL (1964), Süß (1965), DRUCKREY e.a. (1967), SWANN en MAGEE (1968) en PREUSSMANN (1968).

Men stelt zich het werkingsmechanisme als volgt voor (fig. 2.1.). Een van de eerste stappen bij de afbraak is een α C hydroxylering. Dit gebeurt onder invloed van het enzym α C hydroxylase dat vooral in de lever wordt gevonden maar ook in andere organen is aangetoond. Het is zeer waarschijnlijk dat de organotropie, zover deze samenhangt met de chemische samenstelling van de gebruikte oncogene stof, hiervan afhangt. Na de hydroxylering valt de stof onder afsplitsing van aldehyde uiteen. Het aldus ontstane product is uiterst instabiel en vormt onder afstoting van water een diazoalkaan. Bij de aanwezigheid van waterstof-ionen in een waterig milieu ontstaat via een diazonium-ion het direct alkylerend werkende carbonium-ion. Dit gehele proces verloopt zeer snel.

Volgens de tegenwoordige onderzoekers bewerken de carbonium-ionen een alkylering van die nucleïnezuren die de dragers zijn van de genetische informatie. Deze chemische verandering op het moleculaire vlak zou verantwoordelijk zijn voor het begin van de gezwelvorming.

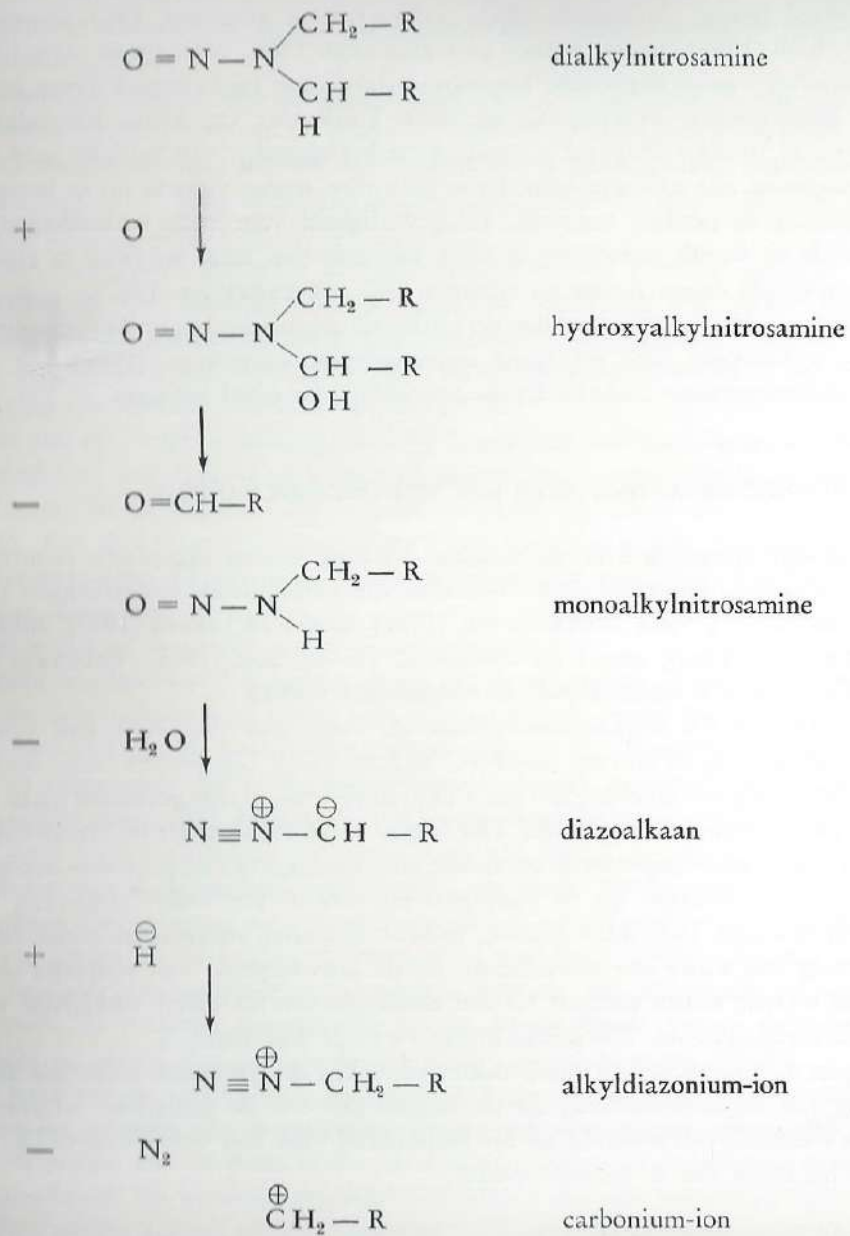


Fig. 2.1. Afbraak van de organische N-nitrosoverbindingen zoals die in het lichaam zou plaatsvinden.

3. DE MACROSCOPISCHE ANATOMIE, MICROSCOPISCHE ANATOMIE EN PATHOLOGISCHE ANATOMIE VAN DE RATTENEUS

3.1. DE MACROSCOPISCHE ANATOMIE

Het blijkt vrij moeilijk te zijn in de betreffende anatomieboeken een goede beschrijving van de bouw van de ratteneus te vinden. Bovendien spreken de verschillende publicaties elkaar op details tegen, bijvoorbeeld over het al of niet aanwezig zijn van een sinus frontalis.

De meeste gegevens die hieronder worden vermeld zijn geput uit een artikel van GEORG KELEMEN in de Archives of Otolaryngology (1946) en uit het handboek „Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere” van JAFFÉ (1931). Verder zijn enige gegevens van eigen onderzoek toegevoegd.

De neusholte van de rat is langwerpig met een uitbocht naar achter-boven, waar zich de ingewikkeld gebouwde ethmoidstreek bevindt. Deze is, zoals bij alle macrosmatische dieren, hoog ontwikkeld.

Het voorste gedeelte van het cavum nasi, het respiratoire deel, is een vrij smalle verbinding tussen het vestibulum nasi en de ductus pharyngeus (fig. 3.1.).

Op de overgang van het vestibulum nasi naar het cavum nasi mondt op de neusbodem de canalis incisivus uit in de onmiddellijke omgeving van de uitmondning van het orgaan van Jacobson. Volgens BROMAN (geciteerd door Kolmer in het handboek van JAFFÉ) kan hierdoor vloeistof uit de mondholte in het orgaan van Jacobson stromen (waterreukorgaan).

In het respiratoire gedeelte van het cavum nasi bevinden zich aan weerszijden twee schelpen. De bovenste schelp, de concha nasalis, bestaat uit een dunne naar lateraal concave beenlamel die in voor-achterwaartse richting op de laterale neuswand, vlak onder het os nasale ontspringt en naar beneden omkrult. Op de

laterale zijde van de schelp zijn, vooral op het achterste deel, een aantal richels, meestal twee, te zien. De onderste schelp, de concha maxillaris, ontspringt in de onderzijde van het cavum nasi uit de laterale wand van de neus en krult naar boven om (fig. 3.1. en 3.2.). Onder het voorste deel van deze concha mondt

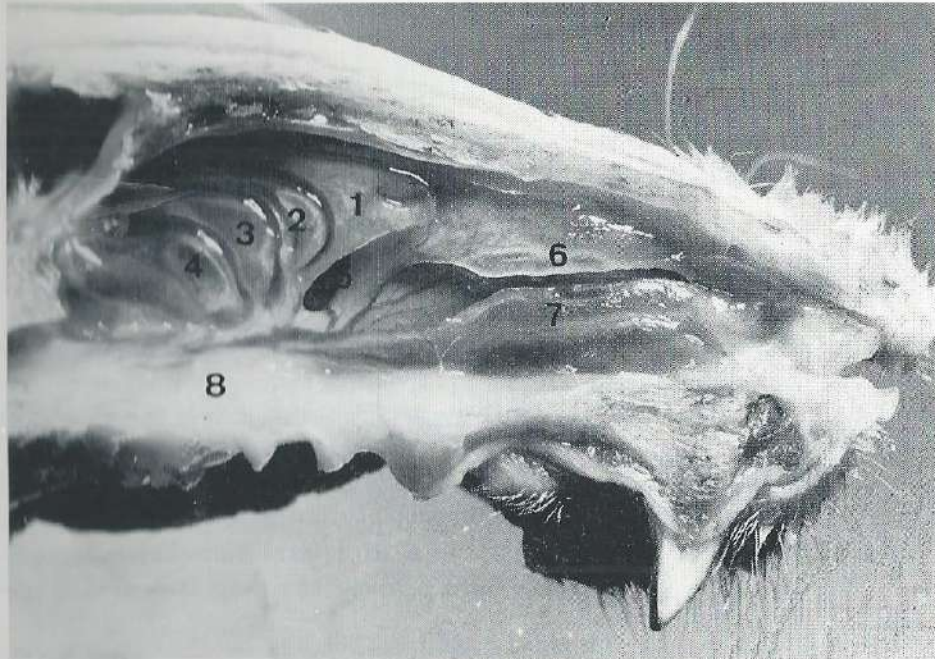


Fig. 3.1. Paramediane doorsnede van de ratteneus. 1-4 rij van binnenste conchae ethmoidales. 5, verbinding tussen neuslumen en sinus maxillaris. 6, concha nasalis. 7, concha maxillaris. 8, ductus pharyngeus.

de ductus nasolacrimalis uit. Tegenover het voorste gedeelte van de concha maxillaris vindt men op het neustussenschot het orgaan van Jacobson (organon vomero-nasale). Dit orgaan is bij volwassen dieren omgeven door een botkapsel die in de neusholte uitpuilt en die alleen bij de uitmonding aan de voorzijde en in het achter-bovengedeelte een opening toont. Dit zogenaamde waterreukorgaan schijnt bij de rat zijn hoogste ontwikkeling te hebben bereikt. Bij de mens gaat het na de twintigste week tijdens de embryonale periode weer langzamerhand terug, bij volwassenen zijn nog slechts rudimenten te vinden.

In tegenstelling tot de vrij eenvoudige uitvoering van de regio respiratoria is de bouw van de regio olfactoria meer ingewikkeld. Het ethmoid bestaat niet, zoals

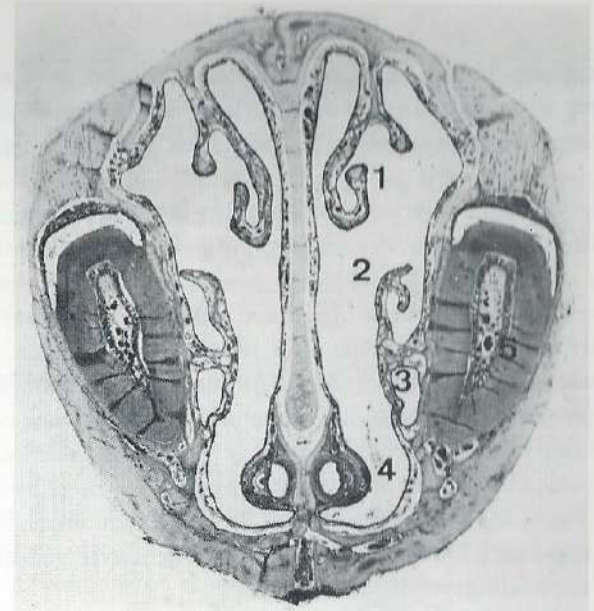


Fig. 3.2. Frontale doorsnede van de regio respiratoria. 1, concha nasalis. 2, concha maxillaris. 3, ductus naso-lacrimalis. 4, orgaan van Jacobson. 5, gebitselement. H E, x 13,2.

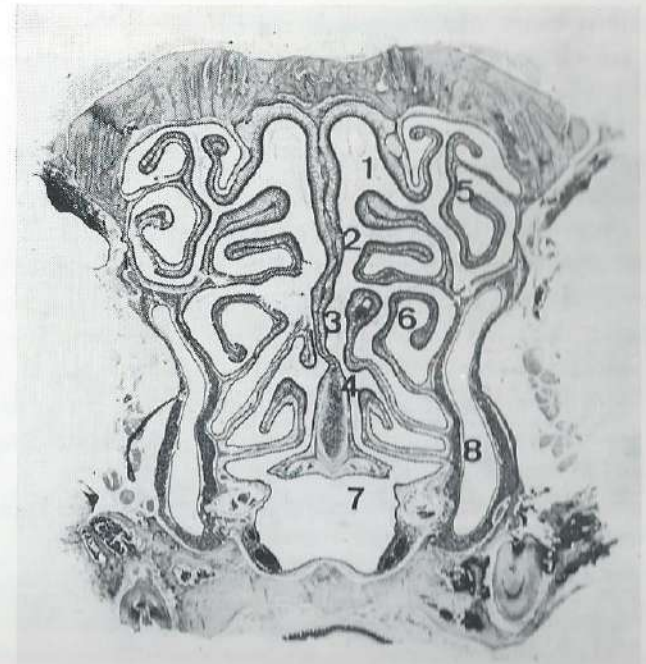


Fig. 3.3. Frontale doorsnede van de regio olfactoria. 1-4, rij van binnenste conchae ethmoidales. 5 en 6, buitenste conchae ethmoidales (conchae obiectae). 7, lamina terminalis. 8, sinus maxillaris. H E, x 8.

bij de mens, uit een aantal luchthoudende cellen maar is opgebouwd uit een aantal schelpen, aan beide zijden zes. Mediaal bevindt zich een rij van vier zogenaamde binnenste schelpen die de twee zogenaamde buitenste schelpen overlappen.

Wanneer bij het ontleden van de neus het achterste gedeelte van het tussenschot wordt weggenomen komen de vier binnenste schelpen die elkaar dakpansgewijze overlappen, te voorschijn (fig. 3.1.). De randen van de schelpen krullen naar beneden of boven om. De tweede binnenste neusschelp, van boven af gerekend, splitst zich kort na het ontstaan in twee plooiën, waarvan de een naar boven en de ander naar onder omkrult (fig. 3.3.). Worden de vier binnenste schelpen weggenomen dan komen de twee buitenste schelpen, ook wel conchae obiectae genoemd, te voorschijn. De eerste ontspringt tussen de bovenste en de daarop volgende schelp, de tweede tussen de laatstgenoemde en de daarop volgende binnenste schelp (fig. 3.3.). Door deze bouw bevindt zich tussen de schelpen een ingewikkeld gangenstelsel waarin, vooral in het achterste gedeelte, gemakkelijk stagnatie van afscheidingsproducten optreedt.

De afvoer van afscheidingsproducten uit het voorste gedeelte van de ethmoidstreek naar de ductus pharyngeus geschiedt langs de achterzijde van de regio respiratoria. Het achterste gedeelte van de ethmoidstreek heeft een bodem hetgeen de stagnatie van afscheidingsproducten bevordert. Deze bodem wordt gevormd door een vleugelvormige uitstulping naar lateraal van de achterzijde van het neustussenschot: de lamina terminalis (fig. 3.3.).

Bij de overgang van het cavum nasi naar de ductus pharyngeus bevindt zich op de laterale wand een lichte verhevenheid die, zoals later beschreven zal worden, uit lymfoïd weefsel bestaat.

De rat heeft één neusbijholte: de sinus maxillaris. Deze bestaat uit een vrij smalle ruimte met de grootste afmeting verticaal (fig. 3.3.). Het wijde ostium bevindt zich op de overgang van het respiratoire en het olfactoire deel van de neus. De sinus is omgeven door een dikke laag klierweefsel die vooral onder de bodem een massief karakter heeft en wel de klier van Stenson wordt genoemd. Ter plaatse van deze klier bestaat een defect in de laterale neuswand, tussen het klierweefsel en het slijmvlies van het cavum nasi bevindt zich steeds een grote veneuze sinus. De functie van dit vat is niet bekend.

In de neus bevindt zich een groot aantal klieren die in de volgende groepen kunnen worden ingedeeld:

1. de glandulae nasales laterales anteriores, uitmondend voor-onder in de laterale neuswand.

2. de glandulae nasales mediales anteriores, uitmondend voor-onder op het neusseptum.
3. de glandulae sinus maxillaris, uitmondend in de sinus.
4. de glandulae nasales mediales posteriores, een kleine kliergroep uitmondend onder het orgaan van Jacobson.
5. de klieren van het orgaan van Jacobson.
6. de glandulae olfactoriae, ook wel de klieren van Bowman genoemd.

3.2. MICROSCOPISCHE ANATOMIE VAN HET NEUSSLIJMVLIES VAN DE RAT

Het vestibulum nasi is bekleed met plaveiselepitheel dat bij de overgang in het cavum nasi overgaat in trilhaarepitheel, behalve op de bodem, waar het doorloopt tot aan de achterzijde van het orgaan van Jacobson.

Het trilhaarepitheel van de pars respiratoria zet zich voort tot aan de achterzijde van het neustussenschot terwijl het op de laterale neuswand doorloopt tot op de voor-onderzijde van het schelpenconglomeraat van de ethmoidstreek. Het trilhaarepitheel is een cellaag dik, de kernen zijn gerangschikt in één of twee rijen (pseudostratificatie). Tussen de trilhaarcellen liggen vele bekercellen. Basaal is een rij gedrongen cellen zichtbaar, de zogenaamde vervangcellen (fig. 3.4.).



Fig. 3.4. Trilhaarepitheel uit de regio respiratoria. 1, trilhaar. 2, skelet van de concha. 3, vervangcellen. H E, x 528.

In de submucosa bevinden zich, naast de talrijke tubulo-acineuze klieren van de verschillende kliergroepen, vrij veel arteriën en wijde venen. Dit geldt speciaal voor de conchae. Verder zijn er uitlopers van de nervus trigeminus en de sympathicus zichtbaar.

Het neustussenschot is voor het grootste gedeelte kraakbenig, alleen achter-boven is het benig. De sinus maxillaris is bekleed met trilhaarepitheel, de kernen zijn gerangschikt in één rij. Onder het epitheel bevindt zich een brede laag klieren. De verhevenheid op de laterale wand bij de overgang naar de ductus pharyngeus wordt veroorzaakt door een ophoping van lymffollikels. Waarschijnlijk zijn deze te vergelijken met de ring van Waldeyer bij de mens.

De regio olfactoria beslaat het grootste gedeelte van de schelpen in de ethmoid-streek, het dak van de neusholte en het achter-boven gedeelte van het neustussenschot. Het tekent zich af door een gele kleur (locus luteus).

De bekleding van de regio olfactoria bestaat grotendeels uit reukepitheel. Op de van het lumen afgekeerde zijde van de schelpen, vooral van de onderste, bevindt zich echter dikwijls respiratoir trilhaarepitheel. De uitbreiding hiervan varieert nogal (fig. 3.5.). Het reukepitheel bestaat uit drie soorten cellen: steuncellen,

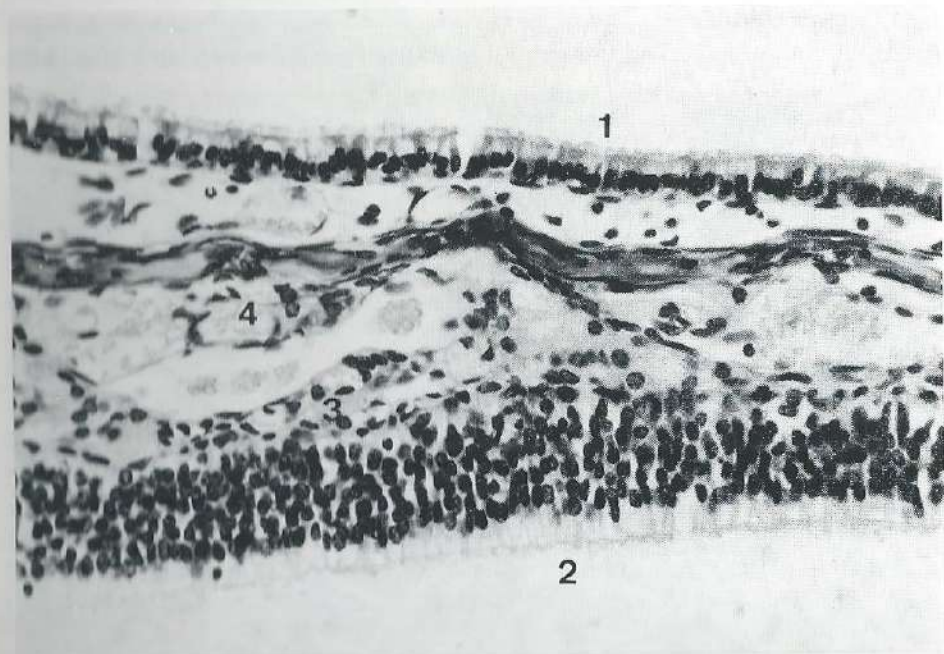


Fig. 3.5. Trilhaar- en reukepitheel uit de regio olfactoria. 1. trilhaarepitheel. 2. reukepitheel. 3. klieren van Bowman. 4. fila olfactoria. H E, x 330.

reukcellen en basale cellen. De steuncellen strekken zich uit van de oppervlakte van het slijmvlies tot aan de basaalmembraan. Het basale gedeelte van de cel is zeer smal. Het apicale gedeelte van de cel bevat een ovale kern. Aan het vrije uiteinde vormen de steuncellen cuticulalijsten die met elkaar samenhangen, maar openingen vrij laten voor de blaasjes van de reukcellen.

De reukcellen zijn bipolaire, fusiforme zenuwcellen die door de steuncellen omringd worden. Op doorsnede blijkt een aantal rijen kernen boven elkaar gerangschikt te liggen (pseudostratificatie) met de laag van de kernen van de steuncellen en die van de basale cellen als uitersten.

De dikte van het reukepitheel varieert van 40 tot 120 μ (SEIFERT 1970). Deze dikte is afhankelijk van het aantal reukcellen. Op sommige plaatsen, vooral in de periferie zijn slechts één à twee kernrijen zichtbaar, op de meeste plaatsen in het reukgebied zijn het er echter zes tot acht (fig. 3.6.). Het apicale gedeelte van de reukcel, de vesicula olfactoria, draagt de zogenaamde basaallichaampjes waaruit de zeer dunne reukharen ontspringen. Het basale deel van de reukcel is zeer smal en bestaat eigenlijk alleen uit een neurofibril, de axon, die zich in de

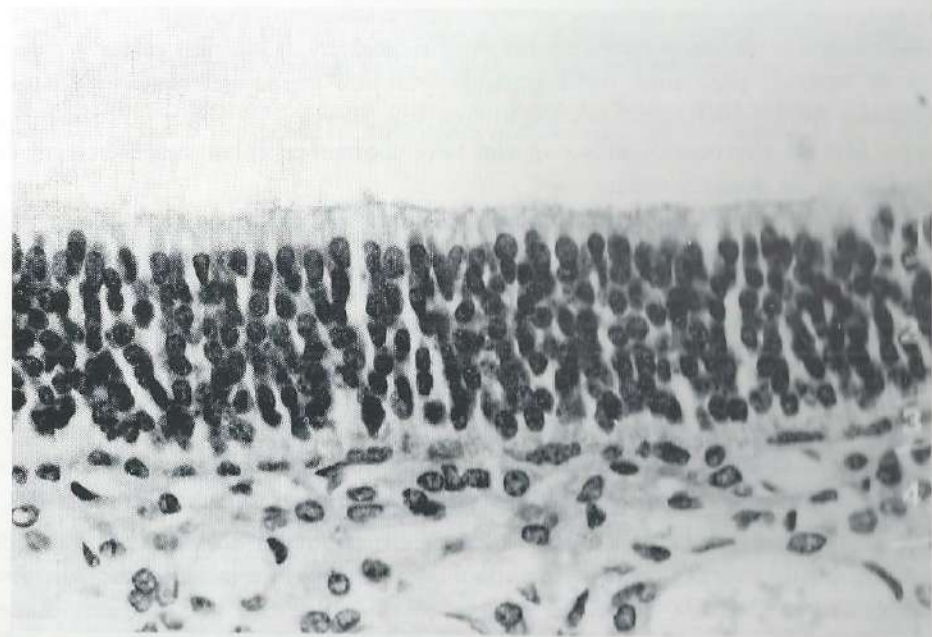


Fig. 3.6. Reukepitheel. 1. kernen van de steuncellen. 2. kernen van de reukcellen. 3. kernen van de basale cellen. 4. kernen van de cellen van de klieren van Bowman. H E, x 528.

onderliggende lamina propria met de axonen van omliggende reukcellen verenigt tot vezels die uiteindelijk de fila olfactoria vormen.

Tenslotte is er de basale cellaag waarin twee typen cellen zijn te onderscheiden. Dit onderscheid kon eerst goed met de electronenmicroscop worden gemaakt (ANDRES 1966). Allereerst zijn er de vrij platte, tegen de basaalmembraan aanliggende cellen met ronde of ovale kern. Daarnaast zijn pyramidevormige cellen met ronde kern te zien, de zogenaamde heldere cellen. De laatsten zouden een reservoir van neuroblasten vormen waaruit gedurende het verdere leven zintuigcellen kunnen ontstaan (ANDRES 1966, SEIFERT 1970). Bij oudere dieren zouden zij nog slechts bij uitzondering te vinden zijn.

De gele kleur van de reukstreek blijkt veroorzaakt te worden door een pigment dat zich vooral bevindt in de steuncellen en in mindere mate in de basaalcellen en zintuigcellen (SEIFERT 1970).

De lamina propria van het reukgebied heeft een dikte variërend van 0,2 tot 1 mm. Hierin bevinden zich de deels loodrecht, deels schuin verlopende tubulaire klieren van Bowman die slechts zelden vertakt zijn en met zeer fijne uitvoergangen op het reukepithel uitmonden. De klieren zijn in grote hoeveelheden aanwezig en liggen vlak onder het epitheel vrijwel tegen elkaar aan. In de diepte strekken zij zich tussen de zenuwvezels uit tot aan het bot van de conchae (zie afbeelding op de omslag, deze foto werd gemaakt van een coupe gekleurd volgens de Periodic Acid Schiff methode). De klieren van Bowman zijn van het gemengde type. Met de electronenmicroscop zijn twee soorten cellen te onderscheiden, de heldere en de donkere cellen.

De uitlopers van de reukcellen vormen bundels van mergloze zenuwvezels die echter wel een schede van Schwann hebben. Deze vezels die uiteindelijk de fila olfactoria gaan vormen zijn omgeven door een fijn bindweefsel met veel capillairen. Daarnaast vindt men de vertakkingen van de nervus trigeminus die onmiddellijk te onderscheiden zijn omdat zij naast mergloze ook merghoudende vezels voeren.

Het orgaan van Jacobson

Dit orgaan heeft een buisvormige structuur en mondt op de voorzijde van het septum, bij de overgang van het vestibulum in het cavum nasi, in de neus uit. Lateraal ervan ligt in hetzelfde benige kanaal een groot vat met een dikke adventitia, omgeven door een laag klieren. Het laterale deel van de buis wordt bekleed door trilhaarepithel met één tot twee kernrijen, het mediale deel draagt



Fig. 3.7. Frontale doorsnede van het orgaan van Jacobson beiderzijds. 1. lumen, 2. kernen van de steuncellen, 3. kernen van de zintuigcellen, 4. trilhaarepithel, 5. neusholte. H B, x 52,8.

het eigenlijke zintuigepithel (fig. 3.7.). Meer naar achter maakt de buis een draaiing van 90° waardoor het zintuigepithel aan de onderzijde komt te liggen. Het zintuigepithel lijkt veel op reukepithel, maar onderscheidt zich ervan doordat de kernen van de zenuwcellen niet zo compact op elkaar liggen. Bovendien ontbreekt een duidelijke basale cellaag. De centrale rij van kernen wordt gevormd door steuncellen die lang-ovale kernen hebben die naar het lumen wijzen en in één tot twee rijen zijn gerangschikt. Daaronder bevinden zich de kernen van de zintuigcellen, gerangschikt in zeven tot negen rijen. De rond-ovale kernen liggen parallel aan het oppervlak van het epitheel en staan dus loodrecht op de ovale kernen van de steuncellen. De axonen uit de zintuigcellen verenigen zich tot de nervus Jacobsoni.

De klieren van het orgaan van Jacobson zijn van het sereuze type en bevinden zich voornamelijk aan de laterale en dorsale zijde.

3.3. DE PATHOLOGISCHE ANATOMIE VAN DE RATTENEUS

Mededelingen over spontane ziekelijke veranderingen in het neusslijmvlies van de rat zijn in de literatuur schaars. In het fraaie handboek „Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere” van JAFFÉ (1931) wordt door BERBERICH en NUSSBAUM vermeld dat bij ratten een acute of chronische neuscatarrh kan voorkomen. Verdere details worden niet gegeven. In hetzelfde boek zegt KOLMER dikwijls een “catharralische Infiltration” in de ratteneus te hebben waargenomen die meestal tot een kant beperkt bleef. Het orgaan van Jacobson was dan meestal ook aangedaan.

KELEMEN en SARGENT (1946) onderzochten de koppen van 40 uiterlijk gezonde ratten uit verschillende laboratoria. Bij 24 dieren werden in het cavum nasi en in de sinus maxillaris min of meer belangrijke veranderingen gevonden. Deze bestonden uit bloeding, purulente ontsteking, excessieve ophoping van slijm of fibrine, dit laatste vooral in het achterste gedeelte van de ethmoidstreek. Een enkele maal zagen zij vorming van granulaties op het neustussenschot, verkalkte ettermassa's en corpora aliena, meestal van plantaardige oorsprong.

Mededelingen over spontane gezwellen in de ratteneus werden in de beschikbare literatuur niet gevonden. In het bovengenoemde handboek van JAFFÉ is een uitgebreid hoofdstuk te vinden over spontane gezwellen bij verschillende diersoorten, o.a. de rat. In dit hoofdstuk worden spontane gezwellen beschreven van talrijke organen, de neus ontbreekt echter.

KELEMEN en SARGENT (1946) vonden evenmin gezwellen in hun nauwkeurig nagekeken materiaal. De hoeveelheid, 40 koppen, is uiteraard erg klein.

Volgens HERROLD (1964) zijn spontane gezwellen in de neusholte bij ratten niet beschreven. DRUCKREY (1967) komt tot dezelfde conclusie.

3.3.1. Eigen onderzoek

Aan de literatuurgegevens kunnen enkele ervaringen uit eigen onderzoek worden toegevoegd. Bij de later te beschrijven experimenten werd een aantal ratten als controledier gebruikt, zij werden alleen subcutaan met gedestilleerd water ingespoten. Van deze ratten waren 33 bruikbaar voor een nauwkeurig onderzoek van het neusslijmvlies. Bij 5 van deze dieren werden min of meer belangrijke afwijkingen waargenomen in de vorm van bloedingen, ophopingen van slijm, speciaal in het achter-boven gedeelte van de neus en, meestal uitgebreide, infiltraten van het slijmvlies.

Bij één dier, een mannetjesrat van 14 maanden, werd op de voorzijde van een

van de conchae maxillares een metaplastisch plekje in het trilhaarepitheel gevonden. In een circumschrikt gebied van het slijmvlies was plaveiselepitheel te zien, vele cellagen dik met vorming van papillen. Het trilhaarepitheel aan de oppervlakte van het plekje leek intact te zijn. Het wekte de indruk dat de metaplasie was uitgegaan van de basale cellaag (fig. 3.8.). Deze ratteneus werd

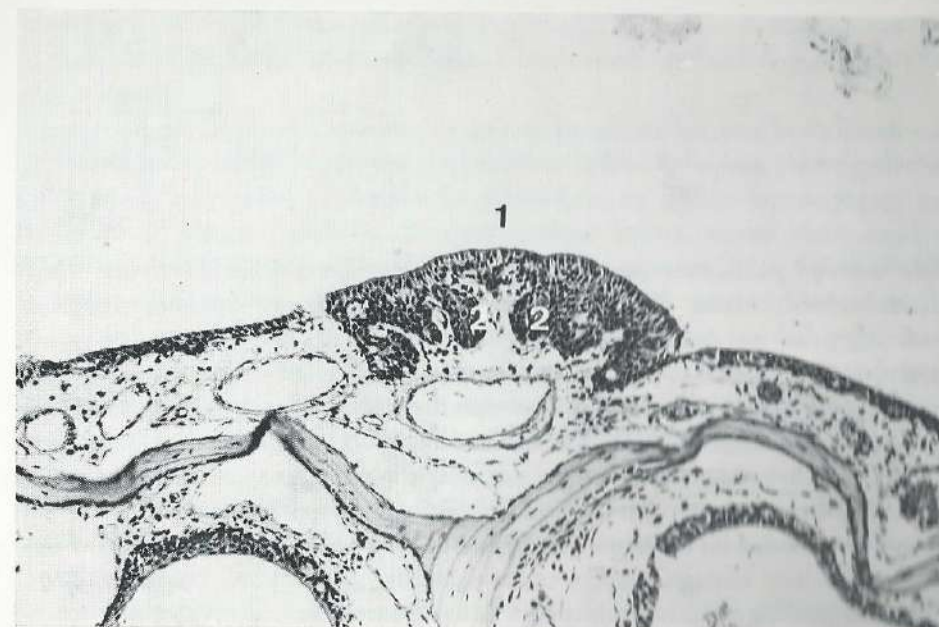


Fig. 3.8. Metaplasie concha maxillaris. 1. intact cilinderepitheel. 2. proliferatie, waarschijnlijk uitgaande van de z.g. vervangcellen. H E, x 132.

daarna in serie opgesneden en nagekeken. In geen enkele andere coupé was echter iets van metaplasie te zien, het plekje is waarschijnlijk erg klein geweest. Voor zover was na te gaan is dit voor het eerst dat een dergelijke afwijking in de ratteneus wordt beschreven.

Hoewel dus nooit zogenaamde spontane gezwellen in de neus en neusbijholten bij ratten zijn beschreven is het niet goed in te zien dat zij ook niet zouden voorkomen. In allerlei andere organen van de rat zijn immers wel spontane gezwellen gevonden. Waarschijnlijk zijn zij zeer zeldzaam zoals trouwens ook het geval is in de menselijke pathologie. Gezwollen van neus en neusbijholten vormen slechts circa 2 % van het totale aantal gezwellen dat bij de mens wordt gevonden (THOMAS 1965).

4. HISTOPATHOLOGIE VAN DE EXPERIMENTELE GEZWELLEN VAN HET NEUSSLIJMVLIES

In de weinige publicaties die aan dit onderwerp zijn gewijd heerst niet altijd eenstemmigheid. Alleen die publicaties waarin wat dieper op het onderwerp wordt ingegaan worden hieronder besproken.

THOMAS (1965) bewerkte een gedeelte van het materiaal uit het laboratorium van Druckrey. De onderzochte dieren waren ratten. De gezwellen in het neusslijmvlies waren opgewekt met verschillende organische N-nitrosoverbindingen. Het meest in het oog vallend waren neuro-epitheliale gezwellen in de ethmoidstreek, die niet te onderscheiden zouden zijn van het esthesioneuroepithelioma zoals dat voorkomt bij de mens. De gezwellen bestonden uit dicht op elkaar liggende cellen met weinig cytoplasma en een grote, ovale, chromatinerijke kern. In de goed gedifferentieerde gebieden was het gezwel door fibrovasculaire schotten in velden verdeeld, waarin rosetten en pseudorosetten waren te zien. Soms waren plexiforme, nieuw gevormde neurofibrillen tussen de gezwelcellen aantoonbaar. Daarnaast kwamen minder goed gedifferentieerde gebieden voor die voornamelijk bestonden uit ophopingen van kleine, dicht opeen gepakte lymfocytachtige cellen met weinig cytoplasma.

Op het neustussenschot of in de directe omgeving werden exofytisch of infiltrerend groeiende plaveiselcelcarcinomen gezien. In dezelfde streek kwamen papillomen voor; deze werden niet nader omschreven. Een enkele maal werd een adenocarcinoom gevonden, over de localisatie werd niet gesproken. Tenslotte werden gezwelhaarden waargenomen waarin het celtipe niet was te identificeren. HOFFMANN en GRAFFI (1964) beschreven gezwellen in het neusslijmvlies van muizen na percutane toediening van diaethylnitrosamine. De gezwellen werden gediagnostiseerd als verhoornende en niet verhoornende plaveiselcelcarcinomen.

In sommige gezwelgebieden waren klierstructuren herkenbaar, hieraan werden geen verdere consequenties verbonden. Soms werden beelden gezien die op papillomen leken.

HERROLD (1964a, 1964b, 1964c) gaf gedetailleerde beschrijvingen van haar bevindingen bij Syrische hamsters. De gezwellen bij deze dieren waren opgewekt door subcutane of intraperitoneale toediening van diaethylnitrosamine. In haar eerste publicatie werd alleen gesproken over ongedifferentieerde carcinomen van de ethmoidstreek. In de latere publicaties werden verschillende typen gezwellen onderscheiden.

Allereerst werd gesproken over neuro-epitheliale gezwellen van het slijmvlies in de ethmoidstreek. Deze waren niet uniform van bouw. Er waren gezwelgedeelten die enorm celrijk waren en waarin de cellen dicht op elkaar gepakt lagen. Een duidelijke architectuur ontbrak. De hyperchrome kernen waren klein, rond of ovaal van vorm. De cellen waren cytoplasma-arm, er waren geen duidelijke celgrenzen zichtbaar. Op enkele plaatsen werden fibrillen gezien. Meestal waren zij moeilijk waar te nemen, waarschijnlijk omdat de cellen zo dicht op elkaar lagen. Soms was doorgroei van het gezwel door de lamina cribriformis zichtbaar. Daarnaast waren er gezwelgebieden waar wel een bepaalde architectuur was terug te vinden. Hier waren de cellen gerangschikt in eilandjes die van elkaar werden gescheiden door dunne fibreuse schotten met veel vaten. De kernen van de cellen waren groter en regelmatiger, in vorm variërend van rond tot ovaal. Het chromatine was fijn over de kern verdeeld. Ook hier was weinig cytoplasma aanwezig en de celgrenzen waren weinig duidelijk. In deze gebieden was sprake van vorming van rosetten en pseudorosetten. Soms waren aanduidingen van fibrillen zichtbaar die uit het cytoplasma leken te komen. Ook HERROLD meende dat deze gezwellen niet te onderscheiden waren van het esthesioneuroepithelioma zoals dat een enkele keer bij de mens is waargenomen.

Naast de bovengenoemde gezwellen werden, eveneens in de ethmoidstreek, adenocarcinomen gevonden die voor het grootste gedeelte weinig gedifferentieerd waren. Slechts hier en daar waren goed gevormde klierstructuren zichtbaar. Plaveiselcelcarcinomen, die meestal waren samengesteld uit slecht gedifferentieerde cellen met op enkele plaatsen keratinisatie en vorming van epitheelparels, werden eveneens gezien.

Tenslotte werd een "squamous cell papilloma" gevonden dat alleen in de regio respiratoria voorkwam. Deze benigne gezwellen gingen uit van de concha maxillaris en de concha nasalis. Zij bestonden uit dikke lagen prolifererend plaveisel-epitheel. Deze epitheelagen hadden neiging tot invaginatie waardoor het stroma

verdrongen werd. In het centrum van de epitheelmassa's was dikwijls keratinisatie te zien met soms vorming van epitheelparels. Het schaarse stroma bestond uit wijdmazig vasculair bindweefsel. Volgens HERROLD was dit beeld niet te onderscheiden van het zogenaamde inverted papilloma (Ewing papilloma) dat bij de mens wordt waargenomen.

Het histologisch beeld van de experimentele gezwellen, zoals het uit de verschillende publicaties naar voren komt, is niet altijd hetzelfde. Het is niet duidelijk of de verschillende proefdieren en de verschillende organische N-nitrosoverbindingen die gebruikt zijn hieraan debet zijn. Het is mogelijk dat het gevorderde stadium van de gezwellen - spontane dood van de dieren werd immers afgewacht of de dieren werden afgemaakt als zij in een slechte algemene toestand waren - een duidelijke interpretatie heeft bemoeilijkt.

In ieder geval leek het noodzakelijk door middel van eigen onderzoek de histopathologie van de door organische N-nitrosoverbindingen opgewekte gezwellen in het neusslijmvlies bij ratten na te gaan.

5. VOORLOPIGE VRAAGSTELLINGEN

Voordat tot het bestuderen van het ontstaan en de groei van experimentele gezwellen in het neusslijmvlies kon worden overgegaan moest een methode worden ontwikkeld waarmee deze gezwellen in een hoog percentage bij de rat konden worden opgewekt. Hiervoor moest worden gezocht naar de meest geschikte organische N-nitrosoverbinding, de vereiste toedieningswijze en de meest geschikte dosering. Bovendien moest door middel van eigen onderzoek een indruk worden verkregen van het histologisch beeld van deze gezwellen.

5.1. DE ONCOGENE STOF, DE TOEDIENINGSWIJZE

In hoofdstuk 2 werd reeds vermeld dat DRUCKREY en medewerkers (1967) 65 organische N-nitrosoverbindingen bij ratten hebben beproefd. Dertien van deze verbindingen gaven gezwellen in het neusslijmvlies, meestal in een laag percentage. Alleen het dimethylnitrosamine maakte hierop een uitzondering. Gezwellen in het neusslijmvlies traden met deze stof alleen dan in een hoog percentage op als het vrij vluchtige dimethylnitrosamine via de inademingslucht aan de dieren werd toegediend. Bij orale toediening ontstonden alleen gezwellen in de lever. Het werken met inhalatieproeven is zeer tijdrovend en het gevaar voor de medewerkers aan de experimenten is niet geheel denkbeeldig. Bovendien is de dosering vrij moeilijk te controleren.

HERROLD (1964c) kon bij subcutane toediening van een andere organische N-nitrosoverbinding, het diaethylnitrosamine, in een hoog percentage gezwellen opwekken in het neusslijmvlies van haar proefdieren. Zij gebruikte bij de experimenten echter Syrische hamsters, het was nog de vraag of ratten op deze organische N-nitrosoverbindingen op dezelfde manier zouden reageren. De eerste vraag luidde daarom

5.1.1. Geeft subcutane toediening van diaethylnitrosamine aan ratten in een hoog percentage gezwellen in het neusslijmvlies?

5.2. DE DOSERING

HERROLD (1964c) gaf Syrische hamsters tweemaal per week 2 mg diaethylnitrosamine. Zij vermeldde in haar publicaties niet het gewicht van haar dieren. Wordt dit op 200 gram gesteld dan komt de dosering neer op 20 mg per kg lichaamsgewicht per week. Waarschijnlijk moet de te geven dosis in deze orde van grootte liggen. Als het antwoord op vraag 5.1.1. bevestigend luidde dan was de volgende vraag

5.2.1. Wat is de optimale dosering via subcutane weg?

5.3. DE HISTOPATHOLOGIE VAN DE EXPERIMENTELE GEZWELLEN

Zoals in hoofdstuk 4 bleek is er in de publicaties geen eenstemmigheid over het histologisch aspect van de experimenteel opgewekte gezwellen in het neusslijmvlies van de proefdieren. De oriënterende experimenten moesten daarom tot slot een antwoord geven op de vraag

5.3.1. Wat is het histologisch aspect van de opgewekte gezwellen in het ratteneusslijmvlies?

6. MATERIAAL EN METHODEN

6.1. DE PROEFDIEREN

De experimenten werden verricht met albinoratten uit de Wistarkolonie. De dieren werden in eigen stal gefokt uit een aantal exemplaren die afkomstig waren van het centraal proefdierenbedrijf T.N.O. te Zeist.

De huisvesting en verzorging geschiedde aanvankelijk in het Pathologisch Instituut, later op de inmiddels gereed gekomen afdeling experimentele geneeskunde van de medische faculteit. De dieren werden op de leeftijd van een maand in afzonderlijke kooien geplaatst. Voor de experimenten werd gebruik gemaakt van ratten die ongeveer drie maanden oud waren. Het gewicht was dan ongeveer 250 gram.

De voeding bestond uit „Hopefarm“-korrels, type AM II (bevattend tarwe, melk, eiwit, gist, vleesmeel, maishaveremout, lijnzaad, maisolie, verschillende mineralen en vitamines). De ratten konden naar believen leidingwater drinken. De proefdierenstal werd op een temperatuur van ongeveer 20° C gehouden. Elke dag vond controle plaats waarbij op het uiterlijk en het gedrag van het dier werd gelet. Van elke rat werd een afzonderlijk protocol bijgehouden. Hierop werden het gewicht, de hoeveelheid ingespoten stoffen, afwijkingen in uiterlijk, gedrag en dergelijke vermeld.

6.2. UITVOERING VAN DE EXPERIMENTEN

Tweemaal per week, in het algemeen op maandag en donderdag, werden de daarvoor in aanmerking komende dieren ingespoten met diaethylnitrosamine. Na weging werd de bij het gewicht passende hoeveelheid diaethylnitrosamine-oplos-

sing subcutaan tussen de schouderbladen ingespoten. De controledieren die bij de experimenten werden gebruikt werden op dezelfde plaats met aqua destillata ingespoten.

6.3. DIAETHYLNITROSAMINE

Het diaethylnitrosamine (N-nitrosodiaethylamine) werd betrokken van de chemische fabriek T. H. Schucardt. Volgens deze fabriek betreft het een zuivere verbinding met een zuiverheidsgraad $K_p,8$, een kookpunt van $63-64^\circ$ C en een moleculair gewicht van 102,14. De verbinding is een heldere vloeistof die goed oplost in water. Voor de proeven werd in het algemeen gebruik gemaakt van een oplossing van 1 % in gedestilleerd water.

6.4. BEWERKING VAN HET MATERIAAL

De dieren werden zo snel mogelijk na de dood onderzocht. Als dit niet mogelijk was, werd het gestorven dier in een vrieskast bewaard bij ongeveer 2° C. Bij de experimenten waarbij de dieren gedood moesten worden, geschiedde dit door decapitatie in een diepe aethernarcose.

Bij de sectie werd de kop in toto verwijderd en gedurende ongeveer een week in formaline-oplossing gefixeerd. Na verwijdering van de huid volgde ontkalking gedurende vijf dagen in de vloeistof volgens Kristensen. Het neusgedeelte van de kop werd vervolgens door middel van frontale sneden in vijf plakken verdeeld, waarna opnieuw ontkalking gedurende twee tot vijf dagen volgde. Na ontwatering door middel van alcohol in stijgende concentratie werden de weefselstukjes ingebed in paraffine en gesneden. De coupes werden gekleurd met haematoxiline-eosine. Zonodig werden andere kleuringen toegepast zoals Periodic Acid Schiff, Gomori, Mallory, Nissl. Behalve de P.A.S. gaven de andere kleuringen weinig meer informatie dan de haematoxiline-eosine kleuring.

Bij de sectie werden als routine hart, longen, lever, milt, nieren en pancreas op afwijkingen gecontroleerd. De microscopisch te onderzoeken organen werden gefixeerd in de vloeistof volgens Bouin gedurende ongeveer twaalf uur. Na uitsnijden vond opnieuw fixatie in deze vloeistof gedurende twaalf uur plaats. Na ontwatering door middel van alcohol in stijgende concentratie werden de weefselstukjes in paraffine ingebed en gesneden. De kleuring geschiedde in het algemeen met haematoxiline-eosine.

7. ORIËTERENDE EXPERIMENTEN

7.1. METHODIEK

Om een antwoord te verkrijgen op de in hoofdstuk 5 geformuleerde vragen werden de proeven als volgt uitgevoerd. Groepen van 8 à 10 ratten werden tweemaal per week ingespoten met respectievelijk 40, 20, 10, 7,5 en 5 mg diaethylnitrosamine per kg lichaamsgewicht. De dosering van 2×10 mg werd gekozen omdat HERROLD (1964c) met deze dosering bij Syrische hamsters in een hoog percentage gezwellen in het neusslijmvlies kon opwekken. Omdat het de vraag was of ratten op dezelfde manier zouden reageren werden bovendien groepen dieren met hogere doses (2×40 en 2×20 mg) en groepen met lagere doses ($2 \times 7,5$ en 2×5 mg) ingespoten.

De groepen werden zoveel mogelijk samengesteld uit gelijke aantallen mannelijke en vrouwelijke exemplaren. De toediening van de stof ging door zolang de algemene toestand van de dieren het toeliet. Meestal werd afgewacht tot de ratten spontaan dood gingen. Bij zeer slechte algemene toestand werden de dieren gedood.

Naast elke groep die met diaethylnitrosamine werd gespoten werd een controle-serie ingezet. Steeds als een dier uit een van de diaethylnitrosamine-groepen dood ging werd een dier uit de betreffende controle-serie gedood. De bewerking voor het microscopisch onderzoek geschiedde volgens de in 6.4. geschetste procedure.

7.2. ALGEMENE BEVINDINGEN (zie tabel 1)

7.2.1. Gemiddelde overlevingsduur

Naarmate de totale dosis lager was nam de gemiddelde overlevingsduur toe. Zie 7.2.3.

Tabel 1. Algemeen

| Doseringsserie | Aantal | Gem. overlevingsduur (met uitersten) | Gem. totale dosis per kg gewicht | Haaruitval | Bloedneus | Zwelling leverstreek |
|--------------------|-----------|---|--|------------|-----------|-------------------------|
| 2 x 40 mg/kg/week | 4 ♀♀ 4 ♂♂ | 98, 1 d. (88-117) | 1120 mg | ++ 8/8 | — | + 8/8 |
| 2 x 20 mg/kg/week | 5 ♀♀ 5 ♂♂ | 153, 3 d. (113-146) | 880 mg | ++ 8/10 | — | ++ 10/10 |
| 2 x 10 mg/kg/week | 5 ♀♀ 5 ♂♂ | 196, 3 d. (168-221) | 560 mg | + 5/10 | + 4/10 | ++ 10/10 |
| 2 x 7,5 mg/kg/week | 8 ♀♀ | 221, 9 d. (174-245) | 480 mg | — | ++ 6/8 | ++ 8/8 |
| 2 x 5 mg/kg/week | 8 ♀♀ | 272, 4 d. (206-303) | 390 mg | — | ++ 8/8 | ++ 8/8 |

— geen afwijkingen

+ afwijkingen aanwezig

++ afwijkingen sterk uitgesproken

7.2.2. *Uitwendig onderzoek*

Alle dieren uit de diaethylnitrosamine-series gingen cachectisch te gronde, dikwijls bestond icterus. Vooral in de series met hogere doses werd haaruitval gezien als gevolg van de toxische werking van het diaethylnitrosamine. Vele dieren uit de groepen met lagere dosering toonden tegen het eind van het leven neusbloedingen (zie 7.3.3.3.). Bij alle dieren was in de laatste fase een vergrote, vaste zwelling voelbaar in de leverstreek. Bij enkele ratten trad op het eind van het leven automutilatie op. Dit uitte zich vooral in knabbelen aan de poten.

7.2.3. *Microscopisch onderzoek van interne organen*

Bij het microscopisch onderzoek werden, behalve de neus, de lever en de longen nagezien. Bij alle dieren werd een levercarcinoom gevonden, soms met metastasen in de longen (fig. 7.1).

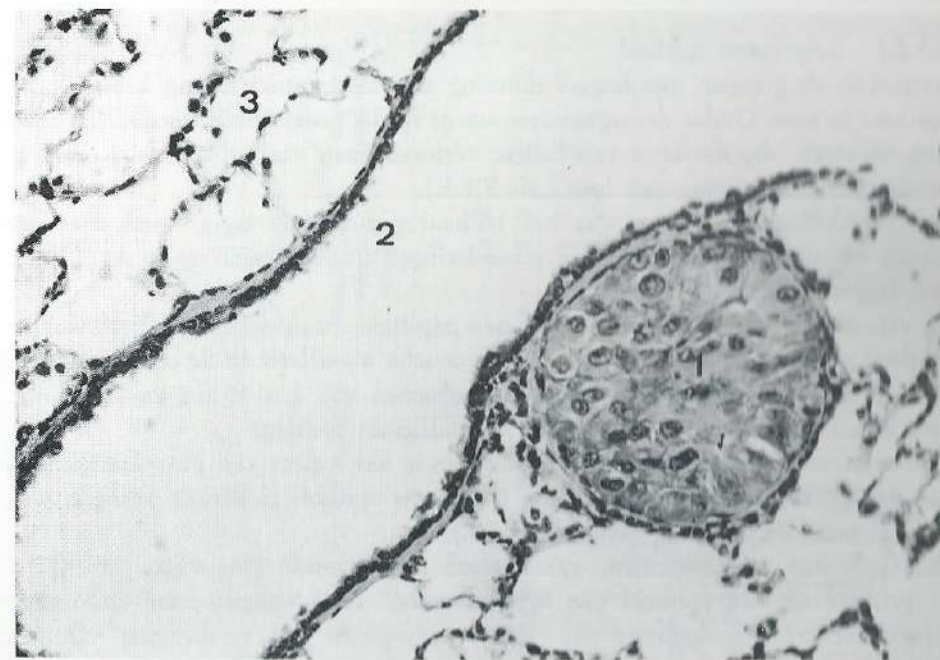


Fig. 7.1. Metastasen van levercarcinoom in longweefsel. 1, bloedvaatje met metastase. 2, wand van bronchiolus. 3 longalveoli. H E, x 207,9.

De doodsoorzaak moet vooral worden toegeschreven aan leverfunctiestoornissen die optraden ten gevolge van het levercarcinoom. Dit carcinoom trad eerder op naarmate de dosis hoger was.

7.3. MICROSCOPISCH ONDERZOEK VAN DE NEUS

7.3.1. Vestibulum nasi

Bij geen enkel dier werden duidelijke afwijkingen in het vestibulum nasi aangetroffen, evenmin in de voortzetting van het plaveiselepitheel op de neusbodem in de regio respiratoria (zie 3.2.).

7.3.2. Regio respiratoria (zie tabel 2)

In het gehele slijmvlies werden, vooral bij de dieren die de hogere doses hadden ontvangen, sterk uitgesproken ontstekingsverschijnselen gevonden.

7.3.2.1. Respiratoir epitheel

Vooraf in de groepen met hogere dosering was desorganisatie van het trilhaar-epitheel te zien. Onder desorganisatie wordt in dit proefschrift verstaan: verlies van trilharen, depolarisatie van cellen, verloren gaan van cellen (voor een wat uitvoeriger beschrijving met foto's zie 9.1.5.).

Op verschillende plaatsen was het trilhaarepitheel meerlagig, soms met het aspect van plaveiselepitheel. Deze veranderingen traden vooral op in de groepen met lagere dosering.

Bij vele dieren werd op meerdere plaatsen papillaire proliferatie van het trilhaar-epitheel gezien, vooral ter plaatse van de concha maxillaris en de concha nasalis. Deze proliferatie ontbrak in de doseringsgroepen van 2 x 40 mg en 2 x 5 mg. Het verschijnsel trad op onder twee verschillende beelden:

a. fungiforme proliferatie. Het epitheel kreeg het aspect van plaveiselepitheel, aan de oppervlakte was dikwijls nog respiratoir epitheel zichtbaar. De steel was meestal smal, de afmeting gering (fig. 7.2.).

Dit type was vrij zeldzaam, vaker werd de volgende groeiwijze gezien.

b. proliferatie van epitheel van het "inverted" type waarbij door uitbundige celvermeerdering invaginatie naar de diepte optrad met verdringing van het stroma^b. Het weinige stroma bestond uit wijdmazig, vasculair bindweefsel. In

^b Dit beeld deed zeer sterk denken aan het in de menselijke pathologie bekende "inverted papilloma" (Ringertz 1938).

Tabel 2. Regio Respiratoria

| Doseringsserie | Trilhaarepitheel | | Submucosa | Klieren | Sinus maxillaris | Orgaan van Jacobson |
|----------------|------------------|--------------------------------|-----------|---------|------------------|---------------------|
| | Desorganisatie | Meerlagigheid van het epitheel | | | | |
| 2 x 40 mg | ++ | 8/8 | + | 8/8 | — | — |
| 2 x 20 mg | ++ | 10/10 | + | 10/10 | + | 7/10 |
| 2 x 10 mg | ++ | 10/10 | + | 10/10 | + | 5/8 |
| 2 x 7,5 mg | + | 8/8 | + | 8/8 | + | 6/8 |
| 2 x 5 mg | + | 8/8 | + | 8/8 | — | — |

— geen afwijkingen

+ afwijkingen aanwezig

++ afwijkingen sterk uitgesproken

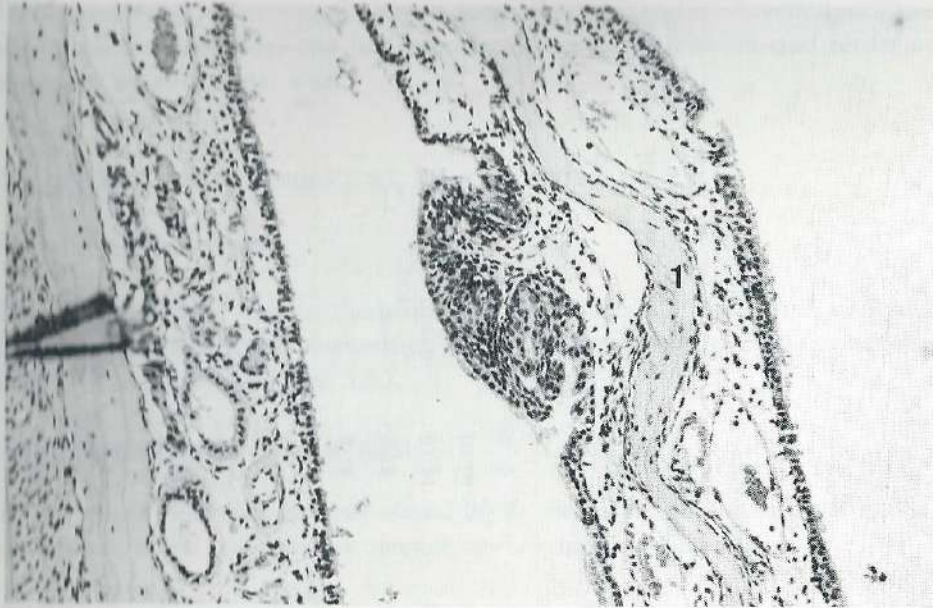


Fig. 7.2. Paddestoelvormig papilloompje. 1. benign skelet van de concha. HE, x 132.



Fig. 7.3. Papilloom van het inverted type. 1. prolifererende celmassa's. 2. stroma. HE, x 132.

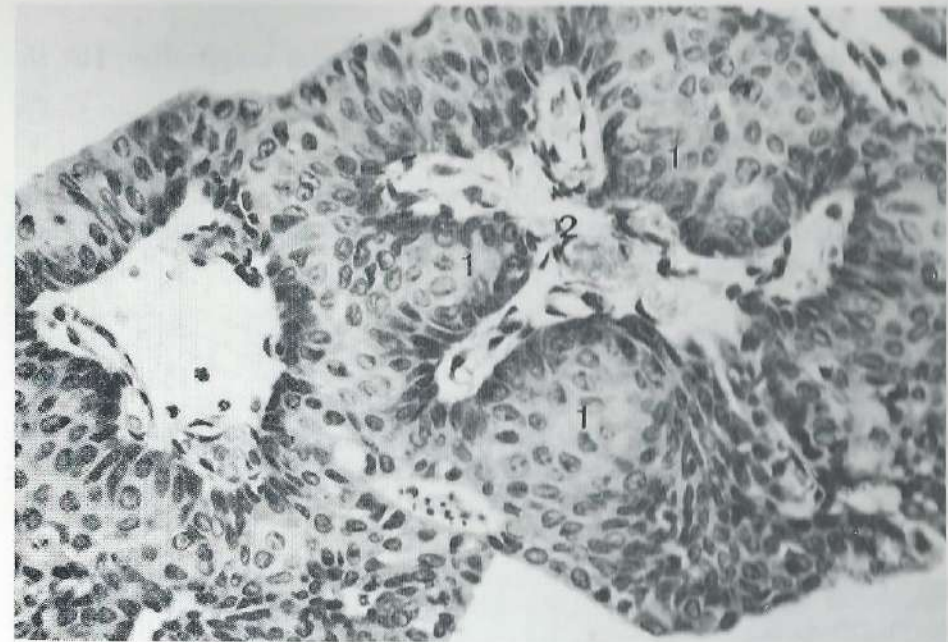


Fig. 7.4. Detailopname van papilloom van het inverted type. 1. instulpende epitheel massa's. 2 stroma. HE, x 330.

dit steunweefsel werd meestal ontsteking aangetroffen. Het prolifererende epitheel had het aspect van plaveiselepitheel, aan de oppervlakte was dikwijls nog trilhaarepitheel te zien (fig. 7.3. en 7.4.). De basaalmembraan was bij alle papillaire vormsels die werden aangetroffen intact.

Het was opvallend dat bovengenoemde verschijnselen (desorganisatie, meerlagigheid van trilhaarepitheel met metaplastisch plaveiselepitheel en papillaire proliferatie) vooral voorkwamen in het achterste deel van de regio respiratoria.

7.3.2.2. Submucosa

Hier werden plaatselijk sterke ontstekingsverschijnselen aangetroffen, soms in de vorm van een infiltraat. Overigens was dit de enige afwijking.

7.3.2.3. Klieren

Afgezien van de klieren van Bowman (zie 7.3.3.2.) toonden de verschillende kliergroepen in de neus geen duidelijke afwijkingen.

7.3.2.4. Orgaan van Jacobson

Bij geen der onderzochte dieren werden bijzonderheden aangetroffen. Het zintuigepitheel was in het algemeen intact gebleven.

7.3.2.5. Sinus maxillaris

Het slijmvlies en de omgevende klieren toonden in geen enkel geval primaire veranderingen. Wel was soms ingroei van gezwelweefsel uit de achterste helft van de neus zichtbaar (zie 7.3.3.3.).

7.3.3. Regio olfactoria (zie tabel 3)

7.3.3.1. Olfactorisch epitheel

Bij de dieren van de 2 x 40 mg serie was het reukepitheel nagenoeg geheel verwoest. De basale cellaag toonde op vele plaatsen een sterke proliferatie soms met het aspect van plaveiselepitheel (fig. 7.5.).

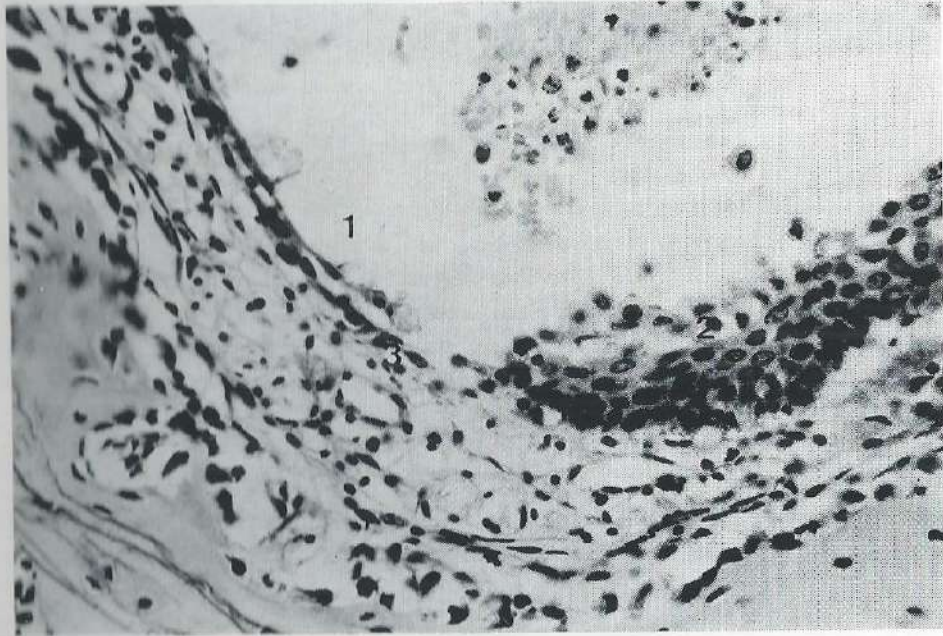


Fig. 7.5. Verwoesting van het reukepitheel bij hoge doses diaethylnitrosamine (2 x 40 mg per kg lichaamsgewicht per week). 1. basale cellaag. 2. proliferatie van de basale cellaag. 3. atrophie van de klieren van Bowman, H E, x 330

Tabel 3. Regio Olfactoria

| Doseringsserie | Reukepitheel | | | Lamina propria | |
|----------------|--------------|-------------------------------|------------------------------------|----------------|--|
| | opp. laag | basale laag | | Gezwelvorming | |
| 2 x 40 mg | ++ 8/8 | Proliferatie + metaplasie 8/8 | Woeiking met atypische kenmerken - | - | Klieren van Bowman, ontsiking, atrophie ++ 8/8 |
| 2 x 20 mg | ++ 10/10 | ++ 10/10 | ++ 10/10 | - | ++ 10/10 |
| 2 x 10 mg | + 10/10 | ++ 10/10 | ++ 10/10 | + 7/10 | + 10/10 |
| 2 x 7,5 mg | + 8/8 | ++ 8/8 | ++ 8/8 | ++ 8/8 | + 8/8 |
| 2 x 5 mg | + 8/8 | ++ 8/8 | ++ 8/8 | ++ 8/8 | + 8/8 |

- geen afwijkingen
 + afwijkingen aanwezig
 ++ afwijkingen sterk uitgesproken

In de 2 x 20 mg serie waren de verwoestingen minder ernstig, toch was op vele plaatsen de regelmatige opbouw van het reukepithel verstoord. Van rangschikking van de kernen in zes tot acht rijen was geen sprake meer, vele cellen waren verloren gegaan. Dit fenomeen werd in tabel 3 samengevat onder de term desorganisatie (voor een uitvoeriger beschrijving met foto zie 9.1.4.).

Zowel op de conchae als op het septum was op verschillende plaatsen een duidelijke proliferatie van de basale cellaag zichtbaar. Het reukepithel ter plaatse was meestal nog intact. De proliferatie was soms vele cellagen dik, het geheel had dan het uiterlijk van plaveiselepitheel. Op verschillende plaatsen leek instulping van het prolifererende epitheel met buisvormige structuren in de lamina propria te bestaan (fig. 7.6.). Het was niet te zien of werkelijk een instulping

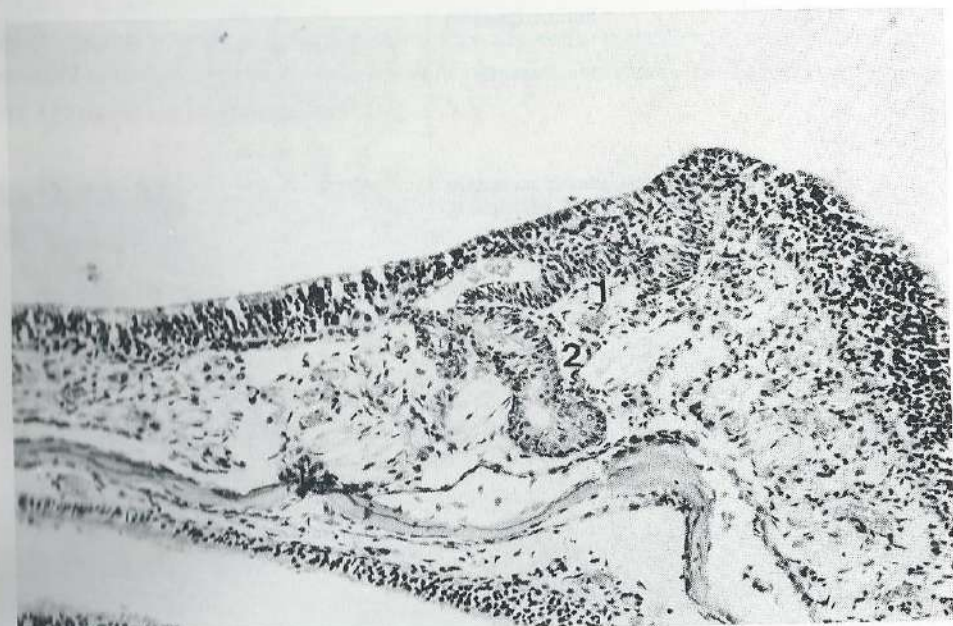


Fig. 7.6. Proliferatie van de basale cellaag. 1. proliferatie basale cellaag. 2. instulping van het prolifererende epitheel of proliferatie van de cellen van de klieren van Bowman. H E, x 132.

in de diepte bestond of dat de proliferatie uitging van de cellen van de klieren van Bowman. Naast deze proliferatie was in de basale cellaag een ander fenomeen zichtbaar dat er duidelijk van verschilde. Dit bestond eveneens uit vermeerdering van basale cellen, maar de cellen hadden weinig cytoplasma, de kernen waren donkerder en chromatinerijker met soms enige polymorphie. Een

enkele maal was in deze woekeringen neiging tot cirkelvormige rangschikking van de cellen zichtbaar (fig. 7.7.). Bij de series met lagere doseringen waren

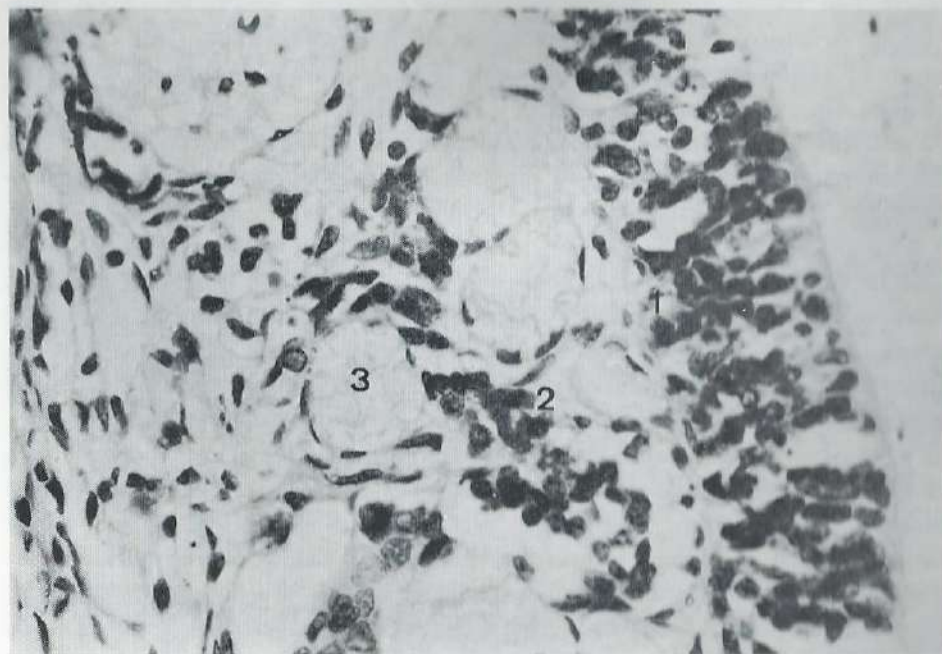


Fig. 7.7. Celwoekeringen met atypische kenmerken in de regio olfactoria. 1. celwoekeringen basale cellaag. 2. celwoekering in de lamina propria. 3. fila olfactoria. H E, x 528.

deze twee fenomenen steeds naast elkaar aanwezig. Geleidelijke overgangen werden niet gezien.

De boven beschreven afwijkingen waren het sterkst aanwezig in het achterste gedeelte van de pars olfactoria.

7.3.3.2. Lamina propria

Bij de dieren in de 2 x 40 mg serie werden sterke ontstekingsverschijnselen, vooral rond de klieren van Bowman, aangetroffen. De hoeveelheid klierparenchym was duidelijk verminderd, er leek atrophie te zijn opgetreden (fig. 7.5.). In de 2 x 20 mg serie werden bij alle dieren op vele plaatsen celwoekeringen met atypische kenmerken gezien die niet te onderscheiden waren van dergelijke celwoekeringen in de basale cellaag (fig. 7.7.). De relatie van deze celgroepjes

met donkere chromatinerijke kernen tot de klieren van Bowman en de fila olfactoria was niet duidelijk. Soms leken ze in, soms rond deze structuren te liggen. Een enkele maal waren celstrengen gevormd, een andere maal buisvormige structuren die konden reiken tot aan het reukepithel. Deze celwoekeringen in de lamina propria werden ook bij alle dieren in de lagere doseringsgroepen aangetroffen.

De ontstekingsverschijnselen rond de klieren van Bowman en de atrophie van het klierparenchym waren in de lagere doseringsgroepen, zij het minder uitgesproken, eveneens aanwezig.

7.3.3.3. Gezwelvorming

Naast de genoemde afwijkingen werden in de 2 x 10 mg serie bij een aantal dieren massieve gezwellen in de regio olfactoria aangetroffen. In de 2 x 7,5 en in de 2 x 5 mg serie waren deze gezwellen bij alle dieren aanwezig, soms aan beide zijden. Zij ontbraken in de 2 x 40 mg en de 2 x 20 mg serie.

De gezwellen hadden meestal een grote omvang en vulden bij sommige dieren de gehele ethmoidstreek. Het histologisch beeld was niet eenvormig. Grote gebieden bestonden uit ophopingen van lymfocyt-achtige cellen met kleine donkere kernen en weinig cytoplasma. Hier werd weinig stroma gezien en er bestond geen duidelijke architectuur (fig. 7.8.).

Op sommige plaatsen was een geleidelijke overgang naar een ander celtype zichtbaar waarvan de kernen groter waren en een fijner verdeeld chromatine hadden. Ook hier waren de cellen plasma-arm en waren de celgrenzen niet duidelijk. Wel was in deze gebieden meestal sprake van een bepaalde architectuur omdat de celmassa's door fibro-vasculaire schotten in kleinere veldjes verdeeld werden. Hier en daar was sprake van rangschikking van cilindervormige cellen rond een lumen (rosetten), op andere plaatsen rond een imaginair middelpunt (pseudorosetten, fig. 7.9.).

Bij sterke vergroting waren vezelachtige structuren tussen de cellen zichtbaar die soms uit het cytoplasma leken te komen (fig. 7.10).

Op plaatsen waar het gezwel in aanraking met bot kwam (concha, septum, laterale neuswand) had duidelijk destructie van botweefsel plaatsgevonden. Bij de dieren waar het gezwel in de ethmoidstreek een grote uitbreiding had, werden in het gezwelweefsel alleen nog de resten van pre-existente structuren aangetroffen. In het neuslumen werden bijna altijd grote massa's bloed aangetroffen hetgeen een verklaring vormt voor de neusbloeding in de laatste levensfase. Bij enkele dieren was doorgroei van het gezwel in de klieren rond de sinus maxillaris zichtbaar.

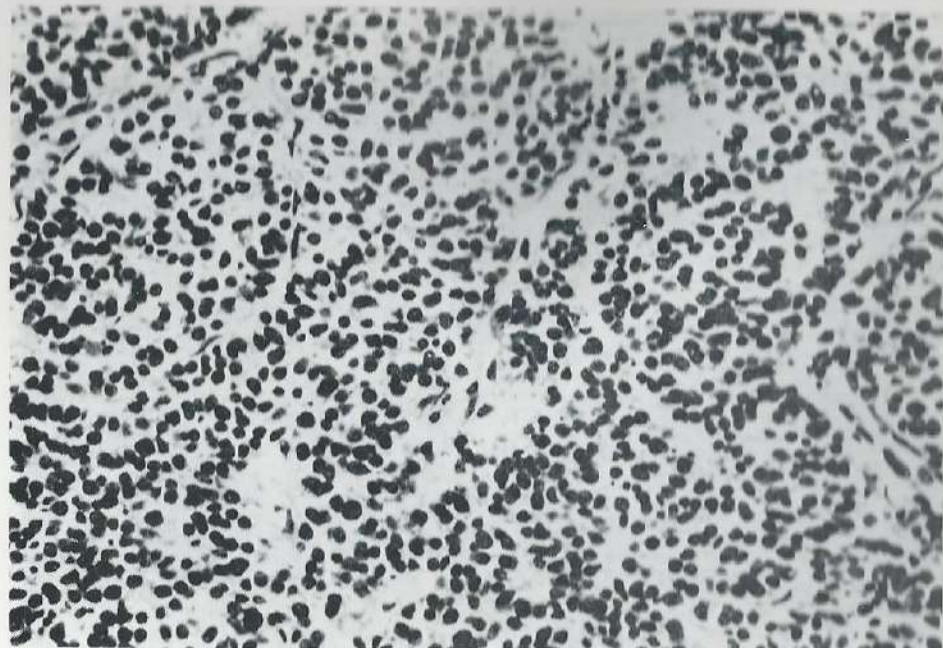


Fig. 7.8. Weinig gedifferentieerd gebied uit een esthesioneuroepithelioma. Kleine lymfocyt-achtige cellen met donkere kernen, weinig stroma. H.E., x 330.

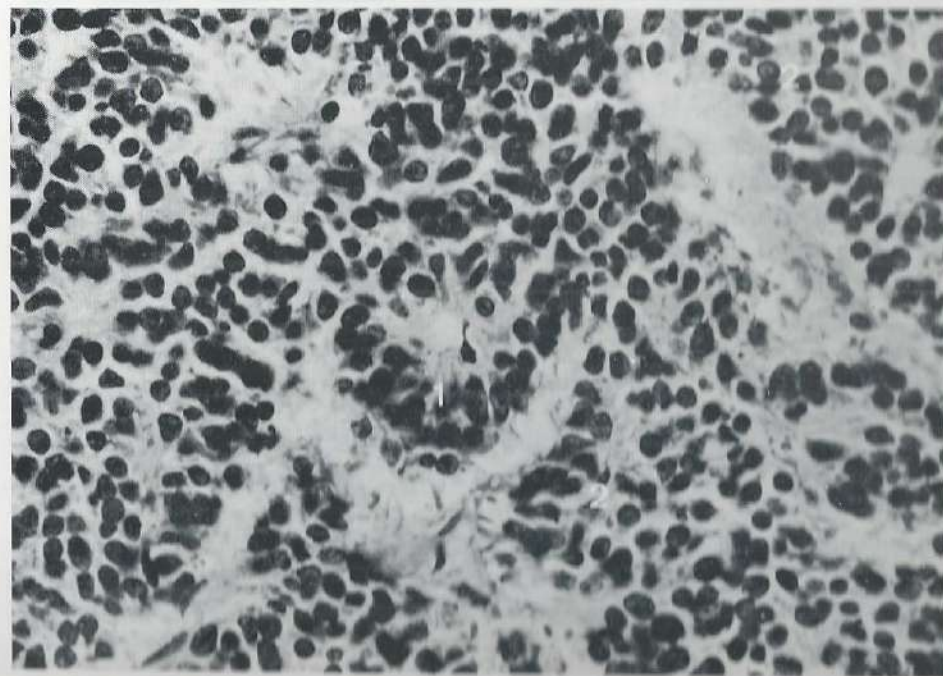


Fig. 7.9. Gedifferentieerd gebied uit esthesioneuroepithelioma. 1. roset. 2. veldjes gescheiden door fibro-vasculaire schotten. H.E., x 528.

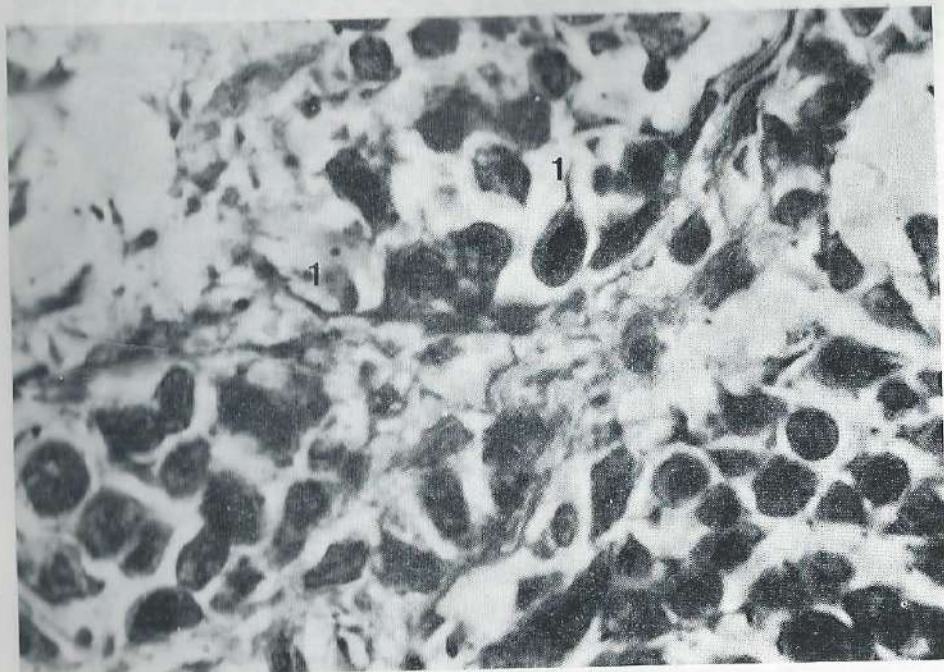


Fig. 7.10. Intercellulaire vezels in esthesioneuroepithelioma. 1. vezels die uit het cytoplasma lijken te komen. Phase contrast. x 1332.

In de peripherie van de gezwellen bestond neiging tot groei langs de zenuwbanden. Verschillende malen werd doorgroei in de voorste schedelgroeve via de openingen in de lamina cribriformis gezien. Bij één dier was deze botwand voor een groot deel gedestruëerd, het intracranieel groeiende gezwel had de hersenmassa verdrongen (fig. 7.11.).

7.4. ONDERZOEK VAN DE CONTROLEDIEREN

Een van deze dieren stierf in het begin van de experimenten aan een intercurrente ziekte, waarschijnlijk een pneumonie. De doodsoorzaak kon niet worden vastgesteld wegens de vergevorderde autolyse.

In hoofdstuk 3 (Pathologische anatomie van de ratteneus), waar het onderzoek van de controledieren reeds ter sprake kwam, werd beschreven dat bij enkele dieren min of meer belangrijke afwijkingen werden waargenomen in de vorm

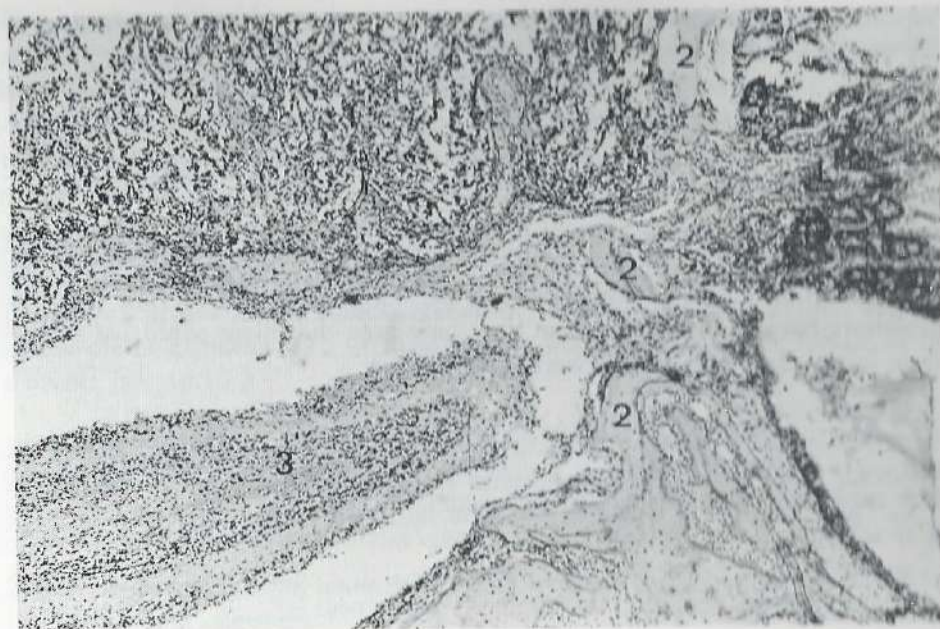


Fig. 7.11. Doorbraak van esthesioneuroepithelioma in de voorste schedelgroeve, 1. esthesioneuroepithelioma. 2. lamina cribrosa. 3. naar lateraal gedrukte hersenmassa. H.E. x 33.

van bloedingen, ophopingen van slijm speciaal in het achter-boven gedeelte van de neus en ontstekingsinfiltraten van het slijmvlies. Daar werd tevens beschreven dat bij één dier duidelijk metaplastisch plaveiselepitheel in het trilhaarepitheel van de regio respiratoria werd aangetroffen (fig. 3.8.).

7.5. BEANTWOORDING DER VRAGEN

7.5.1. De oncogene stof, de toedieningswijze, de dosering

De in hoofdstuk 5 gestelde vragen:

Geeft subcutane toediening van diaethylnitrosamine bij ratten in een hoog percentage gezwellen in het neusslijmvlies (5.1.1.)?

Wat is de optimale dosering via subcutane weg (5.2.1.)?

kunnen op grond van de resultaten van de boven beschreven proeven als volgt worden beantwoord.

Subcutane toediening van diaethylnitrosamine bij de rat geeft aanleiding tot het ontstaan van gezwellen in het neusslijmvlies. Het meest geschikt lijkt een dosis van $2 \times 7,5$ mg per kg lichaamsgewicht per week. Bij deze dosering werd in de coupes van zes van de acht dieren papillaire proliferatie van het trilhaar-epitheel in de regio respiratoria waargenomen, terwijl bij alle dieren infiltratief groeiende gezwellen in de regio olfactoria werden gevonden. Een dosering van 2×10 mg per kg lichaamsgewicht per week lijkt minder geschikt omdat in deze serie slechts bij zeven van de tien dieren een gezwel in de regio olfactoria werd gevonden. Een dosering van 2×5 mg per kg lichaamsgewicht lijkt evenmin bruikbaar omdat in de coupes van deze serie geen duidelijke papillaire proliferatie in de regio respiratoria werd aangetroffen.

7.5.2. De histopathologie van de experimentele gezwellen

Het antwoord op de in hoofdstuk 5 gestelde vraag,
Wat is het histologisch aspect van de opgewekte gezwellen in het ratteneus-slijmvlies (5.3.1.)?
lijdt verschillend voor de twee regionen in de neus.

7.5.2.1. Regio respiratoria

In deze streek werd papillaire proliferatie van het epitheel gezien die sterke gelijkenis vertoont met het histologisch beeld van de papillomen zoals die voorkomen in het neusslijmvlies van de mens. De papillomen gingen voornamelijk uit van de conchae. De groeiwijze was fungiform of "inverted". De fungiform groeiende papillomen waren klein en kwamen weinig voor. De meeste papillomen waren van het "inverted" type en bereikten een veel grotere omvang.

7.5.2.2. Regio olfactoria

In deze streek kwamen invasief groeiende gezwellen voor, die op grond van de typische bouw esthesioneuroepitheliomen kunnen worden genoemd. Zij voldeden aan de criteria die gesteld moeten worden voor de diagnose van een neurogeen gezwel en die OBERT (1960) als volgt samenvatte:

1. het voorkomen van intercellulaire fibrillen.
2. slecht omschreven, nagenoeg ontbrekend cytoplasma.
3. ronde tot ovale kernen.
4. scherp omschreven, fijn- of grofkorrelig chromatine.
5. verdeling van het gezwel in lobuli door bindweefselsschotten.
6. vorming van rosetten en pseudo-rosetten.

Het histologisch beeld van de gezwellen in de eigen experimenten komt overeen met de beschrijvingen van HERROLD (1964b, c) en THOMAS (1965). Deze onderzoekers kwamen tot dezelfde diagnose.

7.6. OVERIGE BEVINDINGEN

Bij de overige bevindingen moet allereerst een negatieve vermeld worden. In tegenstelling tot HERROLD (1964) en THOMAS (1965) werden geen duidelijke plaveiselcelcarcinomen en adenocarcinomen waargenomen. Wel werden beelden gezien die er gelijkenis mee vertoonden. Dit komt nog nader ter sprake in de discussie (zie 10.1.1.).

De afwijkingen in de neus bij de dieren in dezelfde doseringsgroep toonden veel overeenkomst. De inductietijd van de verschillende fenomenen is bij de dieren in dezelfde doseringsgroep kennelijk ongeveer gelijk.

Tussen de afwijkingen bij mannelijke en vrouwelijke dieren werden geen duidelijke verschillen opgemerkt.

Zowel in de regio respiratoria als in de regio olfactoria waren de afwijkingen het meest uitgesproken in het achterste gedeelte.

In de verschillende kliergroepen in de neus werden, met uitzondering van de klieren van Bowman, geen bijzonderheden gevonden.

Afgezien van lichte autolytische veranderingen was het orgaan van Jacobson bij alle dieren intact gebleven.

8. DEFINITIEVE VRAAGSTELLINGEN, PROEFOPSTELLINGEN

8.1. DE VRAGEN

Behalve papillomen en esthesioneuroepitheliomen zagen HERROLD (1964) en THOMAS (1965) ook plaveiselcelcarcinomen en adenocarcinomen in het neusslijmvlies van de proefdieren. Bij een vergelijkende studie zijn vooral de plaveiselcelcarcinomen en de adenocarcinomen interessant omdat deze gezweltypen het meest voorkomen in de neus en neusbijholten van de mens. In de eigen experimenten (7.) werden echter alleen duidelijke papillomen en esthesioneuroepitheliomen gevonden. Het verdere onderzoek moest derhalve beperkt worden tot het bestuderen van het ontstaan en de groei van deze gezwellen.

In de experimenten van hoofdstuk 7 werden een aantal afwijkingen in het neusslijmvlies van de ratten geconstateerd die als leidraad gediend hebben bij de vraagstelling voor het verdere onderzoek. Zo werd in de regio respiratoria, naast het optreden van papillomen met verschillende groeiwijze, multifocale meerlagigheid van het trilhaarepitheel gevonden. Soms werd op deze plaatsen plaveiselepitheel gezien. Het was niet duidelijk of deze twee fenomenen iets met elkaar te maken hebben. De vraag kon gesteld worden,

8.1.1. *Is de meerlagigheid (respectievelijk het metaplastisch plaveiselepitheel) in de regio respiratoria een voorstadium van latere papilloomvorming?*

In de regio olfactoria werden, naast het optreden van esthesioneuroepitheliomen, verschillende andere fenomenen waargenomen. De basale cellaag toonde op vele plaatsen proliferatie met vorming van metaplastisch plaveiselepitheel. In dezelfde laag was woekering met atypische kenmerken van cellen zichtbaar. De nieuw gevormde cellen neigden soms tot circulaire rangschikking. Dezelfde celwoekeringen waren dikwijls ook te zien in de lamina propria. Ge-

zien de gelijkenis met sommige gezwelgedeelten in het esthesioneuroepithelioma leken deze celwoekeringen het beginpunt van genoemde gezwellen.

De volgende vraag kon worden gesteld,

8.1.2. *Is de proliferatie van de basale cellaag in de regio olfactoria een voorstadium van de celwoekeringen met atypische kenmerken en dus van het esthesioneuroepithelioma?*

En als het antwoord op deze vraag negatief uit zou vallen,

8.1.3. *Uit welke celtype in de regio olfactoria ontstaan de celwoekeringen dan wel?*

8.2. PROEFOPSTELLINGEN

Voor het vinden van een antwoord op bovengenoemde vragen moest een proefopstelling worden gekozen waarbij het gedrag van het neusslijmvlies tijdens het experiment met korte tussenpozen kon worden geobserveerd. De meest geschikte opstelling werd na enige inleidende experimenten gevonden.

8.2.1. Cytologisch onderzoek

Allereerst werd periodiek cytologisch onderzoek van het neusslijmvlies tijdens het experiment beproefd. De proefdieren werden met een stevige paardehaar tot niezen gebracht en het product werd op een voorwerpsglas opgevangen. Het op deze wijze verkregen materiaal was spaarzaam en moeilijk te beoordelen. Vervolgens werd getracht met een fijne scherpe lepel (uit het micro-instrumentarium van de oorchirurgie) slijmvlies uit de neus te schrapen. Dit gaf praktisch grote moeilijkheden omdat de proefdieren in narcose moesten worden gebracht voor het slagen van een dergelijke ingreep. Verschillende dieren gingen aan de narcose te gronde. Deze werkwijze gaf bovendien weinig informatie omdat alleen de voorste helft van de neus, het respiratoire gedeelte, goed kon worden bereikt. Zoals in hoofdstuk 3 werd beschreven is de bouw van de olfactoire streek nogal ingewikkeld terwijl deze streek door de ligging achter-boven in de neus moeilijk bereikbaar is. Het is begrijpelijk dat hieruit op deze manier weinig materiaal kon worden verkregen. Van het cytologisch onderzoek werd daarom in de loop van de experimenten afgezien.

8.2.2. Histologisch onderzoek

Bij de oriënterende experimenten, waarbij de spontane dood van de proefdieren

werd afgewacht, werd gezien dat bij geschikte dosering nagenoeg alle dieren gezwollen in het neusslijmvlies kregen. Deze gezwollen toonden, wat de uitbreiding betreft, bij de verschillende dieren in dezelfde doseringsgroep veel overeenkomst. De inductietijd van de gezwollen is dus waarschijnlijk vrij constant. Het is dan zeer waarschijnlijk dat ook de ontwikkeling van de gezwollen bij de verschillende proefdieren in dezelfde doseringsgroep op ongeveer dezelfde manier en in ongeveer dezelfde tijd verloopt. De afwijkingen in het neusslijmvlies zijn dus waarschijnlijk op een bepaald moment tijdens het experiment bij verschillende proefdieren in dezelfde doseringsgroep ongeveer dezelfde en met elkaar vergelijkbaar.

Uitgaande van deze gedachtengang leek het logisch een proef in te zetten met een aantal ratten die met dezelfde hoeveelheden van het diaethylnitrosamine zouden worden ingespoten en daarna, met bepaalde tussenpozen, een aantal dieren te doden voor onderzoek van het neusslijmvlies. Op deze manier zou waarschijnlijk een bepaalde volgorde van verschijnselen in het neusslijmvlies van de proefdieren zijn aan te tonen. De gedetailleerde beschrijving van de proefopstelling volgt in hoofdstuk 9.1. (Experiment met voortgezette toediening van diaethylnitrosamine).

Met dit experiment werd inderdaad een beeld verkregen van de ontwikkeling van de papillomen en de esthesioneuroepitheliomen. De chronologische volgorde van de verschillende bevindingen was echter niet duidelijk. Dit kwam waarschijnlijk omdat de tussenpoos waarna steeds een aantal dieren werd gedood te groot was genomen. Bovendien was de totale dosis van het diaethylnitrosamine die de dieren bij de voortgezette toediening uiteindelijk ontvingen verhoudingsgewijs vrij groot.

Men zou kunnen trachten een meer genuanceerd beeld te krijgen door opnieuw hetzelfde experiment te doen en dan met kortere tussenpoos een aantal ratten te doden voor onderzoek van het neusslijmvlies. Dit experiment zou bovendien gericht kunnen zijn omdat immers nu bekend is op welk tijdstip, gerekend vanaf het begin van het experiment, de afwijkingen ongeveer beginnen op te treden. Voor het verkrijgen van een beter beeld werd echter een andere manier gekozen, namelijk de werkwijze waarmee de inductietijd van de verschillende afwijkingen langer wordt gemaakt. Dit kan worden bereikt door de toediening van lagere totale doses. De verschijnselen worden hierdoor, gerekend over een bepaald tijdsverloop, als het ware uit elkaar getrokken. De gedetailleerde beschrijving van een dergelijke proefopstelling volgt in hoofdstuk 9.2. (Experiment met verschillende toedieningsduur van diaethylnitrosamine).

9. EXPERIMENTEN MET BEANTWOORDING VAN DE VRAGEN

9.1. EXPERIMENT MET VOORTGEZETTE TOEDIENING VAN DIAETHYLNITROSAMINE

9.1.1. *Methodiek*

Uit de resultaten van de oriënterende proeven (7.) bleek dat een dosis van $2 \times 7,5$ mg diaethylnitrosamine per kg lichaamsgewicht per week het meest geschikt was voor het bestuderen van het ontstaan en de groei van de papillomen en esthesioneuroepitheliomen. De gemiddelde overlevingsduur bedroeg bij een dergelijke dosering, gerekend vanaf het begin van het experiment, 221,9 dagen of ongeveer zeven maanden.

De tussenpoos waarna steeds een aantal dieren zou worden gedood werd voor het nu te beschrijven experiment vastgesteld op een maand. Deze termijn was vrij willekeurig, moest dat zijn omdat geen enkel onderzoek bekend was over het ontstaan en de groei van gezwollen in het neusslijmvlies waaraan gerefereerd kon worden. Gezien de te verwachten grote overeenkomst in afwijkingen werden de aantallen die elke maand zouden worden gedood klein gehouden en op zes gesteld. Om over vergelijkingsmateriaal te kunnen beschikken werden tevens een aantal controledieren in het experiment opgenomen, hiervoor werd gerekend op twee dieren per maand. Per maand zouden dus acht ratten worden afgemaakt, wat het totaal voor het experiment op zesenvijftig bracht. De toediening van zowel diaethylnitrosamine als aqua destillata ging door tot de dieren werden gedood.

De bewerking van de neus geschiedde volgens de in 6.4. geschetste procedure. Een samenvatting van de resultaten van het experiment geeft tabel 4. De bevindingen zullen achtereenvolgens per maand besproken worden.

Tabel 4. Overzicht van de resultaten van experiment 9.1.

| Inductietijd | Aantal | Regio respiratoria | | | | | Regio olfactoria | | | | |
|--------------|--------------|--------------------|----------------------------|------------|----------------|---------------------------|-------------------------|--|---|--------------------------|--|
| | | Desorganisatie | Meertagigheid + metaplasie | Papillomen | Desorganisatie | Proliferatie + metaplasie | atw. klieren van Bowman | Woekering met atypische kenmerken in basale laag | Woekering met atypische kenmerken in lamina propria | Esthesionuro-epithelomen | |
| 3 mnd | 3 ♂♂ 3 ♀♀ | — | — | — | + 6/6 | — | — | — | — | — | |
| 4 mnd | 3 ♂♂ 3 ♀♀ | + 6/6 | + 6/6 | + 2/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | — | — | — | |
| 5 mnd | 3 ♂♂ 3 ♀♀ | + 6/6 | + 6/6 | + + 4/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 2/6 | |
| 6 mnd | 3 ♂♂ 3 ♀♀ | + 6/6 | + 6/6 | + + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | + 6/6 | |
| 7 mnd | ♂ | + 2/2 | + + 2/2 | + + 2/2 | + 2/2 | + + 2/2 | + + 2/2 | + + 2/2 | + + 2/2 | + + 2/2 | |

— geen afwijkingen

+ afwijkingen aanwezig

+ + afwijkingen sterk uitgesproken

9.1.2. *Bevindingen na één maand*

Behalve de gebruikelijke afwijkingen bij een enkel dier (zie 3.3.) werden geen bijzonderheden in de neus gevonden.

9.1.3. *Bevindingen na twee maanden*

Bij de diaethylnitrosamine-ratten noch bij de aqua destillata-ratten werden veranderingen in het neusslijmvlies gevonden.

9.1.4. *Bevindingen na drie maanden*

Bij de controledieren werden geen afwijkingen in het neusslijmvlies gevonden. Bij de ratten die met diaethylnitrosamine werden ingespoten waren in de regio respiratoria geen veranderingen zichtbaar. In het reukepitheel daarentegen waren bij alle dieren duidelijke afwijkingen te vinden. Op vele plaatsen was de regelmatige opbouw van het epitheel verstoord. De kernen waren niet meer in zes tot acht rijen gerangschikt (zie 3.2.) maar lagen wanordelijk boven en naast elkaar. De cellen hadden zich afgerond waardoor het oorspronkelijk eenlagige epitheel meerlagig leek te zijn geworden. Bovendien was er afname van het aantal cellen. Op bovengenoemde plaatsen waren de reukharen veelal verloren gegaan (fig. 9.1.). Dit geheel van verschijnselen is in tabel 4 samengevat onder de term desorganisatie van het reukepitheel. De afwijkingen concentreerden zich vooral hoog in de neus en wel in het reukslijmvlies van het neusdak en de bovenste conchae ethmoidales.

9.1.5. *Bevindingen na vier maanden*

In het neusslijmvlies van de ratten die met aqua destillata waren ingespoten werden geen bijzonderheden gevonden. Bij de dieren die met diaethylnitrosamine waren ingespoten werden nu zowel in de regio respiratoria als in de regio olfactoria afwijkingen gezien.

In de regio respiratoria toonde het trilhaarepitheel op vele plaatsen verstoring in de regelmatige opbouw. De kernen waren niet meer, zoals normaal, gerangschikt in een of twee rijen (zie 3.2.), maar lagen zonder enig systeem boven en naast elkaar. Op deze plaatsen waren de trilharen verloren gegaan (fig. 9.2.). Deze bevindingen worden in tabel 4 samengevat onder de term desorganisatie van het respiratoire epitheel.

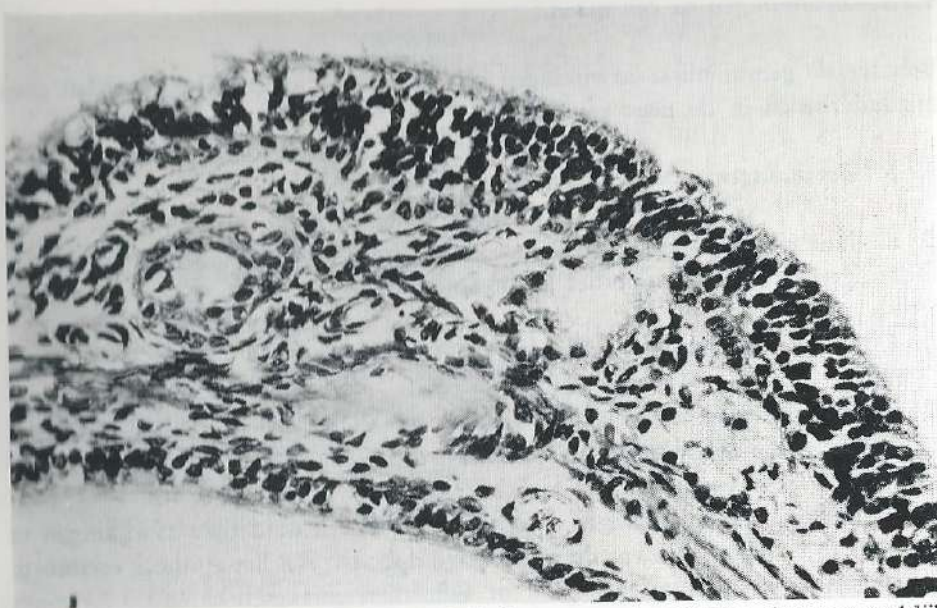


Fig. 9.1. Desorganisatie van het reukepitheel. De kernen van de reukcellen liggen wanordelijk door elkaar. Sommige cellen zijn gezwollen. H E, x 330.

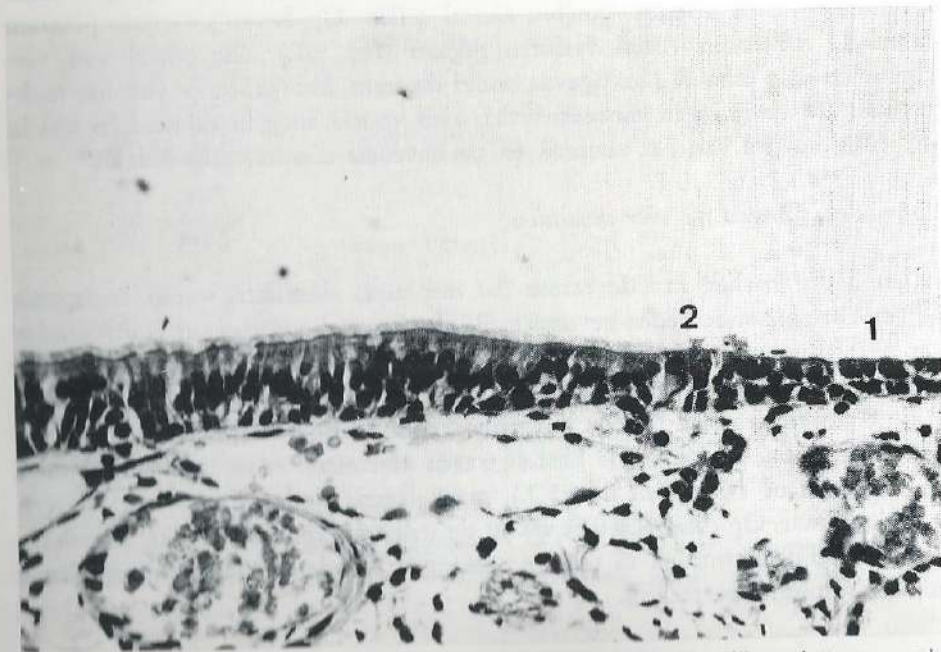


Fig. 9.2. Desorganisatie van het trilhaarepitheel. 1. de cylindercellen lijken platter geworden en hebben hun trilharen verloren. 2. wanordelijke ligging van de kernen. H E, x 330.

Op verschillende plaatsen werd meerlagigheid van het cilindrische epitheel geconstateerd soms met het aspect van plaveiselepitheel (fig. 9.3.).

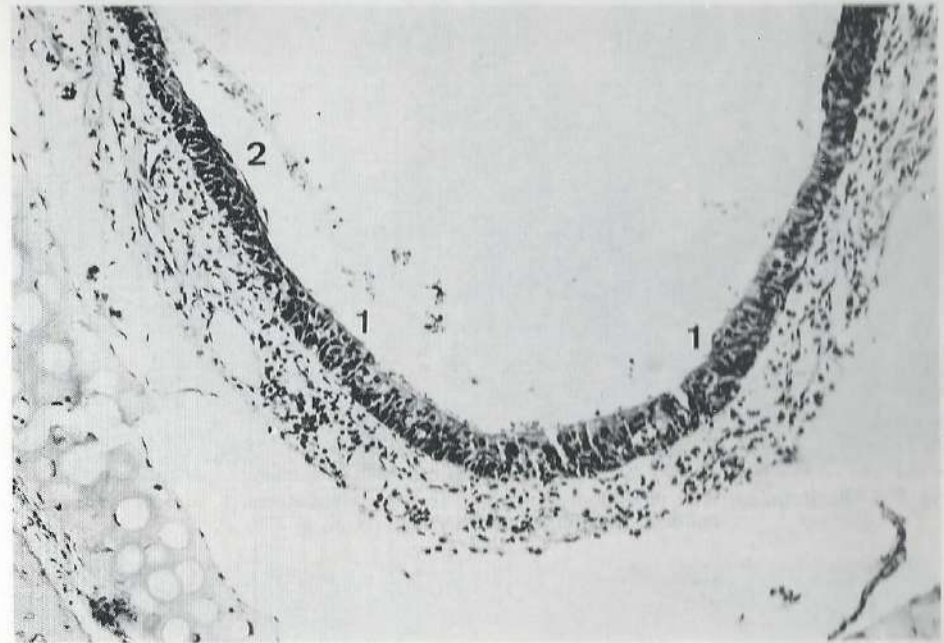


Fig. 9.3. Desorganisatie en metaplasie in de regio respiratoria. 1. meerlagigheid van het trilhaarepitheel. 2. metaplastisch plaveiselepitheel. H E, x 132.

Bij verschillende dieren werden in deze streek, bij uitstek op de conchae, kleine uitstulpingen van het trilhaarepitheel gezien met een centraal stroma waarin zich meestal een bloedvat bevond (fig. 9.4.). Soms waren, vooral in de basale lagen van deze uitstulpingen, opgezwollen cellen zichtbaar (fig. 9.5.). Dit phenomeen was in verschillende stadia herkenbaar en er bestonden geleidelijke overgangen naar kleine papillomen van het "inverted" type (fig. 9.5., 9.6. en 9.7.). Bij twee dieren werden dergelijke kleine papillomen van het "inverted" type gevonden.

In de regio olfactoria werd bij alle dieren op vele plaatsen in het reukepitheel een duidelijke desorganisatie waargenomen. Bovendien was bij allen op meerdere plaatsen proliferatie van de basale cellaag zichtbaar. De ovale kernen van de nieuw gevormde cellen hadden een fijn verdeeld chromatine en waren groter



Fig. 9.4. Beginstadium van papilloomvorming in de regio respiratoria. 1. proliferatie van het epitheel. 2. stroma met bloedvat. H E, x 330.

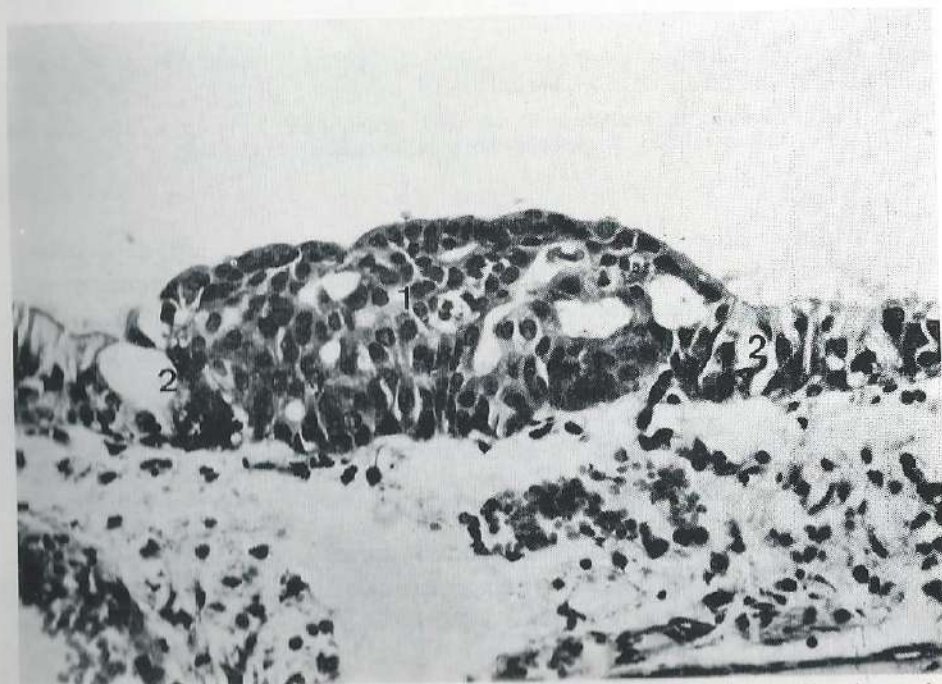


Fig. 9.5. Beginstadium van papilloomvorming in de regio respiratoria. 1. proliferatie van het epitheel. 2. gezwollen cellen. H E, x 330.

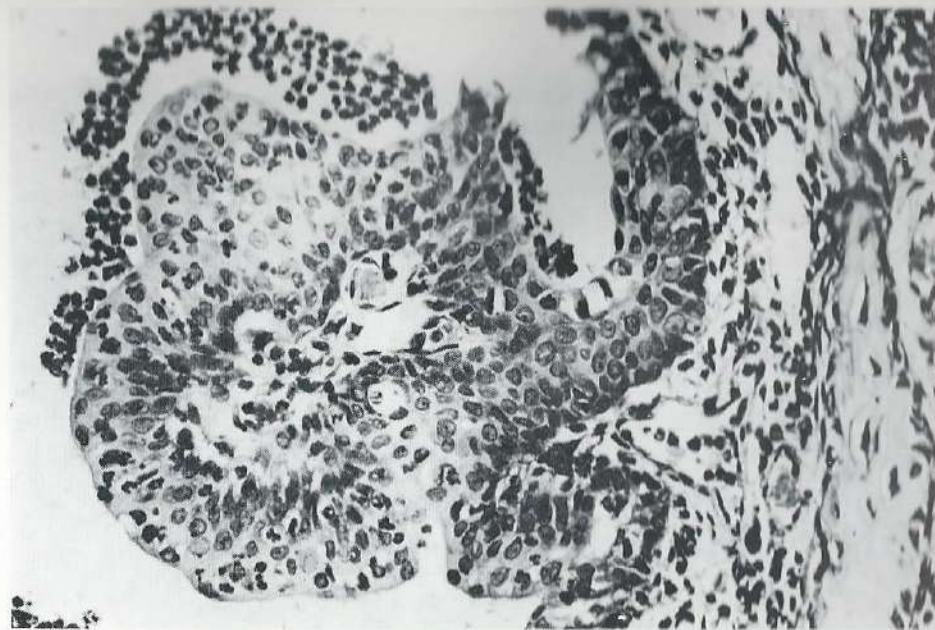


Fig. 9.6. Klein papilloom in de regio respiratoria. H E, x 207,9

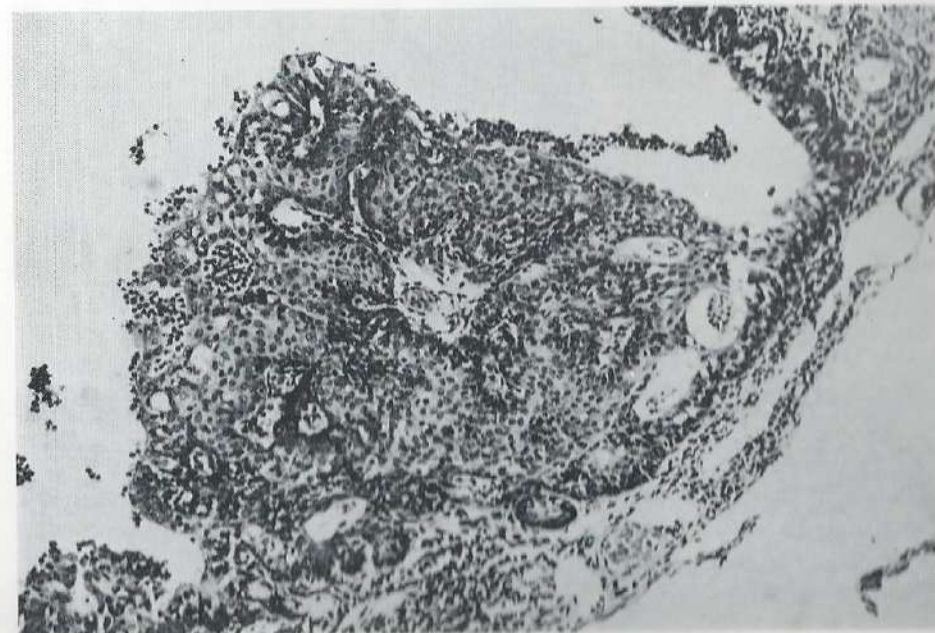


Fig. 9.7. Klein papilloom in de regio respiratoria met nu duidelijk "inverted" groeipatroon. H E, x 132.



Fig. 9.8. Beginnende proliferatie van de basale cellaag in de regio olfactoria. 1. proliferatie. 2. reukcellen met lichte desorganisatie. 3. fila olfactoria. H E, x 330.

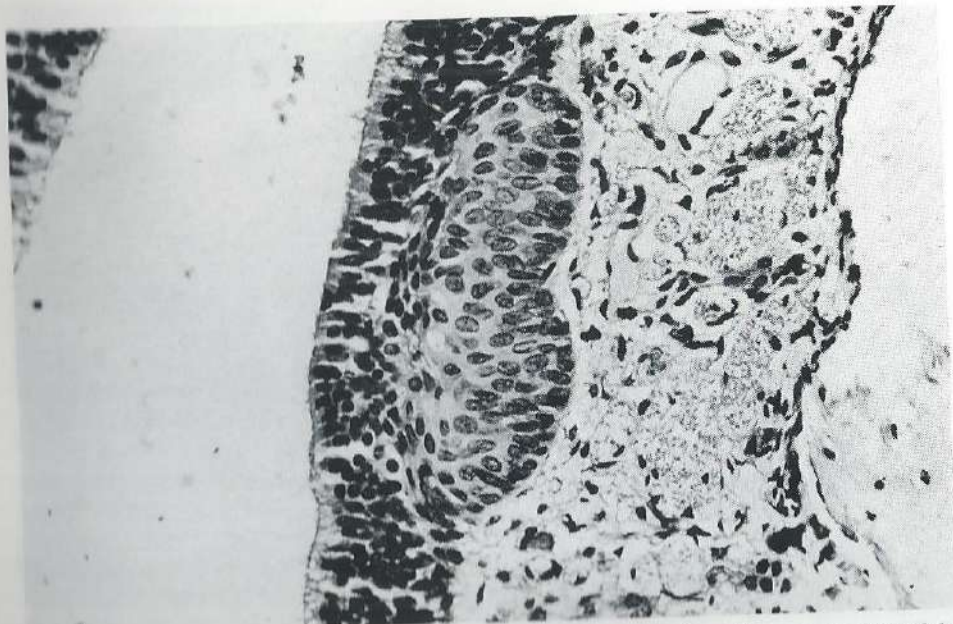


Fig. 9.9. Proliferatie van de basale cellaag in de regio olfactoria. De cellen aan de oppervlakte van de prolifererende plek gaan afplatten en krijgen het aspect van plaveiselepitheel. H E, x 330.

dan die van de oorspronkelijke. De lengterichting van de kernen, normaliter evenwijdig aan de oppervlakte, stond nu loodrecht daarop (fig. 9.8.). Op sommige plaatsen was de basale laag verschillende cellagen dik geworden en had het aspect van plaveiselepitheel gekregen (fig. 9.9.). Een enkele keer leek een uitstulping van de proliferatie in de lamina propria te bestaan. Het was niet duidelijk te zien of werkelijk een uitstulping bestond of dat proliferatie van de cellen van de klieren van Bowman was opgetreden (fig. 9.10.). Rond de buisjes

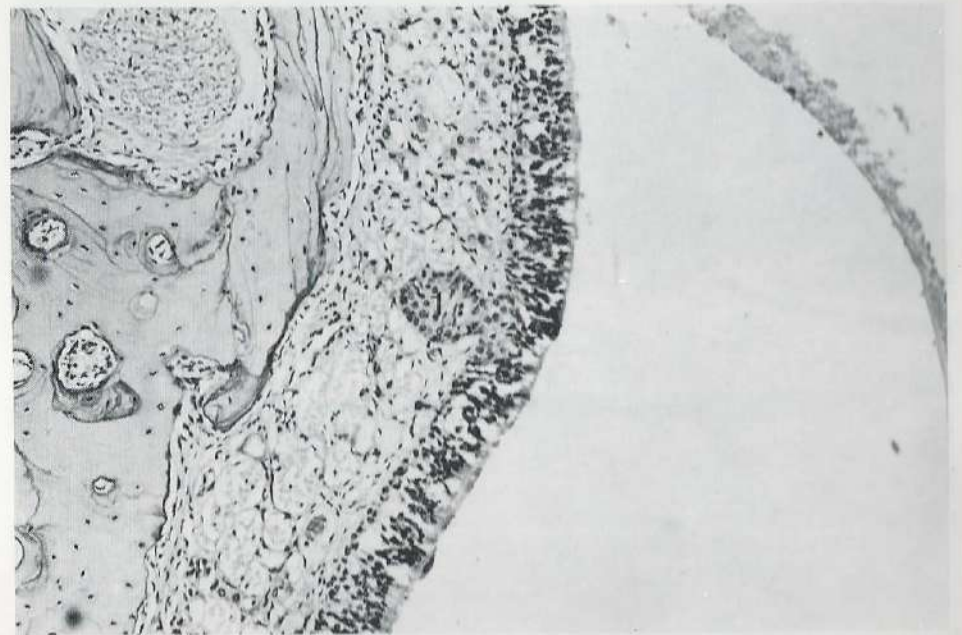


Fig. 9.10. Proliferatie van de basale cellaag in de regio olfactoria. 1. uitstulping in de lamina propria of proliferatie van de klieren van Bowman? H E, x 132.

van de klieren van Bowman waren ontstekingscellen te vinden, de P.A.S.-kleuring van het klierparenchym was duidelijk minder positief dan normaal het geval is.

9.1.6. Bevindingen na vijf maanden

Bij de controledieren werden geen afwijkingen in het neusslijmvlies gevonden. De afwijkingen bij de met diaethylnitrosamine ingespoten dieren waren zowel in de regio respiratoria als in de regio olfactoria toegenomen.

In de regio respiratoria was de meerlagigheid van het cilinderepitheel op veel meer plaatsen waar te nemen. Het metaplastisch plaveiselepitheel in deze plekken was toegenomen. Papillomen van het "inverted" type werden nu bij vier dieren gevonden. Zij hadden een grotere omvang dan in de vorige serie (fig. 9.11.).

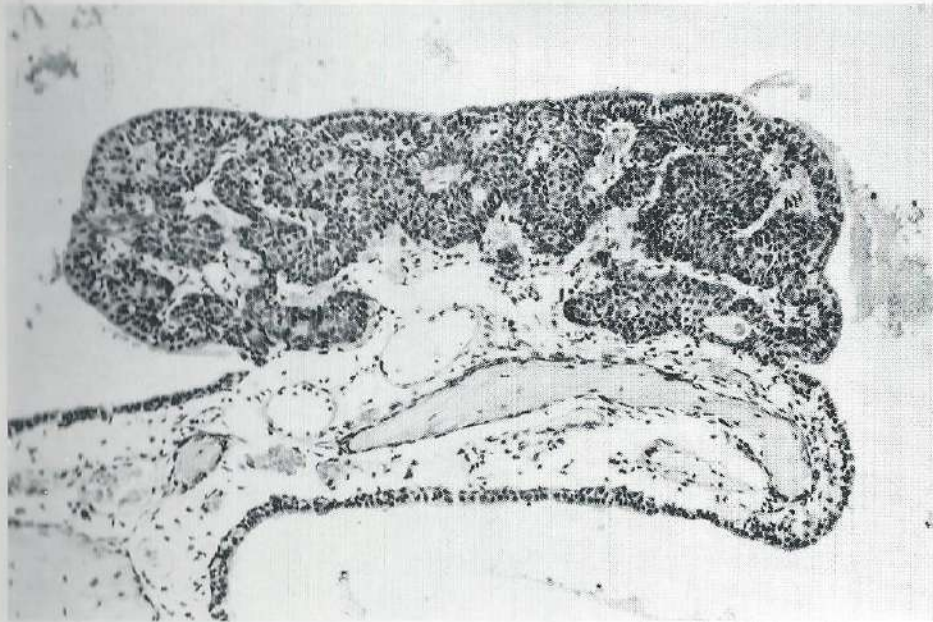


Fig. 9.11. Klein "inverted" papilloma in de regio respiratoria. H E, x 132.

In de regio olfactoria was de proliferatie van de basale cellaag sterk toegenomen, evenals de uitbreiding daarvan in de lamina propria (fig. 9.12.). De afwijkingen in de klieren van Bowman waren nu duidelijk zichtbaar in de vorm van verwijdingen van de klierbuisjes en atrophie van het parenchym.

In de basale cellaag was nu tevens celvermeerdering van een ander type te zien. De nieuw gevormde cellen hadden weinig cytoplasma, de kernen waren klein en zeer donker van kleur, er was kernpolymorphie. Soms bestond neiging tot cirkelvormige rangschikking. Op plaatsen waar deze woekeringen optraden was het bedekkend reukepitheel dikwijls intact gebleven. Dezelfde woekeringen waren op enkele plaatsen in de lamina propria zichtbaar (fig. 9.13.). De relatie van deze celgroepen tot de zenuwvezels en de klierbuisjes van Bowman kon niet nader worden bepaald. De celwoekeringen toonden een sterke gelijkenis met bepaalde

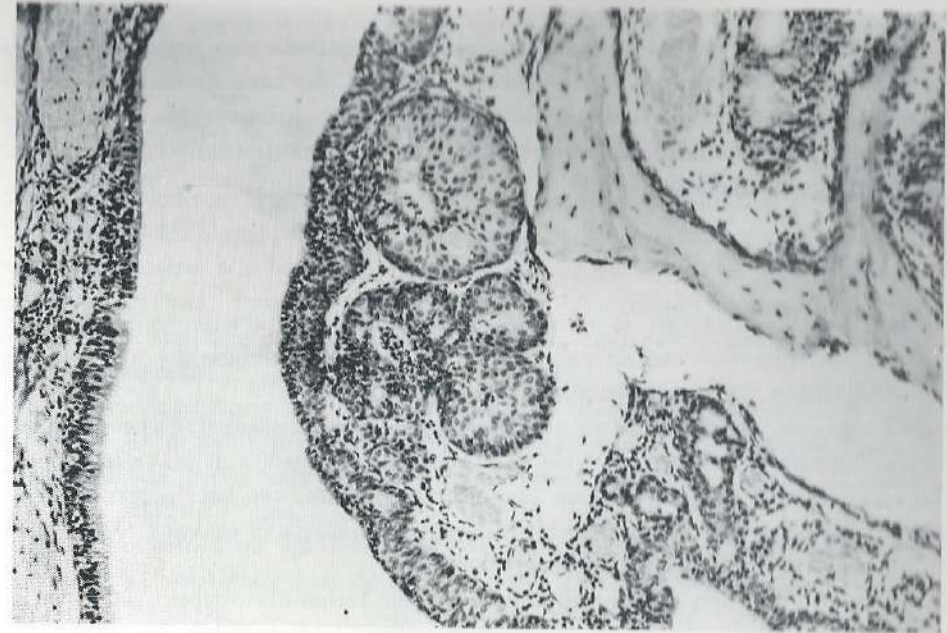


Fig. 9.12. Uitgebreide proliferatie van de basale cellaag in de regio olfactoria. Uitbreiding in de lamina propria of proliferatie van de klieren van Bowman? H E, x 132.

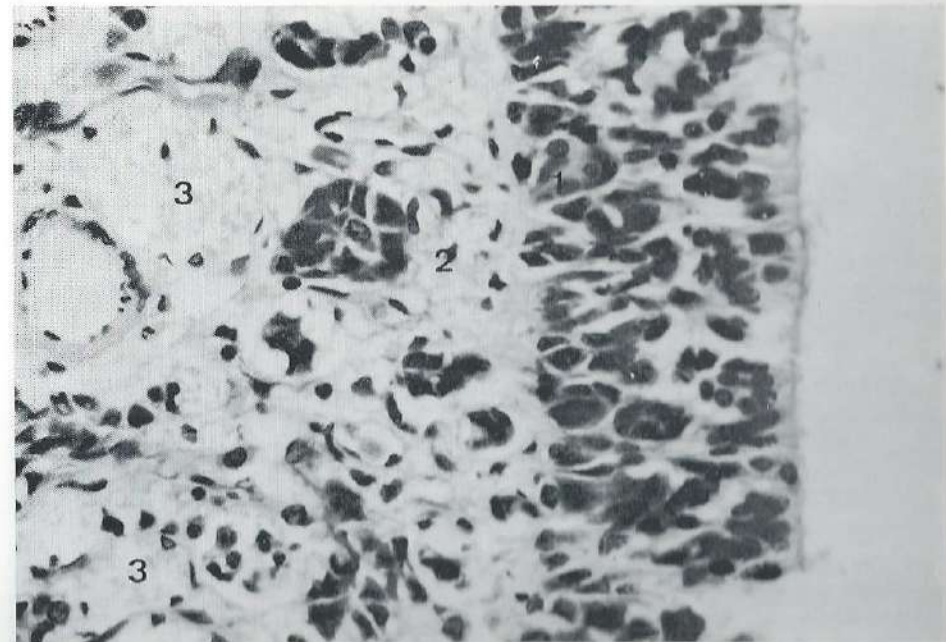


Fig. 9.13. Celwoekering met atypische kenmerken in de regio olfactoria. 1. celwoekering in de basale cellaag. 2. celwoekering in de lamina propria. 3. fila olfactoria. H E, x 528.

gebieden van de vol ontwikkelde esthesioneuroepitheliomen zoals die bij de oriënterende experimenten (7.) beschreven werden. Bij twee dieren had de celwoekering een dergelijke omvang bereikt dat kleine, massieve gezwellen in de reukstreek waren ontstaan die opgebouwd waren uit gedifferentieerde en minder gedifferentieerde gebieden.

9.1.7. Bevindingen na zes maanden

In het neusslijmvlies van de controledieren werden geen afwijkingen gevonden. In het neusslijmvlies van de met diaethylnitrosamine behandelde ratten waren de afwijkingen verder toegenomen.

In de regio respiratoria was nu over uitgebreide gebieden meerlagigheid van het cilinderepitheel zichtbaar, op vele plaatsen met het aspect van plaveiselepitheel. Bij alle dieren werden papillomen aangetroffen, meestal van het "inverted" type. De papillomen waren dikwijls multiple en zeer duidelijk in omvang toegenomen in vergelijking met die van de vorige serie.

In de regio olfactoria was nu bij alle dieren een esthesioneuroepithelioma waarneembaar, dikwijls aan beide zijden. Het gezwel had duidelijk invasieve kenmerken gekregen, zich uitend bij één van de dieren in doorgroei door het neusseptum (fig. 9.14.). In de gebieden die vrij van gezwelweefsel waren, was in de

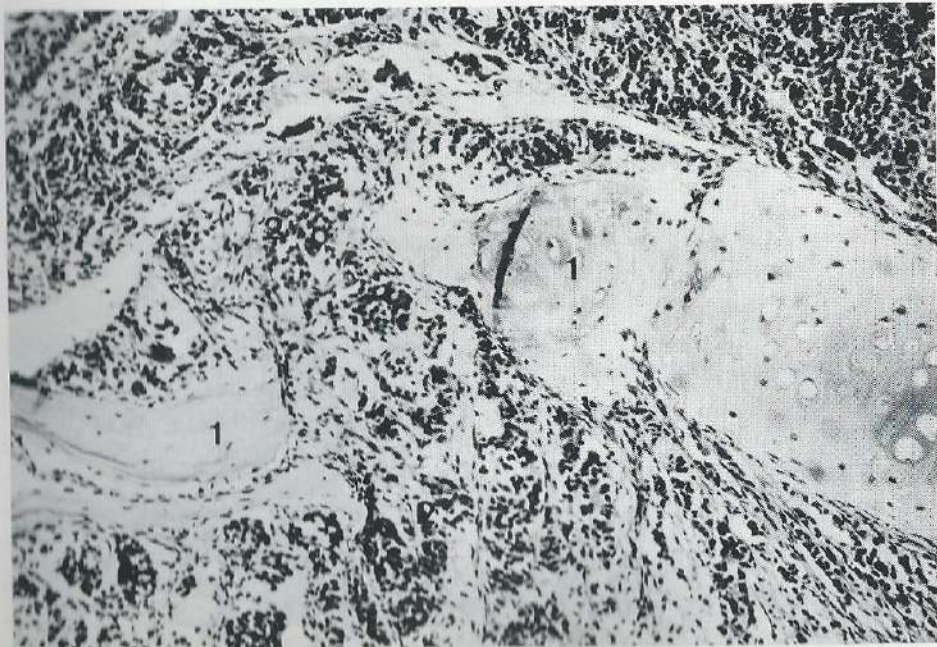


Fig. 9.14. Doorgroei van esthesioneuroepithelioma door het neustussenschot. 1. septum, 2. celvelden van het esthesioneuroepithelioma. H E, x 132.

lamina propria een duidelijke atrophie van het parenchym van de klieren van Bowman zichtbaar.

9.1.8. Bevindingen na zeven maanden

Bij de controledieren werden geen afwijkingen in het neusslijmvlies aangetroffen. In de loop van het experiment gingen enige dieren door intercurrente ziekten verloren. De serie was hierdoor uitgedund tot vijf dieren, de twee controleratten inbegrepen. Door autolyse was één van de proefdieren die met diaethylnitrosamine was ingespoten niet bruikbaar voor onderzoek, zodat slechts twee ratten overbleven.

In de regio respiratoria was bij deze dieren het trilhaarepitheel nagenoeg geheel meerlagig geworden. Op vele plaatsen was metaplastisch plaveiselepitheel zichtbaar. Bij beide dieren werden multiple papillomen gevonden, meestal uitgebreid, van het "inverted" type.

In de regio olfactoria werd bij beide dieren een esthesioneuroepithelioma gevonden. De proliferatie van de basale cellaag met vorming van metaplastisch plaveiselepitheel was nu zeer uitgebreid. Op vele plaatsen was aan de oppervlakte keratinisatie zichtbaar en in de uitstulpingen in de lamina propria waren soms hoornparels te zien (fig. 9.15.). Bij een van de proefdieren werd in de

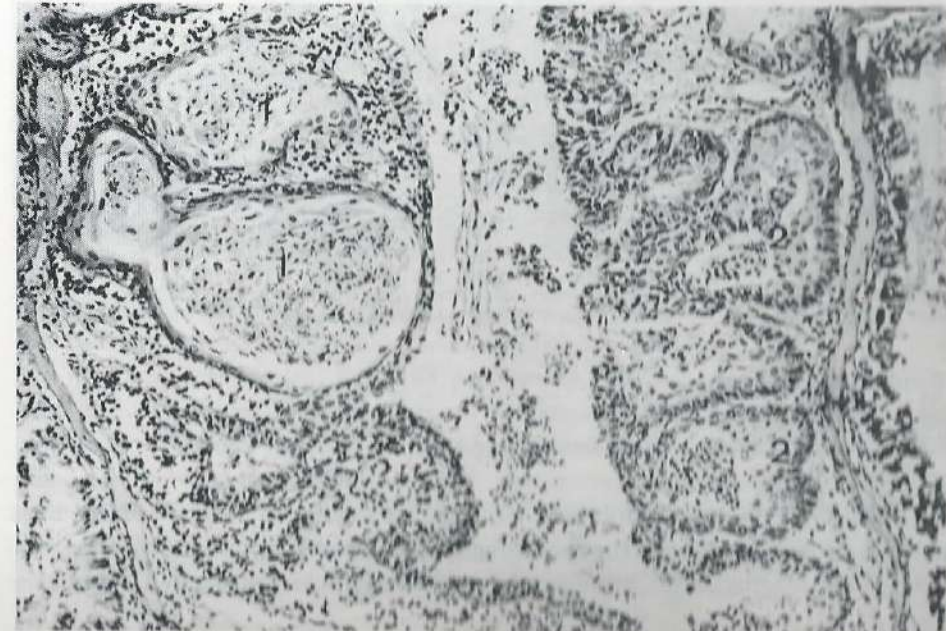


Fig. 9.15. Uitgebreide proliferatie van de basale cellaag met vorming van metaplastisch plaveiselepitheel in de regio olfactoria. 1. epitheelparels, 2. proliferatie met metaplasie. H E, x 132.

regio olfactoria aan een zijde een benigne uitziend gezwel gevonden dat de vorm had van een papilloom. Het was echter opgebouwd uit buisachtige structuren waarvan de wand bestond uit meerlagig cilinderepitheel. Het stroma bestond uit losmazig bindweefsel met vrij veel ontstekingscellen. De P.A.S.-kleuring was zowel van de celinhoud als van het materiaal in het lumen positief. Het geheel kon beschreven worden als een papillair adenoom. Het gezwel ging uit van de binnenzijde van een van de ethmoidischelpen op een plaats waar zich respiratoir epitheel bevond (fig. 9.16. en 9.17.).

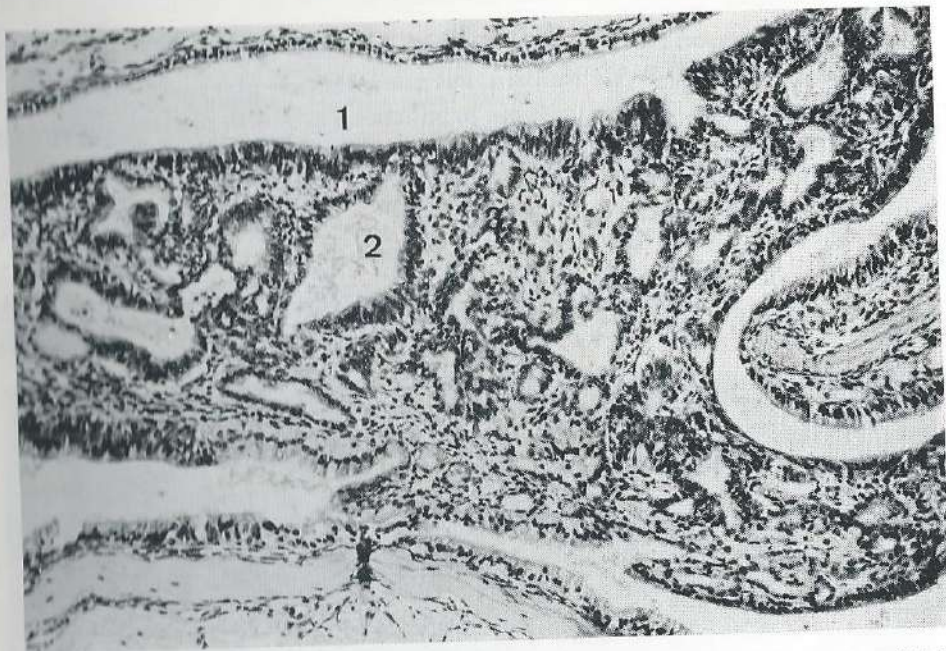


Fig. 9.16. Papillair adenoom in de regio olfactoria. 1. trilhaarepitheel. 2. lumen met P.A.S. positief materiaal. 3. stroma. Voor een detailopname zie fig. 9.17. P.A.S. x 132.

9.1.9. Samenvatting van de bevindingen

Bij de chronologische samenvatting van de resultaten van het experiment moet worden bedacht dat de gevonden inductietijden gelden voor een dosering van $2 \times 7,5$ mg diaethylnitrosamine per kg lichaamsgewicht per week. De inductie-

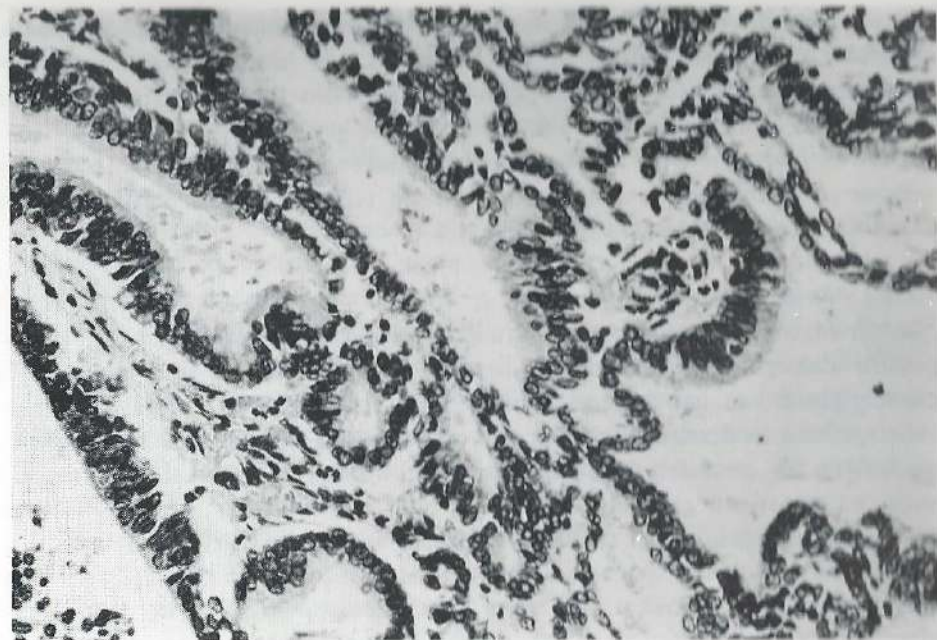


Fig. 9.17. Papillair adenoom in de regio olfactoria. H E, x 330.

tijd is immers afhankelijk van de hoogte van de dosis. De gevonden afwijkingen waren verschillend voor de regio respiratoria en de regio olfactoria, in de laatste streek traden de afwijkingen het eerst op.

9.1.9.1. Regio olfactoria

Na drie maanden was op verschillende plaatsen desorganisatie van het reuk-epitheel zichtbaar.

Na vier maanden werd naast de toegenomen desorganisatie proliferatie van de basale cellaag gevonden. Bovendien was het parenchym van de klieren van Bowman minder goed kleurbaar met de P.A.S.-kleuring.

Na vijf maanden werden, naast de proliferatie, celwoekeringen met atypische kenmerken in de basale cellaag gezien. Dergelijke celwoekeringen traden eveneens op in de lamina propria. De proliferatie van de basale cellaag stond steeds volkomen los van deze celwoekeringen, nergens waren overgangen te zien. Bij twee dieren hadden de celwoekeringen een dergelijke omvang bereikt dat kon worden gesproken van een klein esthesioneuroepithelioma. In het parenchym van de klieren van Bowman was duidelijk atrofie zichtbaar.

Na zes maanden werd bij alle dieren een esthesioneuroepithelioma gevonden, soms aan beide zijden. Naast de proliferatie van de basale cellaag en de vorming van metaplastisch plaveiselepitheel werden nu keratinevorming aan de oppervlakte en hoornparelvorming in de diepte gevonden.

Na zeven maanden werd bij de twee overgebleven dieren hetzelfde beeld gevonden. Bij een van de dieren werd in de regio olfactoria bovendien een papillair adenoom gezien.

9.1.9.2. Regio respiratoria

Na vier maanden waren de eerste afwijkingen zichtbaar in de vorm van plekgewijze desorganisatie van het trilhaarepitheel. Bovendien trad multifocale meerlagigheid van het epitheel op met soms vorming van metaplastisch plaveiselepitheel. In dezelfde maand waren uitstulpingen van het epitheel zichtbaar, meestal op de conchae. Deze uitstulpingen kwamen in verschillende gradatie voor, waardoor een geleidelijke overgang naar het "inverted" papilloma werd gesuggereerd. In de regio respiratoria traden daarna in het verloop van het experiment alleen nog kwantitatieve veranderingen op; de meerlagigheid van het cilinderepitheel strekte zich over steeds grotere gebieden uit, het metaplastisch plaveiselepitheel nam toe, de papillomen werden groter.

9.1.9.3. Overige bevindingen

De afwijkingen waren zowel in de regio respiratoria als in de regio olfactoria het meest uitgesproken in het achterste gedeelte.

Afgezien van de klieren van Bowman werden in de verschillende kliergroepen in de neus geen duidelijke afwijkingen gevonden.

Het slijmvlies van de kaakholtten toonde geen veranderingen.

Het orgaan van Jacobson was bij alle dieren intact.

9.2. EXPERIMENT MET VERSCHILLENDE TOEDIENINGSDUUR VAN DIAETHYLNITROSAMINE

9.2.1. Methodiek

Uit de resultaten van het voorgaande experiment (9.1.) bleek dat de eerste

waarneembare histologische veranderingen in het neusslijmvlies, bij voortgezette toediening van $2 \times 7,5$ mg diaethylnitrosamine per kg lichaamsgewicht per week, na drie maanden optraden. De afwijkingen die daarna zichtbaar werden volgden elkaar zo snel op dat de chronologische volgorde niet duidelijk werd. Het maakte de indruk alsof zij elkaar ten dele overlaptten bij de gebruikte methodiek van de voortgezette toediening.

In het nu te beschrijven experiment werd daarom getracht de fenomenen te spreiden door de toediening van lagere totale doses. Dit werd bereikt door de dieren slechts gedurende beperkte tijd in te spuiten. De dosis bedroeg steeds $2 \times 7,5$ mg per week. Een toediening gedurende drie maanden werd als bovengrens genomen omdat bekend was dat dan de eerste waarneembare veranderingen op zouden treden. Daarnaast werden enkele groepen ratten in het experiment opgenomen die gedurende kortere tijd met diaethylnitrosamine werden ingespoten; hiervoor werden perioden genomen van twee maanden, een maand en een week.

Vier maanden na het begin van de toediening werden van elke groep twee dieren voor onderzoek van het neusslijmvlies gedood; dit geschiedde daarna elke maand. De grootte van de groepen werd bepaald op twintig ratten zodat het experiment in totaal dertien maanden zou duren. De werkelijke duur werd veertien maanden omdat op het laatst van elke groep slechts één proefdier werd afgemaakt. De uitvoering van het experiment is weergegeven in tabel 5. Zes dieren stierven gedurende het experiment en waren voor het onderzoek niet bruikbaar.

Om een gegeven totale dosis van het diaethylnitrosamine te bereiken werd de toediening over een bepaald tijdsverloop gekozen. Bij eenmalige toediening werd een te groot verlies van proefdieren door de toxische werking van de stof gevreesd. Het aantal proefdieren dat elke maand werd afgemaakt werd op twee gesteld gezien de in experiment 9.1. gebleken grote overeenkomst in afwijkingen. De bewerking van de neus geschiedde volgens de in 6.4. geschetste procedure.

De bevindingen zullen per doseringsgroep worden besproken. De fenomenen waarop werd gelet waren in de regio respiratoria meerlagigheid van het trilhaar-epitheel, metaplastisch plaveiselepitheel en papilloomvorming; in de regio olfactoria werd gezocht naar proliferatie van de basale cellaag, veranderingen in de klieren van Bowman, celwoekering met atypische kenmerken in de basale cellaag, dergelijke celwoekeringen in de lamina propria en vorming van esthesioneuroepitheliomen.

Tabel 5. Overzicht experiment 9.2.

| Tijd gedurende welke werd ingespoten | Tijdstip, na het begin van het experiment, waarop de dieren werden afgemaakt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|
| | 1 week | 4 mnd | | 5 mnd | | 6 mnd | | 7 mnd | | 8 mnd | | 9 mnd | | 10 mnd | | 11 mnd | | 12 mnd | | 13 mnd | | 14 mnd |
| 1 mnd | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| 2 mnd | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| 3 mnd | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |

9.2.2. *Bevindingen na toediening van een week* (totale dosis 15 mg per kg lichaamsgewicht)

De dieren uit deze serie werden gedurende veertien maanden gevolgd (zie tabel 5.). Bij geen der dieren werden de fenomenen waarnaar werd gezocht in het neusslijmvlies gevonden. Wel werd bij een der ratten die na twaalf maanden werden gedood eenzijdig een papillair adenoom in de regio olfactoria waargenomen. Het gezwel ging uit van het respiratoire epitheel dat in deze streek dikwijls aan de binnenzijde van de conchae te vinden is (fig. 9.16. en 9.17.).

9.2.3. *Bevindingen na toediening van een maand* (totale dosis 60 mg per kg lichaamsgewicht)

De resultaten zijn samengevat in tabel 6.

In de regio respiratoria werd bij een van de dieren die na acht maanden werden gedood een begin van papilloomvorming gevonden. Een maand later werden bij één rat duidelijke meerlagigheid van het cilinderepitheel en metaplastisch plaveiselepitheel gezien. De bovengenoemde fenomenen werden overigens bij de dieren die in de latere maanden werden afgemaakt niet constant teruggevonden. In de regio olfactoria werd bij een van de dieren die na zeven maanden waren gedood een papillair adenoom gezien. Negen maanden na het begin van het experiment waren de eerste veranderingen in de basale cellaag zichtbaar in de vorm van proliferatie van de cellen, later werd hier ook metaplastisch plaveiselepitheel gevonden. Dit was bij de dieren die in de latere maanden werden gedood geen constant verschijnsel.

9.2.4. *Bevindingen na toediening van twee maanden* (totale dosis 120 mg per kg lichaamsgewicht)

De resultaten zijn samengevat in tabel 7.

In de regio respiratoria werd na zes maanden voor het eerst papilloomvorming waargenomen. Meerlagigheid van het cilinderepitheel en metaplastisch plaveiselepitheel werden pas na acht maanden zichtbaar. De bovengenoemde verschijnselen werden daarna niet constant teruggevonden.

In de regio olfactoria werden de eerste veranderingen na vijf maanden gevonden in de vorm van proliferatie van de basale cellaag, hetgeen daarna steeds aanwezig was, terwijl later op deze plaatsen ook metaplastisch plaveiselepitheel

Tabel 6. Bevindingen na toediening gedurende 1 mnd.
(totale dosis 60 mg per kg lichaamsgewicht)

| | 4 mnd | 5 mnd | 6 mnd | 7 mnd | 8 mnd | 9 mnd | 10 mnd | 11 mnd | 12 mnd | 13 mnd | 14 mnd |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂* | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♂ ♂ | ♀ | ♂ |
| Regio respiratoria | | | | | | | | | | | |
| meerlagigheid + metaplasie | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| Papillomen | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | + |
| Proliferatie + metaplasie | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - |
| afw. klieren van Bowman | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| celwoekering met atypische kenmerken in basale laag | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| celwoekering met atypische kenmerken in lamina propria | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Regio olfactoria | | | | | | | | | | | |
| esthesioneuro- epitheliomen | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

* papillair adenoom

- geen afwijkingen

+ afwijkingen aanwezig

Tabel 7. Bevindingen na toediening gedurende 2 mnd.
(totale dosis 120 mg per kg lichaamsgewicht)

| | 4 mnd | 5 mnd | 6 mnd | 7 mnd | 8 mnd | 9 mnd | 10 mnd | 11 mnd | 12 mnd | 13 mnd |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♀ ♂ | ♂ ♂ | ♀ |
| Regio respiratoria | | | | | | | | | | |
| meerlagigheid + metaplasie | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - |
| Papillomen | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + |
| Proliferatie + metaplasie | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| afw. klieren van Bowman | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| celwoekering met atypische kenmerken in basale laag | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Regio olfactoria | | | | | | | | | | |
| celwoekering met atypische kenmerken in lamina propria | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| esthesioneuro- epitheliomen | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- geen afwijkingen

+ afwijkingen aanwezig

werd gevonden. Bij de dieren die in de laatste maanden werden afgemaakt leek dit verschijnsel echter in omvang te zijn afgenomen. In de klieren van Bowman waren na zes maanden afwijkingen aantoonbaar in die zin dat minder P.A.S.-positief materiaal dan normaal werd gevonden. Bij de ratten die in de latere maanden werden gedood werden soms verwijdingen van de klierbuisjes gezien. Duidelijke atrophie van het parenchym werd niet waargenomen.

9.2.5. *Bevindingen na toediening van drie maanden*
(totale dosis 180 mg per kg lichaamsgewicht)

De resultaten zijn samengevat in tabel 8.

In de regio respiratoria werd na vijf maanden papilloomvorming gezien, hetgeen daarna bijna steeds werd waargenomen. Meerlagigheid van het cilinderepithel en metaplastisch plaveiselepitheel traden in deze streek voor het eerst op na negen maanden en waren daarna geen constant verschijnsel. Bij de rat die na twaalf maanden werd gedood werd aan één zijde een plaveiscelcarcinoom van de ductus naso-lacrimalis gevonden (fig. 9.18.).

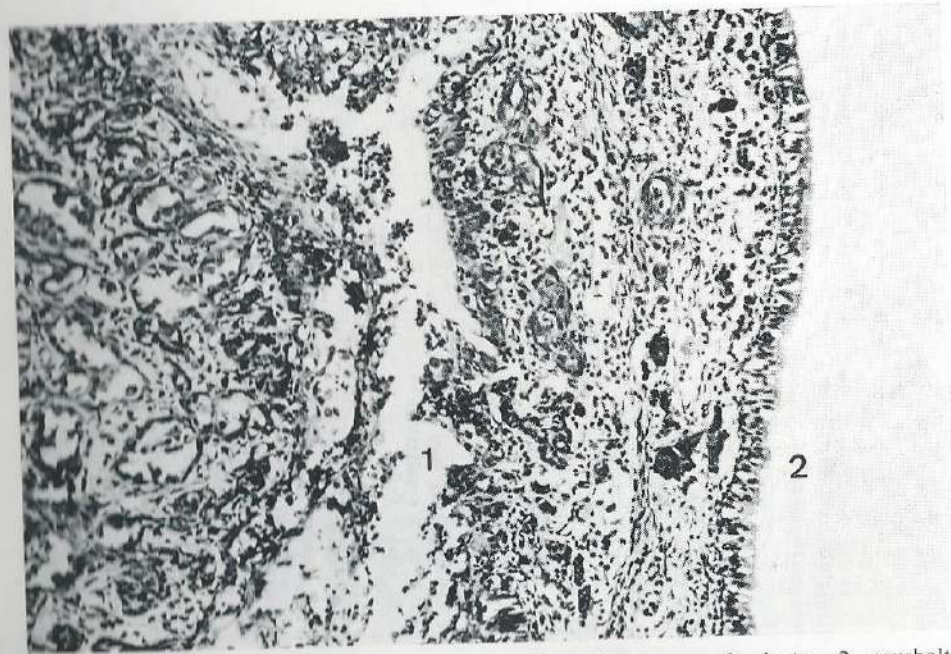


Fig. 9.18. Carcinoom van de ductus nasolacrimalis. 1. lumen van de ductus. 2. neusholte. H E, x 132.

Tabel 8. Bevindingen na toediening gedurende 3 mnd.
(totale dosis 180 mg per kg lichaamsgewicht)

| | 4 mnd | 5 mnd | 6 mnd | 7 mnd | 8 mnd | 9 mnd | 10 mnd | 11 mnd | 12 mnd | 13 mnd |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Regio respiratoria | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ |
| meerlagigheid metaplasie | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - |
| Papillomen | - | + | - | + | + | - | - | + | + | + |
| Proliferatie metaplasie | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| afw. klieren van Bowman | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| celwoekering met atypische kenmerken in basale laag | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| celwoekering met atypische kenmerken in lamina propria | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| esthesioneuro-epitheliomen | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Regio olfactoria | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ |
| carcinoma ductus nasolacrimalis | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| geen afwijkingen | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| afwijkingen aanwezig | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

* carcinoma ductus nasolacrimalis
- geen afwijkingen
+ afwijkingen aanwezig

In de regio olfactoria was direct na vier maanden proliferatie van de basale cellaag zichtbaar, op deze plaatsen werd ook vaak metaplastisch plaveisel-epitheel gevonden. Bij de later afgemaakte dieren was dit een constante bevinding, bij de ratten die in de laatste phase van het experiment werden gedood was de uitbreiding echter duidelijk minder. Celwoekering met atypische kenmerken in de basale cellaag trad voor het eerst op na zes maanden en werd daarna steeds waargenomen (fig. 9.19.). Celwoekering met atypische kenmerken

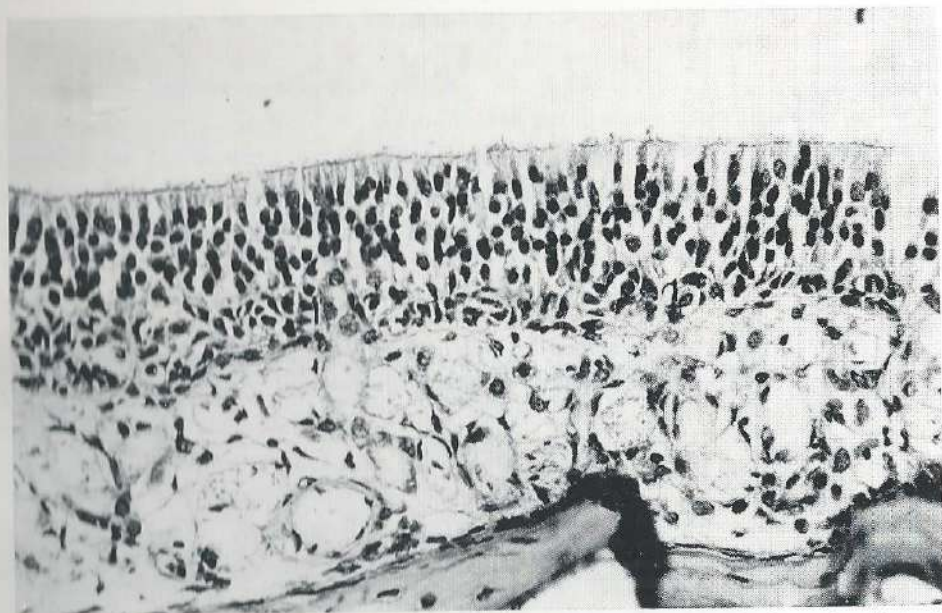


Fig. 9.19. Celwoekering met atypische kenmerken in de basale cellaag in de regio olfactoria. 1, neiging tot circulaire rangschikking van de woekerende cellen. H.E. x 330.

in de lamina propria werd zichtbaar na zeven maanden. Ook deze bevinding werd waargenomen bij alle dieren die later werden gedood. Na acht maanden werd bij een van de ratten een klein maar duidelijk esthesioneuroepithelioma gevonden.

In de klieren van Bowman waren vanaf de vierde maand direct afwijkingen zichtbaar in de vorm van vermindering van de hoeveelheid P.A.S.-positief materiaal en verwijding van klierbuisjes (fig. 9.20.). Bij de dieren die in de latere maanden van het experiment werden gedood was atrophie van het klierparenchym te zien.

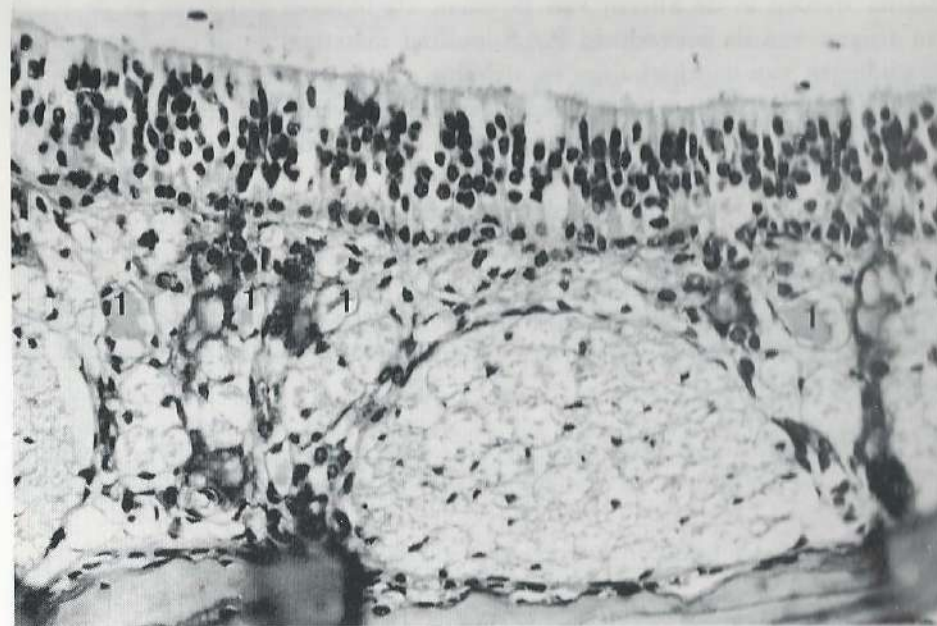


Fig. 9.20. Verwijdingen van de klieren van Bowman (1). P.A.S. x 330.

9.2.6. *Samenvatting van de bevindingen*

9.2.6.1. *Regio respiratoria*

Papilloomvorming trad steeds eerder op dan meerlagigheid van het trilhaar-epitheel en metaplastisch plaveisel-epitheel. Bij de dieren in de hogere doseringsgroepen was het vooral in de latere fasen van het experiment een constant verschijnsel. Bij een van de ratten die gedurende drie maanden met diaethylnitrosamine was ingespoten werd een plaveiselcelcarcinoom van de ductus nasolacrimalis gevonden.

9.2.6.2. *Regio olfactoria*

Afgezien van desorganisatie in het epitheel was proliferatie van de basale cellaag het eerst waargenomen verschijnsel. Later was op deze plaatsen eveneens metaplastisch plaveisel-epitheel te zien. Bij de dieren die in de laatste maanden werden afgemaakt was het minder uitgesproken, er leek neiging tot regressie van de proliferatie te bestaan.

Daarna werden in de klieren van Bowman afwijkingen zichtbaar in de vorm van afname van de hoeveelheid P.A.S.-positief materiaal en in een latere fase verwijdingen van de klierbuisjes en atrophie van het parenchym.

Woekering van cellen met atypische kenmerken werd het eerst gezien in de basale cellaag, later in de lamina propria, daarna volgden massieve esthesioneuroepitheliomen.

In het experiment werd tweemaal een papillair adenoom gevonden.

9.2.6.3. Overige bevindingen

In het algemeen traden de afwijkingen het eerst op in het achterste gedeelte van zowel de regio respiratoria als de regio olfactoria. Zij waren daar ook het meest uitgesproken.

Er was bij toediening gedurende beperkte tijd van het diaethylnitrosamine minder eenvormigheid in de afwijkingen dan bij voortgezette toediening (9.1.).

In het orgaan van Jacobson werden geen duidelijke veranderingen gezien.

De verschillende kliergroepen, afgezien van de klieren van Bowman, bleven intact.

In het slijmvlies van de sinus maxillaris werden geen duidelijke afwijkingen aangetroffen.

9.3. BEANTWOORDING VAN DE VRAGEN

De onder 8.1.1. gestelde vraag:

Is de meerlagigheid (respectievelijk het metaplastisch plaveiselepitheel) in de regio respiratoria een voorstadium van latere papilloomvorming?

kan, gezien de bevindingen van de proeven, ontkennend worden beantwoord. In het experiment 9.1. bleek dat de fenomenen steeds naast elkaar optraden. De papillomen leken te ontstaan als directe uitspruitingen van het epitheel. In het experiment 9.2. bleek bovendien dat de papilloomvorming steeds aan de meerlagigheid van het trilhaarepitheel en het metaplastisch plaveiselepitheel vooraf ging.

De onder 8.1.2. gestelde vraag:

Is de proliferatie van de basale cellaag in de regio olfactoria een voorstadium van de celwoekeringen met atypische kenmerken en dus van het esthesioneuroepithelioma?

kan eveneens ontkennend worden beantwoord. Hoewel in de chronologische volgorde de proliferatie van basale cellen steeds aan de woekeringen met atypische kenmerken van basale cellen vooraf ging, konden nergens overgangen worden aangetoond. Het prolifererende epitheel van de basale laag ging over in plaveiselepitheel met vorming van keratine en hoornparels. Het aspect van het epitheel bleef echter steeds rustig, overal was de basaal membraan intact. In experiment 9.2. kon zelfs een neiging tot regressie van de proliferatie, wat op te vatten is als herstel, worden waargenomen.

Het antwoord op de in 8.1.3. gestelde vraag:

Uit welk celtype in de regio olfactoria ontstaan de celwoekeringen dan wel?

volgt uit de resultaten van experiment 9.2. In dit experiment werden de woekeringen met atypische kenmerken het eerst gezien in de basale cellaag. Een maand later waren dezelfde woekeringen zichtbaar in de lamina propria. Het is dus zeer waarschijnlijk dat de afwijkingen beginnen in de basale cellaag van het olfactoire epitheel. Het beginpunt van het esthesioneuroepithelioma moet derhalve in deze laag gezocht worden.

10. DISCUSSIE

In dit hoofdstuk zullen eerst de resultaten van de experimenten worden besproken. Daarna volgen enige beschouwingen over deze bevindingen in relatie tot de menselijke pathologie.

10.1. BESPREKING VAN DE RESULTATEN

10.1.1. Ontbreken van carcinomen

Het uitgangspunt van het onderzoek was de bestudering van het ontstaan en de groei van experimentele gezwellen, waarbij de belangstelling vooral uitging naar de carcinomen. In tegenstelling tot HERROLD (1964) en THOMAS (1965) werden in de eigen experimenten echter geen carcinomen van het neusslijmvlies gevonden. Wel werd éénmaal een plaveiselcelcarcinoom van de ductus nasolacrimalis gezien (fig. 9.17.).

Voor dit verschil in bevindingen zijn meerdere verklaringen denkbaar. Het is bijvoorbeeld mogelijk dat het gebruik van een ander proefdier een rol heeft gespeeld. HERROLD verwekte immers de gezwellen met diaethylnitrosamine bij Syrische hamsters. Erg waarschijnlijk is deze verklaring niet omdat THOMAS, zij het met andere organische N-nitrosoverbindingen, bij ratten wel carcinomen van het neusslijmvlies vond.

Dan is het mogelijk dat ingroei van een carcinoom van de ductus nasolacrimalis in de neus verwarring heeft gegeven. De verklaring moet waarschijnlijk eerder gezocht worden in een verschil in interpretatie van de gevonden afwijkingen. De dieren die zowel door HERROLD als door THOMAS werden onderzocht waren aan de gevolgen van de toediening van de oncogene stof dood gegaan en had-

den waarschijnlijk vol-ontwikkelde gezwellen. Het is heel goed mogelijk dat bepaalde mengbeelden in deze gezwellen tot de diagnose plaveiselcelcarcinoom of adenocarcinoom hebben geleid. Zo werd in de eigen experimenten in de ethmoidstreek dikwijls ingroei van een weinig gedifferentieerd esthesioneuroepithelioma gezien in een gebied waar metaplastisch plaveiselepitheel met vorming van epitheelparels aanwezig was (fig. 10.1.). Het is heel goed denkbaar

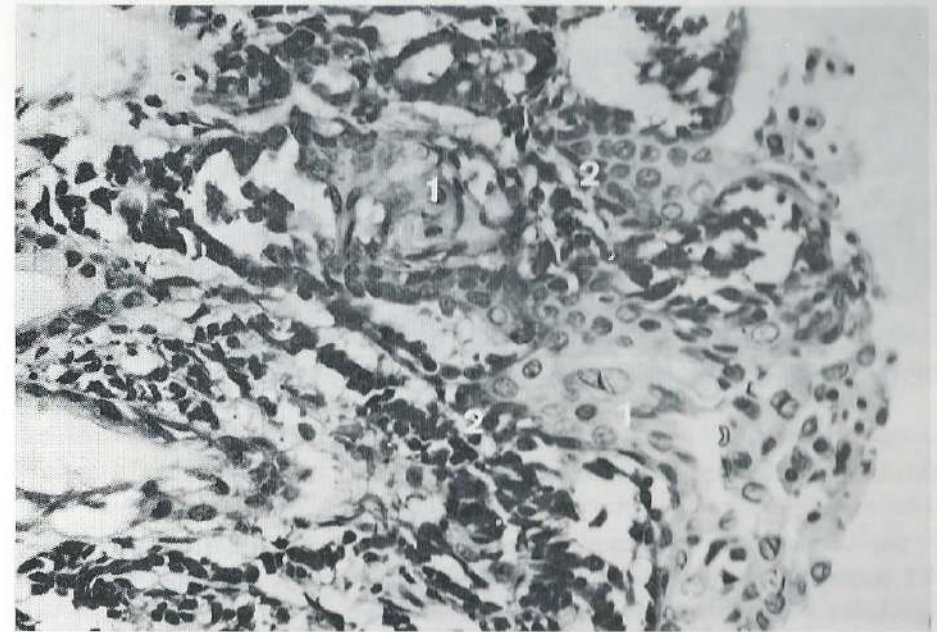


Fig. 10.1. Vermenging van metaplastisch plaveiselepitheel in de regio olfactoria (1) en strengen van weinig gedifferentieerd esthesioneuroepitheliomaweefsel (2). H.E., x 330.

dat een dergelijk beeld voor een plaveiselcelcarcinoom wordt aangezien. Verder is het voor te stellen dat bij ingroei van een weinig gedifferentieerd esthesioneuroepithelioma in een papillair adenoom van de ethmoidstreek de diagnose adenocarcinoom wordt gesteld. In het esthesioneuroepithelioma zelf kwamen overigens dikwijls gebieden voor die aan adenocarcinoma deden denken (fig. 10.2.). In de eigen experimenten maakte de P.A.S.-kleuring een dergelijke diagnose echter steeds onwaarschijnlijk.

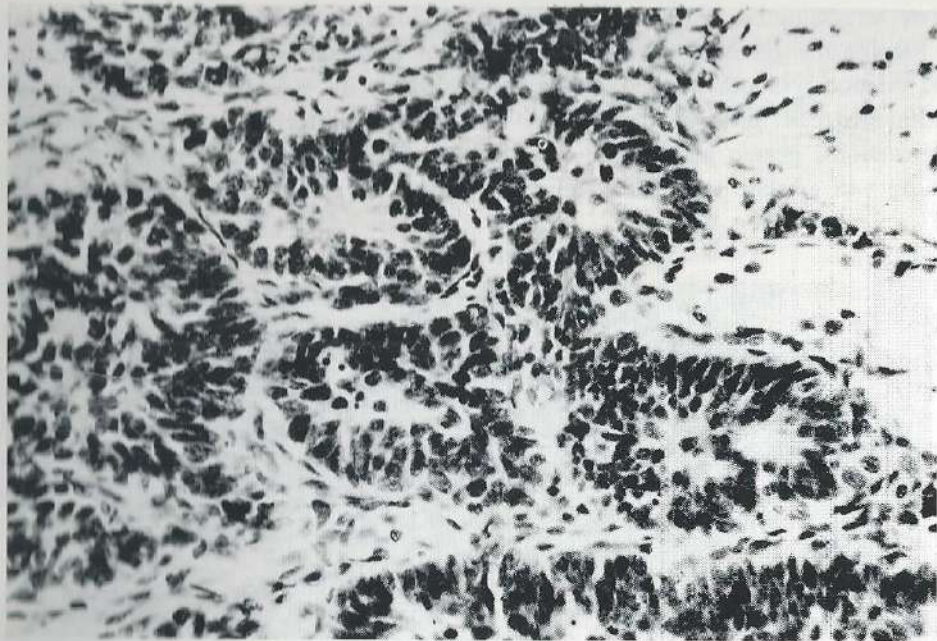


Fig. 10.2. Rosetten en pseudorosetten in een esthesioneuroepithelioma. De rangschikking kan verwarring geven met adenocarcinoom. P.A.S. x 330.

10.1.2. *Ontstaan en groei van de papillomen*

De papillomen in de regio respiratoria ontstonden direct uit het trilhaarepitheel. Het metaplastisch plaveiselepitheel, dat in deze streek eveneens voorkwam, bleek geen voorstadium van de papillomen te zijn.

De papillomen leken te ontstaan als uitspruitingen van het trilhaarepitheel, waarschijnlijk door proliferatie van de vervangcellen. Aan de oppervlakte van het papilloom bleef het trilhaarepitheel dikwijls intact. De vergevorderde papillomen in de regio respiratoria waren vrijwel steeds van het "inverted" type. De fungiform groeiende papillomen waren altijd klein van formaat. Het is denkbaar dat zij een fase zijn in de groei van het "inverted" papilloma.

HERROLD (1964) vermeldt het voorkomen van epitheelparels in de papillomen van het "inverted" type. In de eigen experimenten werd dit nooit gezien. Dit zou ook merkwaardig zijn omdat aan de oppervlakte juist dikwijls respiratoir epitheel wordt gezien. De epitheelparels komen wel voor in het ethmoid als producten van het metaplastisch plaveiselepitheel in deze streek. Te oordelen

naar de illustratie in de betreffende publicatie is hierdoor de verwarring ontstaan.

In de ethmoidstreek werd een enkele maal een papillair adenoom gevonden. Dit kwam steeds op die plaatsen in het ethmoid voor waar zich respiratoir epitheel bevindt, namelijk aan de concave zijde van vooral de onderste schelpen. Deze nieuwvorming werd nooit in het beginstadium aangetroffen, zodat geen oordeel over de ontstaanswijze mogelijk is. Waarschijnlijk was het punt van uitgang wel het respiratoire epitheel. Als dit zo is dan is het merkwaardig dat het trilhaarepitheel in de regio respiratoria en de regio olfactoria verschillende reageren op het diaethylnitrosamine.

De vondst van een dergelijk papillair adenoom werd door vroegere onderzoekers overigens nooit vermeld.

10.1.3. *Ontstaan en groei van het esthesioneuroepithelioma*

In de basale cellaag van het olfactoire epitheel traden in de experimenten twee fenomenen op. Het eerste was een proliferatie van de cellen met daarna optreden van metaplastisch plaveiselepitheel. Later werd woekering van cellen met atypische kenmerken zichtbaar die beschouwd werd als beginpunt van het esthesioneuroepithelioma.

Het voorkomen van deze twee duidelijk van elkaar te onderscheiden afwijkingen kan verschillende oorzaken hebben. Het is mogelijk dat de cellen in de basale laag op twee verschillende manieren reageren of dat twee verschillende soorten cellen in deze laag voorkomen.

De laatste hypothese lijkt het meest waarschijnlijk en is in overeenstemming met waarnemingen van ANDRES (1965, 1966). Deze onderzoeker was in staat met de electronenmicroscopie in de basale cellaag van het reukepitheel twee duidelijk van elkaar te onderscheiden celtypen aan te tonen, de heldere en de donkere basaalcellen. Volgens ANDRES zijn de donkere cellen de eigenlijke basaalcellen, de heldere cellen noemde bij blasteemcellen. Door latere onderzoekers (o.a. SEIFERT 1970) zijn deze waarnemingen bevestigd. Vooral bij jonge dieren komen veel heldere basaalcellen voor, in deze cellen worden dikwijls mitosen gezien. Op oudere leeftijd neemt het aantal heldere cellen af terwijl ook weinig mitosen meer worden waargenomen. Men vat de heldere cellen tegenwoordig op als neuroblasten waaruit reukcellen kunnen ontstaan. Vooral op jongere leeftijd kan vanuit deze cellen regeneratie van het reukepitheel plaatsvinden. Regeneratie van donkere basaalcellen en steuncellen zou door directe deling plaatsvinden.

Het lijkt aannemelijk dat de donkere basaalcellen, die potentieel alleen het uitgangspunt van nieuwe donkere basaalcellen zouden zijn, bij prikkeling met proliferatie en metaplasie zullen reageren. De neuroblasten zouden op een dergelijke prikkeling reageren met woekering en vorming van neurogene gezwellen. Het uitgangspunt van het esthesioneuroepithelioma zou dan de neuroblast in de basale cellaag van het olfactoire epitheel zijn.

De groei van het esthesioneuroepithelioma kon in de experimenten niet duidelijk worden gevolgd. Het meest waarschijnlijk is dat de woekering van de basale cellaag zich voortzette in de lamina propria. Het is echter ook denkbaar dat gezwellgroei in het weefsel van de lamina propria werd geïnduceerd of dat in deze laag, zij het op een later tijdstip, eveneens primaire gezwellvorming optrad. Erg waarschijnlijk zijn deze laatstgenoemde veronderstellingen niet omdat de gezwellgroei dan zou moeten uitgaan van de cellen van Schwann of, wat nog onwaarschijnlijker is, van het parenchym van de klieren van Bowman.

10.1.4. *Wijze van inwerking van het diaethylnitrosamine op het neusslijmvlies*

Het is opvallend dat de eerste afwijkingen (desorganisatie) optraden in de oppervlakkige laag van het epitheel. Dit wekt de indruk dat de inwerking vanuit het lumen van de neus plaats vond. De desorganisatie trad het eerst op in de regio olfactoria. In deze streek werden in de klieren van Bowman, eveneens in een vroeg stadium, stoornissen in de functie gezien. Op grond hiervan lijkt het aantrekkelijk de volgende werkhypothese over de inwerking van het diaethylnitrosamine op het neusslijmvlies op te stellen.

Het diaethylnitrosamine of een omzettingsproduct daarvan wordt door de klieren van Bowman uitgescheiden in het neusslijm en oefent daarna vanaf het oppervlak zijn werking uit. Behalve de bovengenoemde, pleiten de volgende waarnemingen voor deze hypothese.

1. De afwijkingen, zowel in de regio respiratoria als in de regio olfactoria waren steeds het meest uitgesproken in het achterste gedeelte. Zoals in 3.1. werd beschreven treedt in het achterste deel van de regio olfactoria gemakkelijk stagnatie van neusslijm op, een oncogene stof in het neusslijm zal hier dan ook langer inwerken. De afvoer van het neusslijm uit de regio olfactoria naar de ductus pharyngeus geschiedt langs de achterzijde van de regio respiratoria (3.1.). Een oncogene stof in het neusslijm zal dus ook vooral in het achterste deel van de regio respiratoria zijn werking uitoefenen.

2. In het vestibulum nasi werden nooit afwijkingen gevonden. Deze streek blijft betrekkelijk vrij van neusslijm.

3. In het orgaan van Jacobson, in de sinus maxillaris en in de verschillende kliergroepen in de neus (afgezien van de klieren van Bowman) werden geen afwijkingen gezien. Deze structuren zijn door hun beschutte ligging gevrijwaard voor de inwerking van stoffen vanuit het neusslijm.

10.2. BESCHOUWINGEN IN RELATIE TOT DE MENSELIJKE PATHOLOGIE

10.2.1. *De papillomen*

De literatuur over de papillomen in de neus bij de mens is vrij verwarrend, dit wordt in de hand gewerkt door de vele namen die worden gebruikt. Zo wordt gesproken over papillaire sinusitis, epitheliaal papilloom, overgangsepitheel papilloom, hard papilloom, zacht papilloom, papilloom van Ringertz, papilloom van Ewing, papilloom van Schneider enz. (PFISTERER 1961).

Waarschijnlijk is het voorkomen van verschillende soorten papillomen in de neus de oorzaak dat deze afwijking zoveel namen draagt. Zo onderscheidt HYAMS (1971) drie verschillende histologische typen. Op 315 papillomen uit het materiaal van het Armed Forces Institute of Pathology vond hij 149 papillomen van het "inverted" type (EWING), 156 fungiform groeiende papillomen en 10 "cylindercell" papillomen.

Over de oorzaak van de papillomen bij de mens is weinig bekend. Als mogelijkheden worden o.a. genoemd: recidiverende of chronische infectie van het neusslijmvlies, overgang van banale neuspoliepen in het papilloom en virusinfectie van het neusslijmvlies. De laatste tijd wordt vooral de nadruk gelegd op een exogene factor als oorzaak.

In het materiaal van de experimenten in dit proefschrift kwamen in principe dezelfde typen papillomen voor als in de humane pathologie. De papillomen van het "inverted" type werden het meest gezien. Zij bereikten ook de grootste omvang. Fungiform groeiende papillomen werden veel minder gevonden, zij waren altijd klein. Een enkele maal werd een papillair adenoom gevonden, vergelijkbaar met het "cylindercell" papilloom zoals HYAMS dat beschreef. De histologische overeenkomst tussen de papillomen bij de mens en de papillomen zoals die in het experiment gevonden werden zou kunnen pleiten voor het bestaan van een exogene factor als oorzaak van het papilloom in de neus en neusbijholten. Het is de vraag welke stof of welke stoffen de oorzaak kunnen zijn. Van 11 patiënten bij wie tussen 1965 en 1970 in het Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit de diagnose Ewing papilloom werd gesteld werd een

uitvoerige anamnese opgenomen (BELONJE en OEY 1971). De werk-, leef- en woonomstandigheden boden geen aanknopingspunten voor de aannahme van het bestaan van een gemeenschappelijke oorzaak. Het enige wat opviel was dat alle patienten op één na sterke sigarettenrokers waren of waren geweest.

10.2.2. *Het esthesioneuroepithelioma*

Het esthesioneuroepithelioma is een zeer zeldzaam voorkomend gezwel, tot 1966 waren 80 gevallen in de literatuur gerapporteerd (SILCOX 1966). De eerste patient met deze afwijking werd in 1924 beschreven door BERGER, LUC en RICHARD.

Het histologisch aspect van het "Esthésioneuroépithélioma olfactif" (oorspronkelijke naam van BERGER) is dikwijls niet te onderscheiden van het histologisch beeld van gezwellen van de bijnier of van de ganglia van het sympathische zenuwstelsel en van het retinoblastoom. Meestal worden twee typen onderscheiden: het esthesioneurocytoma met strengen ongedifferentieerde cellen, gescheiden door bindweefselchotten en soms vorming van pseudorosetten en neurofibrillen, en het esthesioneuroepithelioma met vorming van echte rosetten, bestaande uit cylindercellen. Het gezwel heeft invasieve eigenschappen, naast uitbreiding in omgevende structuren (kaakholte, oogholte, fossa pterygo-palatina) is doorgroei in de voorste schedelgroeve bij patienten beschreven. Bij het experimentele esthesioneuroepithelioma konden de twee bovenbeschreven histologische types eveneens worden onderscheiden. Zij kwamen dikwijls naast elkaar bij hetzelfde proefdier voor. Ook de invasieve groei werd steeds gezien. Bij verschillende proefdieren werd een doorbraak door de lamina cribiformis naar de voorste schedelgroeve waargenomen.

Over het uitgangspunt van het esthesioneuroepithelioma bestaat verschil van mening, als mogelijkheden worden genoemd:

1. de reukplacode
2. het ganglion sphenopalatinum
3. het orgaan van Jacobson
4. het reukepitheel.

Ad. 1. De reukplacode, het primordium van het reukorgaan, bestaat alleen tijdens de embryonale ontwikkeling. Het is niet goed in te zien hoe hieruit op latere leeftijd nog gezwellen zouden kunnen ontstaan.

Ad. 2. De ligging van het ganglion sphenopalatinum in de fossa pterygo-palatina maakt deze structuur als uitgangspunt zeer onwaarschijnlijk. Het gezwel

zou, om de neusholte te bereiken, botdestructie moeten veroorzaken. Dit wordt bij de vroeg ontdekte gevallen van het esthesioneuroepithelioma bij de mens niet vermeld. Bovendien zou vorming van rosetten slecht te rijmen zijn met een gezwel van sympatische origine (MENDELOFF 1957).

Ad. 3. Het orgaan van Jacobson bereikt zijn hoogste ontwikkeling bij de mens tijdens de twintigste embryonale week, daarna gaat het langzamerhand terug. Soms worden rudimenten teruggevonden in het voor-onder gedeelte van het neustussenschot. Deze localisatie maakt het zeer onwaarschijnlijk dat een esthesioneuroepithelioma van deze resten zou uitgaan omdat de vroeg gediagnosticeerde gezwellen altijd hoog in de neus worden gevonden.

Ad. 4. Als het meest waarschijnlijke punt van uitgang wordt door vele auteurs het reukepitheel genoemd.

De uitkomsten van de experimenten zijn hiermee volkomen in overeenstemming. Nooit werd het orgaan van Jacobson als uitgangspunt van een experimenteel esthesioneuroepitheliom gezien. De gezwellen ontstonden steeds in de reukstreek, uitgaande van de basale cellaag van het reukepitheel. De neuroblasten in deze basale laag zijn het meest waarschijnlijke uitgangspunt. Het lijkt aannemelijk dat ook het esthesioneuroepithelioma dat bij de mens voorkomt uitgaat van de basale cellaag in het olfactoire epitheel.

10.2.3. *Uitwendige oorzaken van gezwellen in neus en neusbijholten*

De laatste decennia wordt het meer en meer waarschijnlijk dat een groot aantal van de gezwellen die bij de mens voorkomen uitwendige oorzaken hebben. Volgens sommigen (geciteerd door HADDOW 1970) zou dit zelfs gelden voor 80 % der gevallen.

Dat ook bij het ontstaan van gezwellen van neus en neusbijholten uitwendige factoren waarschijnlijk een grote rol spelen wordt geïllustreerd door het voorkomen in bepaalde beroepen van deze gezwellen in een veel hoger percentage dan bij vergelijkbare bevolkingsgroepen. Zo vond ACHESON (1970) bij leerbewerkers een duidelijk groter aantal carcinomen van neus en neusbijholten dan te verwachten was.

HADFIELD (1969) deed een dergelijke bevinding bij houtbewerkers. Hij vond in High Wycombe, een plaatsje in het graafschap Buckinghamshire waar zich een concentratie bevindt van de Engelse meubelindustrie een opvallend aantal adenocarcinomen van de ethmoidstreek. Het jaarlijks gemiddelde over de periode

van 1956 tot 1965, omgerekend per miljoen inwoners, bedroeg voor High Wycombe 60,1. Voor het gehele graafschap Buckinghamshire waren de cijfers respectievelijk 2,6 en 0,0. De getallen voor het voorkomen van plaveiselcelcarcinomen waren voor de verschillende graafschappen ongeveer gelijk en bedroegen voor Buckinghamshire, Oxfordshire en Berkshire respectievelijk 4,3, 3,2 en 3,9 per miljoen inwoners.

Ook GIGNOUX en BERNARD (1969) vonden onder hun patiënten met gezwellen van neus en neusbijholten opmerkelijk veel houtbewerkers namelijk 17 van de 53. Zestien van de houtbewerkers hadden een adenocarcinoom van de neus en neusbijholten. Het viel hen op dat speciaal de mensen die ruw hout bewerkten het grootste gevaar liepen. Het zijn kennelijk stoffen uit het hout zelf die verantwoordelijk zijn en niet andere stoffen die in de meubelindustrie gebruikt worden als vernis en dergelijke. Over de aard van de carcinogene stof is nog niets met zekerheid bekend.

Het voorkomen van het adenocarcinoom in een zo hoog percentage is iets heel ongewoons omdat dit gezwel van de neus en neusbijholten vrij zeldzaam is. Zo vonden FRAZELL en LEWIS (1963) bij 416 patiënten met maligniteiten van neus en neusbijholten in 81 % een plaveiselcelcarcinoom en in 19 % een adenocarcinoom.

De gezwellen bij de houtbewerkers traden vooral op in de ethmoidstreek en volgens HADFIELD is dit niet zo verbazingwekkend voor een carcinogeen dat geïnhaald wordt. Het is echter de vraag of dit wel zo vanzelfsprekend is. Als door de neus wordt geademd zal weinig van de ingeademde lucht via de ethmoidcellen, met hun vrij nauwe afvoeropeningen, gevoerd worden. Bovendien wordt bij lichamelijke arbeid weinig door de neus geademd.

Het ontstaan van de carcinomen juist in de ethmoidstreek is beter begrijpelijk met behulp van de werkhypothese die is opgesteld voor de werking van de organische N-nitrosoverbindingen in de neus bij ratten (zie 10.1.4.). Volgens deze hypothese zouden de carcinogene stoffen, na geresorbeerd te zijn door het neusslijmvlies en mogelijk ook door het slijmvlies van de mond en de lagere luchtwegen, door de klieren van Bowman, eventueel in veranderde vorm, in het neusslijm worden uitgescheiden. Op deze manier is een langdurige en geconcentreerde inwerking in de ethmoidstreek denkbaar.

Het is voorstelbaar dat een andere bron van uitwendige oorzaken voor gezwellen van neus en neusbijholten gevormd wordt door de organische N-nitrosoverbindingen. Voor talrijke toepassingen van deze stoffen zijn namelijk patenten aan-

gevraagd, bijvoorbeeld als oplosmiddel, als toevoeging aan smeermiddelen en motorbenzine, als middel om corrosie te verhinderen, als insecticide, als middel om polymerisatie te bevorderen respectievelijk te verhinderen. In hoeverre dergelijke toepassingen gerealiseerd zijn is moeilijk na te gaan.

Wel is bekend dat organische N-nitrosoverbindingen in consumptiegoederen kunnen ontstaan. Zo toonden ENDER e.a. (1964) dimethylnitrosamine aan in haringmeel dat bereid was uit haring die met natriumnitriet was gepreserveerd. Dit onderzoek werd gedaan naar aanleiding van een epidemie van een toxische leverziekte onder runderen in 1961 en 1962 in een bepaalde streek van Noorwegen. Het bovengenoemde haringmeel kon als de boosdoener worden aangewezen.

SANDER (1967) heeft aangetoond dat in vitro in menselijk maagsap organische N-nitrosoverbindingen kunnen worden gevormd uit secundaire aminen en nitrieten. Het is denkbaar dat carcinogene nitrosaminen gevormd worden door inwerking van nitrieten op secundaire amines die in het voedsel aanwezig zijn. Nitrieten worden immers ook als conserveermiddel in de voedingsmiddelenindustrie gebruikt.

DRUCKREY en PREUSSMANN tenslotte, spraken in 1962 het vermoeden uit dat in tabaksrook organische N-nitrosoverbindingen ontstaan. Zij baseerden dit vermoeden op het voorkomen van verschillende secundaire aminen in tabak zoals diaethylamine, pyrrolidine en piperidine. Bij de verbranding van tabak ontstaan nitreuze gassen. Het is bekend dat de inwerking van deze gassen op secundaire aminen aanleiding kan geven tot het ontstaan van organische N-nitrosoverbindingen. NEURATH e.a. (1964) waren in staat om organische N-nitrosoverbindingen, zij het in zeer geringe concentratie (0,19 microgram per sigaret) in sigarettenrook aan te tonen.

Het is nog niet bekend of langdurige blootstelling aan dergelijke geringe hoeveelheden schadelijk is. Het is echter wel denkbaar dat gevaar kan ontstaan door cumulatie van organische N-nitrosoverbindingen die via verschillende wegen in het lichaam terechtkomen.

11. SAMENVATTING

Over het ontstaan en de groei van gezwellen in de neus en neusbijholten van de mens is weinig bekend. Dit gegeven vormde het uitgangspunt voor een vergelijkend onderzoek. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de ontdekking van HERROLD en DRUCKREY in 1964 dat bepaalde organische N-nitrosoverbindingen (o.a. het in deze experimenten gebruikte diaethylnitrosamine) gezwellen in het neusslijmvlies van proefdieren veroorzaken.

In tegenstelling tot HERROLD (1964) en THOMAS (1965) werden in de eigen oriënterende experimenten (7.) met ratten geen duidelijke plaveiselcelcarcinomen gevonden. Wel werden papillomen, voornamelijk van het "inverted" type in de regio respiratoria gezien terwijl in de regio olfactoria esthesioneuroepitheliomen werden waargenomen.

In de experimenten waarin het ontstaan en de groei van de gezwellen werden gevolgd (9.) werd geconstateerd dat de papillomen in de regio respiratoria rechtstreeks uit het trilhaarepitheel ontstonden, waarschijnlijk door proliferatie van de vervangcellen. Onder invloed van het diaethylnitrosamine traden in deze streek tevens meerlagigheid van het trilhaarepitheel en metaplastisch plaveiselepitheel op. Deze bleken geen voorstadium van het papilloom te zijn.

Verder werd gezien dat de esthesioneuroepitheliomen ontstonden uit woekeringen van cellen in de basale laag van het reukepitheel. In deze laag kwam ook een goedaardig uitziende proliferatie van cellen voor. Later werd op die plaatsen dikwijls metaplastisch plaveiselepitheel gezien. Dit bleek met het ontstaan van de gezwellen niets te maken te hebben. Het wekte zelfs de indruk dat de proliferatie na staken van de toediening van het diaethylnitrosamine ophield en dat de afwijkingen terug gingen.

Verder werd in deze experimenten (9.) driemaal een papillair adenoom in de

regio olfactoria gevonden, waarschijnlijk uitgaand van het trilhaarepitheel dat op enkele plaatsen in deze streek voorkomt. Deze nieuwvorming werd door de vroegere onderzoekers nog niet vermeld.

Eénmaal werd een plaveiselcelcarcinoom, uitgaande van de ductus naso-lacrimalis gezien.

In de discussie wordt het vermoeden uitgesproken dat de vondst, door andere onderzoekers, van plaveiselcelcarcinomen en adenocarcinomen in het neusslijmvlies van hun proefdieren, op een verkeerde interpretatie berust. Worden namelijk de vol-ontwikkelde gezwellen onderzocht, zoals door HERROLD (1964) en THOMAS (1965) werd gedaan, dan kunnen mengbeelden van esthesioneuroepithelioma en metaplastisch plaveiselepitheel in de regio olfactoria de indruk wekken van een plaveiselcelcarcinoom. Het bestaan van een adenocarcinoom kan worden gesuggereerd door mengbeelden van esthesioneuroepitheliomen en papillair adenoom. In het esthesioneuroepithelioma zelf komen overigens gebieden voor die sterk op een adenocarcinoom kunnen lijken. Een dergelijke verkeerde interpretatie kan worden voorkomen door het ontstaan en de groei van de gezwellen te volgen, zoals in de eigen experimenten werd gedaan.

Vervolgens wordt in de discussie naar aanleiding van de bevindingen in de verschillende experimenten een hypothese opgesteld over het werkingsmechanisme van organische N-nitrosoverbindingen in de neus. Volgens deze hypothese worden deze verbindingen of omzettingsproducten ervan, door de klieren van Bowman uitgescheiden en oefenen daarna vanuit het neusslijm hun werking op het neusslijmvlies uit. De door o.a. HADFIELD (1969) beschreven bevinding dat de bij houtbewerkers relatief vaak voorkomende gezwellen (voornamelijk adenocarcinomen) in de neus bijna altijd in de ethmoidstreek worden gevonden is, met een werkingsmechanisme van het carcinogeen volgens deze hypothese, beter begrijpelijk.

Verder wordt geconcludeerd dat het voorkomen van dezelfde typen papillomen zowel in het experiment als in de humane pathologie een sterke aanwijzing is voor het bestaan van een exogene factor als oorzaak van de papillomen bij de mens.

Uitgaande van de mening van de meeste klinici en patholoog-anatomen dat het esthesioneuroepithelioma, zoals dat een enkele keer bij de mens voorkomt, uitgaat van het reukepitheel, wordt verondersteld dat dit gezwel, evenals in de experimenten, ontstaat in de basale cellaag, waarschijnlijk uit de neuroblasten. Tenslotte wordt erop gewezen dat, nu de laatste tijd de nadruk komt te liggen

op exogene factoren (vooral van chemische aard) als oorzaken van gezwellen, sterk rekening moet worden gehouden met de organische N-nitrosoverbindingen als mogelijke bron. In sigarettenrook komen zeer kleine hoeveelheden van deze verbindingen voor, het is verder waarschijnlijk dat de verbindingen in het voedsel kunnen ontstaan. Deze hoeveelheden zijn zo klein dat ze waarschijnlijk op zich geen gevaar vormen. Het is echter denkbaar dat bij cumulatie van de organische N-nitrosoverbindingen die op verschillende manieren in het lichaam terechtkomen de gevarengrens wordt overschreden.

SUMMARY

Little is known about the origin and growth of tumors in the human nose. This lack in knowledge was the reason for the comparative experiments described in this thesis. Diaethylnitrosamin, one of the organic N-nitroso compounds causing tumors in the nasal mucous membrane of experimental animals, a discovery made by HERROLD (1964) and DRUCKREY (1964), was used for the experiments in rats. Contrary to the findings of HERROLD (1964) and THOMAS (1965) no epidermoid carcinomas and adenocarcinomas were found in the preliminary experiments (chapter 7.). In agreement with HERROLD (1964) and THOMAS (1965) papillomas of the inverted type (EWING) were seen in the respiratory region and esthesioneuroepitheliomas (neuroblastomas) in the olfactory region.

In subsequent experiments (chapter 9.) the growth of these tumors was studied. It was ascertained that the papillomas were growing directly from the respiratory epithelium, possibly caused by proliferation of the basal cells. In these experiments metaplastic stratified epithelium was seen also, this being an independant phenomenon and not the preliminary stage of the papillomas. From the experiments it was apparent that the esthesioneuroepitheliomas started from the basal cell layer of the olfactory epithelium. In the same layer a benign proliferation of basal cells was found. This too was entirely independant from the esthesioneuroepitheliomas. It even seemed to regrede when administration of diaethylnitrosamin was stopped.

A papillary adenoma in the olfactory region was found in three instances. It seemed to originate from the respiratory epithelium which is found in some places in this area. This type of experimental nasal tumor has not been published sofar.

In one of the rats an epidermoid carcinoma of the nasolacrimal duct was found. The difference in outcome of these experiments as compared with the findings of HERROLD (1964) and THOMAS (1965), namely the non-occurrence of epidermoid carcinomas and adenocarcinomas might be explained as follows. They examined fullgrown nasal tumors in their animals. In that case mixture of poorly differentiated esthesioneuroepithelioma cells with areas of proliferation of basal cells and metaplastic stratified epithelium in the olfactory region can easily be confounded with an epidermoid carcinoma. This was seen also in the experiments described in this thesis (fig. 10.1.). The mixed growths of esthesioneuroepitheliomas and papillary adenomas may look like adenocarcinoma. Finally some areas in this esthesioneuroepithelioma can easily be taken for adenocarcinomas (fig. 10.2.).

In the discussion of the experiments a hypothesis concerning the way of action of the organic N-nitrosocompounds in the nose is framed. According to this, the organic N-nitrosocompounds or derivatives are secreted by the Bowman glands and act from the lumen of the nose on the epithelium. With this hypothesis the localisation in the ethmoid of certain tumors (in most cases adenocarcinomas) relatively often found in woodworkers, is more comprehensible. Another point is that the occurrence of nasal papillomas of the same histological types in these experiments and in the human pathology, could be a strong indication for the existence of an external causative factor for the human nasal papillomas.

Most pathologists consider the olfactory epithelium as the origin of the human esthesioneuroepitheliomas. It is probable that these tumors, like they did in the experiments, originate from the basal cell layer of the epithelium, most likely from the neuroblasts in this layer.

Finally the possible role of organic N-nitrosocompounds as causative factor in cancer is pointed out. Minute amounts have been demonstrated in cigarette-smoke (NEURATH 1964). Formation of organic N-nitrosocompounds in vitro from secondary amines and nitrites when mixed together in human gastric juice was shown by SANDERS in 1967; this might happen in the stomach as well. Although nothing is known about the danger of these minute amounts of organic N-nitrosocompounds, it is conceivable that cumulation of such amounts from different sources might be harmful.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR

- ACHESON, E. D., R. H. COWDELL and B. JOLLES (1970). Nasal cancer in the Northamptonshire Boot and Shoe Industry, *Brit. Med. J.* 385-393.
- ANDRES, K. H. (1966). Der Feinbau der Regio olfactoria von Makrosmatikern, *Z. für Zellforschung* 69, 140-154.
- ASCHOFF, J. (1964). Die Bedeutung der Tagesperiodik für Tierhaltung und Tierexperiment, W. H. Weihe. *Die Umwelt der Versuchstiere. Beiheft zur Int. Z. für Vitaminforschung* 9, 43.
- ASH, J. E., M. R. BECK and J. D. WILKES (1964). Tumors of the upper respiratory tract and ear. *Armed Forces Institute of Pathology*.
- BARGMANN, W. (1967). Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 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 (1971). Papilloma inversum van de neus. Wordt binnenkort gepubliceerd in het N.T.v.G.
- BENEDETTI, E. L. and P. EMMELOT (1966). Effect of Dimethylnitrosamine on the Endoplasmic reticulum of Rat Liver Cells. *Laboratory Investigation* 15/1, 209-216.
- BERENBLUM, I. (1967). Cancer Research Today, Pergamon Press Ltd.
- BERGER, L., Luc et Richard (1924). l'Esthesioneuroépithéliome olfactif *Bull. de l'association française pour l'étude du cancer* 13, 410-421.
- BERTALANFFY, L. von (1960). Fundamental aspects of normal and malignant growth, W. W. Nowinsky, Elsevier, Amsterdam.
- BROUWERS, J. A. J. and P. EMMELOT (1960). Microsomal N-demethylation and the effect of the hepatic carcinogen dimethylnitrosamine on amino acid incorporation into the proteins of rat livers and hepatomas. *Exp. Cell Res.* 19, 467-474.
- CAMPENHOUT, E. van (1936). Origine du nerf olfactif chez le porc. *Arch. d'anatomie microscopique* 32, 391-407.
- DEELMAN, H. T. (1923). Onderzoekingen over den proefondervindelijke teerkanker, *N.T.v.G.* 67, 1, 1416.
- DIBBLE, Ph. A. and A. K. BROWN (1961). Esthesioneuroepithelioma, *Laryngoscope* 71, 192-199.
- DONTENWILL, W. und U. MOHR (1962a). Die Organotrope Wirkung der Nitrosamine, *Z. für Krebsforschung* 65, 166-167.
- DONTENWILL, W. und U. MOHR (1962b). Vergleichende Untersuchungen an metaplastischen und malignen Epithelwucherungen des Respirationstraktes im Tierexperiment. *Z. für Krebsforschung* 65, 168-170.
- DONTENWILL, W. und B. WIEBECKE (1964). Autoradiographische Untersuchungen während der experimentellen Carcinomenstehung im Respirationstrakt des Goldhamsters nach Behandlung mit Diäthylnitrosamin. *Z. für Krebsforschung* 66, 321-332.

- DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL und M. MÜLLER (1961). Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen. *Die Naturwissenschaften* 48, 134-135.
- DRUCKREY, H. und R. PREUSSMANN (1962). Zur Entstehung carcinogener Nitrosamine am Beispiel des Tabakrauchs. *Die Naturwissenschaften* 49, 498.
- DRUCKREY, H., A. SCHILDBACH, D. SCHMÄHL, R. PREUSSMANN und S. IVANKOVIC (1963a). Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin. *Arzneimittelforschung* 13, 841-851.
- DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, R. PREUSSMANN und S. IVANKOVIC (1963b). Krebszeugung durch einmalige Dosis von Methylnitrosoharnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen. *Die Naturwissenschaften* 50, 735.
- DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, R. PREUSSMANN und S. IVANKOVIC (1964a). Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten. *Z. für Krebsforschung* 66, 1-10.
- DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC, H. D. MENNEL und R. PREUSSMANN (1964b). Selektive Erzeugung von Carcinomen der Nasenhöhle bei Ratten durch N-N-Di-Nitrosopiperazin, 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-butylnitrosamin. *Z. für Krebsforschung* 75, 231-224.
- DUTTON, A. H. and D. F. HEATH (1956). Demethylation of dimethylnitrosamine in rats and mice. *Nature* 178, 644.
- ENDER, F., G. HAVRE, A. HELGEBOSTAD, N. KOPPANG, R. MADSEN and L. CEH (1964). Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Die Naturwissenschaften* 51, 637.
- FARRIS, E. J. and J. O. GRIFFITH (1962). The rat in laboratory investigation. Hafner, New York.
- FRAZELL, E. L. and J. S. LEWIS (1963). Cancer of the nasal cavity and accessory sinuses. A report of the management of 416 patients. *Cancer* 16/2, 1293-1301.
- GIGNOUX, M. et Ph. BERNARD (1969). Tumeurs malignes de l'ethmoïde chez les travailleurs du bois. *J. de Méd. de Lyon* 50, 731-735.
- GSELL, D. (1964). Absterbekurven und Wachstumskarakteristika einer „Alterzucht“ von Wistar-Ratten. W. H. Weihe. *Die Umwelt der Versuchstiere. Beiheft nr. 9. Z. für Vitaminforschung* 114-126.
- HADDOW, A. (1970). De huidige kennis betreffende de mogelijke oorzaken van kanker. *Abbotempo* 4, 8-11.
- HADFIELD, E. (1969). Tumours of the nose and sinuses in relation to woodworkers. *J. Otol. & Lar.* 83, 417-423.
- HAMILTON, A. and H. L. HARDY (1949). Industrial Toxicology. P. Hoeber, New York.
- HAMILTON, W. J., J. D. BOYD and H. W. MOSSMANN (1944). Human Embryology. W. Heffer and Sons Ltd.
- HAOT, J. et J. C. BIENFAIT (1969). Les papillomes inversés des cavités naso-sinusiennes. *Path. Europ.* 4/3, 222-234.
- HENROT, H., J. DESNOS et J. VIGNARD (1970). Papillomas naso-sinusiens dites d'Ewing ou de Ringertz. *Ann. Oto-Laryng* 87, 49-64.
- HERRMANN, H. (1960). p-Methylnitrosaminbenzaldehyd, ein Stoffwechselprodukt von *Clitocybe suaveolens*. *Die Naturwissenschaften* 74, 162.
- 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. (1964a). Effect of route of administration on the carcinogenic action of diethylnitrosamine. *Brit. J. of Cancer* 18, 763-767.
- HERROLD, K. M. (1964b). Epithelial papillomas of the nasal cavity. *Arch. of Path.* 78, 189-195.
- HERROLD, K. M. (1964c). Induction of olfactory neuroepithelial tumors in syrian hamsters by diethylnitrosamine. *Cancer* 17, 114-121.
- HERROLD, K. M. (1966). Carcinogenic effect of N-methyl-N-Nitrosourea administered subcutaneously to syrian hamsters. *J. Path. Bact.* 92, 35-41.
- HERROLD, K. M. (1969). Aflatoxin induced lesions in syrian hamsters. *Brit. J. of Cancer* 23, 655-660.
- HOCH-LIGETI, C., M. F. ARGUS and J. C. ARCOS (1970). Induction of carcinomas in the nasal cavity of rats by dioxane. *Brit. J. of Cancer* 24, 164-167.
- HOFFMANN, F. und A. GRAFFI (1964). Nasenhöhrentumoren bei Mäusen nach percutaner Diäthylnitrosaminapplikation. *Archiv für Geschwulstforschung* 23/4, 274-288.
- HUEPER, W. C. (1961). Carcinogens in the human environment. *Arch. Path.* 71, 237-267.
- HUEPER, W. C. (1961). Carcinogens in the human environment. *Arch. Path.* 71, 355-380.
- HYAMS, V. J. (1971). Papillomas of the nasal cavity and paranasal sinuses "a clinico-pathological study of 315 cases". *Ann. of Otol., Rhin. & Lar.* 80/2, 192-206.
- JAFFÉ, R. (1931). Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. Julius Springer, Berlin.
- KELEMEN, G and F. SARGENT (1946). Nonexperimental pathologic nasal findings in laboratory rats. *Arch. of Otolaryng.* 44, 24-42.
- KLOBBIE, M. E. A. (1890). Action de l'acide azoteux sur les corps azotés. *Recueil des travaux chimiques des Pays Bas IX*, 132-155.
- LEADING ARTICLES (1968). Nitrites, Nitrosamines, and Cancer. *Lancet* nr. 7551, 1071.
- 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 J. M. BARNES (1959). The experimental production of tumours in the rat by dimethylnitrosamine (N-nitroso dimethylamine). *Acta Unio Int. contra cancerum* 15, 187-190.
- MAGEE, P. N. and T. HULTIN (1962). Toxic liver injury and carcinogenesis. *Biochem. J.* 83, 106-114.
- MAGEE, P. N. and E. FARBER (1962). Toxic liver injury and carcinogenesis. *Biochem. J.* 114-124.

MAGEE, P. N. and J. M. BARNES (1962). Induction of kidney tumours in the rat with dimethylnitrosamine (N-nitrosodimethylamine). *J. of Path. & Bact.* 84, 19-31.

MAGEE, P. N. and R. SCHOENTAL (1964). Carcinogenesis by nitroso compounds. *Brit. Med. Bull.* 20, 102-106.

MAXIMOW, A. A. and W. BLOOM (1948). A textbook of histology. W. B. Saunders Company, Philadelphia/London.

MENDELOFF, J. (1957). The olfactory neuroepithelial tumors "a review of the literature and report of six additional cases". *Cancer* 10, 944-956.

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.

MOHR, U. and J. ALTHOFF (1965). Die diaplacentare Wirkung des Cancerogens Diäthyl-nitrosamin bei der Maus. *Z. für Krebsforschung* 67, 152-155.

MOHR, U., O. WIESER und K. PIELSTICKER (1966). Die Minimaldosis für die Wirkung von Diäthylnitrosamin auf die Trachea beim Goldhamster. *Die Naturwissenschaften* 53/9, 229.

MONTESANO, R. and U. SAFFIOTTI (1968). Carcinogenic response of the respiratory tract of syrian golden hamsters to different doses of diethylnitrosamine. *Cancer Res.* 28, 2197-2210.

MÜLLER, E., H. HAISS und W. RUNDEL (1960). Über das Kalium-methyldiazotat ein „stabilisiertes Diazomethan“, und das Monomethylnitrosamin. *Chem. Berichte* 93, 1541-1552.

NEURATH, G., B. PIRMANN und H. WICHERN (1964). Zur Frage der N-Nitrosoverbindungen im Tabakrauch. *Beiträge zur Tabakforschung, Band 2/7*, 311-319.

OBERT, G. J., K. D. DEVINE and J. R. McDONALD (1960). Olfactory neuroblastomas. *Cancer* 13, 205-215.

PALMER, R. E., A. J. DELANEY and A. CANNON (1960). Olfactory esthesioneuroepithelioma. *Virginia Med. Monthly* 87/3, 146-149.

PASTERNAK, L. (1964). Untersuchungen über die mutagene Wirkung verschiedener Nitrosamin- und Nitrosamid-Verbindungen. *Arzneimittel Forschung* 14/7, 802-804.

PFISTERER, H. (1961). Über das sogen. harte Papillom der Nase und der Nebenhöhlen. *Pract. Oto-Rhino-Laryng.* 23, 217-232.

PREUSSMANN, R. (1968). Direct alkylating agents as carcinogens. *Food, Cosmet. Toxicol.* 6/3, 576-577.

REICHARD, P. and B. ESTBORN (1951). Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J. of biol. chem.* 188, 839-846.

RINGERTZ, N. (1938). Pathology of malignant tumors arising in the nasal and paranasal cavities and maxilla. *Acta Otol.* 27 (suppl.), 31-42.

ROBBINS, S. L. (1968). Pathology. W. B. Saunders Company, Philadelphia/London.

SCHERPENBERG, H. J. C. van (1958). Electron microscopy of normal and regenerating olfactory epithelium in man and the cat. Diss. Leiden.

SCHOENTAL, R. and J. P. M. BENSTED (1963). Effects of whole body irradiation and of partial hepatectomy on the liver lesions induced in rats by a single dose of retrorsine, a pyrrolizidine (senecio) alkaloid. *Brit. J. of Cancer* 17, 242-251.

SEIFERT, K. (1969). Geschichte und Bibliographie der Erforschung des peripheren Geruchsorgans. *Clio Medica* 4, 305-337.

SEIFERT, K. (1970). Die Ultrastruktur des Riechepithels beim Makrosomatiker. George Thieme Verlag, Stuttgart.

SILCOX, L. E. (1966). Olfactory neuroblastoma. *Laryngoscope* 76, 665-673.

STAM, F. C. (1957). Histo-pathogenesis en classificatie van cerebrale gliomen. Thesis Amsterdam.

SUSS, R. (1965). Zur Wirkungsweise der Nitrosamine. *Z. für Naturforschung* 20b, 714.

SWANN, P. F. and P. N. MAGEE (1968). Nitrosamine-induced carcinogenesis. *Biochem. J.* 110/1, 39-47.

THOMAS, C. (1965). Zur Morphologie der Nasenhöhrentumoren bei der Ratte. *Z. für Krebsforschung* 67, 1-10.

THOMAS, C. und R. BOLLMANN (1969). Untersuchungen zur Organotropie der krebs-erzeugenden Wirkung des N-Nitroso-N-methyl-Harnstoffes (NMH) an Ratten. *Experientia* 25/1, 50-51.

THOMAS, C. und B. T. SO (1969). Zur Morphologie der durch N-Nitroso-Verbindungen erzeugten Tumoren im oberen Verdauungstrakt der Ratte. *Arzneimittelforschung* 19, 1077-1081

TODD, R. B. and W. BOWMAN (1856). The physiological anatomy and physiology of man, Volume II, J. W. Parker and Son, London.

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. and V. P. VAISHNAV (1971). Olfactory neuroblastoma. *J. of Lar. & Otol.* 85/4, 407-410.

WALLENBORN, W. McK., G. S. FITZ-HUGH and J. A. WILKERSON (1963). Olfactory esthesioneuroepithelioma. *Ann. of Otol., Rhinol. & Lar.* 72, 149-156.

STELLINGEN.

I.

Het metaplastisch plaveiselepitheel dat na subcutane toediening van diaethylnitrosamine in de regio respiratoria van de ratteneus gevonden wordt is niet het voorstadium van de in dezelfde streek optredende papillomen.

II.

Het experimentele esthesioneuroepithelioma in de ratteneus gaat uit van de basale cellaag van het reukepitheel, zeer waarschijnlijk van de neuroblasten in die laag.

III.

De omschrijving van vage duizeligheidsklachten als Menière-syndroom of Menière-achtige toestand wekt verwarring en is daarom te verwerpen.

IV.

Elke trommelvliesperforatie dient voor de oorchirurg een uitdaging tot sluiting te zijn.

V.

Voor de differentiaaldiagnostiek van emphyseem bij zuigelingen is de bronchoscopie onontbeerlijk.

VI.

Als de baring bij een chemische inleiding niet op gang komt dienen de vliezen te worden gebroken.

VII.

Bij apexresecties aan molaren in de bovenkaak dient de palatinale radix via het palatum durum benaderd te worden.