

Synthese

**Genotypische en fenotypische variabiliteit,  
individuele susceptibiliteitsfactoren  
en industriële genotoxische/neurotoxische agentia  
in arbeidsgeneeskunde**

VUB- M. Kirsch-Volders (coördinator)

KUL- H. Veulemans

RUG- H. Thierens

RUG- L. de Ridder

UCL- D. Lison

UCL- P. Vielle

ULg- C. Laurent

**Prof. Dr. KIRSCH-VOLDERS M. –  
Coordinator**

Vrije Universiteit Brussel (VUB)  
Laboratorium voor Cellulaire Genetica  
Pleinlaan 2  
1050 Brussel  
tel: 02/629.34.23.  
fax: 02/629.34.08.  
E-mail: mkirschv@vub.ac.be

**Prof. Dr. VEULEMANS H.**

Katholieke Universiteit Leuven (KUL)  
Laboratorium voor Arbeidshygiëne en  
Toxicologie  
Kapucijnenvoer 35  
3000 Leuven  
tel: 016/33.69.95.  
fax: 016/33.69.97.  
E-mail :  
Hendrik.Veulemans@med.kuleuven.ac.be

**Prof. Dr. DE RIDDER L.**

Universiteit Gent (RUG2)  
Vakgroep Anatomie, embryologie en  
histologie en medische fysica  
Louis Pasteurlaan 2  
9000 Gent  
tel: 09/264 92 41  
fax:09/264 94 98  
E-mail: leo.deridder@rug.ac.be

**Prof. Dr. THIERENS H.**

Universiteit Gent (RUG1)  
Faculteit Geneeskunde  
Vakgroep Anatomie, embryologie en  
histologie en medische fysica  
Proeftuinstraat 86  
9000 Gent  
tel: 09/264 66 43  
fax: 09/264 66 99  
E-mail: hubert.thierens@rug.ac.be

**Prof. Dr. LISON D.**

Université Catholique de Louvain (UCL)  
Unité de Toxicologie Industrielle et Médecine  
du Travail  
Clos Chapelle aux Champs 30.54  
1200 Bruxelles  
tel: 02/764.32.20.  
E-mail : lison@toxi.ucl.ac.be

**Prof. Dr. VIELLE P.**

Université catholique de Louvain (UCL)  
Département de Droit Economique et Social  
Collège Thomas More  
Place Montesquieu 2  
1348 Louvain-la-Neuve  
tel: 010/47 47 60 (58)  
fax: 010/47 47 57  
E-mail: vielle@deso.ucl.ac.be

**Dr. LAURENT Ch.**

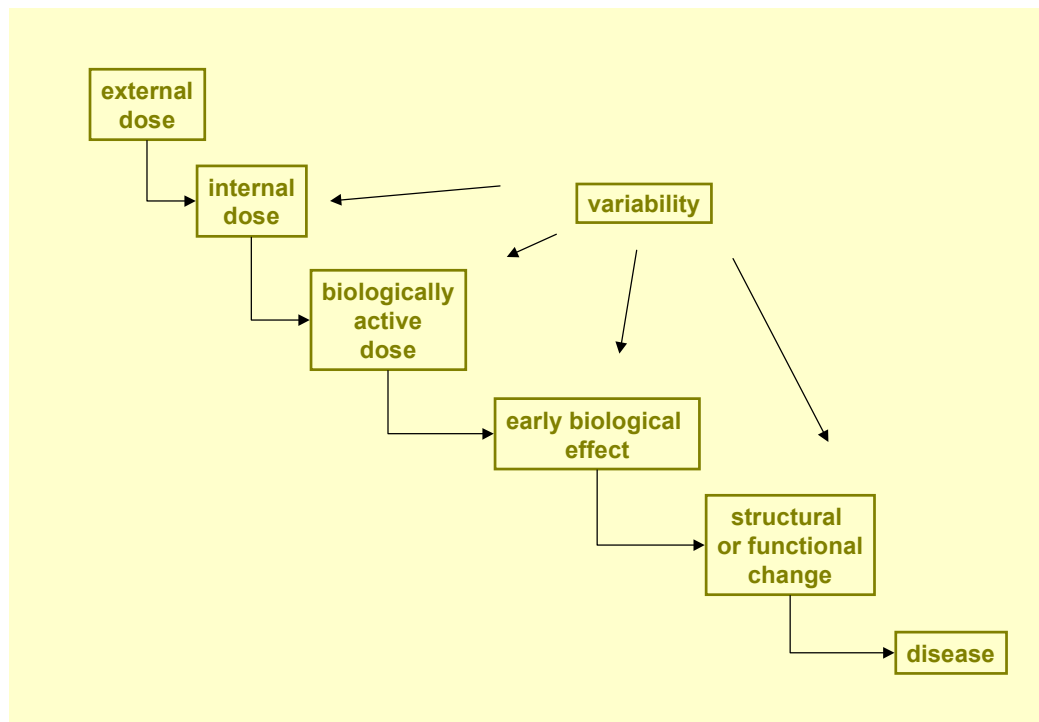
Université de Liège (ULg)  
Laboratoire d'Oncologie, Radiobiologie et  
Mutagenèse Expérimentale  
Tour de Pathologie 1, CHU B23  
4000 Liège  
tel: 04 / 366.24.47. - 04 / 366.25.33.  
fax: 04 / 366.24.33.  
E-mail : chr.laurent@ulg.ac.be

## Trefwoorden

Beroepsbiomonitoring, mutagenen/opioiden, genotype, fenotype, interindividuele susceptibiliteit

## Inleiding

Medische opvolgingsprogramma's voor arbeiders potentieel blootgesteld aan schadelijke stoffen in de werkplaats zijn gebaseerd op het hieronder getoonde paradigma, dat de sequentie van gebeurtenissen samenvat die blootstelling aan toxische agentia linkt met de uitdrukking van een ziekte (beroepsziekte).



Drie complementaire benaderingen worden algemeen onderscheiden: (1) *blootstellingsmonitoring* gebaseerd op het gebruik van parameters die de externe dosis, interne dosis, biologisch actieve dosis en soms vroege reversibele effecten weergeven, (2) *effect monitoring*, die de respons van het organisme op chemische blootstelling onderzoekt, in het ideale geval met vroege parameters die predictief zijn voor een ziekterisico, en (3) *susceptibiliteitsmonitoring*, die als doel heeft om met de interindividuele variabiliteit in de biobeschikbaarheid van en de respons op xenobiotica rekening te houden. Dit laatste aspect wordt echter zelden geïmplementeerd in de arbeidsgeneeskunde door het tekort aan gevalideerde methoden, en er bestaat geen consensus betreffende de aanvaardbaarheid van deze aanpak.

Gedurende de laatste jaren hebben de sequencerij van het menselijke genoom en de introductie van moleculaire biologie technieken gezorgd voor aanzienbare vooruitgang in bijna alle biomedische disciplines. In het bijzonder hebben ze de ontwikkeling toegelaten van nieuwe biomerkers voor susceptibiliteit (metaboliserende enzymen, DNA repair enzymen, celcycluscontrole genen, immuun respons genen, ...).

Dit vooruitzicht is echter een ernstige reden tot bezorgdheid, in het bijzonder omdat het zou kunnen leiden tot de mogelijke uitsluiting van de meest gevoelige individu's, de zwakste werknemers, uit de arbeidsmarkt. Deze kwestie is het onderwerp van een gepassioneerd debat in Europa en de V.S., met soms ver uiteenlopende meningen. In België was het debat toen dit onderzoeksprogramma gestart werd niet goed gestructureerd, en rekening houdend met de snel vorderende technische ontwikkelingen werd geanticiperd dat deze kwestie niet langer over het hoofd gezien kon worden. Moeten individuele susceptibiliteitstests verboden worden? Moet het testen van individuele susceptibiliteit geïmplementeerd worden in de arbeidsgeneeskunde? Moet deze implementatie gecontroleerd worden? Hoe? Wat zou het voordeel van deze tests zijn?

Alvorens deze ethische kwesties besproken werden, werden echter de volgende vragen beschouwd:

- 1. Zijn we BEKWAAM om susceptibiliteitsparameters te meten? Zijn de huidig beschikbare diagnostische tools voldoende betrouwbaar en robuust om op grote schaal gebruikt te worden? Zijn tests die de identificatie van genotype of fenotype toelaten beschikbaar in België?*
- 2. Is het potentieel NUTTIG om deze tests te implementeren? In de veronderstelling dat de technische aspecten voldoende gekend zijn, wat is dan de predictieve waarde van deze tests? Wat is hun nauwkeurigheid? In welke context zouden deze tests nuttige informatie verschaffen?*

Er werd verwacht dat enkel nadat men een duidelijk antwoord had op deze vragen het mogelijk zou zijn om, op basis van degelijke wetenschappelijke argumenten, de sociale en ethische implicaties van susceptibiliteitsmonitoring te bespreken:

- 3. Indien deze testen potentieel nuttig zijn, zijn ze TOEPASBAAR in de arbeidsgeneeskunde?*

Toen dit wetenschappelijk onderzoeksprogramma werd opgestart, werd benadrukt dat het de verantwoordelijkheid was van de wetenschappers om de nodige elementen te verschaffen voor een serene en gegronde discussie van deze problematiek. Men achtte het ongepast om de ethische implicaties te bespreken van een test die niet beschikbaar is, of waarvan de predictieve waarde niet aangetoond is.

## **Resultaten**

De strategie van het onderzoeksprogramma is gebaseerd op de **integratie van nieuw ontwikkelde biomerkers en de interactie tussen fundamentele en toegepaste research**. Ze evolueerde in parallel met de identificatie van nieuwe biomerkers voor individuele susceptibiliteit. De sociale aspecten vormden een belangrijk deel van het project, met bijzondere aandacht voor de juridische aspecten.

### **Wetenschappelijke aspecten:**

De nauwe **interactie** en de **interdisciplinariteit** van de betrokken teams liet een geïntegreerde aanpak toe van de evaluatie van blootstellings-, effect- en susceptibiliteitsbiomerkers voor de evaluatie van beroepsblootstelling aan mutagenen en

opioïde analgetica. Kruisbestuiving tussen laboratoria was een belangrijke stimulerende factor.

In een eerste stap beslisten de teams samen over de te ontwikkelen en te valideren methodologieën, de te bestuderen populaties, de voor te bereiden questionnaires, de sampling schema's en de coördinerende groep. Raad werd gevraagd in het opvolgcomité. In een tweede stap werden de verschillende experimentele studies uitgevoerd in de verschillende laboratoria of in nauwe samenwerking tussen verschillende laboratoria (RUG/VUB, UCL/VUB, UCL/KUL/VUB). De laatste stap was een geïntegreerde statistische analyse van de samengevoegde data van de verschillende groepen, en betrof de individuele susceptibiliteit voor een gegeven beroepsblootstelling.

De collaboratieve **studie (KUL/UCL/VUB) op styreen** susceptibiliteit combineerde een brede reeks van verschillende biomerkers. In het bijzonder werd aandacht besteed aan het ontwikkelen van accurate en gevoelige quantificatie van styreen adducten, en genotypering en fenotypering van relevante genen. De resultaten wijzen erop dat chromosoom-/genoommutaties gevormd worden in arbeiders blootgesteld aan lage concentraties styreen. De duur van blootstelling, leeftijd en rookgewoontes zijn belangrijke variabelen waarmee rekening moet gehouden worden in studies die de genotoxische effecten op arbeiders evalueren. Genotypering van metaboliserende en DNA repair enzymen zijn nuttig voor het bepalen van individueel genotoxisch risico voor styreen. Het *in vitro* DNA strand break fenotype zou een waardevolle methode kunnen zijn om de repaircapaciteit van arbeiders in te schatten.

Wat blootstelling aan **kobaltstof (VUB/UCL)** betreft, werden zijn mutagene effecten door de inductie van oxidatieve schade aangetoond *in vitro* in menselijke lymfocyten en *in vivo* in rat longcellen. De evaluatie van zijn carcinogeen potentiaal werd gecombineerd met studies over de inductie van apoptose in arbeiders blootgesteld aan kobalt alleen of aan hard metaalstof (WC-Co). Er werd geen significante verhoging van genotoxische effecten waargenomen in arbeiders blootgesteld aan de TLV-TWA ( $20\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Multipole regressie analyse wees er echter op dat arbeiders die roken en blootgesteld zijn aan hard metaalstof verhoogde urinaire 8-OHdG concentraties en micronucleï waarden hebben. Er werd geconcludeerd dat deze groep aan arbeiders een hogere medische surveillance nodig heeft. In dezelfde populatie arbeiders en matched controls werd genetische susceptibiliteit bepaald door de identificatie van individuele capaciteit tot het verwijderen van oxidatieve schade en om DNA strand breakage te herstellen. Deze resultaten wijzen erop dat polymorfismen voor genen die coderen voor repair enzymen die ingrijpen op geoxideerde basen (8-OHdG), enkelstrengige DNA breuken (XRCC1) en dubbelstrengige DNA breuken (XRCC3) betrokken zijn in de variatie van de hoeveelheid genotoxische effecten geïnduceerd in arbeiders blootgesteld aan Co-bevattend stof. Interacties tussen deze polymorfismen blijken van belang te zijn, en er kan dus niet één genotypering in het bijzonder aangeraden worden. Bovendien, als benadrukt in onze vorige studie, is de interactie met roken een belangrijke factor, wat niet verrassend is aangezien roken zelf oxidatieve schade kan induceren.

Een prospectieve studie van de predictiviteit van het Glu69 polymorfisme voor long parenchymale ziekte werd uitgevoerd door longfunctie parameters te bestuderen in arbeiders uit een kobalt-producerend bedrijf die betrokken waren in een respiratorisch monitoringprogramma tussen 1988 en 2001. 122 mannelijke arbeiders met tenminste drie longfunctie tests (FEV1, FVC) gedurende de opvolgingsperiode werden geëvalueerd. De belangrijkste bevinding was dat blootstelling aan kobalt bijdroeg tot een verlaging over de tijd van FEV1, maar niet van FVC, en dit enkel in rokers. Er werd geen invloed van het Glu69 polymorfisme gevonden. Alhoewel de amplitude van de bijkomende verlaging geassocieerd

met blootstelling relatief klein was (<20%) in vergelijking met de verwachte verlaging in rokers, wezen deze resultaten erop dat verdere inspanningen om blootstelling te verlagen en arbeiders te motiveren om te stoppen met roken nog steeds gerechtvaardigd zijn.

De resultaten bekomen door de UCL-VUB dragen op significante wijze bij tot het **begrip van de mechanismen van carcinogenese** geïnduceerd door kobaltstof, en laten een toekomstige grondige wetenschappelijke benadering toe van **individuele susceptibiliteit** voor dit type beroepsblootstelling.

Hun complementaire expertise (arbeidstoxicologie en genotoxiciteit) hebben geleid tot uitnodigingen voor het samen schrijven van drie **review papers** (Lison et al., 2000; Kirsch-Volders et al., 2002; De Boeck et al., 2003), het geven van verschillende **lezingen** in België en in het buitenland over het bepalen van genotoxiciteit in beroepsblootstelling, en tot het deelnemen aan de **IARC working group** voor de evaluatie van kobalt-bevattend stof (2003).

Wat **ioniserende stralen (RUG/VUB/ULg)** betreft, werden studies uitgevoerd om de correlatie te onderzoeken tussen een verhoogde chromosomale radiosensitiviteit die waargenomen wordt in sommige individu's (patiënten, arbeiders) en de expressie van DNA schade processing genen. Deze studies kunnen beschouwd worden als een eerste stadium in het begrijpen van **de moleculaire mechanismen die de oorzaak zijn van radiosensitiviteit**. De detectie van mutaties, polymorfismen in DNA schade processing genen in individu's die een verhoogde *in vivo* radiosensitiviteit of *in vitro* chromosomale radiosensitiviteit vertonen is van belang voor de toekomst in het kader van **susceptibiliteit van arbeiders voor bestraling**. Alhoewel de huidige studies hebben aangetoond dat chromosomale assays betrouwbare technieken zijn voor het bepalen van radiosensitiviteit in populatiestudies, is een verdere **optimalisatie** nodig om hun waarde voor individuele risk assessment te verbeteren. Meerdere bloedstaalnames zal mogelijk de specificiteit van de assays verhogen.

**Genotyping** voor meerdere DNA repair genen en **fenotypering** voor strand break repair werden uitgevoerd in arbeiders uit een kerncentrale blootgesteld aan chronische lage niveau's aan ioniserende stralen. Op basis van de resultaten is het niet mogelijke één enkel genotype te selecteren voor voorspelling van de individuele susceptibiliteit voor ioniserende stralen. Een combinatie van de drie genotypingen voor hOGG1, XRCC1 en XRCC3 wordt aangeraden. Als alternatief of bijkomend, wordt het *in vitro* DNA strengbreuk fenotype, dat verschillende repair pathways integreert, aangeraden.

De studie van beroepsblootstelling aan **opioiden (KUL)** is de eerste in dit domein, en was zeer succesvol in de ontwikkeling van adequate analytische methodologieën. Voor de evaluatie van blootstelling via inademing zijn gepaste sampling technieken en strategieën algemeen beschikbaar. Voor blootstelling aan chemicaliën via de huid is er nog steeds een tekort aan zulke gestandaardiseerde methodologieën voor het bepalen van de blootstelling, en verdere **standardisatie** is vereist. Desondanks werd een exploratief protocol voor dermale blootstelling ontwikkeld en succesvol geïmplementeerd. Ruimtelijke distributie van totale dermale lichaamscontaminatie aan fentanyl werd gemeten via dermale patch samplers, geplaatst op verschillende anatomische zones van het lichaam. Bovendien werd gevonden dat een simpel "hand wiping" protocol een adequate schattingsparameter was van totale dermale lichaamsblootstelling. Om interne blootstelling op te volgen kunnen specifieke biomerkers gebruikt worden zoals opioïde niveau's en de concentratie van hun metabolieten in urine. Deze urinaire biomerkers waren sterk gecorreleerd met totale dermale lichaamsblootstelling aan fentanyl, terwijl deze correlatie significant minder was in het geval van respiratorische blootstelling. Het belang van verschillende blootstellingspathways werd onderzocht, en er werd geconcludeerd dat absorptie via de huid een belangrijke blootstellingswijze zou kunnen zijn. In deze omstandigheden is de bepaling van de geïntegreerde individuele opname aan

opioiden van arbeiders met een biologische monitoringstrategie essentieel. Bovendien zou fentanyl metabolisatie en eliminatie onderworpen kunnen zijn aan interindividuele variabiliteit, en het kiezen van de gepaste biomerker voor blootstelling zou mogelijk bijkomende informatie kunnen verschaffen over de individuele susceptibiliteit van blootgestelde arbeiders. Het wordt verwacht dat deze studie later zal kunnen dienen **als model** voor het bepalen van beroepsblootstelling en individuele susceptibiliteit van arbeiders voor andere farmaceutische verbindingen met gelijkaardige effecten.

De resultaten bekomen in dit onderzoeksproject zijn indrukwekkend. Hun wetenschappelijke kwaliteit is bevestigd door de vele publicaties in peer-review papers. Zij beantwoorden de meerderheid aan vragen die gesteld werden bij het aanvangen van dit project. Methodologieën zijn nu **beschikbaar** gemaakt om genotypering voor metabolische activatie en DNA repair uit te voeren, en fenotypering van specifieke cellulaire functies te kunnen bepalen. Deze methoden zijn **nuttig** aangezien hun implementatie bijdraagt tot het verfijnen van de nauwkeurigheid van biomerkers voor blootstelling en de predictiviteit van biomerkers voor effect. Hun **toepasbaarheid** moet verder beschouwd worden in de **ethisch-juridische** context.

### **Juridische aspecten:**

Dankzij de **interdisciplinariteit** van het project was een beter begrip van de doelstellingen en limieten van de andere betrokken disciplines mogelijk.

Naast de wederzijdse uitwisseling van informatie liet de geïntegreerde aard van de interdisciplinariteit binnen het netwerk een goede uitwisseling van standpunten toe, en een echte confrontatie van ideeën tussen, en zelfs binnen de betrokken disciplines.

Het liet ook een beter begrip toe van de **juridische belangen** verbonden aan de vraag over het gebruik van genetische tests in het kader van de werkrelaties. Deze belangen werden vervolgens in de bredere context van de **preventie van, en compensatie** voor beroepsziekten. Dit laat ons toe de sterkten en zwakheden van ons systeem rekening houdend met deze belangen te benadrukken.

### **Besluit**

Verschillende methodologieën voor **genotypering** en **fenotypering** werden **gevalideerd** door de collaborerende teams om een adequate **preventie** van arbeiders blootgesteld aan **mutagenen/carcinogenen en opioïde analgetica** in de werkplaats toe te laten. De laboratoria demonstreerden hun **specificiteit** om interindividuele variatie voor de metabolisatie van mutagenen/carcinogenen en repair van DNA lesies te detecteren. Ze evalueerden hun responsen in verschillende industriële settings, maar een compleet begrip van de relatie tussen genotype en fenotype zal verdere studies vereisen. De bekomen resultaten moeten dus steeds **voorzichtig** geïnterpreteerd worden.

Tests voor genotypering en fenotypering hebben nog steeds een **onzekere klinische validiteit** door gelimiteerde en potentieel bevooroordeelde studiepopulaties, lage genotype penetrantie, variabele expressiviteit, een tekort aan begrip van fenotypische modifiers, en multiële of ambigue klinische endpoints. Voor genvarianten geassocieerd met algemeen voorkomende ziekten wordt een lage predictieve waarde verwacht aangezien vele andere genetische en niet-genetische factoren ook bijdragen aan het klinisch resultaat. Het klinisch nut van een test hangt ook af van de beschikbaarheid, veiligheid en doeltreffendheid van preventieve of



therapeutische maatregelen die aangeboden worden aan individu's met positieve testresultaten. Hun toepassing zou enkel moeten aangeraden worden als een complementaire informatie voor de normale **arbeidssurveillance** en niet voor pre-screening van arbeiders.

Zowel de wetenschappelijke als de legale aspecten onderlijnden de sterkten van interdisciplinariteit. Dit was essentieel voor de kwaliteit en de uitvoerbaarheid van het project. En wat nog belangrijker is, **de interactie tussen wetenschappelijke en juridische aspecten verschaften een unieke toegevoegde waarde, die van goede wetenschappelijke vragen een essentiële benadering maakte voor verantwoordelijke wetenschap.**