

Academiejaar 2014-2015

Faculteit Farmaceutische, Biomedische en
Diergeneeskundige wetenschappen

Onderwijscommissie Biomedische Wetenschappen



Studie naar het genotoxisch potentieel van
componenten die kunnen migreren uit
bedrukte papieren en kartonnen
voedingscontactmaterialen

Door:

Annelies Van Heyst

Masterproef voorgelegd tot het behalen van de graad van

Master in de Biomedische wetenschappen

Promotor(en): Prof. Dr. Luc Verschaeve

Copromotor: Dr. Apr. Birgit Mertens

Begeleider: Apr. Melissa Van Bossuyt

Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid

OD Voeding, geneesmiddelen en consumentenveiligheid

Afdeling Toxicologie

Juliette Wytsmanstraat 14

1050 Brussel



WETENSCHAPPELIJK INSTITUUT
VOLKSGEZONDHEID
INSTITUT SCIENTIFIQUE
DE SANTÉ PUBLIQUE

Inhoudsopgave

Voorwoord	3
Samenvatting.....	4
Abstract	5
Verklarende woordenlijst.....	6
1 Inleiding.....	7
1.1 Voedselcontactmaterialen	7
1.2 Voedselcontactmaterialen als bron van chemische stoffen	7
1.2.1 Kunststoffen FCM	7
1.2.2 Metalen FCM.....	8
1.2.3 FCM vervaardigd uit rubber	8
1.2.4 FCM vervaardigd uit papier en karton	9
1.3 Migratie van chemische stoffen	9
1.3.1 Het migratieproces.....	10
1.3.2 Migratie uit gerecycleerde FCM en uit FCM voor veelvuldig gebruik.....	11
1.4 Wetgeving.....	11
1.4.1 Algemene verordening inzake materialen en voorwerpen bestemd om met levensmiddelen in contact te komen	11
1.4.2 Wetgeving voor kunststof materialen en artikels bestemd om met voeding in contact te komen.....	11
1.4.3 Overige verordeningen en resoluties	13
1.5 Genotoxiciteit	13
1.6 Het PRIMISTRA-project.....	14
2 Doelstelling.....	16
3 Methodologie.....	18
3.1 Algemene principes.....	18
3.1.1 In silico evaluatie van het genotoxisch potentieel	18
3.1.2 Literatuurstudie.....	20
3.1.3 In vitro genotoxiciteitstesten	20
4 Materiaal en methoden	24
4.1 Bacteriën	24
4.2 Cellen.....	24
4.3 Chemische stoffen.....	24
4.4 <i>In silico</i> programma's	24
4.5 Literatuurstudie: ECHA website	25
4.6 <i>In vitro</i> genotoxiciteits- en cytotoxiciteitstesten.....	25
4.6.1 VITOTOX®-test.....	25
4.6.2 Micronucleustest.....	27
5 Resultaten	32
5.1 <i>In silico</i> programma's	32
5.1.1 ToxTree.....	32
5.1.2 Derek Nexus™.....	33
5.2 Literatuurstudie.....	35
5.3 <i>In vitro</i> testen.....	35
5.3.1 VITOTOX®-test.....	35

5.3.2	Micronucleustest.....	39
6	Discussie	47
6.1	Evaluatie van het genotoxisch potentieel van een selectie van componenten die kunnen worden verwerkt in bedrukte papieren en kartonnen FCM	47
6.2	Optimalisatie micronucleustest	48
6.3	Onderzoeksstrategie	49
7	Conclusie	50
8	Referenties	51
9	Bijlagen	55
9.1	VITOTOX [®] -test: Voorbeeld van een verdunningsreeks aangemaakt in een 96-well plaat	55
9.2	Mycoplasma detectie celculturen	55
9.3	Controle AD van ToxTree.....	56
9.4	Voorbeeld beslissingsboom ToxTree: Ethyl-tolueen-4-sulfonaat	57
9.5	Overzicht literatuurstudie ECHA website	58
9.6	Resultaten VITOTOX [®] -test.....	61
9.7	Resultaten micronucleustest.....	67

Voorwoord

Op het einde van mijn master biomedische wetenschappen kreeg ik de kans om een thesis te maken over een onderwerp dat me enorm aanspreekt. Verschillende mensen hebben me geholpen om dit tot een goed einde te brengen en ik wil hen dan ook graag bedanken.

Graag zou ik Prof. Dr. Luc Verschaeve willen bedanken voor de kans om mijn thesis in de onderzoeksgroep toxicologie te voltooien. Daarnaast wil ik graag Dr. Apr. Birgit Mertens bedanken voor de leerrijke samenwerking en hulp bij het schrijven van deze thesis. Het was enorm boeiend om deel te mogen uitmaken van het PRIMISTRA-project. Ook al de tijd die in het nakijken van de thesis is gestoken, apprecieer ik enorm.

Voorts wil ik nog Apr. Melissa Van Bossuyt bedanken om me wegwijs te maken op de afdeling toxicologie en voor het aanleren van de, soms toch complexe, *in silico*-programma's. Ik waardeer het dat je steeds bereid was om vragen te beantwoorden en om de delen over de *in silico*-programma's na te kijken.

Ook Roel Anthonissen wil ik bedanken bedanken voor de leuke tijd samen in het laboratorium en voor het aanleren van de *in vitro* genotoxiciteitstesten. Ook jij stond steeds klaar om elke vraag met enthousiasme te beantwoorden

Tevens ben ik mijn vriend en familie zeer dankbaar voor de steun tijdens het schrijven van deze thesis.

Samenvatting

Voedselcontactmaterialen (FCM) is een brede term die verschillende materialen die in contact komen met voeding omvat. Aangezien FCM een mogelijke bron vormen van blootstelling aan chemische stoffen, is er nood aan een wetgeving die de consument beschermt tegen de mogelijke risico's geassocieerd met het gebruik van FCM. In Europa bestaat er tot op vandaag enkel een algemene verordening [EC (No) 1935/2004] en een specifieke wetgeving voor kunststoffen FCM [(EU) No 10/2011]. Voor alle niet-kunststoffen FCM waaronder FCM vervaardigd uit bedrukt papier en karton, is nog geen specifieke Europese wetgeving beschikbaar. Die FCM kunnen dus componenten bevatten waarvan de toxiciteit niet of onvoldoende bekend is. Deze masterproef heeft als doel om het genotoxisch potentieel van een selectie van chemische componenten die gebruikt kunnen worden in bedrukt papier en karton FCM te evalueren.

Er worden veertien testcomponenten geselecteerd waarvan reeds *in silico* in het onthaallabo werd aangetoond dat ze mogelijk genotoxisch zijn. De evaluatie berust op een stapsgewijze methodologie. Het genotoxisch potentieel wordt eerste geverifieerd in de twee *in silico* programma's, namelijk ToxTree en Derek Nexus™. Vervolgens wordt er aan de hand van gegevens van het Europees Agentschap voor Chemicaliën (ECHA) nagegaan of er resultaten van eerdere *in vitro* en *in vivo* genotoxiciteitstesten met deze componenten beschikbaar zijn. Daarna wordt de genotoxiciteit van de componenten *in vitro* getest met de VITOTOX®-test.

Op basis van de voorspellingen met de *in silico* programma's, de gegevens beschikbaar op de ECHA website en de resultaten van de VITOTOX®-test wordt besloten dat 4,4'-diamino-difenylnmethaan en 4,4'-oxydianiline genotoxisch zijn. Twee andere componenten worden als niet-genotoxisch beschouwd, namelijk furfural en 5-aminosalicylzuur. Voor de andere 10 componenten zijn verdere testen of literatuuronderzoek noodzakelijk (1,10-fenantroline, ethyl-tolueen-4-sulfonaat, soedaan IV, soedaan III, 1-(methylamino)antrachinon, 7-diethylamino-4-methylcoumarin, 2-chlooraceetamide, 4-nitrotolueen, 2-nitrotolueen en 2-methyl-4-isothiazoline-3-on).

De 14 componenten die getest zijn vormen maar een klein geheel binnen de grote databank van meer dan 4000 componenten. Er zijn dus mogelijk nog veel meer stoffen aanwezig in bedrukt papier en karton FCM die een genotoxisch effect kunnen uitoefenen en verder onderzoek is bijgevolg noodzakelijk.

Om een vollediger beeld te hebben van het genotoxisch profiel, moet voor sommige componenten een tweede *in vitro* genotoxiciteitstest, de micronucleustest, worden uitgevoerd. In het onthaallaboratorium is reeds een protocol beschikbaar voor het uitvoeren van de micronucleustest in C3A cellen met componenten die geen metabole activatie vereisen. Het bestaande protocol wordt daarom verder aangepast met als doel het optimaliseren van de automatische scoring en het detecteren van componenten die metabole activatie vereisen.

Geen van de aanpassingen die in deze studie worden onderzocht, resulteert in een eenduidige detectie van de positieve componenten die metabole activatie vereisen en die volgens het OECD protocol zeker positief zouden moeten zijn. Deze resultaten wijzen erop dat een micronucleustest met hepatocyten moeilijk uit te voeren is met componenten die metabolisatie vereisen. HepG2 cellen van een andere collectie of overschakelen naar een andere cellijn zouden een oplossing kunnen zijn.

Uit de verschillende micronucleustesten zijn wel een aantal parameters naar voor gekomen die een invloed hebben op het aantal binucleaire cellen dat kan worden gescoord en de kwaliteit van de beelden. De micronucleustest wordt bijvoorbeeld best uitgevoerd in een 6-well plaat. Daarnaast is het gebruik van 0,5% DMSO en 4 µg/ml Cyt-B aanbevolen omdat er dan meer binucleaire cellen gevormd worden. Het invoeren van een herstelperiode na Cyt-B leidt tot een betere CBPI waarde maar geeft geen verhoging in het aantal MN per 2000 cellen. Er is voor deze parameter nog meer onderzoek nodig om te kunnen bepalen wat de juiste invloed ervan is.

Abstract

Food contact materials (FCM) include all materials intended to be in contact with food during production, handling or storage. They are a possible source of food contamination as migration of chemicals from FCM into food has been confirmed by several food crises. Due to this possible migration, there is a need for a legislation that protects consumers against the potential risks associated with FCM. In Europa, a specific regulation is currently only available for plastic FCM [(EU) No 10/2011]. Non-plastic FCM, like printed paper and board, only need to be compliant with the general framework regulation for FCM [EC (No) 1935/2004]. These materials may therefore contain a large number of chemicals whose toxicity is not sufficiently known. This master dissertation aims to evaluate the genotoxic potential of a selection of chemicals which can be used in printed paper and board FCM.

Fourteen test chemicals which have been identified as potentially genotoxic with *in silico* tools by researchers of the WIV-ISP, are selected. The evaluation follows a stepwise approach. First, the genotoxic profile of all 14 chemicals is verified with two *in silico* tools, namely ToxTree en Derek Nexus™. Next, the ECHA website is consulted to collect data of previous *in vitro* and *in vivo* genotoxicity tests with the compounds. Finally, the genotoxicity of every chemical is tested in the *in vitro* VITOTOX®-test.

By combining the outcome of the *in silico* prediction, the data available on the ECHA website and the results of the VITOTOX®-test, two compounds, i.e. 4,4'-diaminodiphenylmethane and 4,4'-oxydianiline, are identified as genotoxic. Two other chemicals are not genotoxic, namely furfural and 5-aminosalicylic acid. The remaining 10 chemicals, however, require more testing or literature research (1,10-phenanthroline, 2-methyl-4-isothiazolin-3-one, ethyl paratoluenesulfonate, sudan IV, sudan III, 1-methylaminoanthraquinone, 7-diethylamino-4-methylcoumarin, 2-chloroacetamide, 2-nitrotoluene and 4-nitrotoluene).

These fourteen test chemicals only represent a small fraction of the large database of more than 4000 chemicals. Possibly, there are many more substances which may have genotoxic effects and therefore, further research is needed.

In order to further characterize the genotoxic profile, an additional *in vitro* genotoxicity test is needed for some compounds, i.e. the *in vitro* micronucleustest. In the Toxicology unit of the WIV-ISP, a protocol for a micronucleus assay with C3A cells for compounds not requiring metabolism is already available. The basic protocol is further adjusted in order to optimize the automatic scoring and to detecting chemicals requiring metabolic activation.

From different experiments for optimizing the automatic scoring, it appears that 6-well plates give the best results. The images of the cells are sharper and there can be enough binucleated cells scored. The results also indicate that 0,5% DMSO and 4 µg/ml Cyt-B are recommended.

Despite the different adjustments, the results show that it is difficult to implement hepatocytes in the micronucleus assay for chemicals which require metabolism. Chemicals with definitely genotoxic effects according to the OECD guideline, are not detected in the micronucleus assay with hepatocytes.

Although HepG2 cells appear to be a good theoretical model, they do not give a positive outcome for chemicals requiring metabolic activation under the conditions used in the current study. HepG2 cells from another collection or a different cell line should therefore be used.

Verklarende woordenlijst

4NQO:	4-Nitroquinoline-1-oxide
Afl-B1:	Aflatoxine-B1
ATCC:	<i>American type culture collection</i> ; Amerikaanse weefselculturen
B(a)P:	<i>Benzo(a)pyrene</i> ; Benzo(a)pyreen
CAS:	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CBPI:	Cytokines geblokkeerde proliferatie index
CHO:	<i>Chinese hamster ovary cells</i> ; ovariumcellen van Chinese hamster
CP:	<i>Cyclophosphamide</i> ; Cyclofosfamide
Cyp 450:	Cytochroom P450 enzymstelsel
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenylindole
Derek Nexus™:	<i>Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge</i>
DMSO:	Dimethylsulfoxide
ECHA:	<i>European Chemicals Agency</i> ; Europees Agentschap voor Chemicaliën
EFSA:	<i>European Food Safety Authority</i> ; Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid
FCM:	<i>Food contact materials</i> ; Voedselcontactmaterialen
GMP:	<i>Good manufacturing practice</i>
HepG2:	Cellijn afkomstig van humaan levercarcinoom
hGH:	<i>human growth hormone</i> ; humaan groeihormoon
ITX:	Isopropyl thioxanthone
MMS:	<i>Methyl methanesulfonate</i> ; Methylmethaansulfonaat
MN:	Micronucleus
OECD:	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> ; Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling
OML:	<i>Overall migration limits</i> ; Algemene migratielimiet
PAK:	Polycyclisch aromatisch koolwaterstof
(Q)SAR:	<i>(Quantitative) Structure-Activity Relationship</i> ; (Kwantitatieve) Structuursactiviteitsrelatie
REACH:	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> ; Registratie, Evaluatie, Autorisatie en Restrictie van chemische stoffen
SMILES:	<i>Simplified molecular-input line-entry system</i>
SML:	<i>Specific migration limit</i> ; Specifieke migratielimiet
TA104(RecN2-4):	<i>Salmonella typhimurium</i> stam met variant RecN gen
TA104 pr1 :	<i>Salmonella typhimurium</i> stam met lichtgevend effect
WIV-ISP:	Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid - Institut Scientifique de Santé Publique

1 Inleiding

1.1 Voedselcontactmaterialen

Om voedsel te bereiden, oogsten, bewerken, bewaren en verpakken worden verschillende soorten machines, instrumenten en materialen gebruikt. Voedselcontactmaterialen ("*food contact materials*", FCM) is een brede term die verschillende materialen die in contact komen met voeding omvat (Figuur 1). De meest gebruikte en gekende FCM zijn verpakkingsmaterialen vanwege hun vele voordelen voor de consument. Het beschermt de voeding tegen contaminatie met bacteriën en schimmels. Compact verpakte voeding is bovendien gemakkelijk te verplaatsen bijvoorbeeld van winkel naar huiskamer maar ook bij transport over grotere afstanden. Met de juiste verpakking blijft de voeding gedurende een bepaalde tijd intact. De verpakking is anderzijds een manier om de consument informatie (bv. de ingrediënten en de nutritionele waarden) over het product te verschaffen. Dankzij het gebruik van verpakkingsmaterialen kan de voeding bovendien gevolgd worden gedurende het gehele verwerkingsproces. Op die manier zijn de herkomst en de datum van verwerking van het voedsel exact gekend (Coles et al., 2003).



Figuur 1. Voedselcontactmaterialen (FCM)
(Senstech)

Naast de verpakkingsmaterialen omvatten de FCM ook materialen die gebruikt worden in de verwerking van voeding, zoals een koffiezetapparaat of machines voor de productie van voeding, alsmede containers gebruikt voor het vervoer van voedsel. Ook materialen die in contact komen met water dat voor humane consumptie wordt gebruikt, vallen onder de term FCM (EC, 2004).

1.2 Voedselcontactmaterialen als bron van chemische stoffen

FCM zijn samengesteld uit een mengsel van chemische stoffen. In principe is elke chemische stof en dus ook de chemische stoffen verwerkt in FCM, mogelijk toxisch voor de mens. Dit inherente vermogen van een chemische stof om ongewenste effecten bij te mens te induceren wordt ook de 'hazard' van een chemische stof genoemd. Het risico daarentegen is de kans dat een bepaald ongewenst effect zich zal voordoen in de gegeven omstandigheden. Bijgevolg wordt het risico niet enkel bepaald door de hazard van de chemische stof, maar ook door de blootstelling. Dit betekent dat een chemische stof uit een FCM enkel een risico inhoudt voor de consument indien de stof uit de verpakking naar de voeding migreert (Norman et al., 2013; Sharpe and Irvine, 2004).

Hieronder wordt een overzicht gegeven van de samenstelling van de verschillende types FCM. De chemische stoffen die kunnen migreren, zullen verschillen in functie van het type FCM.

1.2.1 Kunststoffen FCM

Ongeveer 50% van alle voedingsmiddelen in Europa zijn verpakt in kunststof en heel wat gebruiksvoorwerpen bedoeld om met voedingsmiddelen in contact te komen zijn gemaakt van kunststof. Dit maakt deze materialen tot de meest gebruikte FCM. Het grote voordeel van kunststof is dat het uit verschillende componenten kan worden samengesteld. Vaak zijn de kunststof FCM polymeren. De mogelijke migratieproducten van kunststof FCM zijn dan ook (i) residuele monomeren die niet zijn weggereageerd, (ii) additieven die worden gebruikt tijdens het vervaardigen van het polymeer en die geen deel uitmaken van de chemische polymeerstructuur en (iii) degradatieproducten (Cooper, 2006).

Kunststof kan bestaan uit één laag of meerdere lagen kunststof of een combinatie van kunststof met andere materialen (Cooper, 2006). Dit maakt het mogelijk om voor specifieke voedingsmiddelen de meest ideale verpakking of instrumenten voor manipulatie van deze voedingsmiddelen te maken. Vanwege hun vele toepassingen en hun veelvuldig gebruik, heeft de Europese Unie enkele jaren geleden laten onderzoeken wat de mogelijke gezondheidsrisico's zijn van deze kunststoffen. Dit heeft in 2011 geleid tot het in voege treden van de wetgeving over kunststof materialen en artikels bestemd om met voeding in contact te komen [(EU) No 10/2011] (zie 1.4.2) (EC, 2011).

Enkele voorbeelden van veelgebruikte polymeren zijn lage en hoge dichtheid polyethyleen (LDPE respectievelijk HDPE), polypropyleen (PP), polystyreen (PS), polyvinylchloride (PVC) en polyethyleentereftalaat (PET). Het best gekende polymeer is PET, dat zijn toepassing kent als polymeer waarvan de kunststof drankflessen worden gemaakt (Cooper, 2006).

1.2.2 Metalen FCM

Metalen hebben een breed toepassingsgebied binnen FCM. Ze worden gebruikt in machines voor voedselbewerking, in bestek, kommen en werkbladen en in verpakkingen. Als verpakking zijn ze vooral terug te vinden in wegwerpschaaltjes en drankblikjes in de vorm van staal (ijzer en tin) en aluminium. Hoewel metalen de hoofdcomponent van FCM kunnen zijn, komen ze niet rechtstreeks in contact met de voedingsmiddelen. Er worden extra materialen als barrière tussen het metalen omhulsel en de voeding geplaatst, ook beter gekend als "*coating*", om te vermijden dat er interactie optreedt tussen het metaal en de voeding. Dit geldt in twee richtingen: het metaal wordt beschermd tegen corrosie en de voeding wordt afgeschermd van mogelijk schadelijke migratieproducten (Whitaker, 2006).

Metalen worden gebruikt als FCM omdat ze op lange termijn stabiel opgeslagen kunnen worden, contaminatie kunnen vermijden en de kwaliteit van de voeding kunnen waarborgen met een verlengde houdbaarheid van de voedingsmiddelen als gevolg. Dit kan enkel bekomen worden door de integriteit van de verpakkingen in alle stadia van het verwerkingsproces te handhaven. De integriteit wordt op zijn beurt bepaald door de fysicochemische eigenschappen van de verschillende materialen die gebruikt worden. De meest relevante metalen voor FCM zijn ijzer, tin, aluminium, chroom en lood (Whitaker, 2006).

Zoals eerder vermeld zijn ijzer en tin de hoofdbestanddelen van staal maar vaak wordt het staal nog gecoat door een laag chroom. Chroom is een duidelijk voorbeeld van een component waarbij de chemische eigenschappen een grote rol spelen in voedselveiligheid. Er bestaan immers verschillende isotopen van Chroom waarbij CrVI een hoge toxiciteit vertoont. Tijdens het verwerkingsproces moet dus worden opgevolgd dat enkel de veilige isotopen Cr⁰ en Cr^{III} worden gebruikt (Whitaker, 2006).

1.2.3 FCM vervaardigd uit rubber

Rubber is zowel een natuurlijk als een synthetisch product. Het komt voor als emulsie in het sap van bomen of planten (bijvoorbeeld de *Ficus elastica*) en wordt omschreven als een materiaal dat bij kamertemperatuur elastische kenmerken vertoont.

Deze kenmerken zijn te wijten aan een combinatie van de chemische structuur van de polymeerbasis en de vulkanisatie die voor de driedimensionale structuur zorgt.

In tegenstelling tot kunststoffen wordt rubber maar zelden gebruikt als verpakkingsmateriaal voor voedingsmiddelen. Als verpakkingsmateriaal wordt het enkel gebruikt in de dop om bepaalde glazen flessen of reservoirs af te sluiten. Binnen de FCM wordt het eerder gebruikt in attributen die gebruikt worden tijdens de verwerking van voedingsmiddelen (Tabel 1).

Tabel 1. Rubberen componenten gebruikt in FCM tijdens de verwerking van voedingsmiddelen (Aangepast uit Forrest, 2006)

Locatie	Component
Voedseltransport	Transportbanden en rubberen plinten
Leidingwerk	Flexibele aansluitingen en vlinderkleppen
Pompen	Membraanpompen
Machines, opslagvaten	Algemene afsluitingen en verpakkingen
Blikjes en flessen	Afsluitingen
Voeding manipulatie	Handschoenen
Voeding bereiding	Siliconen vormen
Voedselverpakking	Vlees- en gevogelnetjes

1.2.4 FCM vervaardigd uit papier en karton

Papier en karton hebben een lange en succesvolle geschiedenis van veilig gebruik in de voedingsindustrie in een breed toepassingsgebied. Binnen de toepassingen zijn er gradaties in het contact tussen het papier en karton en de voeding. Er zijn toepassingen waarbij er innig contact is tussen het FCM en de voeding, zoals theezakjes, bakvellen en filters, en verpakkingen die rechtstreeks in contact komen met de voeding zoals de zakken voor suiker en dozen voor droge- en diepvriesproducten. Daarnaast heeft het een zeer breed scala van toepassingen in transport en distributie (European paper and board food packaging chain, 2012).

Niet-gecoat en onbehandeld papier en karton is niet geschikt om voedsel te verpakken met een zeer hoog vochtgehalte (bijvoorbeeld vloeibaar voedsel of natte gekoelde producten), omdat blootstelling aan een hoog vochtgehalte desintegratie van het materiaal veroorzaakt. Voor deze soorten voedsel wordt gewoonlijk gecoat papier en karton gebruikt, en in de meeste toepassingen zelfs met een kunststoffen bescherm laag als coating. Het aandeel van verpakkingen gemaakt van gecoat papier en karton is naar schatting 17% (gelijk aan 4,4 kg per persoon per jaar) van alle verpakkingen die in direct contact komen met voedsel (Pira International, 2005). Tussen de 70-80% van alle gecoat papier en karton dat in direct contact komt met levensmiddelen wordt gebruikt als verpakingskarton voor vloeistoffen (bijvoorbeeld gebruikt in melkkartons en dranken) en in 75% van deze verpakkingen dient aluminiumfolie als tussenlaag om migratie van componenten uit het papier en karton te voorkomen (European paper and board food packaging chain, 2012).



Figuur 2. Voorbeeld van bedrukte papieren en kartonnen FCM.

1.3 Migratie van chemische stoffen

Er werd reeds aangetoond dat componenten vanuit FCM naar de voedingsmiddelen kunnen migreren (Geueke et al., 2014). In 2005 vestigde Nestlé onbewust de aandacht op FCM en hun potentieel risico voor de volksgezondheid. In Italië werd namelijk isopropyl thioxanthone (ITX) aangetroffen in een opvolgmelk voor peuters van deze firma. ITX is een foto-initiator die onder andere gebruikt wordt in de inkt van verpakingsmaterialen van melk (John Hooper and Giles Tremlett, 2005).

Het voorval zorgde ervoor dat miljoenen liters melk van de markt werden gehaald. Uiteindelijk kon de Europese autoriteit voor voedselveiligheid ("European Food Safety Authority", EFSA) aantonen dat ITX niet genotoxisch is. Op het ogenblik van de evaluatie waren gegevens over de toxiciteit van ITX echter schaars waardoor het zeer moeilijk was om de verschillende risico's gerelateerd aan de blootstelling van ITX grondig te beoordelen (EFSA, 2005).

In 2012 werd bovendien in een *in vitro* studie aangetoond dat 2-ITX endocriene effecten heeft, meer bepaald een anti-agonistische werking op zowel androgene als oestrogene receptoren en door modulatie van de biosynthese van steroïden (Reitsma et al., 2013). Hoewel de resultaten van deze *in vitro* testen wijzen op een endocriene activiteit van 2-ITX, zijn er bijkomende *in vivo* studies noodzakelijk om te onderzoeken of de component ook een hormoonverstorend effect induceert.

Enkele jaren later, in 2009, kreeg EFSA de vraag van de Europese Commissie om advies te geven over 4-methylbenzofenon. Deze chemische stof was teruggevonden in ontbijtgranen na migratie vanuit de inkt op de verpakking (EFSA, 2009). 4-methylbenzofenon is een foto-initiator en kan onder sommige omstandigheden doorheen de kartonnen buiten- en kunststoffen binnenverpakking naar ontbijtgranen migreren. Het advies van EFSA luidde dat op basis van structurele gegevens en experimentele resultaten 4-methylbenzofenon geen genotoxische effecten uitoefent. Indien 4-methylbenzofenon verder gebruikt wordt als foto-initiator is er wel nood aan een volledige risicobeoordeling. Dit betekent dat er meer toxicologische gegevens nodig zijn.

Recent werd bisphenol A (BPA) teruggevonden in drankblikjes (Bae and Hong, 2015). BPA is een chemische stof die voornamelijk wordt gebruikt in combinatie met andere chemicaliën om kunststoffen en harsen te vervaardigen. Resten van BPA zijn aanwezig in epoxyharsen gebruikt om beschermende coatings te maken voor drankblikjes. BPA kan migreren in kleine hoeveelheden naar de drank in het blikje (Bae and Hong, 2015). Naar de mogelijke gevaren van BPA voor de volksgezondheid is de laatste jaren veel onderzoek verricht. BPA zou optreden als endocriene verstoorder en verschillende toxicologische effecten uitoefenen zoals neurologische, immunologische, cardiologische, reproductieve en carcinogene effecten. Omdat onderzoekers een grote verscheidenheid aan effecten hebben gevonden, besloot EFSA in 2014 een grondige evaluatie te maken van BPA. Op basis van een literatuuronderzoek met honderden artikels concludeerden deskundigen van EFSA dat BPA geen risico vormt voor de gezondheid van consumenten van elke leeftijdsgroep (inclusief ongeboren kinderen, zuigelingen en adolescenten) bij de huidige blootstellingsniveaus (EFSA, 2015).

Deze incidenten illustreren dat componenten uit FCM kunnen migreren naar de voeding en bijgevolg een mogelijk risico kunnen inhouden voor de consument.

1.3.1 Het migratieproces

Het hele migratieproces bestaat uit drie stappen. De diffusie of beweging van migrerende chemische stoffen van de kern van de FCM naar de rand is de eerste stap. Nadien volgt de transfer van de moleculen vanuit de FCM naar de voedingsmiddelen. Ten slotte is er een dispersie of verdeling van de chemische stof over het geheel van de voedingsmiddelen (BVI, 2013).

Verschillende parameters bepalen in hoeverre een chemische component zal migreren vanuit de FCM naar de voeding. Een eerste parameter is de **chemische samenstelling** van de componenten. Er bestaan verbindingen die meer of minder affiniteit vertonen voor bepaalde milieus. Lipofiele verbindingen migreren bijvoorbeeld gemakkelijk naar een apolair milieu zoals vet of olie en moeilijk naar een polair milieu zoals water of zuur. De verpakkingen van boter en van citroenlimonade zullen dus heel verschillend zijn (BVI, 2013).

Een andere parameter die een rol speelt is de **temperatuur**. Bij een hoge temperatuur zal het migratieproces veel sneller verlopen dan bij een lage temperatuur. De kans op verontreiniging door migratie uit de verpakking is dus beduidend kleiner in de koelkast dan in de oven. Hoewel dit heel voor de hand liggend lijkt, zijn er vandaag de dag nochtans veel recipiënten die tegelijkertijd dienst doen als verpakking voor het bewaren van het product en als schaal tijdens de bereiding ervan. Heel wat kant-en-klaar gerechten gaan niet meer in een traditionele pan of vuurvaste schotel maar gaan met de verpakking de microgolfoven in (BVI, 2013).

Een derde parameter is **tijd**. Deze parameter zal bepalen of er veel of weinig bestanddelen overgaan naar de voeding. Het spreekt voor zich dat hoe langer een FCM in contact komt met de voedingsmiddelen, hoe groter de kans is dat er componenten migreren vanuit de verpakking (BVI, 2013).

1.3.2 Migratie uit gerecycleerde FCM en uit FCM voor veelvuldig gebruik

Tot slot dient ook nog te worden opgemerkt dat er tegenwoordig veel FCM worden gerecycleerd omdat het helpt om duurzaam om te gaan met natuurlijke grondstoffen, energie bespaart, de opwarming van de aarde afremt én de economie stimuleert (Fost Plus, 2015). Ook hier moet er extra aandacht gevestigd worden op de mogelijke risico's voor de gezondheid van de consument. Er moet onderzocht worden of contaminaties die aanwezig waren in de oorspronkelijke FCM niet voorkomen in het uiteindelijke gerecycleerde FCM, of alle componenten in de gerecycleerde FCM wel bedoeld zijn om gebruikt te worden in FCM en of de adjuvantia in de gerecycleerde FCM voldoen aan alle voorschriften voor materialen in FCM (FDA, 2014). Er is ook een categorie van FCM waarvoor een bijzonder aandachtspunt optreedt: materialen die meerdere keren worden gebruikt zoals bekers, bestek, machines,... . Er moet dus onderzocht worden hoe de materialen evolueren en of het risico op toxische effecten niet groter wordt naarmate de materialen meer gebruikt worden en eventueel slijtage vertonen.

1.4 Wetgeving

Aangezien FCM een mogelijke bron vormen van blootstelling aan chemische stoffen, is er nood aan een wetgeving die de consument beschermt tegen de mogelijke risico's geassocieerd met het gebruik van FCM.

1.4.1 Algemene verordening inzake materialen en voorwerpen bestemd om met levensmiddelen in contact te komen

In 2004 trad de algemene verordening inzake materialen en voorwerpen bestemd om met levensmiddelen in contact te komen [EC (No) 1935/2004] in voegen. De kern van de kaderverordening is artikel 3. Hierin wordt gesteld dat materialen en voorwerpen, onder "*good manufacturing practice*" (GMP) dienen te worden vervaardigd en dat ze geen bestanddelen aan levensmiddelen mogen afgeven in bepaalde hoeveelheden.

De voorwaarden voor de afgegeven hoeveelheden zijn:

- * Geen gevaar voor de gezondheid van de mens;
- * Geen onaanvaardbare wijziging in de samenstelling van de levensmiddelen;
- * Geen aantasting van de organoleptische eigenschappen van de levensmiddelen (o.a. geur- en smaakafwijkingen) (EC, 2004).

1.4.2 Wetgeving voor kunststof materialen en artikels bestemd om met voeding in contact te komen

Naast deze algemene verordening, is er een specifieke wetgeving voor kunststof materialen en artikels bestemd om met voeding in contact te komen [(EU) No 10/2011]. Omdat is aangetoond dat componenten vanuit kunststoffen naar de voeding kunnen migreren, bevat verordening [(EU) No 10/2011] enkele migratielimieten. De "*overall migration limit*" (OML) staat voor de maximale toegelaten hoeveelheid niet-vluchtige componenten die door het materiaal wordt vrijgegeven in voedselsimulanten. De limiet is vastgelegd op 60 mg/kg voedingsmiddel of 10 mg/dm² wat concreet betekent dat FCM niet meer dan 10 mg van een substantie per dm² oppervlakte van de FCM mogen vrijgeven.

De "*specific migration limit*" (SML) is een meer gedetailleerde migratielimiet die de maximale toegelaten hoeveelheid van een specifieke component die via een materiaal terecht mag komen in voedsel of een voedselsimulant vastlegt.

Indien de SML overschreden wordt, kan de veiligheid van de gezondheid van de consument niet gegarandeerd worden. Annex I van de verordening bevat alle componenten (monomeren en additieven) die geautoriseerd zijn voor het gebruik als startproduct of additief in kunststof bestemd als FCM. Voor substanties die opgenomen zijn in Annex I van de wetgeving maar waarvoor geen SML opgegeven staat, wordt een SML van 60 mg/kg toegepast.

Indien een producent een component wil gebruiken voor het vervaardigen van kunststof FCM die niet in Annex I is opgenomen, moet een dossier worden ingediend. Op basis van dit dossier zullen vervolgens de mogelijke risico's van de FCM component worden geëvalueerd door EFSA. De risico's voor de gezondheid van de consument als gevolg van de migratie van een chemische component uit FCM worden bepaald door (i) de specifieke toxiciteit van de stof, (ii) de hoeveelheid stof die migreert naar de voeding en (iii) de consumptie van de voeding die de chemische stof bevat. De toxicologische testen die nodig zijn om het mogelijk risico juist in te schatten, zijn afhankelijk van de hoeveelheid stof die kan migreren (Tabel 2).

Tabel 2. Vereiste toxicologische testen voor kunststoffen FCM volgens de Europese Unie per migratieniveau (Barlow, 2009).

Migratie in de voeding (µg/kg voedsel)	Vereiste toxicologische testen op Europees niveau
≤ 50	3 <i>in vitro</i> genotoxiciteitstesten: Ames test, genmutatietest met zoogdiercellen, chromosoomaberratietest met zoogdiercellen Enkel <i>in vivo</i> testen indien minstens één van de <i>in vitro</i> testen een positief resultaat geeft
≤ 5000	3 <i>in vitro</i> genotoxiciteitstesten: Ames test, genmutatietest met zoogdiercellen, chromosoomaberratietest met zoogdiercellen 90 dagen orale toxiciteitsstudie Bioaccumulatie testen
> 5000	3 <i>in vitro</i> genotoxiciteitstesten: Ames test, genmutatietest met zoogdiercellen, chromosoomaberratietest met zoogdiercellen 90 dagen orale toxiciteitsstudie in 2 species Bioaccumulatie testen ADME testen Reproductietesten Ontwikkelingstoxiciteit in 2 species Chronische toxiciteit in 2 species Carcinogeniciteit in 2 species

De specifieke toxiciteit zal worden geëvalueerd op basis van de resultaten van de toxiciteitstesten, daar waar de blootstelling wordt bepaald door de migratie van de stof naar de voeding te vermenigvuldigen met de consumptie van de voeding. Voor theoretische berekeningen wordt aangenomen dat 1 persoon van 60 kg ongeveer 1 kg verpakt voedsel consumeert per dag. Bijgevolg zal de migratie dus bepalend zijn om de blootstelling te berekenen. Vergelijking 1 geeft de meest gebruikte formule weer (Van Hoeck et al., 2015).

$$\text{Blootstelling (mg/persoon/dag)} = \text{migratie (mg/dm}^2\text{)} * \text{gebruik FCM (dm}^2\text{/persoon/dag)}$$

Vergelijking 1. Blootstelling aan chemische stof in relatie tot migratie en gebruik van FCM
Het gebruik van FCM voor 1 persoon van 60 kg bedraagt ongeveer 1 kg verpakt voedsel per dag.
(de Fátima Poças and Hogg, 2007)

EFSA zal op basis van de resultaten van de toxiciteitstesten en de migratiegegevens een risicobeoordeling uitvoeren om na te gaan of het verwerken van de component in de kunststof FCM een risico inhoudt voor de consument.

De risicobeoordeling heeft niet alleen betrekking op de component zelf, maar ook op relevante onzuiverheden en voorspelbare reactie- en degradatie-producten.

Na het evalueren van de aanvraag zal EFSA zijn advies uitbrengen en eventueel een SML-waarde bepalen. Het advies en de SML-waarde zullen voorgelegd worden aan de EC die uiteindelijk zal beslissen of de component in Annex I wordt opgenomen of niet (EFSA, 2008).

1.4.3 Overige verordeningen en resoluties

Voor de meerderheid van de niet-kunststoffen FCM waaronder bedrukt papier en kartonnen FCM, is nog geen specifieke Europese wetgeving beschikbaar. Zij vallen momenteel enkel onder de algemene verordening betreffende FCM [EC (No) 1935/2004] en moeten gemaakt worden onder GMP condities [EC (No) 2023/2006].

Specifiek voor de bedrukte papieren en kartonnen FCM zijn er binnen Europa een aantal documenten beschikbaar die mogelijke componenten oplist die in dit type FCM (kunnen) gebruikt worden, waaronder de **Europese resolutie [AP(2002)1]**. Die specifieke resolutie bevat principes die van toepassing zijn op alle papieren en kartonnen FCM waaronder gecoat karton en karton bestaande uit meerdere lagen. Omdat een geharmoniseerde regeling rond papieren en kartonnen FCM ontbreekt, heeft de Europese Raad de resolutie [AP(2002)1] opgesteld op vraag van verschillende lidstaten (Europe, 2002).

Daarnaast werd er door een werkgroep van EFSA (EFSA Scientific Cooperation, ESCO) in 2011 een overzicht gemaakt van alle componenten die kunnen worden gebruikt in FCM. De lijst met componenten bestaat uit twee delen. Lijst A bevat alle componenten die geëvalueerd zijn na 1991 en lijst B bevat alle componenten die geëvalueerd zijn voor 1991 of die nog niet geëvalueerd zijn. Van de componenten die voorkomen in bedrukt papier en karton bevindt de grote meerderheid (2800 componenten ofwel 90%) zich in lijst B (EFSA, 2012).

In een paar EU-lidstaten geldt alsnog een **nationale wetgeving** voor bepaalde materialen. In 2005 bijvoorbeeld werd door **Zwitserland** een verordening inzake materialen en voorwerpen [SR 817.023.21] opgesteld, waarin een aantal bepalingen staan die specifiek zijn voor de inkt van voedselverpakkingen. De kern van de verordening is een lijst van toegelaten stoffen: de inkt mag enkel samengesteld zijn uit componenten van Annex VI. De componenten werden opgedeeld in twee lijsten. Deel A bevat componenten die al geëvalueerd zijn en deel B bevat componenten die nog niet volgens een officiële test geëvalueerd zijn (Swiss Government, 2005).

1.5 Genotoxiciteit

Genotoxiciteit is een belangrijk toxicologisch eindpunt en gegevens van genotoxiciteitstesten worden dan ook vereist in elke regulatorische context. Ook voor kunststof FCM zijn genotoxiciteitsgegevens steeds vereist, onafhankelijk de mate van migratie (Tabel 2).

Genotoxiciteit omvat alle processen die een wijziging veroorzaken in de structuur, informatie inhoud of segregatie van het DNA. Het is een belangrijk toxicologische eindpunt aangezien het geassocieerd is met ernstige effecten op de gezondheid. In geslachtscellen, wordt DNA-schade gekoppeld aan spontane abortus, onvruchtbaarheid of erfelijke schade aan de nakomelingen en/of latere generaties. Genetische veranderingen in somatische cellen zijn verantwoordelijk voor een verscheidenheid van genetische ziekten. Bovendien werd een ophoping van DNA-schade in somatische cellen reeds gerelateerd aan versnelde veroudering, immuunstoornissen, cardiovasculaire en neurodegeneratieve ziekten. Tot slot kunnen genetische veranderingen in somatische cellen kanker veroorzaken wanneer ze voorkomen in proto-oncogenen of tumorsuppressorgenen (EFSA, 2011; Klaassen, 2007).

Kanker is echter een meerstapsproces dat bestaat uit initiatie, promotie en progressie. Genetische veranderingen die de initiatiefase stimuleren zijn niet altijd voldoende om kanker te veroorzaken.

Wanneer een chemische stof kanker veroorzaakt door directe schade aan het DNA toe te brengen, is de stof een genotoxisch carcinogeen. Kanker kan anderzijds ook het resultaat zijn van de werking van niet-genotoxische carcinogenen, namelijk verbindingen die geen directe schade aan het DNA berokkenen, maar wel het carcinogene proces beïnvloeden (Vinken et al., 2008).

Genotoxiciteit is een ruimer begrip dan mutageniciteit. Genotoxiciteit heeft immers betrekking tot het veroorzaken van DNA-schade in het algemeen. De meeste schade wordt correct hersteld door ingebouwde DNA-herstelsystemen bijvoorbeeld door verwijderen van beschadigde basen of direct omkeren van de chemische reactie aansprakelijk voor DNA schade (Cooper and Hausman, 2003). Bij een te grote DNA-schade zal herstel niet mogelijk zijn en zal de cel apoptose ondergaan. Het is ook mogelijk dat de cel deelt zonder herstel (replicatie met beschadigd DNA) of dat de cel het DNA op een foutieve manier herstelt en dan deelt. In beide gevallen zal de DNA schade worden doorgegeven aan de volgende generaties van cellen. Deze permanente DNA-schade wordt een mutatie genoemd.

Genotoxiciteit zal worden opgespoord aan de hand van *in vitro* en/of *in vivo* genotoxiciteitstesten. Genotoxiciteitstesten omvatten zowel mutageniciteitstesten die permanente DNA-schade opsporen als indicatorstesten (ook wel niet-specifieke genotoxiciteitstesten genoemd) die DNA-schade in het algemeen detecteren. In een regulatorische context worden de resultaten van mutageniciteitstesten gevraagd. Bij **mutageniciteitstesten** wordt er altijd gekeken naar drie eindpunten: genmutaties, structurele chromosoomaberraties en numerieke chromosoomaberraties. Eén enkele test is niet in staat om de drie eindpunten tegelijk te meten. Daarom wordt er beroep gedaan op een batterij van verschillende testen. De testbatterij bestaat meestal uit twee of drie *in vitro* testen (OECD, 2015a):

- * genmutatietest in bacteriën (Ames test) [OECD 471/480];
- * genmutatietest in zoogdiercellen [OECD 476];
- * chromosoomaberratietest [OECD 473] of micronucleustest [OECD 487].

Indien componenten in één van de *in vitro* genotoxiciteitstesten een positief resultaat geven, moeten ze verder onderzocht worden in een adequate *in vivo* opvolgingsstudie. Hierbij is het belangrijk dat *in vivo* dezelfde eindpunten worden geëvalueerd.

Indicatorstesten worden daarentegen vaak gebruikt in een screeningsfase of om meer mechanistische informatie te verkrijgen.

1.6 Het PRIMISTRA-project

Aangezien er voor bedrukt en papieren FCM geen specifieke wetgeving bestaat, kunnen deze FCM een groot aantal componenten bevatten waarvan de toxiciteit niet of onvoldoende gekend is. PRIMISTRA is een onderzoeksproject binnen het WIV-ISP (Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid - Institut Scientifique de Santé Publique) dat als doel heeft een strategie te ontwikkelen om binnen het groot aantal componenten dat kan worden verwerkt in bedrukt papier en karton FCM deze componenten te identificeren die een mogelijk risico inhouden voor de gezondheid van de mens.

Bij de aanvang van het PRIMISTRA-project werd een databank opgesteld die bestaat uit componenten die specifiek aanwezig kunnen zijn in bedrukte kartonnen en papieren FCM. De databank bevat naast algemene informatie over elke component (naam, CAS nummers (*“Chemical Abstracts Service”*), SMILES, moleculaire formule, synoniemen,...) ook de meest relevante fysicochemische gegevens. In de laatste categorie zijn vooral het aantal vrije bindingen en het aantal waterstofacceptoren en -donoren interessant omdat zij een rol kunnen spelen in toxicologische processen.

Verder staat er in de databank ook bij elke component informatie uit de meest recente versies van bovengenoemde documenten, namelijk de Europese resolutie over papier en karton, het document van ESCO, de Zwitserse verordening [SR 817.023.21] (zie 1.4.3) en de Europese verordening over kunststoffen [(EU) No 10/2011] (zie 1.4.2). De verordening over kunststoffen werd opgenomen in de databank omdat er voor deze componenten reeds een wetgeving voorhanden is.

Het resultaat is een databank van meer dan 5000 componenten, ingedeeld volgens geëvalueerd en niet-geëvalueerd. De meerderheid van de componenten behoort tot de laatste groep en werd niet (recent) geëvalueerd (>80%). Voor deze componenten dient te worden onderzocht of ze al dan niet een gevaar inhouden voor de volksgezondheid.

Aangezien het niet mogelijk is om alle toxicologische eindpunten voor de componenten te bestuderen, zal de strategie zich baseren op het mogelijk genotoxisch potentieel van de componenten. Genotoxiciteit is inderdaad een belangrijk toxicologisch eindpunt aangezien het geassocieerd is met ernstige gezondheidsproblemen en in theorie kan optreden bij eenmalige blootstelling aan lage concentraties van een stof. Het genotoxisch profiel van de componenten wordt bestudeerd aan de hand van *in silico* en *in vitro* testen. Componenten die als potentieel genotoxisch worden geïdentificeerd, zullen worden opgenomen in een analytische studie om het migratiepotentieel van de componenten vanuit de verpakking naar de voeding te evalueren.

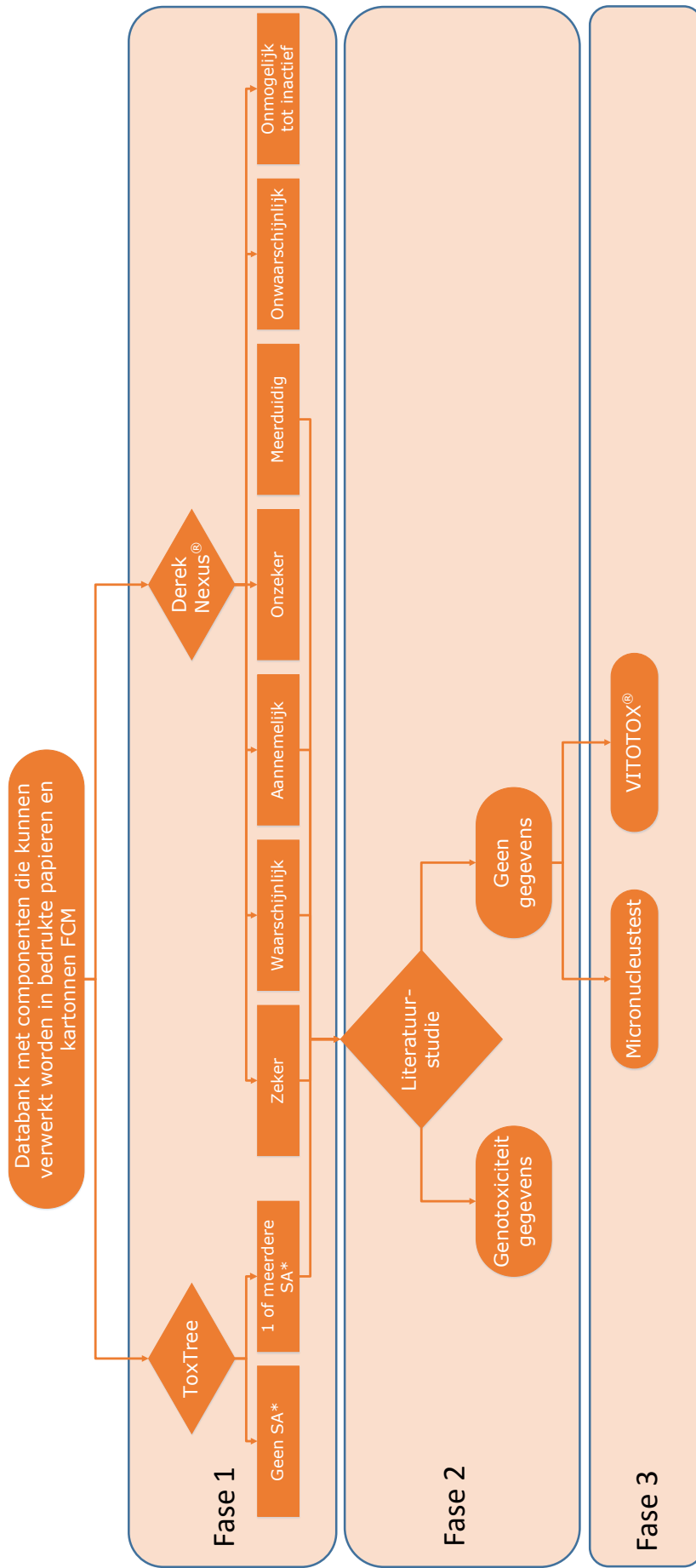
2 Doelstelling

Deze masterproef kadert binnen het PRIMISTRA-project en heeft als doel om het genotoxisch potentieel van chemische componenten die gebruikt kunnen worden in bedrukte papieren en kartonnen FCM te evalueren. De specifieke databank met componenten die aanwezig kunnen zijn in bedrukte papieren en kartonnen FCM wordt als basis voor de studie gebruikt. Gezien de korte tijdsperiode van deze masterproef, worden veertien chemische componenten geselecteerd door onderzoekers van het PRIMISTRA-project uit een lijst van componenten waarvan reeds aan de hand van twee *in silico* programma's, namelijk ToxTree en Derek Nexus™, werd aangetoond in het onthaallabo dat ze mogelijk genotoxisch zijn. Voor de geselecteerde componenten wordt de genotoxiciteit verder onderzocht. Hiervoor wordt gewerkt in drie fasen (zie Figuur 3).

In een eerste fase worden de resultaten van de *in silico* predictie met ToxTree en Derek Nexus™ geverifieerd. *In silico* testen zijn zeer geschikt om een eerste screening te maken van chemische componenten omdat deze programma's de chemische componenten gaan ontleden en op basis van verschillende structurele eigenschappen een voorspelling kunnen maken van de mogelijke toxiciteit.

Indien de component een positief resultaat geeft in beide *in silico* programma, wordt overgegaan naar fase twee: een literatuurstudie over de component. Omdat de componenten net geselecteerd zijn op hun positieve uitkomst in de *in silico* programma's, wordt verwacht dat ze allemaal verder onderzocht moeten worden. Het is echter niet mogelijk om gedurende de masterproef een uitgebreide literatuurstudie uit te voeren voor elk van de 14 componenten. Er wordt daarom gebruik gemaakt van de ECHA-databank (Europees Agentschap voor Chemicaliën) waarin de resultaten van verschillende toxiciteitsstudies werden verzameld voor duizenden chemische stoffen in het kader van REACH (*“Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals”*). Als er geen of onvoldoende gegevens over de genotoxiciteit van de component worden teruggevonden, zal de component verder worden bestudeerd in fase drie.

Fase drie bestaat uit twee verschillende *in vitro* genotoxiciteitstesten: de VITOTOX®-test en de micronucleustest. De VITOTOX®-test is een indicator-test die algemene DNA-schade detecteert. De micronucleustest is, in tegenstelling tot de VITOTOX®-test, een test die permanente DNA-schade opspoorde namelijk numerieke en structurele chromosoomaberraties. Voor de micronucleustest is er een gevalideerd protocol beschikbaar dat is opgesteld door de OECD (*“Organisation for Economic Co-operation and Development”*). De test wordt normaal uitgevoerd met primaire humane of van een ander zoogdier-afgeleide lymfocyten, *“chinese hamster ovary”* (CHO) cellen, V79, CHL/IU, L5178Y cellen of humane cellijnen zoals TK6 (OECD, 2015b). In deze masterproef wordt gekozen om de micronucleustest uit te voeren met humane cellen afgeleid van hepatocyten. De micronucleustest werd in deze celsystemen echter nog niet uitgebreid gevalideerd. De focus in deze studie is dan ook verschoven: in plaats van de chemische componenten te testen, worden verschillende micronucleustesten uitgevoerd om het protocol voor een micronucleustest met hepatocyten met automatische scoring te optimaliseren.



Figuur 3. Schema onderzoeksstrategie

3 Methodologie

3.1 Algemene principes

3.1.1 *In silico* evaluatie van het genotoxisch potentieel

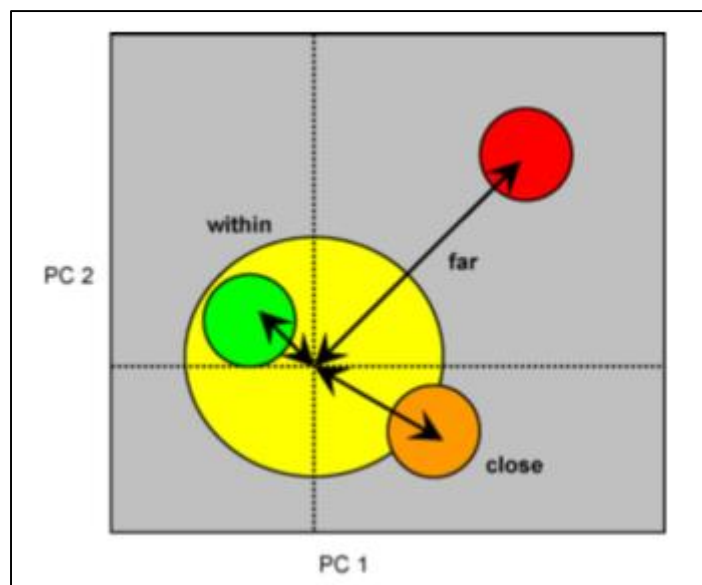
In silico betekent dat de testen worden uitgevoerd met behulp van een computerprogramma. Deze methoden worden ook wel “*non-testing methods*” genoemd wat voor verwarring kan zorgen omdat *in vitro* en *in vivo* methoden nog steeds nodig zijn om *in silico* methoden te valideren en in verdere fasen van het onderzoek (Raunio, 2011). Ten opzichte van *in vitro* en *in vivo* heeft *in silico* enkele voor- en nadelen (Tabel 3).

Tabel 3. Voor- en nadelen *in silico* methoden.

Voordelen	Nadelen
Hogere verwerkingscapaciteit	Simplistische voorstelling (meestal weinig genuanceerd resultaat)
Goedkoop, Snel	Transparantie van het programma (wat wordt er gemodelleerd?)
Grotere reproductiviteit bij gebruik van dezelfde methode	Betrouwbaarheid predictie is afhankelijk van betrouwbaarheid <i>training set</i>
Reduceren gebruik proefdieren	Negatieve predictie meestal niet mogelijk
Vragen weinig voorbereiding	

Volgens ECHA zijn er verschillende mogelijke benaderingen om *in silico* data te genereren. De methoden zijn allemaal gebaseerd op hetzelfde principe: componenten met een vergelijkbare structuur vertonen gelijkaardige biologische reacties. Een mogelijke benadering is gebaseerd op de structuur-activiteitsrelatie (SAR), waarbij de biologische activiteit van chemische stoffen wordt voorspeld a.d.h.v. hun chemische structuur (of structurele gerelateerde eigenschappen). Deze activiteit kan gelijk zijn aan die van de oorspronkelijke verbinding, maar verschillend in sterkte en ongewenste neveneffecten. Er zijn kwalitatieve (SAR) en kwantitatieve (QSAR) SAR-programma's beschikbaar. Het voornaamste verschil tussen beide analysemethoden is de mogelijkheid om een kwantitatieve bepaling uit te voeren. Een QSAR is inderdaad een mathematisch model die een kwantitatieve meting van de chemische structuur correleert met een fysische eigenschap of biologische activiteit. Het is mogelijk deze correlatie voor een groep van componenten te berekenen met statistische methodes zoals regressieanalyse (ECHA, 2008; Serafimova et al., 2010).

Een SAR-analyse is niet kwantitatief en zal enkel nagaan of bepaalde “*structural alerts*” (SA's) worden teruggevonden in de te onderzoeken component. Dit betekent dat deze SAR-programma's geen negatieve voorspellingen kunnen doen. De afwezigheid van een hazard voorspelling betekent alleen dat er geen relevante SA's werden gevonden en niet dat de chemische stof niet toxisch zou kunnen zijn (Serafimova et al., 2010). De laatste jaren is er meer erkenning gekomen voor dit probleem en daarom werd het begrip “*applicability domain*” (AD) of ‘toepassingsgebied’ geïntroduceerd. Het AD omvat descriptoren en afstanden die gebruikt worden om de gelijkenis van de te onderzoeken componenten ten opzichte van een set gekende moleculen in kaart te brengen (Weaver and Gleeson, 2008). De (Q)SAR-model “*training set*” omvat de gekende moleculen die gebruikt werden om het model te bouwen. De moleculen van de “*test set*” (= te onderzoeken componenten) die binnen de “*training set*” of AD vallen, hebben een meer betrouwbare voorspelling dan moleculen die ver buiten het AD vallen. Hoe groter de afstand tussen de moleculen en het AD, hoe minder betrouwbaar de voorspelling wordt. Een voorbeeld van een voorstelling van het AD is terug te vinden in Figuur 4. Het in rekening brengen van het AD wordt steeds vaker toegepast (Bruneau, 2001; Bruneau and McElroy, 2006; Gleeson, 2007; Rodgers et al., 2007; Sheridan et al., 2004; Todeschini et al., 2004; Xu and Gao, 2003).



Figuur 4. Een grafische illustratie van het AD in de belangrijkste component (PC) ruimte. De (Q)SAR-model "training set" wordt vertegenwoordigd door de gele cirkel. "Test set" moleculen zijn als volgt gekleurd: binnen de training ruimte (groen), dichtbij het model (oranje) en ver van het model (rood). "Test set" moleculen die ver van het AD liggen, hebben een minder betrouwbare voorspelling dan diegene die dicht bij het AD liggen. (Weaver and Gleeson, 2008)

Het principe van het AD verplicht de gebruikers om de reikwijdte van de voorgestelde modellen te respecteren. Als een onbekende verbinding buiten het gedefinieerde bereik van een bepaald model valt, wordt het buiten het AD beschouwd en is de voorspelling over de chemische activiteit/toxiciteit van de component onbetrouwbaar (Weaver and Gleeson, 2008).

In deze masterproef wordt gebruikt gemaakt van twee SAR-programma's, ToxTree en Derek Nexus™, om het genotoxisch potentieel van de componenten te evalueren. Beide programma's gaan de structuur van de chemische testcomponenten controleren op SA's ofwel moleculaire functionele groepen of (sub-)structuren die verantwoordelijk zijn voor een toxicologisch eindpunt.

ToxTree

ToxTree is een gratis beschikbare, flexibele en gebruiksvriendelijke SAR-applicatie met uitgebreide functies. De applicatie kan de toxiciteit van een chemische stof inschatten door het toepassen van een beslissingsboom. Er zijn modules om mogelijke huidirritaties, oogirritaties, carcinogeniciteit en mutageniciteit op te sporen.

In 2008 werd de Benigni-Bossa module toegevoegd om specifiek mutageniciteit en carcinogeniciteit te voorspellen. De voorspelling van carcinogeniciteit is gebaseerd op een lijst van moleculair functionele groepen die bekend zijn om hun carcinogene activiteit (SA). Als één of meerdere SA's in een moleculaire structuur wordt herkend, zal ToxTree de chemische stof als potentieel carcinogeen aanduiden (Benigni et al., 2008). Zoals eerder vermeld kunnen SAR-modellen geen negatieve predictie doen. Voor enkele moleculaire structuren is er in ToxTree een QSAR-module ingebouwd die ook toelaat om de afwezigheid van genotoxiciteit te voorspellen. Momenteel zijn de QSAR-modules nog beperkt en kunnen ze enkel voorspellingen doen over de mutagene activiteit van aromatische amines en α -onverzadigde aldehyden in *S. Typhimurium* TA 100 stam en over de carcinogene werking van aromatische amines in knaagdieren (Benigni et al., 2008).

Derek Nexus™

“*Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge*” of Derek is een commercieel computerprogramma dat onderdeel is van het grotere Nexus™ pakket en dat niet enkel gebruik maakt van meer SA's' dan ToxTree maar bovendien gebaseerd is op de kennis van experts. Het programma wordt ondersteund door voorbeelden uit de literatuur.

Zoals eerder vermeld berust *in silico* analyse vaak op de hypothese dat gelijkaardige componenten gelijkaardige biologische reacties hebben. Derek Nexus™ gebruikt een literatuurdatabase om de voorspelling beter te ondersteunen. De data worden verzameld, gecontroleerd en geverifieerd door wetenschappers voordat ze worden gebruikt om nieuwe kennisregels en relaties te ontwikkelen. Deze regels en relaties zijn gebaseerd op empirische observaties die worden ondersteund door een goed begrip van de toxiciteitsmechanismen of door interne uitgebreide controleprocessen. Het is ook mogelijk om de voorspellingen te vergelijken met een zelf aangelegde databank. Derek Nexus™ geeft ook een meer genuanceerde voorspelling van de waarschijnlijkheid van de toxische eigenschappen van een stof. Hiervoor gebruikt het programma verschillende graden: zeker, waarschijnlijk, aannemelijk, onzeker, meerduidelijk, onwaarschijnlijk tot onmogelijk en inactief. De module Derek Nexus™ kan worden aangewend om voorspellingen te doen voor volgende toxicologische eindpunten: carcinogeniciteit, genotoxiciteit, irritatie, neurotoxiciteit, orgaan toxiciteit, reproductietoxiciteit, respiratoire en huidsensitisatie en een aparte categorie andere eindpunten waaronder oestrogeniciteit en fototoxiciteit vallen. De verschillende eindpunten zijn op hun beurt onderverdeeld in subcategorieën. Voor genotoxiciteit zijn er drie subcategorieën, namelijk chromosoomschade, mutageniciteit en niet-specifieke genotoxiciteit met voor elke subcategorie de mogelijkheid tot *in vitro* en *in vivo* voorspellingen (Lhasa limited, 2015).

3.1.2 Literatuurstudie

Indien een component zowel in ToxTree als in Derek Nexus™ als mogelijk genotoxisch wordt aangeduid, wordt een literatuurstudie over de genotoxiciteit van de component uitgevoerd. In deze masterproef zal de literatuurstudie echter beperkt zijn tot het verzamelen van de genotoxiciteitsgegevens (*in vitro* en *in vivo* data) die beschikbaar zijn op de ECHA website. ECHA verzamelt in een databank die gratis toegankelijk is op de website gegevens uit de dossiers die worden ingediend voor de registratie van chemische componenten in het kader van de REACH verordening [1907/2006] (EC, 2006). De databank bevat niet alleen toxiciteitsgegevens, maar ook informatie rond classificatie en labelling en richtlijnen omtrent het veilig gebruik van de chemische stoffen. Voor stoffen die in grotere hoeveelheden worden geproduceerd of geïmporteerd, moeten meer gegevens worden verschaft. Informatie over genotoxiciteit moet steeds ter beschikking worden gesteld, wat niet het geval is voor bijvoorbeeld carcinogeniciteitsgegevens.

Ondanks het feit dat de ECHA website een belangrijke bron is van informatie, moet er toch met enige voorzichtigheid met de gegevens worden omgegaan. Ten eerste wordt de informatie niet door ECHA geverifieerd voor het verspreiden ervan aangezien het de firma is die de interpretatie van de toxiciteitsgegevens verschaft. ECHA controleert maar 5% van alle dossiers terwijl alle resultaten op de ECHA website gepubliceerd worden. Deze “*compliance check*” controleert enkel of de nodige gegevens in het dossier zijn opgenomen en controleert niet of de studies correct uitgevoerd zijn (ECHA, 2015). Daarnaast is de ECHA database dynamisch waarbij het aantal substanties waarvoor informatie beschikbaar is toeneemt in functie van de tijd (ECHA, 2015; Van Hoeck et al., 2014).

3.1.3 In vitro genotoxiciteitstesten

Voor het evalueren van de genotoxiciteit moet er gebruik worden gemaakt van een batterij van *in vitro* testen in plaats van één enkele test. Deze testbatterij is noodzakelijk om de verschillende genotoxische eindpunten (genmutaties, structurele en numerieke chromosoomaberraties) te bestuderen. Vroeger werd doorgaans gestart met drie *in vitro* mutageniciteitstesten (Ames test, *in vitro* genmutatietest in zoogdiercellen en *in vitro* micronucleus- of chromosoomaberratietest).

In verschillende regulatorische contexten worden de drie testen nu gereduceerd tot twee, namelijk de Ames test en de *in vitro* micronucleustest.

Aangezien in de huidige studie een screening wordt uitgevoerd naar de genotoxiciteit van de geselecteerde componenten, zal worden gewerkt met de VITOTOX[®]-test in plaats van de Ames test. In tegenstelling tot de Ames test, detecteert de VITOTOX[®]-test geen mutaties maar DNA-schade. Bijgevolg worden de resultaten van de test momenteel niet aanvaard in een regulatorische context (OECD, 2015a). De VITOTOX[®]-test heeft echter wel een belangrijke waarde in het screenen van componenten voor genotoxiciteit (Westerink et al., 2009). De test is namelijk zeer snel uit te voeren en vereist slechts een kleine hoeveelheid van de testcomponent. Bovendien vertoont de VITOTOX[®]-test een goede correlatie met de Ames test.

De VITOTOX[®]-test zal worden uitgevoerd in combinatie met de *in vitro* micronucleustest. Hierdoor kan er reeds een vrij volledig beeld worden verkregen over de mogelijke genotoxiciteit van de componenten.

VITOTOX[®]-test

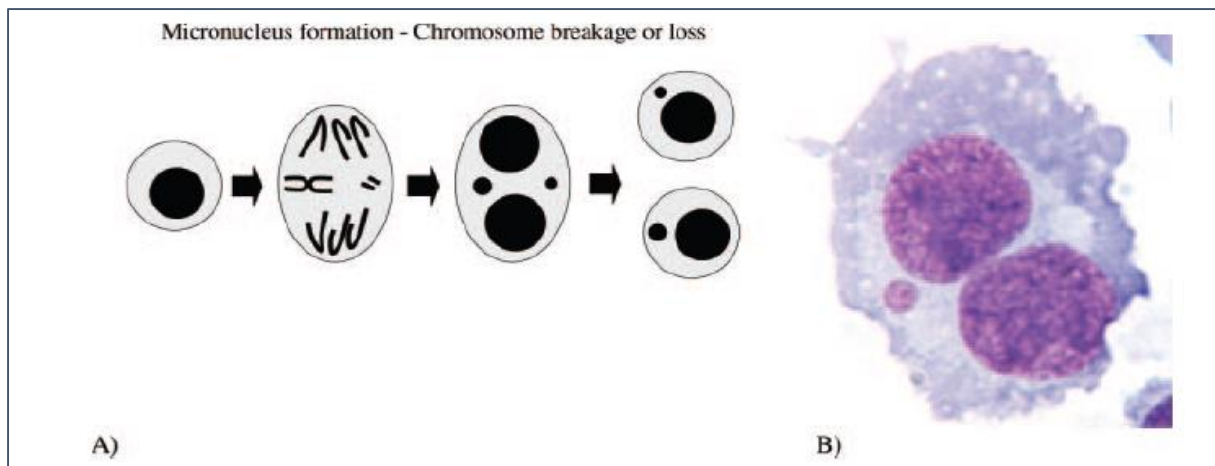
De VITOTOX[®]-test is een bacteriële genotoxiciteitstest gebaseerd op bioluminescentie. Voor de test wordt gebruik gemaakt van twee bacteriestammen, beide afgeleid van de Amesstam TA104 (*Salmonella Typhimurium*). De eigenschappen van deze bacteriestam zijn goed gekend aangezien de stam ook wordt gebruikt in de klassieke Ames test.

De twee bacteriestammen die worden aangewend zijn genetisch gemanipuleerd en bevatten het lux-operon van de mariene natuurlijk bioluminescerende bacterie *Vibrio fischeri*. Bij één stam, de genox stam, staat dit reporter lux-gen onder controle van het RecN-gen, dat zelf deel uitmaakt van het SOS-systeem. Bij contact met een genotoxisch product, wordt het RecN-gen geactiveerd, waardoor ook het lux-operon tot expressie komt en er licht wordt geproduceerd. De andere stam, de cytox stam, bevat het promotorloze lux-gen. Indien de lichtproductie bij deze bacterie onder invloed van blootstelling aan een stof afneemt, wijst dit op een toxisch effect. In het geval de lichtproductie toeneemt, wijst dat op een directe stimulatie van het lux-gen zonder activatie van het SOS-systeem (en eventueel dus op een vals positief resultaat). De luminescentie in deze stam geeft een goed beeld van de “achtergrond” invloed van de stof op het lux-gen. Door de lichtproductie van de twee bacteriën bij blootstelling aan de teststof te vergelijken, kunnen dus zowel toxische als genotoxische eigenschappen van deze teststof worden bestudeerd.

De stammen worden blootgesteld aan de teststof in aan- en afwezigheid van een exogeen metabool activatiesysteem S9 (metaboliserend rattenleverpreparaat). Hierdoor kan ook het toxisch en/of genotoxisch effect bestudeerd worden van eventueel gevormde metaboliëten van de stof. De lichtproductie in beide stammen wordt gedurende de blootstellingstijd van 4 uur simultaan gemeten met een luminometer. Via geschikte software wordt de verhouding tussen de lichtproductie van beiden bepaald en kan de inductie van het SOS repair systeem worden berekend, rekening houdend met spontane afname en/of afname door toxiciteit van de teststof (Verschaeve, 2013).

Micronucleustest

De micronucleustest is een cytogenetische *in vivo* test die ook *in vitro* kan worden uitgevoerd. De test detecteert zowel structurele als numerieke chromosoomaberraties. Een micronucleus (MN) wordt gevormd tijdens de mitose en ontstaat uit een geheel achterblijvend chromosoom (aneugen) of uit een chromosoomfragment dat loskwam na een breuk (clastogen) en niet mee is gemigreerd naar de polen (Figuur 5). Tijdens de telofase vormt zich een nucleaire envelop rondom de chromosomen en fragmenten waarna deze zich ontwinden. Een MN ziet eruit als een gewone celkern maar dan kleiner (Verschaeve, 2012).



Figuur 5. (A) Schematische voorstelling van het ontstaan van micronucleus uit een geheel chromosoom of uit een chromosoomfragment. (B) Microscopisch beeld van een mitogeen gestimuleerde cytokinese-geblokkeerde lymfocyt met één micronucleus (Bonassi et al., 2007).

De micronucleustest wordt normaal uitgevoerd in overeenstemming met de OECD richtlijn no. 487 voor het testen van chemische componenten. De standaard gebruikte cellijnen zijn primaire humane of van een ander zoogdier-afgeleide lymfocyten, CHO cellen, V79, CHL/IU, L5178Y cellen of humane cellijnen zoals TK6 (OECD, 2015b). Ook andere cellijnen zoals HT29, Caco-2, HepaRG, HepG2 cellen, A549 en primaire cellen van embryo's van Syrische Hamsters kunnen worden gebruikt. De micronucleustest werd in deze celsystemen echter nog niet uitgebreid gevalideerd. In deze masterproef wordt gekozen om de micronucleustest uit te voeren met humane cellen afgeleid van hepatocyten, namelijk HepG2 cellen. De reden hiervoor is dat hepatocyten in staat zouden zijn om chemische stoffen zelfstandig te metaboliseren waardoor het gebruik van externe cofactoren, zoals S9, kan worden vermeden (Gad, 2009; Stich and San, 2012). Dit is een groot voordeel ten opzichte van andere cellijnen omdat S9 soms een te lage enzymactiviteit heeft en zo niet alle metabolieten vormt. De mogelijk genotoxische werking van een stof wordt dan niet gedetecteerd. (Brandon et al., 2003).

De biotransformatie-capaciteit van HepG2 cellen is echter omstreden (Le Hégarat, 2014). Er wordt daarom in de masterproef geopteerd om de testen uit te voeren zowel in aan- als afwezigheid van S9. Vanwege de mogelijke toxiciteit van S9 worden de cellen er maar kort (3 tot 6 uur) aan blootgesteld. Het is belangrijk dat de verhouding chemische component en S9 in evenwicht is: er moet voldoende S9 aanwezig zijn om de chemische component te metaboliseren maar de gebruikte hoeveelheid mag niet cytotoxisch zijn. Over het gebruik van hepatocyten in de micronucleustest zijn er echter nog maar weinig gegevens terug te vinden waardoor het noodzakelijk is om onder verschillende condities te testen.

De vorming van MN kan enkel plaatsvinden indien de cel een deling heeft ondergaan. Het is dus belangrijk om de cellen in deling te kunnen onderscheiden van cellen in rust. Om cellen die één deling hebben ondergaan te kunnen onderscheiden van cellen die geen deling hebben ondergaan, wordt cytochalasine B (Cyt-B) gebruikt. Cyt-B zorgt ervoor dat de vorming van de microfilamentaire ring gestopt wordt omdat het de actinepolymerisatie inhibeert en dus cytokinese blokkeert (24 tot 48 uur). Het cytoplasma tussen de twee dochternuclei van de delende cel wordt niet vernauwd en kan dus niet afgesplitst worden. De cel blijft in een binucleair stadium (Carter, 1967). Binucleaire cellen die een celdeling hebben ondergaan zullen bijgevolg kunnen worden onderscheiden van de mononucleaire cellen die geen deling hebben ondergaan.

Een nadeel van Cyt-B is de kans op interferentie tussen Cyt-B en de chemische stof of tussen Cyt-B en andere inhibitoren van cytokinese. Er moet ook rekening gehouden worden met de cytotoxiciteit van Cyt-B: deze wisselt tussen celtypes en zelfs tussen subtypes van hetzelfde celtype.

Een MN wordt gevormd na een celdeling. Een toxische stof kan cellen vernietigen nog voor ze het binucleair stadium bereiken. Alleen gezonde cellen zullen delen wat zal leiden tot een onderschatting van het effect of zelfs vals negatieve resultaten. Daarom is het belangrijk om de celproliferatie en de celdood (apoptose en necrose) te evalueren. Celproliferatie moet bepaald worden in zowel de behandelde als controle celculturen. Dit kan door de "*cytokinesis-block proliferate index*" (CBPI) te bepalen die rekening houdt met Cyt-B (Vergelijking 2). Om een betrouwbaar resultaat te bekomen moeten minstens 500 cellen geteld worden (Surralles et al., 1995).

$$CBPI = \frac{(1 * \#mononucleaire\ cellen + 2 * \#binucleairen + 3 * \#tri - en\ tetranucleaire)}{totaal\ \#cellen}$$

Vergelijking 2. Cytokinesis-block proliferatie index (CBPI) (Kirsch-Volders et al., 2003)

MN kunnen met behulp van beeldanalysesystemen automatisch opgespoord worden zodat de test op grotere schaal uitgevoerd kan worden. Nadelen van de test zijn dat enkel acentrische fragmenten gedetecteerd worden en dat er een celdeling nodig is voor uitdrukking van MN.

4 Materiaal en methoden

4.1 Bacteriën

De bacteriestammen, *S. Typhimurium* TA104 (*RecN2-4*) (genox) en TA104 *pr1* (cytox), zijn afkomstig van Gentaur (Kampenhout, België). De bacteriën worden bewaard bij -80°C en tot cultuur gebracht in een rijk medium. Het rijk medium bestaat uit Lennox L Broth Base (LB Broth Base) (Invitrogen™, Life technologies™, Paisley, Schotland), D-glucose (Janssen Chimica, Geel) en CaCl₂·2H₂O (Merck, Darmstadt, Duitsland). Om ongewenste bacteriegroei te voorkomen, worden ook twee soorten antibiotica toegevoegd: ampiciline 8 mg/ml (Sigma-Aldrich® Chemie, München, Duitsland) en tetracycline 0,8 mg/ml (Sigma-Aldrich® Chemie). Voor de uiteindelijke bacteriesuspensie, worden de bacteriën overgebracht naar een arm medium. Dit medium bestaat uit LB Broth base, D-glucose, CaCl₂·2H₂O en NaCl. De samenstelling van beide media verschilt in de hoeveelheid LB Broth base (10 gram en 1 gram in respectievelijk rijk en arm medium) en de toevoeging van NaCl.

4.2 Cellen

Er wordt gebruikt gemaakt van HepG2 cellen (humane cellen afkomstig van een hepatocarcinoom). De cellijn is afgeleid van hepatocyten en zou in staat moeten zijn om chemische componenten te metaboliseren zonder S9, een exogeen metabool activatiesysteem. HepG2 cellen zijn adherente cellen met een epitheliale morfologie. Ze secreteren verschillende plasmaproteïnes zoals fibrinogeen, plasminogeen en albumine. De groei van de cellen kan gestimuleerd worden met humaan groeihormoon (hGH).

HepG2 cellen worden aangekocht bij ATCC (American tissue cell cultures; LGC standards, Molsheim, Frankrijk) en zijn afkomstig van HepG2 HB-8065™ collectie. De cellen worden bewaard in vloeibare stikstof en gecultiveerd in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) gecomplementeerd met foetaal runderserum, glutamax®, pyruvaat, niet-essentiële aminozuren, en als antimicrobiotica gentamicine en fungizone. Alle componenten voor het medium zijn afkomstig van Gibco® (Life technologies™). Voor de culturen wordt gebruikt gemaakt van 75 cm²-cultuurflessen (Cellstar®, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Duitsland).

4.3 Chemische stoffen

De veertien teststoffen [1,10-fenantroline ≥99%, 2-chlooraceetamide ≥98%, 7-diethylamino-4-methylcoumarin 99%, furfural 99%, 1-(methylamino)antrachinon 98%, 2-nitrotolueen ≥99%, 4-nitrotolueen 99%, 2-methyl-4-isothiazoline-3-on 95%, soedaan III ≥85%, soedaan IV ≥80%, ethyltolueen-4-sulfonaat 98%, 5-aminosalicylzuur ≥99%, 4,4'-oxydianiline 97%, en 4,4'-diaminodifenylnmethaan ≥97%] zijn aangekocht bij Sigma-Aldrich® Chemie. Als positieve controlestoffen worden benzo(a)pyreen (B(a)P), aflatoxine-B1 (Afl-B1), methylmethaansulfonaat (MMS), cyclofosfamide (CP) en 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) gebruikt. Ook deze stoffen worden aangekocht bij Sigma-Aldrich® Chemie.

4.4 *In silico*-programma's

Gezien de korte tijdspanne van deze masterproef, werden veertien chemische componenten geselecteerd door onderzoekers van het PRIMISTRA-project. Die stoffen zijn allen afkomstig uit de lijst van niet-geëvalueerde componenten en worden getest met *in silico* programma's ToxTree (versie 2.6.6) en Derek Nexus™ (versie 2.0.0).

De analyses voor de veertien componenten in ToxTree zijn gebaseerd op de "*carcinogenicity rulebase*" met de Beningi-Bossa module. De module doet een voorspelling op basis van een lijst met moleculair functionele groepen die bekend zijn om hun carcinogene activiteit (SA).

Als één of meerdere SA's in een moleculaire structuur wordt herkend, zal ToxTree de chemische stof als potentieel carcinogeen aanduiden. Als er een SA wordt herkend voor aromatische amines of $\alpha\beta$ -onverzadigde aldehyden kan de component ook door de overeenkomstige QSAR-module geanalyseerd worden (Benigni et al., 2008).

Aan de hand van de SMILES (“*Simplified molecular-input line-entry system*”) van elke component, kan ToxTree drie mogelijke uitkomsten geven: geen alerts voor carcinogene activiteit, SA voor genotoxische carcinogeniteit en SA voor non-genotoxische carcinogeniteit. Indien er een SA wordt teruggevonden, wordt de component als positief beschouwd.

In Derek Nexus™ worden de componenten getest op SA's voor verschillende toxicologische eindpunten. Voor genotoxiciteit wordt er getest op drie verschillende eindpunten, namelijk mutageniteit (*in vitro* en *in vivo*), chromosoomschade (*in vitro* en *in vivo*) en niet-specifieke genotoxiciteit (*in vitro* en *in vivo*). Onder mutageniteit wordt in dit geval enkel de genmutaties verstaan. Voor elke component worden de SMILES ingegeven. Het programma gebruikt verschillende graden om een voorspelling te doen van mogelijke toxiciteit: zeker, waarschijnlijk, mogelijk, onzeker, meerduidig, onwaarschijnlijk tot onmogelijk en inactief. Indien een component minstens de aanduiding meerduidig krijgt voor één van de twee eindpunten, wordt hij als positief beschouwd.

4.5 Literatuurstudie: ECHA website

Per component wordt nagegaan of deze al geregistreerd is in het kader van de REACH verordening. Daarna wordt er gekeken naar de informatie die beschikbaar is over *in vitro* en *in vivo* genotoxiciteit. De studies op de ECHA website zijn gerangschikt volgens betrouwbaarheid. De meest betrouwbare studies krijgen een score 1, de minst betrouwbare 4. Enkel studies met een betrouwbaarheidsscore van 1 (betrouwbaar zonder beperking) en 2 (betrouwbaar met beperking) worden gebruikt. De studies worden ook nog onderverdeeld in “*key studies*” en “*supporting studies*”. Hier wordt enkel gekeken naar de resultaten van de “*key studies*”. Indien er in de “*key studies*” met score 1 en 2 positieve resultaten van *in vitro* experimenten worden teruggevonden, wordt er gekeken of er een adequate *in vivo* opvolgingstest is uitgevoerd. Als die test een negatief resultaat geeft, is de component niet genotoxisch en dus negatief. Als de *in vivo* test een positief resultaat geeft, is de component mogelijk genotoxisch en wordt hij als positief beschouwd.

4.6 *In vitro* genotoxiciteits- en cytotoxiciteitstesten

4.6.1 VITOTOX®-test

Om de testculturen voor te bereiden, wordt aan 24 ml rijk medium (gecomplementeerd met ampicilline en tetracycline) 100 μ l stocksuspensie (genox of cytox stam) toegevoegd en gedurende 16 uur overnacht geïncubeerd in een warmwaterbad (36°C) met schudfunctie (300 slagen/minuut (Clifton, Groot-Britannië)). De volgende dag wordt 160 μ l van die overnachtculturen samen met 20 ml arm medium nog eens gedurende 1 uur geïncubeerd in het warmwaterbad (werkcultuur). De benodigde bacteriesuspensie voor de test worden uiteindelijk bereid door 350 μ l van de werkculturen toe te voegen aan een mengsel bestaande uit arm medium en S9-mix. De juiste verhoudingen zijn weergegeven in Tabel 4. De S9-mix bestaat dan weer uit 1,1 ml reagens AB, 1 ml arm medium en 53 μ l S9.

Tabel 4. Samenstelling bacteriesuspensies

	CYTOX	CYTOX + S9	GENOX	GENOX + S9
Arm medium	3,150 ml	2,150 ml	3,150 ml	2,150 ml
S9-mix		1 ml		1 ml
Bacterie werkcultuur	350 μ l	350 μ l	350 μ l	350 μ l

Voor elk van de veertien testcomponenten wordt een verdunningsreeks aangemaakt in een 96-well plaat. De verschillende componenten worden allemaal eerst getest voor 3 verschillende concentraties: 0,01 mM, 0,1 mM en 1mM. De eerste test geeft een indicatie in welk bereik er verder getest kan worden om mogelijke genotoxiciteit te detecteren. Indien er bij 1 mM geen cytotoxiciteit wordt waargenomen, kan er bij een hogere concentratie getest worden op voorwaarde dat de component oplosbaar is. Elke stof werd minstens in twee verschillende onafhankelijke VITOTOX®-testen getest.

Tabel 5. Testconcentraties van de veertien testcomponenten.

Code	Testcomponent	Testconcentraties (mM)
C1	1,10-Fenantroline	0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,1; 1
C2	2-Chlooracetamide	0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1
C3	Furfural	0,01; 0,1; 0,5; 1; 2; 5
C4	4-Nitrotolueen	0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1
C5	1-(Methylamino)antrachinon	0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2
C6	2-Nitrotolueen	0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1
C7	2-Methyl-4-isothiazoline-3-on	0,00021; 0,00054; 0,0008; 0,001; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,1; 1
C8	Ethyl-tolueen-4-sulfonaat	0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 1
C9	Soedaan IV	0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,5; 1
C10	Soedaan III	0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1
C11	5-Aminosalicylzuur	0,01; 0,1; 1; 2
C12	7-Diethylamino-4-methylcoumarin	0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1
C13	4,4'-Diamino-difenylmethaan	0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 1
C14	4,4'-Oxydianiline	0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1

De testcomponenten zijn allemaal opgelost in 100% DMSO en worden verdund tot er maximaal 1% DMSO aanwezig is in de oplossingen die op de bacteriën worden gebracht (Bijlage 2). Er worden ook twee positieve controles meegenomen: 4NQO is de controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de controle in aanwezigheid van S9. Van elke concentratie van de verdunningsreeks wordt in een zwarte 96-well plaat 10 µl toegevoegd aan 90 µl bacteriesuspensie.

De zwarte 96-well plaat wordt in een luminometer (GloMax®, Promega Benelux b.v., Leiden, Nederland) geplaatst en de lichtproductie in elke well wordt gedurende 4 uur gemeten. De integratietijd van elke well bedraagt één seconde. Als elke well gemeten is, wat één cyclus voorstelt, is er een interval van vijf minuten vooraleer de tweede cyclus wordt gestart.

Voor elke testconditie wordt de "Signal/Noise" (S/N) verhouding automatisch berekend voor beide stammen: dit is de verhouding tussen het signaal gemeten voor de teststof en het signaal gemeten voor de (solvent)controles. De maximale S/N verhouding die wordt gedetecteerd in de genox stam tussen 120 en 240 minuten wordt per component uitgezet in functie van de blootstellingsconcentratie om de concentratie-effect relatie te kunnen beoordelen.

De genox/cytox ratio wordt eveneens berekend. Dit is de ratio tussen de S/N verhouding van de genox stam en de overeenkomstige verhouding van de cytox stam. De maximale genox/cytox ratio wordt nadien voor elke component uitgezet in functie van de concentratie. Ook de minimale S/N tussen 120 en 240 minuten wordt berekend om het toxisch effect te bepalen.

Een component wordt pas genotoxisch beschouwd als voldaan is aan volgende criteria :

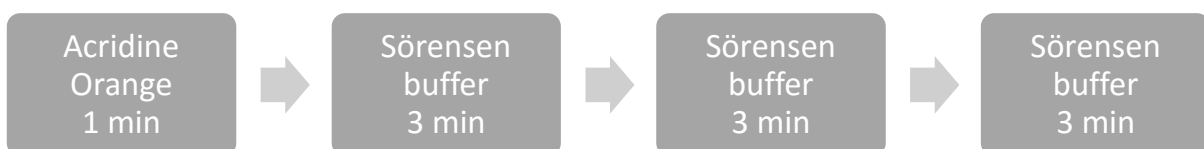
- * De maximale S/N verhouding van de genox stam moet een concentratieafhankelijk effect vertonen bij minstens drie opeenvolgende concentraties;
- * De maximale S/N verhouding in de genox stam en de maximale genox/cytox ratio moet bij minstens twee testconcentraties boven de waarde 1,5 komen;
- * De maximale S/N verhouding van de genox stam moet groter zijn dan 1;
- * Enkel resultaten vanaf 120 minuten worden gebruikt omdat de SOS respons pas start na 20 minuten;
- * Er is geen inductie van beide stammen tegelijk (Verschaeve, 2013).

4.6.2 Micronucleustest

In het onthaallaboratorium is reeds een protocol beschikbaar voor het uitvoeren van de micronucleustest in C3A cellen. De C3A cellen zijn afgeleid van de HepG2 cellen, maar zijn zodanig behandeld dat ze over een betere cytochroom P450 enzymstelsel (Cyp 450) werking zouden beschikken (Busuttill and Klintmalm, 2014). Het protocol kan als volgt worden samengevat. De cellen worden uitgezaaid in een 24-well plaat en vervolgens overnacht in een incubator (37°C, 5% CO₂) geplaatst. De cellen worden dan gedurende 24 uur behandeld met de teststof. Na de behandeling met de teststof wordt Cyt-B toegevoegd.

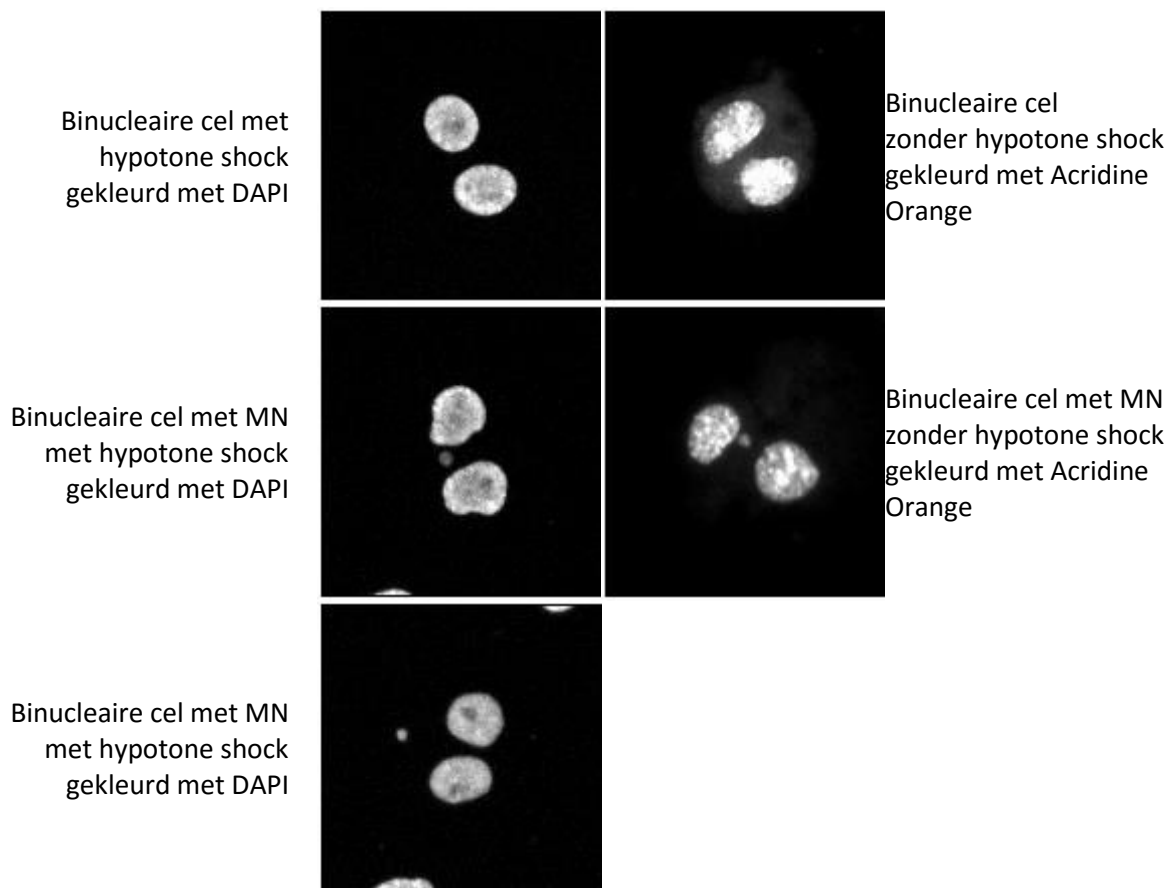
Het Cyt-B wordt verwijderd, de cellen worden getrypsiniseerd en vervolgens gefixeerd met een methanol:azijnzuuroplossing (3:1 v/v). Aan een deel van de cellen wordt vóór de fixatiestap een 0,75 mM KCl oplossing toegevoegd zodat een hypotone shock optreedt. Dit zorgt ervoor dat de kernen opzwellen waardoor ze gemakkelijker automatisch kunnen gescoord worden. Omdat het cytoplasma verdwijnt door de hypotone shock, wordt het enkel toegepast op een deel van de cellen. Zo blijven er nog cellen over om de CBPI te bepalen. Na fixatie worden de cellen overnacht bewaard bij een temperatuur van -20°C alvorens ze op microscoopglasjes te brengen. De cellen zonder hypotone shock worden gekleurd met een Acridine Orange (Invitrogen™, Waltham, USA) oplossing en de cellen met hypotone shock met DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindole) in Vectashield®. DAPI is een kleurstof die bindt aan het DNA en zorgt voor het uitzenden van fluorescentie (Vector Laboratories Inc, 2015). De kernen en MN zullen dus zichtbaar zijn wanneer een fluorescentiefilter van de microscoop gebruikt wordt. Een nadeel van de DAPI kleuring is dat het cytoplasma van de cellen niet zichtbaar is. Dit maakt het soms moeilijk om in te schatten of een MN tot een bepaalde cel behoort, in het bijzonder wanneer de cellen een hypotone shock hebben ondergaan.

De cellen zonder hypotone shock worden gekleurd met Acridine Orange volgens het schema in Figuur 6. Het voordeel bij deze kleuring is dat zowel het cytoplasma als het DNA gekleurd wordt. Zodat per cel kan nagekeken worden hoeveel nuclei en MN er aanwezig zijn. De Acridine Orange kleuring wordt vooral gebruikt om de CBPI te bepalen en om eventueel manueel na te kijken of het aantal MN per 2000 cellen juist geanalyseerd is.



Figuur 6. Schema Acridine Orange kleuring.

De cellen met hypotone shock vertonen mooi egaal gekleurde nuclei en MN waardoor ze geschikt zijn voor automatische scoring. Binucleaire cellen zonder hypotone shock en gekleurd met Acridine Orange hebben daarentegen een minder egale vorm. Bovendien heeft de microscoop moeite om alle beelden scherp te krijgen door het gekleurde cytoplasma (Figuur 7). Automatische scoring van deze cellen is daardoor niet mogelijk.



Figuur 7. Voorbeelden van automatische scoring van MN met Acridine Orange en DAPI kleuringen.

Er worden minstens 2000 cellen per conditie (indien er voldoende cellen aanwezig zijn) geanalyseerd op de aanwezigheid van MN. De scoring van MN gebeurt automatisch met gepaste software (Metafer4 versie 3.9.0) gekoppeld aan een microscoop (Zeiss axio imager Z2). De gedetecteerde MN worden vervolgens manueel geverifieerd. De parameters voor de detectie van binucleairen met MN zijn vastgelegd volgens de criteria van Kirsch-Volders: de MN moeten een diameter hebben die niet groter is dan één derde van de hoofdnuclei, de MN moeten duidelijk te onderscheiden zijn van de hoofdnuclei en de MN moeten hetzelfde gekleurd zijn als de hoofdnuclei (Kirsch-Volders et al., 2003).

Hoewel er reeds grote vooruitgang werd geboekt met de optimalisatie van de automatische scoring, worden in sommige micronucleustesten toch nog steeds onvoldoende binucleaire cellen per conditie teruggevonden. Recent werd bovendien ook vastgesteld dat het huidige protocol niet in staat is om de chromosoomschade geïnduceerd door Afl-B1 te detecteren. Afl-B1 is een genotoxische en carcinogene component die de transversie induceert van G naar T in codon 249 van het p53 tumorsuppressorgen. Afl-B1 heeft het Cyp 450 systeem nodig om zijn metabolieten te vormen die interageren met DNA. De activatie van Afl-B1 gebeurt in de humane lever door de iso-enzymen Cyp 1A2 en 3A4.

Het protocol wordt daarom in de huidige studie verder aangepast met een tweeledig doel:

- * Het optimaliseren van de automatische scoring.
- * Het detecteren van Afl-B1 en andere componenten die metabole activatie vereisen.

Het protocol wordt aangepast op basis van literatuur- en experimentele gegevens. Aangezien er voor de C3A cellen nagenoeg geen gegevens beschikbaar zijn in de literatuur, wordt voor het optimaliseren van het protocol in de huidige studie overgeschakeld op HepG2 cellen.

Er worden in totaal dertien onafhankelijke micronucleustesten uitgevoerd waarbij onderstaande parameters of een combinatie van onderstaande parameters worden onderzocht. Een gedetailleerd protocol van elke van deze testen is beschikbaar in bijlage 9.7.

A. De testcomponent: type component en blootstellingsduur

Er worden naast Afl-B1 nog twee andere componenten bestudeerd die metabole activatie vereisen namelijk B(a)P en CP (Garriott et al., 2002; Lioni et al., 2014). B(a)P is een polycyclisch aromatisch koolwaterstof (PAK) dat wordt geoxideerd door CYP1A1 tot metabolieten die breuken veroorzaken in het DNA. Hierdoor wordt er een stuk van het chromosoom losgekoppeld en wordt een MN gevormd (Sigma-Aldrich®, 2015). CP wordt net zoals Afl-B1 gemetaboliseerd door het Cyp 450 systeem. CP is inactief en wordt geactiveerd door metabolisatie (Marinello et al., 1984).

De **blootstellingstijd** aan de component is ook een belangrijke parameter. De cellen moeten immers lang genoeg blootgesteld worden zodat een mogelijk positief effect van een component gedetecteerd kan worden. Het is bij een onbekende component echter moeilijk om de juiste blootstellingstijd te bepalen (Lorge et al., 2006). Indien de test wordt uitgevoerd met S9, is de maximale blootstellingstijd 6 uur (OECD, 2015b). Bij een langere blootstellingstijd zal S9 te toxic zijn voor de cellen. Er wordt daarom gewerkt met een blootstellingstijd van 4 uur voor de testen met en zonder S9. Chemische componenten die geen metabolisatie nodig hebben en dus geen S9 vereisen, kunnen eventueel langer blootgesteld worden aan de cellen. Er zijn testen uitgevoerd met 4 uur en 24 uur blootstelling.

Er kan ook een herstelperiode worden ingevoerd na de blootstelling aan de testcomponent alvorens de cellen bloot te stellen aan Cyt-B. De cellen worden dan gedurende een bepaalde tijd blootgesteld aan milieu met serum. Een herstelperiode zou de kwaliteit van de cellen verbeteren waardoor de automatische scoring beter verloopt.

B. Aantal uitgezaaide cellen

Het aantal cellen dat uitgezaaid wordt bij het begin van de test is belangrijk. Vermits HepG2 cellen beschikken over contactinhibitie, kan een teveel aan cellen ervoor zorgen dat de cellen vroegtijdig stoppen met delen. Nog voor de testcomponent toegevoegd kan worden, 24 uur na uitzaaien, kan het dus zijn dat er al veel celsterfte is in één well.

Anderzijds mogen er ook niet te weinig cellen uitgezaaid worden. Indien er te weinig cellen uitgezaaid worden, zullen er onvoldoende cellen zijn op het einde van de micronucleustest en automatische scoring onmogelijk wordt.

C. Type multiwellplaat

Het type multiwellplaat kan een invloed hebben op het aantal en de toestand van de cellen en daarom moet de invloed van deze parameter verder worden onderzocht.

In het onthaallaboratorium wordt de micronucleustest meestal uitgevoerd in een 24-well plaat. De voornaamste reden hiervoor is dat een 24-well plaat gemakkelijk te hanteren is en dat er meerdere condities simultaan in 1 plaat kunnen worden getest. De gebruikte volumes van de verschillende componenten liggen ook lager waardoor er met kleinere hoeveelheden S9 en testcomponenten kan worden gewerkt. Een nadeel van de 24-well plaat is echter dat de oppervlakte per well beperkt is. In een well met een grotere oppervlakte (6-well plaat) hebben de cellen meer ruimte om te groeien en zullen er bijgevolg meer cellen kunnen worden gecollecteerd. Dit kan ook een invloed hebben op de kwaliteit van de cellen. De ruimte is voor HepG2 cellen bovendien extra belangrijk omdat ze over contactinhibitie beschikken: de cellen stoppen met groeien als ze tegen een andere cel aan komen te liggen. De micronucleustest wordt daarom uitgevoerd in drie verschillende multiwellplaten: 24-, 12- en 6-well platen.

D. Samenstelling van de testoplossingen

Alle teststoffen zijn opgelost in DMSO en het percentage DMSO dat op de cellen terechtkomt, kan een invloed hebben op de celgroei. Het is belangrijk voor de micronucleustest dat de cellen groeien omdat een MN pas gevormd wordt wanneer een cel deelt. In het basisprotocol worden de testcomponenten zodanig verdund dat er 1% DMSO in de oplossing zit waaraan de cellen worden blootgesteld. Om zeker te zijn dat dit geen invloed heeft op de celgroei, wordt de test ook uitgevoerd met een eindconcentratie van 0,5 % DMSO.

Ook de samenstelling van het milieu wordt aangepast. In een andere cellijn werd aangetoond dat het foetaal runderserum dat wordt gebruikt in het milieu een remmende invloed kan uitoefenen op de celproliferatie (Ma et al., 2009). Het is dus mogelijk dat ook bij de hepatocyten een soortgelijk effect optreedt. Er wordt voor de korte blootstelling aan de testcomponent milieu zonder serum gebruikt om de cellen niet meer stress te geven dan nodig is.

E. Cytochalasine B: concentratie en blootstellingsduur

De concentratie Cyt-B die nodig is om de cellen te blokkeren in het binucleair stadium is afhankelijk van het celtype (Choy, 2001; OECD, 2015b). Het is belangrijk om de juiste concentratie Cyt-B te bepalen voor HepG2 cellen omdat er anders meer vals positieve resultaten optreden. Als de concentratie Cyt-B te laag is, kan het aantal MN bij binucleaire cellen verhoogd zijn. De verhoging is te wijten aan het feit dat onbeschadigde cellen delen voor Cyt-B de cytokinese kan blokkeren. Er zijn dus meer mononucleaire terug te vinden waardoor de verhouding MN op het aantal binucleaire hoger wordt (Surrallés et al., 1992). Een te hoge concentratie Cyt-B leidt dan weer tot DNA fragmentatie. De kleine DNA fragmenten die dan als MN aanzien worden, zijn niet veroorzaakt door het genotoxisch effect van de testcomponent maar door Cyt-B. In het basisprotocol wordt 5 µg/ml Cyt-B gebruikt.

Uit literatuuronderzoek is echter gebleken dat dit misschien een te hoge concentratie is voor hepatocyten. In de meeste experimenten met HepG2 wordt 3 tot 4 µg/ml Cyt-B gebruikt (Chequer et al., 2009; Ehrlich et al., 2002; Lioni et al., 2014). Daarom wordt de micronucleustest ook uitgevoerd met 4 µg/ml Cyt-B.

De blootstellingsduur aan Cyt-B bepaalt mee het aantal binucleaire die gebruikt kunnen worden in de analyse. Hoe meer tijd de cellen hebben om te delen, hoe meer cellen geblokkeerd kunnen worden in het binucleair stadium. Om die reden zijn de experimenten uitgevoerd met verschillende blootstellingsperiodes aan Cyt-B. Er kan na blootstelling aan Cyt-B ook een herstelperiode worden ingevoerd. In het basisprotocol worden de cellen meteen geïncubeerd na de Cyt-B blootstelling. Als de cellen kunnen recupereren voor ze geïncubeerd worden, zou de kwaliteit veel beter zijn ((Lioni et al., 2014)). Daarom wordt de test ook uitgevoerd met een herstelperiode van één uur. Dit wil zeggen dat na de Cyt-B blootstelling het medium met Cyt-B wordt verwijderd en medium met serum wordt toegevoegd.

F. De metaboliserende fractie, S9 mix

Reagens AB wordt aan S9 toegevoegd om het te activeren. De initiële stockoplossing van de S9-mix wordt op dezelfde manier bereid als in de VITOTOX®-test: 1,1 ml reagens AB, 1 ml milieu en 53 µl S9. Dit betekent dat de stockoplossing 2,5% S9 bevat. De stockoplossing wordt vervolgens zodanig verdund in milieu dat de cellen aan 1% S9 worden blootgesteld.

Het is mogelijk dat de verhoudingen van de S9-mix niet in balans zijn omdat de kans bestaat dat er te veel milieu vervangen is door een hoeveelheid AB reagens. Daarom wordt een nieuwe stockoplossing gemaakt met 10% S9. Op deze manier moet de S9-mix meer verdund worden in milieu en blijft de hoeveelheid AB reagens beperkt. De nieuwe S9 mix wordt bereid door 1 ml milieu zonder serum en 1,1 ml reagens AB toe te voegen aan 0,212 ml S9. Ook deze stockoplossing wordt verdund tot 1% S9.

Het is mogelijk dat een concentratie van 1% S9 onvoldoende is om metabolisatie van een component te verzekeren. De mogelijk genotoxische werking van een stof wordt dan niet gedetecteerd. Om zeker te zijn dat chemische componenten die metabolisatie vereisen voor ze genotoxische effecten kunnen uitoefenen ook effectief worden omgezet, wordt de test ook uitgevoerd met een hogere concentratie aan S9. Hiervoor wordt de 10% stockoplossing 5 maal verdund zodat de cellen aan 2% S9 worden blootgesteld.

Statistische verwerking van de resultaten van de micronucleustest

Voor de statistische verwerking van de resultaten worden de tabellen van Kastenbaum en Bowman gebruikt. Met de tabellen wordt bepaald of de frequentie van het aantal MN na toevoegen van de teststof statistisch significant verschillend is van de frequentie in de onbehandelde controles (Kastenbaum and Bowman, 1970).

5 Resultaten

5.1 *In silico* programma's

5.1.1 *ToxTree*

De veertien componenten vertonen allemaal een SA voor genotoxische carcinogeniciteit wanneer de "carcinogenicity rulebase" met de Beningi-Bossa module wordt toegepast. Een voorbeeld van de beslissingsboom achter de Beningi-Bossa module is terug te vinden in bijlage 8.4. Er wordt ook onderzocht of de componenten wel behoren tot het AD van ToxTree (zie bijlage 9.3). Hiervoor wordt samengewerkt met een labo in Duitsland dat beschikt over de geschikte software (ChemProp). Alle testcomponenten behoren tot het AD van ToxTree.

Voor zes van de veertien componenten geeft ook de QSAR-module een positief resultaat (Tabel 6).

Tabel 6. Overzicht resultaten ToxTree.

Code	Genotoxische Carcinogeniciteit	Niet-genotoxisch Carcinogeniciteit
C1	Positief	Negatief
C2	Positief	Negatief
C3	Positief	Negatief
C4	Positief	Negatief
C5	Positief (QSAR mogelijk)	Negatief
C6	Positief	Negatief
C7	Positief	Negatief
C8	Positief	Positief
C9	Positief (QSAR mogelijk)	Negatief
C10	Positief (QSAR mogelijk)	Negatief
C11	Positief	Negatief
C12	Positief (QSAR mogelijk)	Negatief
C13	Positief (QSAR mogelijk)	Negatief
C14	Positief (QSAR mogelijk)	Negatief

5.1.2 Derek Nexus™

Zoals eerder vermeld (zie 4.4) gebruikt Derek Nexus™ verschillende graden om een voorspelling te maken van mogelijke toxiciteit: zeker, waarschijnlijk, mogelijk, onzeker, meerduidig, onwaarschijnlijk tot onmogelijk en inactief. Indien een component minstens de aanduiding meerduidig krijgt voor één van de twee eindpunten (*in vitro* en/of *in vivo*), wordt hij als positief beschouwd. Dit is het geval voor alle veertien testcomponenten (Tabel 7).

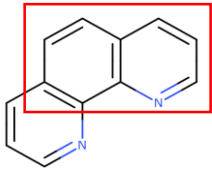
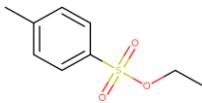
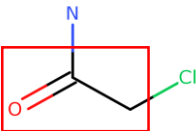
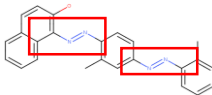
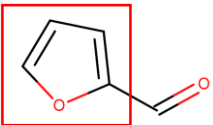
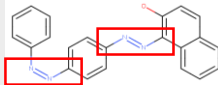
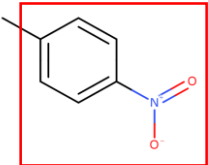
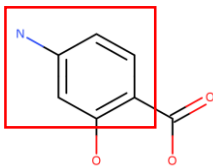
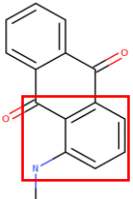
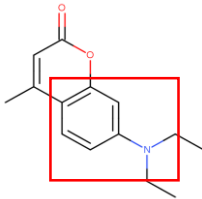
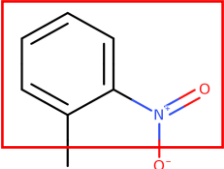
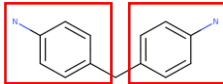
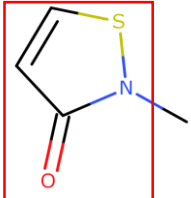
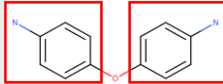
Tabel 7. Overzicht resultaten Derek Nexus™.

Code	Mutageniciteit*		Chromosoomschade	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
C1	Aannemelijk	Aannemelijk	Aannemelijk	-
C2	Inactief	-	Aannemelijk	-
C3	Meerduidig	-	Zeker/ Waarschijnlijk	-
C4	Aannemelijk	-	Meerduidig	Meerduidig
C5	Aannemelijk	-	-	-
C6	Aannemelijk	-	Meerduidig	Meerduidig
C7	Inactief	-	Zeker/ Waarschijnlijk	-
C8	Aannemelijk	-	Aannemelijk	Aannemelijk
C9	Aannemelijk	-	-	-
C10	Aannemelijk	-	-	-
C11	Aannemelijk	-	-	-
C12	Aannemelijk	-	-	-
C13	Meerduidig	-	Aannemelijk	-
C14	Aannemelijk	-	-	-

*mutageniciteit = enkel genmutaties

In Tabel 8 wordt een overzicht gegeven van de chemische structuren en de onderdelen die voor een SA zorgen.

Tabel 8. Chemische structuur die verantwoordelijk kan zijn voor de SA in Derek Nexus™.

Code	Structuur	SA	Code	Structuur	SA
C1		Azaphenanthrene Quinoline	C8		Alkylating agent
C2		Alpha halo carbonyl component	C9		Aromatic azo compound
C3		Furan	C10		Aromatic azo compound
C4		Aromatic nitro compound	C11		Aromatic amine or amide
C5		Aromatic amine or amide	C12		Aromatic amine or amide
C6		Aromatic nitro compound	C13		Aromatic amine or amide
C7		Isothiazolinone Methylisothiazolinone	C14		Aromatic amine or amide

5.2 Literatuurstudie

Voor zeven van de veertien testcomponenten worden gegevens teruggevonden op de ECHA website. 2-chlooraceetamide (C2), furfural (C3), 4-nitrotolueen (C4), 2-nitrotolueen (C6), 4,4'-diaminodifenylnmethaan (C13) en 4,4'-oxydianiline (C14) geven een positief resultaat voor minstens één *in vitro* genotoxiciteitstest (Tabel 9). Indien er een positief resultaat is voor de *in vitro* test, wordt er gekeken naar de adequate *in vivo* opvolgingstest.

Voor 2-chlooraceetamide (C2) en furfural (C3) geeft de *in vivo* test een negatief resultaat en bijgevolg zijn de componenten niet-genotoxisch op basis van de gegevens van de ECHA website. Bij 4-nitrotolueen (C4) worden er op de ECHA website tegenstrijdige resultaten voor de *in vivo* opvolgstudies teruggevonden. Het is dus moeilijk te bepalen of de component al dan niet genotoxisch is. 2-nitrotolueen (C6) geeft een positief *in vivo* resultaat voor niet-specifieke genotoxiciteit. Omdat dit onvoldoende is om te concluderen of de component ook effectief genotoxisch is, zijn er ook hier meer *in vivo* opvolgstudies nodig.

Er zijn maar twee componenten die als genotoxisch worden beschouwd op basis van de gegevens op de ECHA website. 4,4'-diaminodifenylnmethaan geeft zowel *in vitro* en *in vivo* een zwak positief genotoxisch effect. Voor 4,4'-oxydianiline is er een duidelijk positief resultaat *in vitro* en in de adequate *in vivo* opvolgstudies.

5-aminosalicylzuur is de enige component die met zekerheid als negatief kan worden beschouwd. Er is immers een negatief resultaat voor drie verschillen *in vitro* testen.

Tabel 9. Resultaten literatuurstudie (+ = positief, - = negatief, / = geen gegevens) (ECHA website, laatst geconsulteerd 24/02/2015).

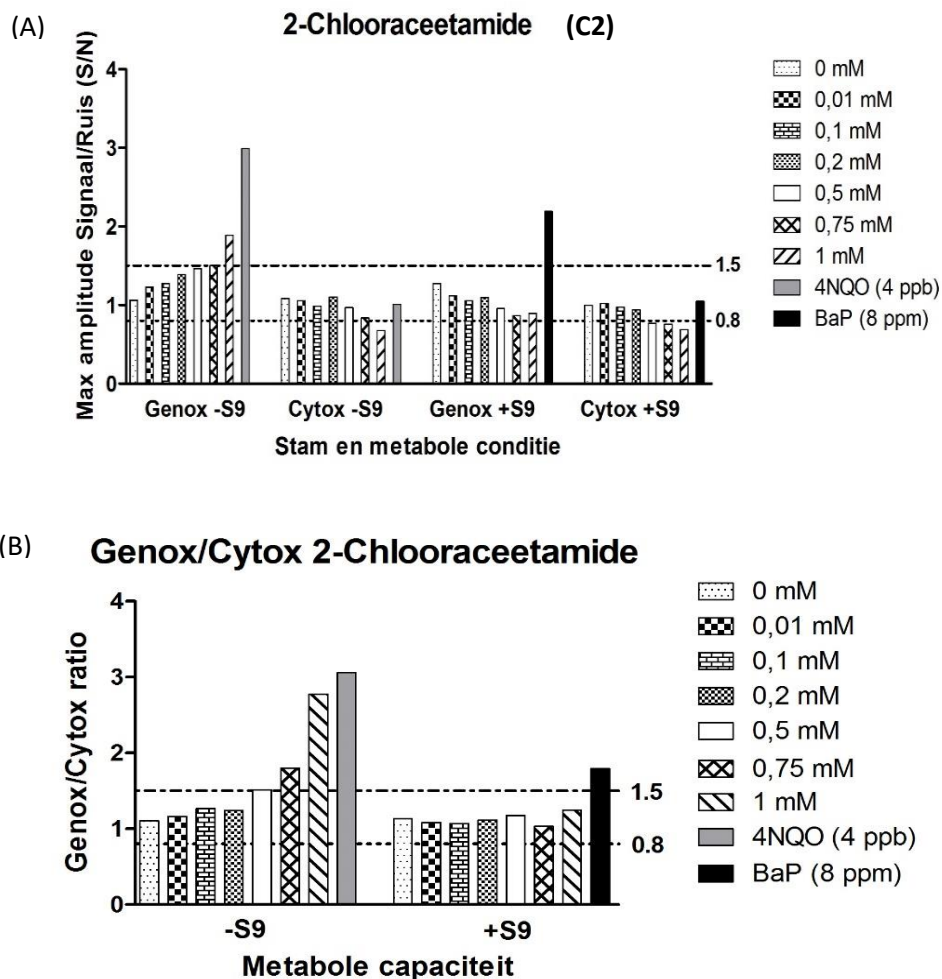
Code	<i>In vitro</i> genotoxiciteitstest			<i>In vivo</i> genotoxiciteitstest		
	Gen-mutatie	Chromosoomschade	Niet-specifieke genotoxiciteit	Gen-mutatie	Chromosoomschade	Niet-specifieke genotoxiciteit
C1	/	/	/	/	/	/
C2	-	+	/	/	-	-
C3	+	+	+	-	/	-
C4	+ met S9	+ met S9	/	+	-	+
C5	/	/	/	/	/	/
C6	-	+	/	/	/	+
C7	/	/	/	/	/	/
C8	/	/	/	/	/	/
C9	/	/	/	/	/	/
C10	/	/	/	/	/	/
C11	-	-	/	/	/	/
C12	/	/	/	/	/	/
C13	+	/	/	/	±	-
C14	+	+	+	/	+	-

5.3 *In vitro* testen

5.3.1 VITOTOX[®]-test

De positieve controlestoffen, 4NQO en B(a)P, voldoen in alle uitgevoerde testen aan de criteria voor genotoxiciteit. Er zijn twee componenten die een mogelijk positief resultaat geven in de VITOTOX[®]-test, namelijk 2-chlooraceetamide (C2) en soedaan IV (C9). De component 2-chlooraceetamide (C2) vertoont in de genox stam in afwezigheid van S9 een concentratieafhankelijke stijging in de maximale S/N verhoudingen. Bij de hoogste concentratie (1 mM) stijgt de maximale S/N verhouding boven de drempelwaarde van 1,5.

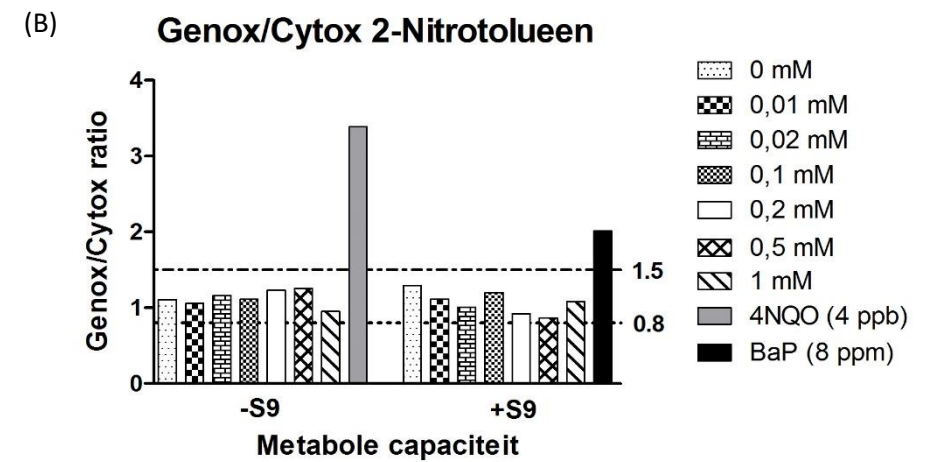
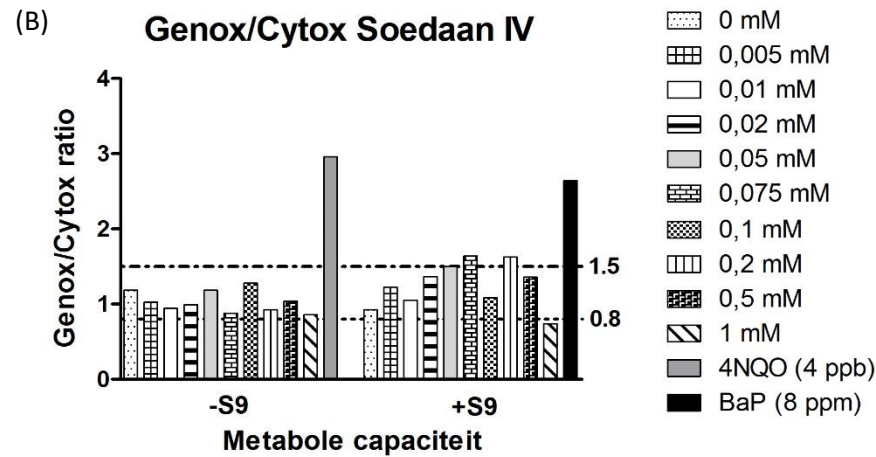
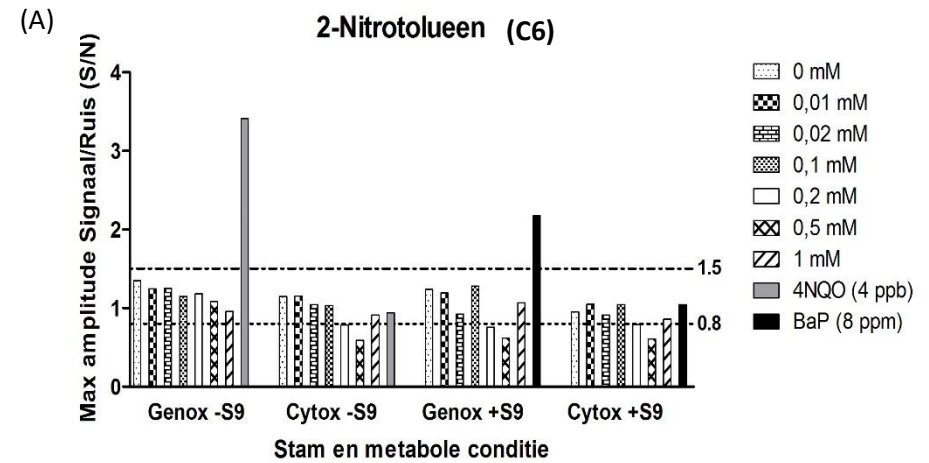
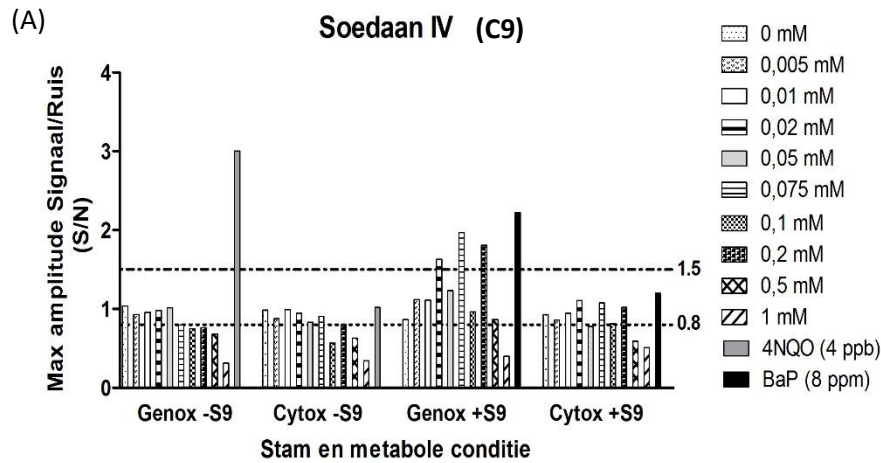
Bij deze hoogste concentratie treedt echter ook een licht cytotoxisch effect op aangezien de minimale S/N verhouding in de cytox stam lager is dan 0,8. Ook bij de maximale genox/cytox ratio wordt er een stijging waargenomen in functie van de concentratie in afwezigheid van S9 (Figuur 8). Bij de drie hoogste concentraties (0,5 mM, 0,75mM en 1 mM) wordt de drempelwaarde van 1.5 overschreden. In aanwezigheid van S9 wordt geen concentratieafhankelijke stijging waargenomen, noch in de maximale S/N verhoudingen die worden gedetecteerd in de genox stam, noch in de maximale genox/cytox ratio's. Hoewel niet aan alle criteria voor een positief resultaat in de VITOTOX®-test is voldaan, wijzen de resultaten toch op een genotoxisch effect van 2-chlooracetamide in afwezigheid van S9.



Figuur 8. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 2-Chlooracetamide gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytox ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 2-Chlooracetamide. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

Bij Soedaan IV (C9) treedt er een stijging van de maximale S/N verhoudingen in de genox stam en van de maximale genox/cytox ratio's op maar enkel in aanwezigheid van S9. De stijging is echter niet volledig concentratieafhankelijk aangezien voor sommige concentraties (0.05 en 0.5 mM) lagere waarden worden gedetecteerd. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat de concentraties in verschillende experimenten worden getest. Eerst zijn 0,01 mM, 0,1 mM en 1 mM getest. De hoogste concentratie, 1 mM, is duidelijk cytotoxisch. Daarom worden in de twee volgende onafhankelijke experimenten lagere concentraties getest namelijk 0,005 mM, 0,02 mM, 0,05 mM, 0,075 mM, 0,2 mM en 0,5 mM (Figuur 10). Soedaan IV voldoet niet aan alle criteria voor een positief resultaat, maar op basis van dit resultaat wordt de genotoxiciteit van Soedaan IV toch best verder onderzocht.

Alle andere componenten geven een negatief resultaat (bijlage 9.5). Als voorbeeld van een negatief resultaat wordt 2-nitrotolueen (C6) besproken. 2-nitrotolueen (C6) vertoont voor geen enkele concentratie een maximale S/N verhouding in de genox stam of een maximale genox/cytox hoger dan 1,5. Er is niet bij een hogere concentratie getest omdat 0,5 mM en 1 mM al cytotoxische concentraties zijn: de maximale S/N verhouding bedraagt 0,8 of minder (Figuur 9).



Figuur 10. (A) Maximale S/N ratio's in functie van Soedaan IV gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van Soedaan IV. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

Figuur 9. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 2-Nitrotolueen gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 2-Nitrotolueen. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

5.3.2 Micronucleustest

De cellen worden regelmatig getest op eventuele aanwezigheid mycoplasma infecties. Er wordt geen besmetting teruggevonden (zie bijlage 9.2).

- A. Invloed van de blootstellingsduur aan de testcomponent en het aantal uitgezaaide cellen (24-well platen)

De micronucleustest wordt eerst uitgevoerd in een 24-well plaat volgens het bestaand protocol met een aantal wijzigingen. Er wordt nu gebruik gemaakt van HepG2 cellen in plaats van C3A cellen. Bovendien wordt de test uitgevoerd in aanwezigheid van S9 metaboliserende fractie (1%) omdat er onduidelijkheid bestaat over de metabole capaciteit van de HepG2 cellen. De blootstellingsduur aan de testcomponent wordt daarom beperkt tot 4 uur (micronucleustest 1). Een tweede experiment verloopt volledig analoog met dit verschil dat er na de blootstelling aan de testcomponent een herstelperiode wordt ingevoerd van 20 uur alvorens Cyt-B toe te dienen (micronucleustest 2). In een derde experiment wordt er bij aanvang van de micronucleustest een groter aantal cellen uitgezaaid per well (300 000/well in plaats van 200 000/well). Deze test wordt enkel uitgevoerd met de negatieve controles en één concentratie aan Afl-B1 (micronucleustest 3).

Tabel 10. Vergelijking blootstellingsduur en aantal uitgezaaide cellen (NA = 'not analyzed' – niet geanalyseerd, / = te toxic, * = significant verschillend ten opzichte van de negatieve controle volgens de tabellen van Kastenbaum en Bowman met $p < 0.05$).

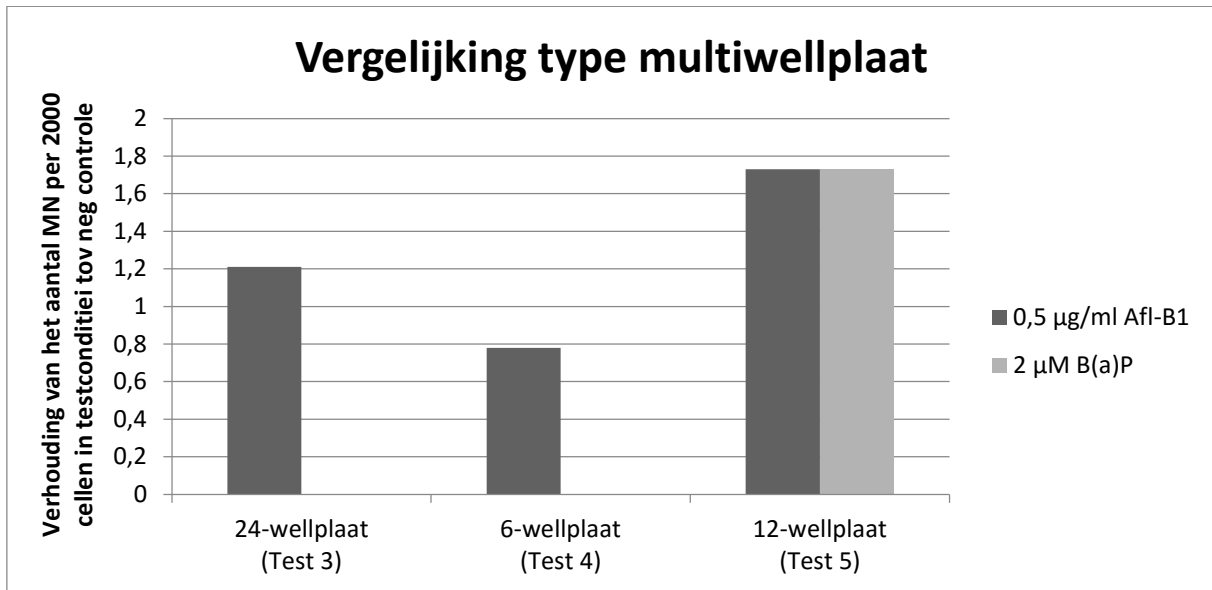
Component	Concentratie	Aantal binucleaire cellen			Aantal MN / 2000 cellen		
		Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3
- Controle		560	1086	3142	18	26	19
Afl-B1	0,25 µg/ml	406	879	NA	49	36	NA
Afl-B1	0,5 µg/ml	576	46	1040	28	/	23
Afl-B1	1 µg/ml	228	49	NA	96*	/	NA
Afl-B1	2 µg/ml	156	/	NA	90*	/	NA
Afl-B1	4 µg/ml	27	/	NA	/	/	NA
B(a)P	1 µg/ml	950	1194	NA	29	27	NA
B(a)P	2 µg/ml	393	2057	NA	25	30	NA
B(a)P	10 µg/ml	822	1156	NA	34	24	NA
B(a)P	20 µg/ml	177	247	NA	23	8	NA
B(a)P	40 µg/ml	462	/	NA	17	/	NA

In de eerste micronucleustest wordt er een significante stijging waargenomen in het aantal MN bij blootstelling van de cellen aan 1 en 2 µg/ml Afl-B1. Er moet hierbij echter worden opgemerkt dat het aantal binucleaire cellen dat kan worden gescoord zeer laag is namelijk 228 en 156. Idealiter moet de aanwezigheid van MN in minimaal 2000 binucleaire cellen worden geëvalueerd. Bij de andere twee experimenten wordt geen verhoging van het aantal MN waargenomen bij blootstelling aan Afl-B1. Er moet wel opgemerkt worden dat onder de condities van micronucleustest 2, namelijk het invoeren van een herstelperiode na blootstelling aan de testcomponent, enkel de resultaten van de laagste concentratie Afl-B1 kunnen worden gebruikt, aangezien de andere concentraties te toxic zijn. B(a)P vertoont geen positief resultaat, noch in micronucleustest 1, noch in micronucleustest 2.

Bij de drie experimenten uitgevoerd in de 24-wellplaten wordt echter steeds na het verwijderen van het medium en het toevoegen van de testcomponenten een zone in de wells waargenomen waar geen cellen meer groeien. De opvallende cirkelvormige zone wordt ook wel omschreven als het halo effect. Omdat dit effect meer uitgesproken is in wells met een klein oppervlakte, wordt de test herhaald met een 12- en een 6-well plaat.

B. Type multiwellplaat

Door het optreden van het halo effect wordt het protocol van micronucleustest 3 herhaald in een 6-wellplaat (micronucleustest 4) en een 12-well plaat (micronucleustest 5). De resultaten worden weergegeven in Figuur 11.



Figuur 11. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende types multiwellplaten.

Figuur 11 illustreert dat er bij gebruik van een 6-wellplaat geen verandering wordt waargenomen in het aantal MN na blootstelling aan Afl-B1 in een concentratie van 0.5 µg/ml. Bij gebruik van een 12-well plaat treedt er wel een stijging op in het aantal MN, zowel na blootstelling aan Afl-B1 als aan B(a)P. De stijging is echter voor geen van de testcomponenten statistisch significant.

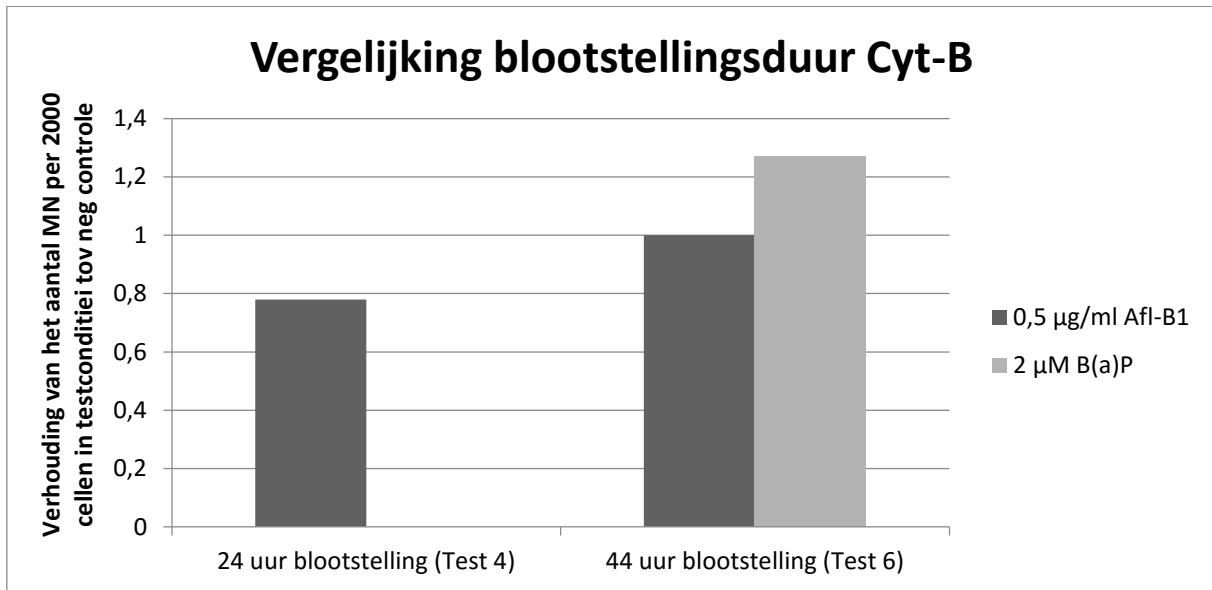
Het aantal en de conditie van de binucleaire cellen van de 6-, 12- en 24-wellplaat worden ook vergeleken en er wordt bepaald welke multiwellplaat de meeste cellen oplevert in de beste conditie om automatisch te scoren. Bij de automatische scoring van de cellen afkomstig van de experimenten uitgevoerd in een 12-wellplaat worden er op één draagglasje ongeveer tussen 1500 en 2000 binucleaire cellen teruggevonden (Tabel 11). Dit aantal ligt lager bij de draagglasjes afkomstig van een experiment in een 6-wellplaat. Zelfs indien er twee draagglasjes worden gescoord, wordt de streefwaarde van 2000 binucleaire cellen niet gehaald voor Afl-B1. De binucleaire cellen afkomstig van het experiment met de 6-wellplaat leveren echter betere beelden op bij de automatisch scoring en daarom wordt verder gewerkt met de 6-wellplaten. Als het protocol op punt staat, is het eventueel wel mogelijk om de test verder te optimaliseren in platen met kleinere wells. Dit laat namelijk toe om meerdere concentraties en componenten tegelijk te testen en kleinere volumes te gebruiken.

Tabel 11. Vergelijking type multiwellplaat (NA = 'not analyzed' – niet geanalyseerd).

Component	Concentratie	Aantal binucleaire cellen		
		Test 3	Test 4	Test 5
- Control		3142	4214	1917
Afl-B1	0,5 µg/ml	1040	710	1440
B(a)P	2 µM	NA	NA	2084

C. Invloed van de blootstellingsduur aan Cyt-B (6-wellplaten)

In micronucleustest 6 wordt nagegaan of bij het verlengen van de blootstellingstijd aan Cyt-B (44 uur in plaats van 24 uur) Afl-B1 en B(a)P een stijging veroorzaken in het aantal MN. De resultaten worden weergegeven in Figuur 12.

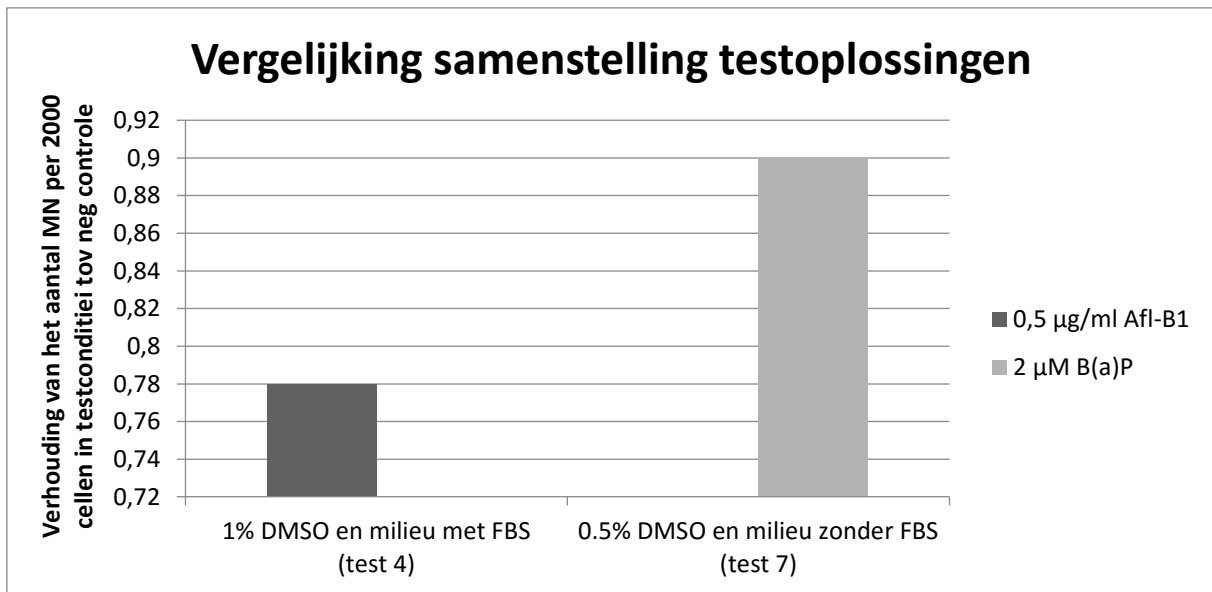


Figuur 12. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende blootstellingstijden aan Cyt-B.

Figuur 12 illustreert dat ook bij een verlengende blootstellingsduur aan Cyt-B geen genotoxisch effect wordt waargenomen van Afl-B1 en B(a)P. Er kan ook worden opgemerkt dat na een verlengde blootstellingsduur aan Cyt-B er meer MN worden waargenomen in de negatieve controlecondities, namelijk 60/2000 (micronucleustest 6) ten opzichte van 18/2000 (micronucleustest 4).

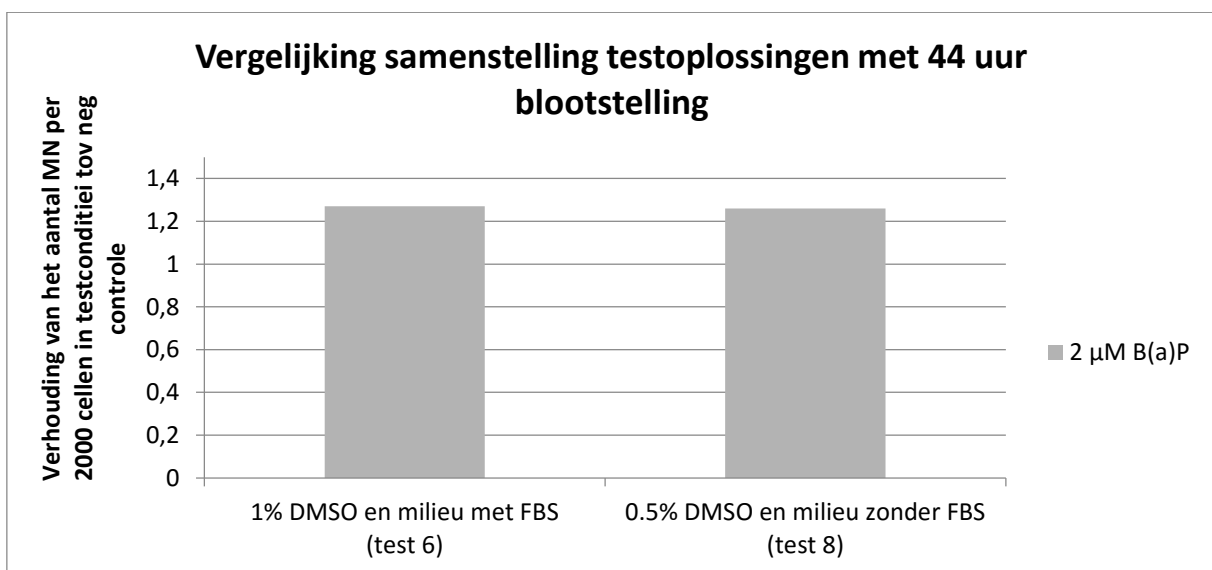
D. Samenstelling van de testoplossing (6-wellplaten)

In de volgende micronucleustest (micronucleustest 7) wordt onderzocht of een aanpassing van de samenstelling van de testoplossing toelaat om componenten die metabole activatie vereisen te detecteren. In vergelijking met micronucleustest 4, wordt er een kleinere hoeveelheid DMSO toegevoegd (eindconcentratie 0,5 in plaats van 1%) en de testoplossing wordt ook in milieu zonder serum bereid. De concentratie aan Afl-B1 wordt daarnaast verhoogd tot 2,5 en 5 µg/ml en er wordt ook één concentratie van B(a)P getest namelijk 2 µM. De concentraties aan Afl-B1 zijn echter te toxisch (CPBI bij 2,5 µg/ml bedraagt 1,17 en 1,15 bij 5 µg/ml ten opzichte van 1,70 in de negatieve controle) en bijgevolg kan niet worden bepaald of Afl-B1 een stijging in het aantal MN induceert. De concentratie B(a)P is niet te toxisch (CPBI bedraagt 1,67) maar vertoont ook geen genotoxisch effect.



Figuur 13. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende samenstellingen van de testoplossingen.

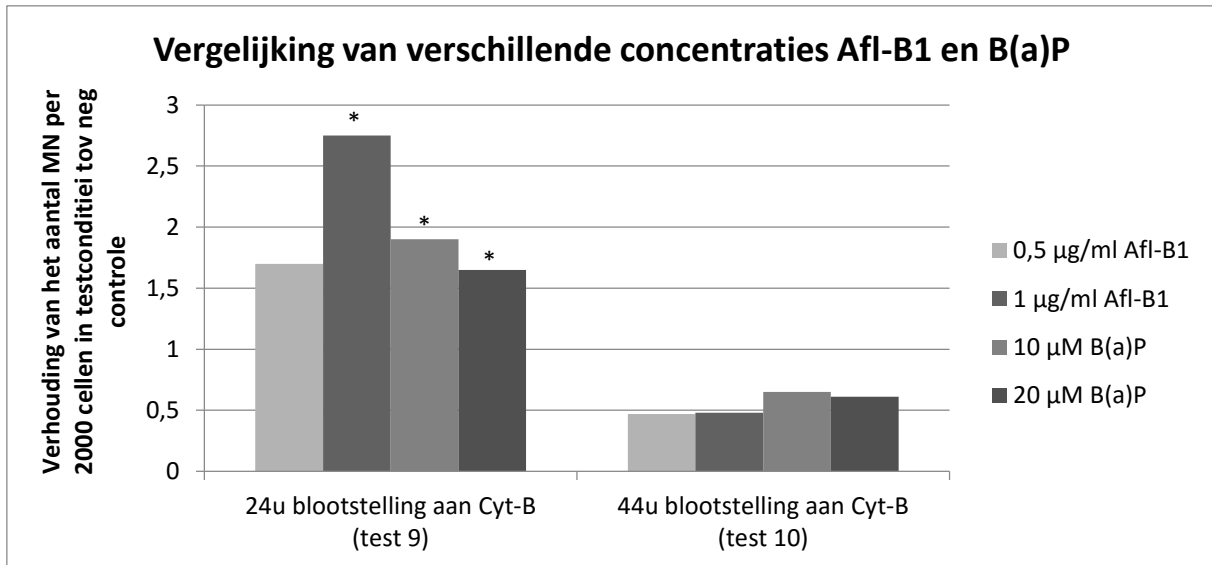
In micronucleustest 8 wordt hetzelfde protocol als in micronucleustest 7 toegepast, maar nu met 44 uur blootstelling aan Cyt-B (5 µg/ml). Ook in deze condities zijn de concentraties van Afl-B1 te toxic. De CPBI bedraagt 1,25 bij 2,5 µg/ml Afl-B1 en 1,15 bij 5 µg/ml Afl-B1 ten opzichte van 1,85 in de negatieve controle. Bij de blootstelling aan 2 µM B(a)P wordt geen statistisch significante verhoging in het aantal MN waargenomen.



Figuur 14. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende samenstellingen van de testoplossingen met een blootstellingsperiode van 44 uur.

E. De concentratie van de testoplossingen

Doordat de concentraties aan Afl-B1 in micronucleustest 7 en 8 te toxisch zijn en B(a)P geen positief resultaat vertoont, worden de concentraties aan de testcomponenten aangepast. De concentraties aan Afl-B1 worden verlaagd (0,5 en 1 µg/ml) en de concentratie aan B(a)P wordt verhoogd (10 en 20 µM). De test wordt terug uitgevoerd met twee verschillende blootstellingstijden aan Cyt-B, namelijk 24 uur (micronucleustest 9) en 44 uur (micronucleustest 10). De resultaten worden weergegeven in Figuur 15.



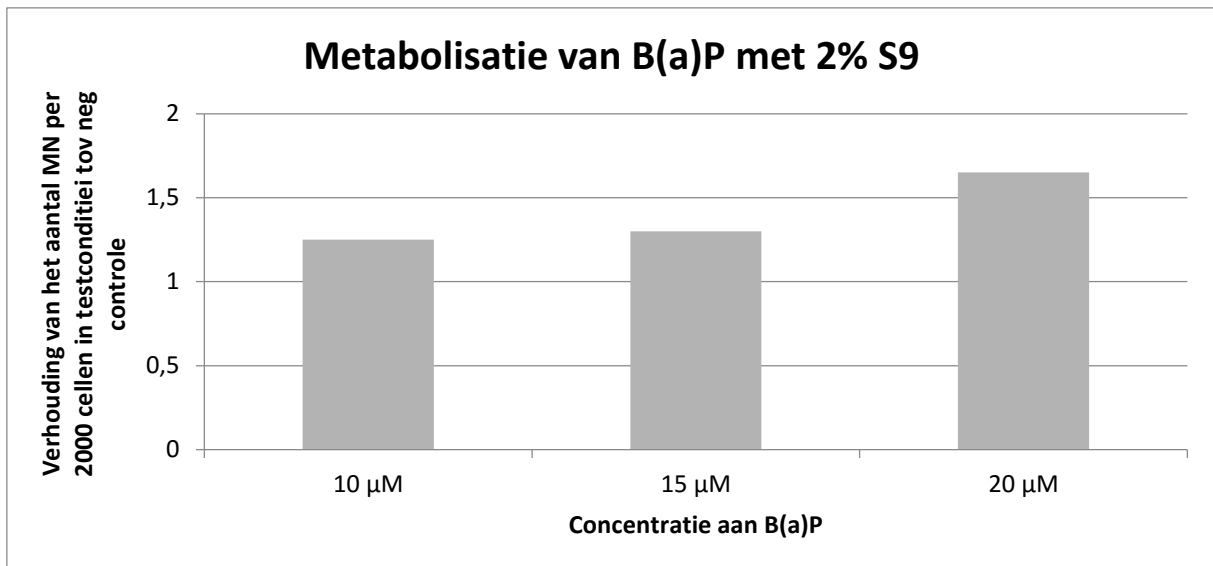
Figuur 15. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende concentraties van aflatoxine-B1 (Afl-B1) en benzo-a-pyreen (B(a)P) bij een verschillende blootstellingsduur aan cytochalasine-B (Cyt-B) (* = significant verschillend ten opzichte van de negatieve controle volgens de tabellen van Kastenbaum en Bowman met $p < 0.05$).

Onder de condities van micronucleustest 9 wordt een significante stijging in het aantal MN waargenomen bij de hoogste concentratie aan Afl-B1 en bij beide concentraties aan B(a)P. Deze stijging kan echter niet worden bevestigd bij manuele scoring van het aantal MN.

Bij de langere blootstelling aan Cyt-B ligt het aantal MN in de negatieve controleconditie zeer hoog (88 MN per 2000 binucleaire cellen). Het aantal MN per 2000 binucleaire cellen in alle testcondities ligt lager.

F. De metaboliserende fractie, S9 mix: samenstelling en percentage

Als volgende parameter wordt de samenstelling en het percentage S9 aangepast. In micronucleustest 11 wordt 2% S9 gebruikt met een aangepaste samenstelling. De test wordt enkel uitgevoerd met B(a)P (10 µM, 15 µM en 20 µM) en de resultaten worden weergegeven in Figuur 16. Hoewel er een concentratieafhankelijke stijging wordt waargenomen in het aantal micronuclei per 2000 cellen voor B(a)P, is deze stijging voor geen enkele concentratie statistisch significant.

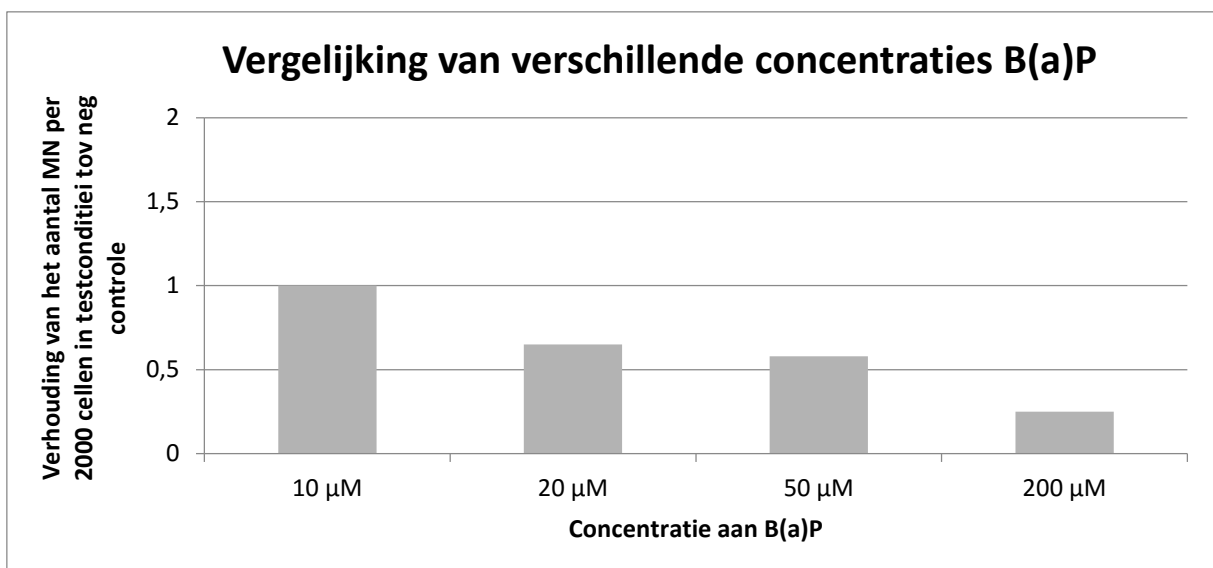


Figuur 16. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende concentraties benzo-a-pyreen (B(a)P).

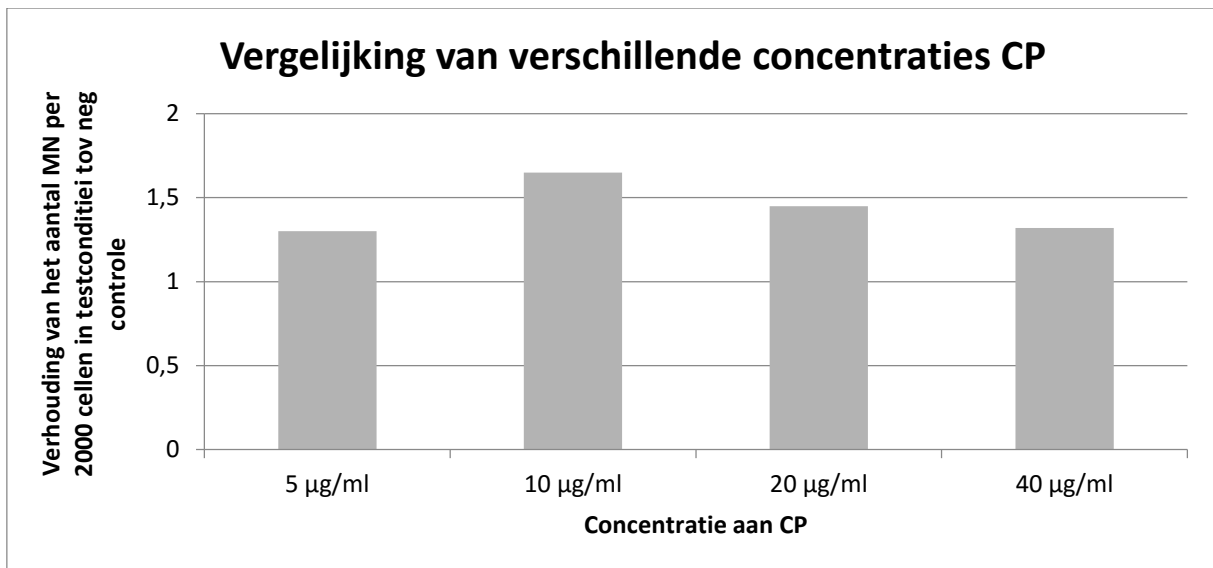
G. Concentratie Cyt-B en CP als positieve controlestof

Aangezien de positieve componenten die metabole activatie vereisen nog steeds niet eenduidig worden gedetecteerd, wordt een test uitgevoerd waarvan de condities nagenoeg volledig overeenkomen met de condities van Lioni (Lioni et al., 2014). In micronucleustest 12 wordt de concentratie aan Cyt-B verlaagd van 5 µg/ml naar 4 µg/ml en er worden bij aanvang van het experiment 500 000 cellen uitgezaaid. De blootstellingstijd aan Cyt-B bedraagt 44 uur en naast B(a)P wordt nu ook het effect van CP onderzocht.

Een extra conditie in het protocol van Lioni is het invoeren van een rustfase na blootstelling aan Cyt-B. Cyt-B wordt verwijderd van de cellen en milieu met serum wordt toegevoegd voor 1 uur. Het invoeren van de rustfase zou ervoor zorgen dat de kwaliteit van de cellen verbeterd en dus de automatische scoring ten goede komt.



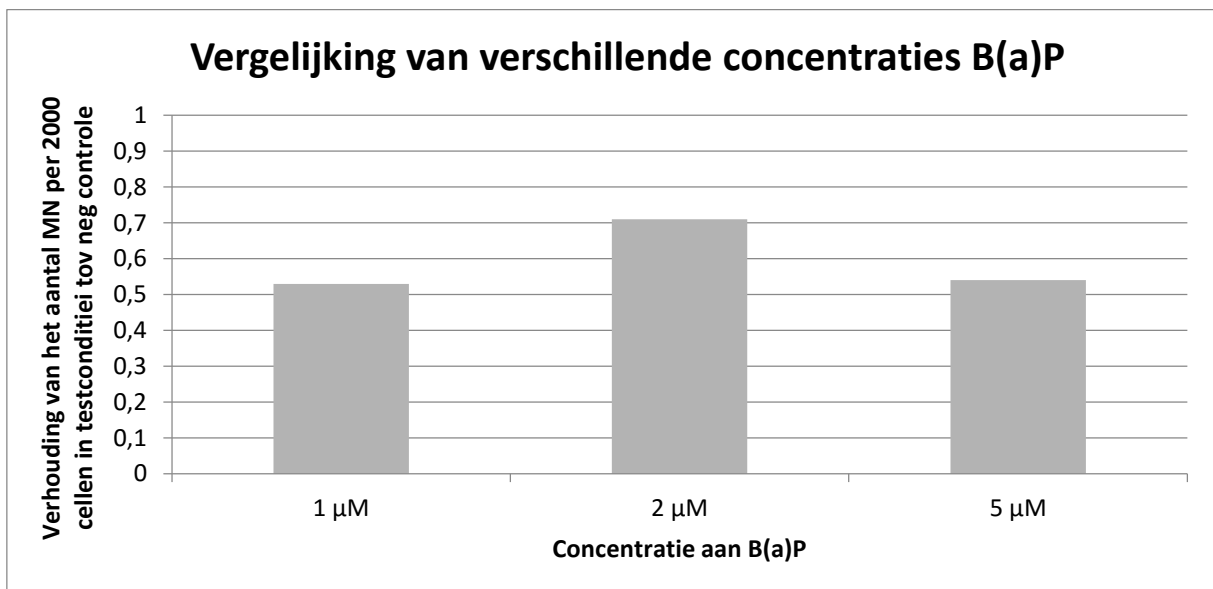
Figuur 17. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende concentraties van benzo-a-pyreen (B(a)P).



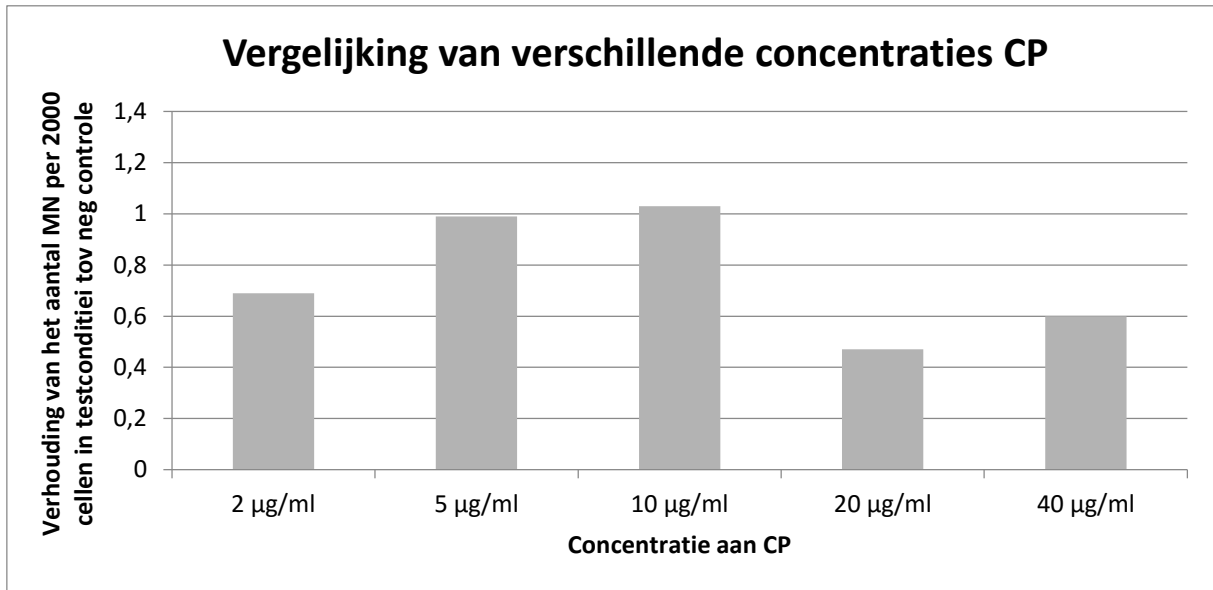
Figuur 18. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende concentraties van cyclophosphamide (CP).

Er wordt geen stijging van het aantal MN waargenomen, noch voor B(a)P, noch voor CP. Bij B(a)P lijkt er zelfs een daling van het aantal MN op te treden. Er is geen onmiddellijke verklaring voor deze daling.

In een laatste experiment worden de condities uit micronucleustest 12 herhaald. Er wordt nu echter gewerkt zonder S9 waardoor de blootstellingsduur aan de testcomponent 24 u bedraagt. Ook in deze condities worden geen verhogingen in het aantal MN waargenomen (Figuur 19 en Figuur 20).



Figuur 19. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende concentraties van benzo-a-pyreen (B(a)P) zonder toevoeging van S9.



Figuur 20. Verhouding van het aantal micronuclei per 2000 cellen in de testconditie ten opzichte van de negatieve controle voor verschillende concentraties van cyclophosphamide (CP) zonder toevoeging van S9.

6 Discussie

6.1 Evaluatie van het genotoxisch potentieel van een selectie van componenten die kunnen worden verwerkt in bedrukte papieren en kartonnen FCM

De gebruikte onderzoeksstrategie is gebaseerd op een combinatie van *in silico* en *in vitro*. Dat betekent dat in de voorgestelde strategie geen proefdieren zullen worden aangewend. Ondanks het feit dat de VITOTOX[®]-test geen standaard *in vitro* genotoxiciteitstest is, vormt de VITOTOX[®]-test in deze masterproef een goed alternatief omdat de VITOTOX[®]-test zeer snel uit te voeren is en een goede correlatie vertoont met de Amestest (van der Lelie et al., 1997). Indien nodig, kan in een volgende fase nog steeds de Amestest worden uitgevoerd om de resultaten van de VITOTOX[®]-test al dan niet te bevestigen.

Op basis van de voorspellingen met ToxTree en Derek Nexus[™], de gegevens beschikbaar op de ECHA website en de resultaten van de VITOTOX[®]-test kunnen de veertien testcomponenten onderverdeeld worden in drie categoriën.

Categorie 1 bevat de componenten die **niet-genotoxisch** zijn. Dit zijn componenten die geen positief resultaat vertonen in de VITOTOX[®]-test en waarvoor op de ECHA website gegevens beschikbaar zijn die aantonen dat de component niet-genotoxisch is. Voor deze componenten zullen geen verdere testen uitgevoerd worden.

Tot deze categorie behoren furfural (C3) en 5-aminosalicylzuur (C11). Furfural vertoont een positief resultaat in de *in vitro* testen (genmutaties en chromosoomaberraties) maar is negatief in de overeenkomstige *in vivo* opvolgstudies volgens de ECHA website. De component vertoont ook een negatief resultaat in de VITOTOX[®]-test.

5-aminosalicylzuur (C11) vertoont een negatief resultaat in de verschillende *in vitro* testen (genmutaties en chromosoomaberraties) volgens de ECHA website. De component vertoont ook een negatief resultaat in de VITOTOX[®]-test.

In **categorie 2** worden de component ondergebracht waarvoor **verdere testen of literatuuronderzoek noodzakelijk** zijn.

- * **Subcategorie 2A:** componenten die moeten worden geëvalueerd met een *in vitro* micronucleustest.

Er zijn vijf componenten die een **hoge prioriteit** krijgen (C1, C7, C8 en C9).

1,10-fenantroline (C1), 2-methyl-4-isothiazoline-3-on (C7), ethyl-tolueen-4-sulfonaat (C8) zijn de componenten die een SA voor chromosoomschade vertonen in Derek Nexus[™] en waarvoor geen genotoxiciteitsgegevens worden teruggevonden op de ECHA website.

Soedaan IV (C9) vertoont geen SA voor chromosoomschade in Derek Nexus[™], maar wel een positief resultaat in de VITOTOX[®]-test. Aangezien er voor de component geen genotoxiciteitsgegevens beschikbaar zijn op de ECHA website is het belangrijk om het genotoxisch profiel van de component verder te onderzoeken onder andere aan de hand van de *in vitro* micronucleustest.

1-(methylamino)antrachinon (C5), soedaan III (C10) en 7-diethylamino-4-methylcoumarin (C12) krijgen een **medium prioriteit**. Deze componenten vertonen geen SA voor chromosoomschade in Derek Nexus[™] en zijn negatief in de VITOTOX[®]-test. Aangezien een negatieve predictie voor chromosoomschade in Derek Nexus[™] met voorzichtigheid moet worden geïnterpreteerd, is het bijgevolg toch aangewezen om voor deze componenten een *in vitro* micronucleustest uit te voeren.

* **Subcategorie 2B:** componenten waarvoor meer *in vivo* genotoxiciteitsgegevens nodig zijn.

Hier worden vier componenten geplaatst, namelijk 2-chlooraceetamide (C2), 4-nitrotolueen (C4), 2-nitrotolueen (C6) en 2-methyl-4-isothiazoline-3-on (C7). Dit zijn componenten waarvoor tegenstrijdige en/of onvoldoende *in vivo* gegevens beschikbaar zijn op de ECHA website en die verder moeten worden onderzocht.

Categorie 3 bevat componenten die **genotoxisch** zijn. Dit zijn componenten waarvoor de gegevens die op de ECHA website beschikbaar zijn aantonen dat de component genotoxisch is. Die componenten zullen opgenomen worden in de migratiestudie.

4,4'-diamino-difenylmethaan (C13) vertoont zowel een positief effect in *in vitro* testen voor genmutaties als voor chromosoomschade. Bovendien vertoont de component een (zwak) positief resultaat in de *in vivo* micronucleustest.

4,4'-oxydianiline (C14) vertoont zowel een positief effect in *in vitro* testen voor genmutaties als voor chromosoomschade. Bovendien vertoont de component een positief resultaat in de *in vivo* follow-up testen.

Tabel 12. Overzicht van de resultaten van ToxTree, Derek Nexus™, ECHA website en VITOTOX®-test voor de veertien testcomponenten (+ = positief, - = negatief, / = geen gegevens)

Code	ToxTree	Derek Nexus™		ECHA website		VITOTOX®-test
	Genotoxische carcinogeniciteit	Gen-mutaties	Chromosoomschade	Gen-mutaties	Chromosoomschade	
C1	+	+	+	/	/	-
C2	+	-	+	-	-	+
C3	+	+	+	-	-	-
C4	+	+	+	+/-	+/-	-
C5	+	+	+	/	/	-
C6	+	+	+	-	+/-	-
C7	+	-	+	/	/	-
C8	+	+	+	/	/	-
C9	+	+	-	/	/	+
C10	+	+	-	/	/	-
C11	+	+	-	-	-	-
C12	+	+	-	/	/	-
C13	+	+	+	+/-	+	-
C14	+	+	-	+	+	-

6.2 Optimalisatie micronucleustest

Geen van de aanpassingen aan het basisprotocol die in deze studie worden onderzocht, resulteert in een eenduidige detectie van de positieve componenten die metabole activatie vereisen en die volgens het OECD protocol (OECD, 2015b) zeker positief zouden moeten zijn. Deze resultaten wijzen erop dat een micronucleustest met hepatocyten moeilijk uit te voeren is met componenten die metabolisatie vereisen.

Uit de verschillende micronucleustesten zijn wel een aantal parameters naar voor gekomen die een invloed hebben op het aantal binucleaire cellen dat kan worden gescoord en de kwaliteit van de beelden. De micronucleustest wordt bijvoorbeeld best uitgevoerd in een 6-well plaat. De beelden van de cellen zien er beter uit en er worden nog voldoende binucleairen gescoord. Daarnaast is het gebruik van 0,5% DMSO en 4 µg/ml Cyt-B aanbevolen omdat er dan meer binucleaire cellen gevormd worden.

Het invoeren van een herstelperiode na Cyt-B leidt tot een betere CBPI waarde maar geeft geen verhoging in het aantal MN per 2000 cellen. Er is voor deze parameter nog meer onderzoek nodig om te kunnen bepalen wat de juiste invloed ervan is.

Door verschillende parameters aan te passen verloopt het automatisch scoren van de cellen beter. Die verbetering van de kwaliteit van de binucleaire cellen en MN is een belangrijk prestatie die het mogelijk maakt om een automatische scoring uit te voeren. Een manuele scoring bij de micronucleustest is immers zeer subjectief. Door een automatische scoring mogelijk te maken, worden de resultaten objectief bekeken en krijgt de micronucleustest meer "power" binnen het wetenschappelijk onderzoek.

Vanwege de moeilijkheden met de hepatocyten, zijn er in het onthaallabo testen uitgevoerd met "mouse lymphoma" cellen en staan er testen gepland met CHO cellen. De eerste resultaten van de micronucleustesten met "mouse lymphoma" cellen zien er veelbelovend uit (Tabel 13) al moet wel worden opgemerkt dat er onvoldoende binucleaire cellen konden worden gescoord.

Tabel 13. Resultaten micronucleustest met "mouse lymphoma" cellen (* = significant verschillend ten opzichte van de negatieve controle volgens de tabellen van Kastenbaum en Bowman met $p < 0.05$).

Testcomponent	Aantal MN	Aantal CELLEN	MN/2000 CELLEN	CPBI	Trypaan blauw (% viability)
negatief (medium)	16	738	43	2,184	74,50%
0,5% DMSO	25	1481	34	2,202	72,00%
S9 1%	29	1092	53	2,18	61,80%
S9 1% + 0,5% DMSO	17	1088	31	2,212	74,50%
MMS 10 µg/ml	16	892	36	2,108	59,20%
MMS 20 µg/ml	21	621	68*	1,994	65,30%
4NQO 0,1µg/ml + 0,5% DMSO	7	171	82	1,444	62,50%
BaP 5µM +1% S9; 0,5% DMSO	43	595	145*	1,95	67,10%
BaP 10µM +1% S9; 0,5% DMSO	20	131	305*	1,444	48,20%
AFB1 0,5 µg/ml +1% S9; 0,5% DMSO	4	146	55	1,344	66,70%

6.3 Onderzoeksstrategie

De voorgestelde aanpak vertrekt vanuit het evalueren van de toxiciteit, namelijk de genotoxiciteit. In principe zou ook kunnen worden gestart met het evalueren van de blootstelling. In dit geval zou dan eerst worden bepaald welke chemische componenten migreren vanuit de FCM in de voeding. Een voordeel van een dergelijke aanpak zou zijn dat er minder stoffen *in silico* en *in vitro* getest moeten worden uitgevoerd. Bij deze aanpak bestaat echter het gevaar dat componenten die in lage concentraties migreren niet worden opgemerkt. In het geval van genotoxische componenten, kan echter migratie van een kleine hoeveelheid van de component al geassocieerd zijn met ernstige gezondheidsproblemen aangezien genotoxische componenten geen drempelwaarde vertonen. Bovendien is het niet mogelijk om de migratie van een component uit alle verschillende FCM vervaardigd uit bedrukt papier en karton na te gaan en moet er dus worden gewerkt met simulaties. Bijgevolg is het in het geval van genotoxiciteit beter om eerst te evalueren welke componenten genotoxisch zijn, en pas nadien te bepalen of ze uit de verpakking kunnen migreren.

7 Conclusie

Op basis van de SA's geïdentificeerd met de *in silico* programma's, de gegevens beschikbaar op de ECHA-website en de resultaten van de VITOTOX®-test kunnen de componenten in drie grote groepen worden onderverdeeld. **Categorie 1** bevat twee componenten die **niet-genotoxisch** zijn, namelijk furfural en 5-aminosalicylzuur. Voor de 10 componenten in **categorie 2** zijn verdere testen of literatuuronderzoek noodzakelijk (1,10-fenantroline, ethyl-tolueen-4-sulfonaat, soedaan IV, soedaan III, 1-(methylamino)antrachinon, 7-diethylamino-4-methylcoumarin, 2-chlooracetamide, 4-nitrotolueen, 2-nitrotolueen en 2-methyl-4-isothiazoline-3-on). Tenslotte zijn er twee componenten, 4,4'-diamino-difenylnmethaan en 4,4'-oxydianiline die tot **categorie 3** behoren. Die bevat componenten die **genotoxisch** zijn en dus zullen de componenten opgenomen worden in de migratiestudie.

Om de componenten te kunnen testen met de micronucleustest moet die helemaal op punt staan. De HepG2 cellen zijn een goed theoretisch model maar uit de experimenten is gebleken dat ze niet in staat zijn om componenten te detecteren die metabole activatie vereisen, zelfs in aanwezigheid van S9. Een mogelijke oplossing zou kunnen zijn om HepG2 cellen van een andere collectie te gebruiken of over te schakelen naar een andere cellijn.

De resultaten in deze masterproef geven duidelijk weer dat er een noodzaak is aan een strategie om binnen het groot aantal componenten dat kan worden verwerkt in bedrukte papieren en kartonnen FCM deze componenten te identificeren die een mogelijk risico inhouden voor de gezondheid van de mens. De 14 componenten die getest zijn vormen maar een klein geheel binnen de grote databank van meer dan 4000 componenten. Er zijn dus mogelijk nog veel meer stoffen die genotoxische eigenschappen kunnen vertonen. Het is belangrijk om de migratie van deze potentieel genotoxische stoffen te bestuderen zodat kan worden nagegaan of ze ook een risico vormen voor de consument.

8 Referenties

- Bae, S., and Hong, Y.C. (2015). Exposure to bisphenol A from drinking canned beverages increases blood pressure: randomized crossover trial. *Hypertension* 65, 313-319.
- Barlow, S.M. (2009). Risk assessment of food-contact materials: past experience and future challenges. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 26, 1526-1533.
- Benigni, R., Bossa, C., Jeliaskova, N., Netzeva, T., and Worth, A. (2008). The Benigni/Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity - a module of Toxtree: EUR 23241 EN.
- Brandon, E.F., Raap, C.D., Meijerman, I., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H. (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and applied pharmacology* 189, 233-246.
- Bruneau, P. (2001). Search for Predictive Generic Model of Aqueous Solubility Using Bayesian Neural Nets. *Journal of chemical information and computer sciences* 41, 1605-1616.
- Bruneau, P., and McElroy, N.R. (2006). logD7.4 modeling using Bayesian Regularized Neural Networks. Assessment and correction of the errors of prediction. *Journal of chemical information and modeling* 46, 1379-1387.
- BVI, H.B.v. (2013). Inpakken en Uitpakken. *Bio-ingenieurs KU Leuven* 16, 4.
- Carter, S.B. (1967). Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213, 261-264.
- Chequer, F.M.D., Angeli, J.P.F., Ferraz, E.R.A., Tsuboy, M.S., Marcarini, J.C., Mantovani, M.S., and de Oliveira, D.P. (2009). The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 676, 83-86.
- Choy, W.N. (2001). *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment* (Taylor & Francis).
- Coles, R., McDowell, D., and Kirwan, M.J. (2003). *Food Packaging Technology* (Taylor & Francis).
- Cooper, G.M., and Hausman, R.E. (2003). *The Cell: A Molecular Approach* (Sinauer Associates, Incorporated).
- Cooper, I. (2006). Plastics and chemical migration into food. In *Chemical Migration and Food Contact Materials*, K. Barnes, R. Sinclair, and D. Watson, eds. (Elsevier Science).
- de Fátima Poças, M., and Hogg, T. (2007). Exposure assessment of chemicals from packaging materials in foods: a review. *Trends in Food Science & Technology* 18, 219-230.
- EC (2004). Framework Regulation on materials and articles intended to come into contact with food. In EC (No) 1935/2004.
- EC (2006). VERORDENING (EG) Nr. 1907/2006 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie. *Publicatieblad L* 396, 521.
- EC (2011). Commission Regulation on plastic materials and articles intended to come into contact with food. In Regulation No 10/2011.

ECHA, E.C.A. (2008). Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.6: QSARs and grouping of chemicals.

ECHA, E.C.A. (2015). Information on Chemicals.

EFSA (2008). Note for guidance for petitioners presenting an application for the safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorisation.

EFSA (2009). EFSA statement on the presence of 4-methylbenzophenone found in breakfast cereals. The EFSA journal, 19.

EFSA (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment (EFSA Scientific Committee), pp. 69.

EFSA (2012). Report of ESCO WG on non-plastic Food Contact Materials (supporting publications), pp. 63.

EFSA (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. In EFSA Journal, pp. 23.

Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, H., Gann, M., Majer, B.J., Eisenbauer, M., and Knasmüller, S. (2002). Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. Food and Chemical Toxicology 40, 1085-1090.

Europe, C.o. (2002). Resolution on paper and board materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. Version 4(2009).

European paper and board food packaging chain (2012). Industry Guideline for the Compliance of Paper & Board Materials and Articles for Food Contact.

FDA (2014). Guidance for Industry: Use of Recycled Plastics in Food Packaging: Chemistry Considerations, F.a.D.A. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), ed.

Fost Plus (2015). Waarom sorteren en recycleren?, laatst geconsulteerd 13/06/2015.

Gad, S.C. (2009). Drug Safety Evaluation (Wiley).

Garriott, M.L., Barry Phelps, J., and Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the in vitro micronucleus test: I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 517, 123-134.

Geueke, B., Wagner, C.C., and Muncke, J. (2014). Food contact substances and chemicals of concern: a comparison of inventories. Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 31, 1438-1450.

Gleeson, M.P. (2007). Plasma Protein Binding Affinity and Its Relationship to Molecular Structure: An In-silico Analysis. Journal of Medicinal Chemistry 50, 101-112.

Kastenbaum, M.A., and Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 9, 527-549.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., *et al.* (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. Mutation research 540, 153-163.

Klaassen, C. (2007). Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition (McGraw-Hill Education).

Lhasa limited (2015). How Derek Nexus™ works. , laatst geconsulteerd 08/06/2015.

Lionti, K., Severin, I., Dahbi, L., Toury, B., and Chagnon, M.C. (2014). In vitro genotoxicity assessment of MTES, GPTES and TEOS, three precursors intended for use in food contact coatings. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 65, 76-81.

Loge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G., and Marzin, D. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. Mutation research 607, 13-36.

Ma, X., Que, Y., Kong, J., Liu, H., and Zhang, J. (2009). Effect of fetal bovine serum on the proliferation and differentiation of murine corneal epithelial cells *in vitro*. Int J Opfthalmol 2, 4.

Marinello, A.J., Bansal, S.K., Paul, B., Koser, P.L., Love, J., Struck, R.F., and Gurtoo, H.L. (1984). Metabolism and Binding of Cyclophosphamide and Its Metabolite Acrolein to Rat Hepatic Microsomal Cytochrome P-450. Cancer Research 44, 4615-4621.

Norman, R.E., Carpenter, D.O., Scott, J., Brune, M.N., and Sly, P.D. (2013). Environmental exposures: an underrecognized contribution to noncommunicable diseases. Reviews on environmental health 28, 59-65.

OECD (2015a). Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects (OECD).

OECD (2015b). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (OECD Publishing).

Pira International (2005). Consumption of Coated Paper & Board in Contact with Food in the EU. Final Report for CEFIC FCA Additives in Paper and Board Industry Group (APBIG). .

Raunio, H. (2011). In Silico Toxicology – Non-Testing Methods. Frontiers in Pharmacology 2.

Rodgers, S.L., Davis, A.M., Tomkinson, N.P., and van de Waterbeemd, H. (2007). QSAR Modeling Using Automatically Updating Correction Libraries: Application to a Human Plasma Protein Binding Model. Journal of chemical information and modeling 47, 2401-2407.

Senstech, V.A.v.S.v.V.e.C. (<https://sensnet.wordpress.com/symposium-food-contact-materials/>).

Serafimova, R., Fuart Gatnik, M., and Worth, A. (2010). Review of QSAR Models and Software Tools for Predicting Genotoxicity and Carcinogenicity (Joint Research Centre; Institute for Health and Consumer Protection), pp. 49.

Sharpe, R.M., and Irvine, D.S. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? BMJ (Clinical research ed) 328, 447-451.

Sheridan, R.P., Feuston, B.P., Maiorov, V.N., and Kearsley, S.K. (2004). Similarity to molecules in the training set is a good discriminator for prediction accuracy in QSAR. Journal of chemical information and computer sciences 44, 1912-1928.

Sigma-Aldrich® (2015). B1760 SIGMA, Benzo[a]pyrene, ≥96% (HPLC).

Stich, H.F., and San, R.H.C. (2012). Short-Term Tests for Chemical Carcinogens (Springer New York).

Surrallés, J., Carbonell, E., Marcos, R., Degrassi, F., Antocchia, A., and Tanzarella, C. (1992). A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. Mutagenesis 7, 407-410.

Swiss Government (2005). Swiss Ordinance on materials and articles In 81702321.

Todeschini, R., Consonni, V., and Pavan, M. (2004). A distance measure between models: a tool for similarity/diversity analysis of model populations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 70, 55-61.

Van Hoeck, E., Mertens, B., Bolle, F., and Fraselle, S. (2014). Evaluatie van de migratie van toxische chemicaliën uit vernis gebruikt voor voedselverpakkingen in voorbereiding van een toekomstig koninklijk besluit: Screening, identificatie en kwantificatie van de (geno)toxische organische componenten. In VerniTox (RF 13/6280) (WIV-ISP), pp. 73.

Van Hoeck, E., Mertens, B., Gosciny, S., N'Goy, T., Van paemel, M., Bolle, F., and Vleminckx, C. (2015). Study on implications on the requirements for submission of toxicological information, restrictions and administrative consequences of the draft revised guideline on Food Contact Materials. (EFSA, Parma, Italy), pp. 117.

Vector Laboratories Inc (2015). Vectashield® Mounting Medium with DAPI, laatst geconsulteerd 28/05/2015 (Vector Laboratories, Inc).

Verschaeve, L. (2012). Genetische toxicologie. In *Toxicologische werkingsmechanismen* (Universiteit Antwerpen).

Verschaeve, L. (2013). High throughput bacterial mutagenicity testing. In *High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing*, P. Steinberg, ed. (Wiley).

Vinken, M., Doktorova, T., Ellinger-Ziegelbauer, H., Ahr, H.J., Lock, E., Carmichael, P., Roggen, E., van Delft, J., Kleinjans, J., Castell, J., *et al.* (2008). The carcinoGENOMICS project: critical selection of model compounds for the development of omics-based in vitro carcinogenicity screening assays. *Mutation research* 659, 202-210.

Weaver, S., and Gleeson, M.P. (2008). The importance of the domain of applicability in QSAR modeling. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26, 1315-1326.

Westerink, W.M., Stevenson, J.C., Lauwers, A., Griffioen, G., Horbach, G.J., and Schoonen, W.G. (2009). Evaluation of the Vitotox and RadarScreen assays for the rapid assessment of genotoxicity in the early research phase of drug development. *Mutation research* 676, 113-130.

Whitaker, R. (2006). Metal packaging and chemical migration into food. In *Chemical Migration and Food Contact Materials*, R. Barale, R. Sinclair, and D. Watson, eds. (Elsevier Science).

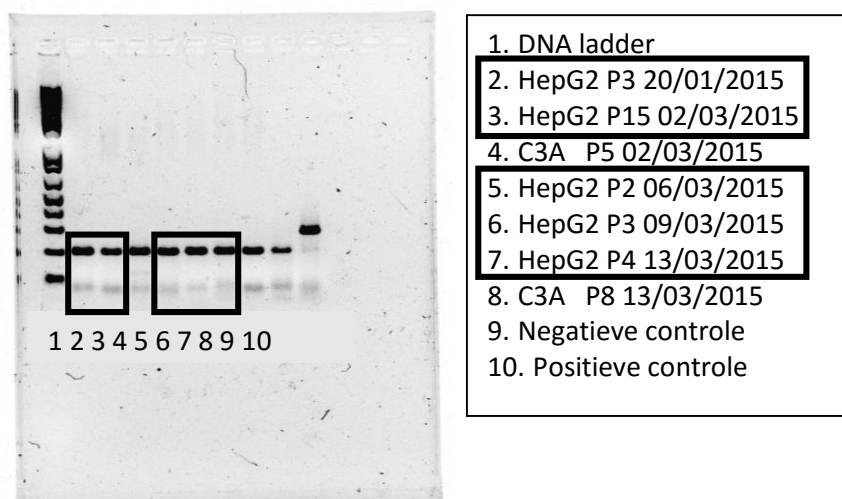
Xu, Y.-j., and Gao, H. (2003). Dimension related distance and its application in QSAR/QSPR model error estimation. *QSAR & Combinatorial Science* 22, 422-429.

9 Bijlagen

9.1 VITOTOX®-test: Voorbeeld van een verdunningsreeks aangemaakt in een 96-well plaat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				10	10			10	10			
				A5	A6			A9	A10			µl stock testcomponent
	100	100	100	90	90		100	90	90			µl solvent
						100				100		µl stock (dilutie)
B				Substantie 1			Substantie 2					
				10	10			10	10			µl stock testcomponent
C				C5	C6			C9	C10			
	100	100	100	90	90		100	90	90			µl solvent
						100				100		µl stock (dilutie)
D				Substantie 3			Substantie 4					
E				20µl A1-A10						10µl 4NQO	10µl DMSO	
				180 µl H ₂ O						90µl H ₂ O	90µl H ₂ O	
F				100µl E1-E10						10µl B(a)P	10µl DMSO	
										90µl H ₂ O	90µl H ₂ O	
G				20 µl C1-C10						10µl 4NQO	10µl DMSO	
				180 µl H ₂ O						90µl H ₂ O	90µl H ₂ O	
H				100 µl G1-G10						10µl B(a)P	10µl DMSO	
										90µl H ₂ O	90µl H ₂ O	

9.2 Mycoplasma detectie celculturen



Figuur 21. Mycoplasma PCRtest met zeven stalen. Het resultaat van elk staal komt overeen met het patroon van de negatieve controle. Dit betekent dat alle stalen mycoplasma vrij zijn.

9.3 Controle AD van ToxTree

Code	CAS Nummer	Naam van de component	Standaard analyse: Chemische domein met 3= binnen, 2= grens binnen, 0= buiten of grens buiten
C1	0000066-71-7	1,10-Fenantroline	3
C2	0000079-07-2	2-Chlooraceetamide	3
C8	0000080-40-0	Ethyl-tolueen-4-sulfonaat	3
C5	0000082-38-2	1-(Methylamino)antrachinon	3
C9	0000085-83-6	Soedaan IV	3
C10	0000085-86-9	Soedaan III	3
C6	0000088-72-2	2-Nitrotolueen	3
C11	0000089-57-6	5-Aminosalicylzuur	3
C12	0000091-44-1	7-Diethylamino-4-methylcoumarin	3
C3	0000098-01-1	Furfural	3
C4	0000099-99-0	4-Nitrotolueen	3
C13	0000101-77-9	4,4'-Diamino-difenylmethaan	3
C14	0000101-80-4	4,4'-Oxydianiline	3
C8	0002682-20-4	2-Methyl-4-isothiazoline-3-on	3

9.5 Overzicht literatuurstudie ECHA website

Code	Toxiciteit data	Genotoxiciteit					
		<i>In vitro</i> genmutatie test		<i>In vitro</i> test voor clastogene/aneugene effecten		<i>In vivo</i> follow-up test	Andere testen
		Bacteriële genmutatietest	Genmutatietest in zoogdiercellen	<i>In vivo</i> micronucleustest			
C1	Pre registerd						
C2	Low priority	1.Results (K)*: -S9: neg ; +S9: neg	1. V79 cells (K): -S9: neg; +S9: neg	1. V79 cells (K): -S9: pos (at cytotoxic concentration) +S9: pos (at cytotoxic concentration)		1. Mouse (oral) (K): - females: neg - males: neg	1. In vitro CTA assay in SHE cells (S): -S9: neg +S9: neg 2. Dominant lethal test in mouse (oral) (S)*: -males: neg 3. Assays in parallel: bone marrow / spermatogonias chromosome aberration; erythrocyte micronucleustest in Chinese hamster (ip) (S)*: -males: neg

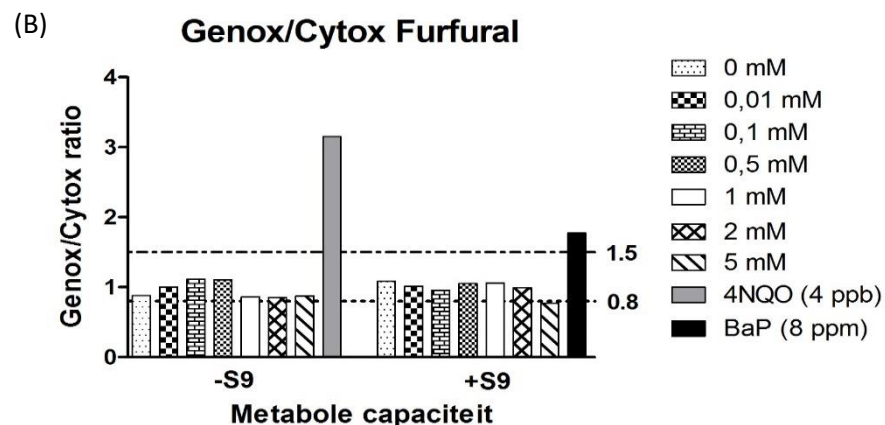
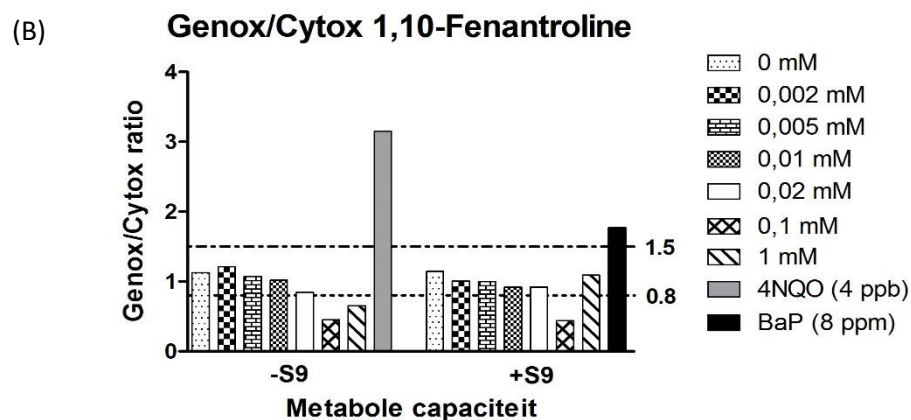
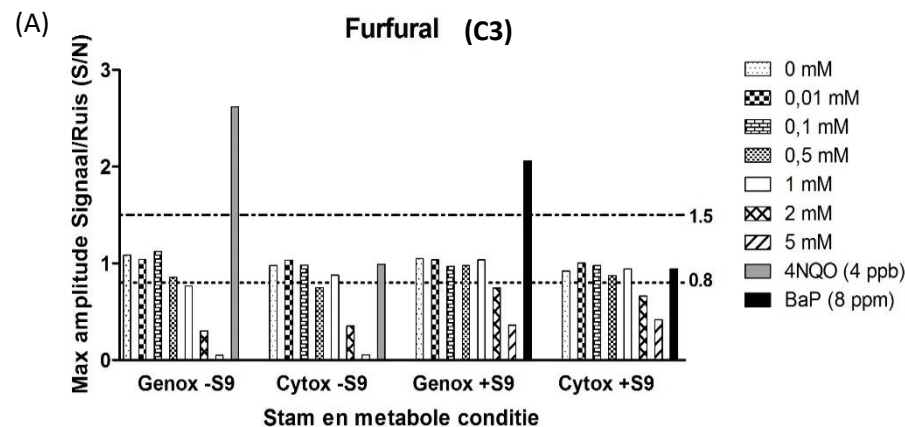
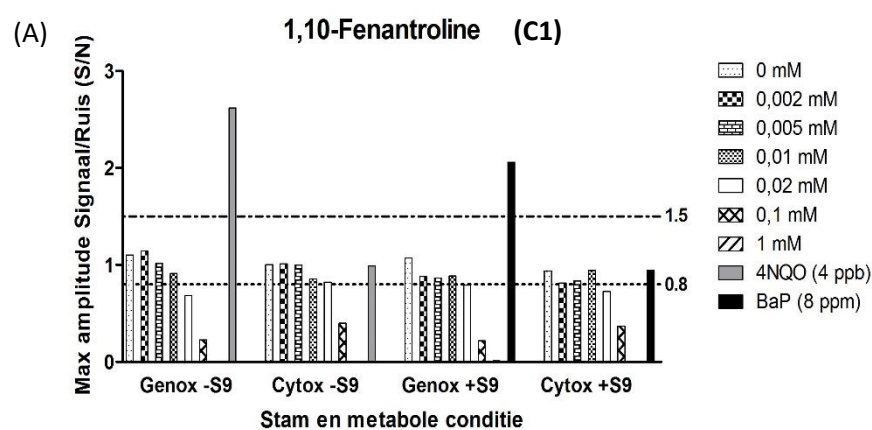
C3	High priority (no adequate <i>in vivo</i> follow- up)	1. Results (K)*: -S9: neg; +S9: neg 2. Results (K): -S9: neg; +S9: neg 3. Results (K): -S9: pos (only in TA100) +S9: neg 4. Results (NS)*: -S9: pos (only in TA100) +S9: pos (only in TA100).	1. Mouse L5178Y/TK lymphoma cells (K)*: -S9: pos	1. CHO cells (K): -S9: pos; +S9: pos			1. <i>In vivo</i> UDS assay in mouse hepatocytes (K)*: neg. 2. <i>In vivo</i> SCE and CA assay in mice (K)*: neg 3. Transgenic animal mutagenicity assay (lacZ transgenic) (oral) (K): neg 4. <i>In vivo</i> UDS assay in rat hepatocytes (K)*: neg. 5. In vitro SCE test in human lymphocytes (S)*: -S9: pos <i>+ Several other supporting in vitro and in vivo assays</i>
C4		1. Results (K)*: -S9: neg; +S9: neg 2. Results (S): -S9: neg +S9: neg	1. Mouse lymphoma L5178Y cells (K)*: -S9: neg +S9: pos (it is unclear whether this response can be attributed to gene mutations or cytogenetic effects)	1. CHO cells (K)*: -S9: neg +S9: pos: weak positive in the first trial and positive in the second trial		1. Rat F344 (intraperitoneal) (K)*: -male: neg	1. <i>In vivo</i> UDS assay in rat F344 hepatocytes (K)*: pos 2. <i>In vivo</i> UDS assay in mouse hepatocytes (NS)*: pos 3. Sister chromatid exchange assay in mammalian cells, CHO cells (K)*: -S9: pos (doses that induced cell cycle delay, which is an indication of cytotoxicity) +S9: pos (doses that induced cell cycle delay, which is an indication of cytotoxicity)
C5	Pre registerd						
C6		1. Results (K)*: -S9: neg; +S9: neg 2. Results (S)*: -S9: neg; +S9: neg		1. CHO cells (K)*: -S9: neg; +S9: pos 2. CHO cells (NS)*: -S9: neg; +S9: neg	1. Chinese hamster lung cell line (CHL/IU)*: -S9: pos		1. <i>In vivo</i> UDS assay in rat F344 hepatocytes (K)*: pos males: >= 100 mg/kg bw ; females: >= 200 mg/kg bw

C7	Pre registerd						
C8	Pre registerd						
C9	Pre registerd						
C10	Pre registerd						
C11		1. Results (K)*: -S9: neg; +S9: neg	1. Mouse lymphoma L5178Y cells (K)*: neg	1. Chinese hamster lung fibroblasts (V79) (K)*: -S9: neg; +S9: neg			
C12	Pre registerd						
C13		1. Results (K)*: -S9: neg +S9: pos with TA 100, weakly positive with TA 98 and TA 1538 (dose dependent)	1. Mouse lymphoma L5178Y cells (K)*: only -S9: pos in 2 of 3 tests (weak signal)		1. Mouse bone marrow (B6C3F1) (K)*: weak genotoxic effect 2. Mouse (CD-1) (S)*: ambiguous results		1. <i>In vivo</i> UDS assay in rat and mouse hepatocytes (NS)*: neg
C14		1. Results (K)*: +S9: pos with TA 100, TA 98 and TA 1535 (dose dependent)	1. Mouse lymphoma L5178Y cells (K)*: only -S9: pos (even with lowest test concentration 50 µg/ml)	1. CHO cells (K)*: -S9: pos +S9: pos		1. Mouse B6C3F1 intraperitoneal (K)*: pos	1. Sister chromatid exchange assay in mammalian cells, CHO cells (K)*: -S9: pos +S9: pos 2. <i>In vivo</i> UDS assay in rat Fischer 344 (K)*: neg

* Remark: Results are reliable with restrictions.

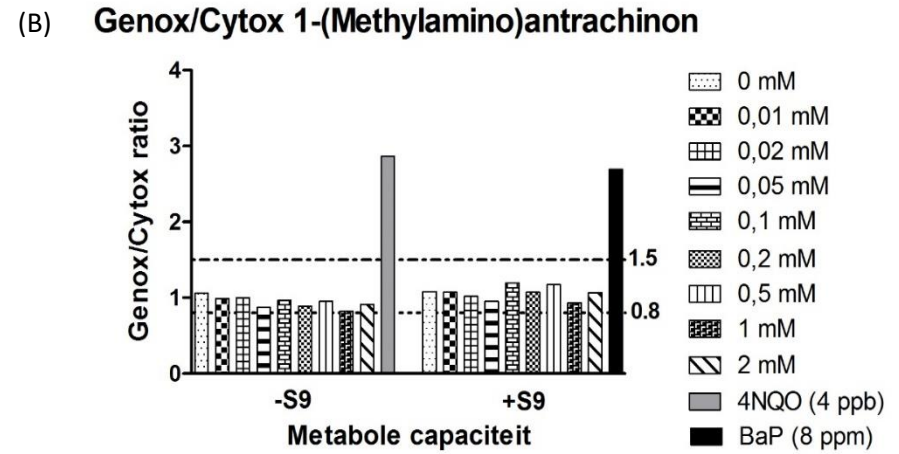
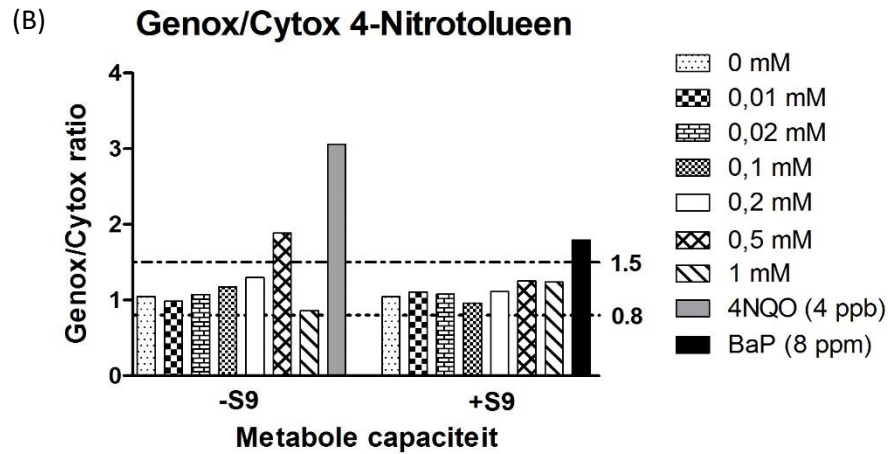
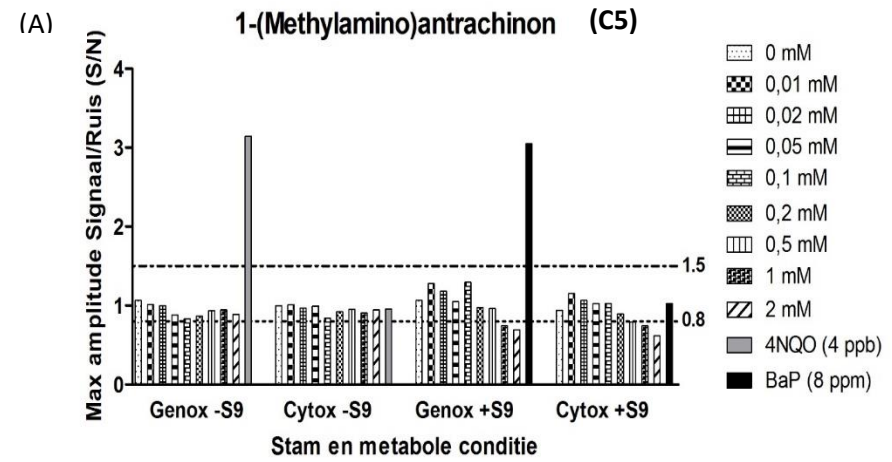
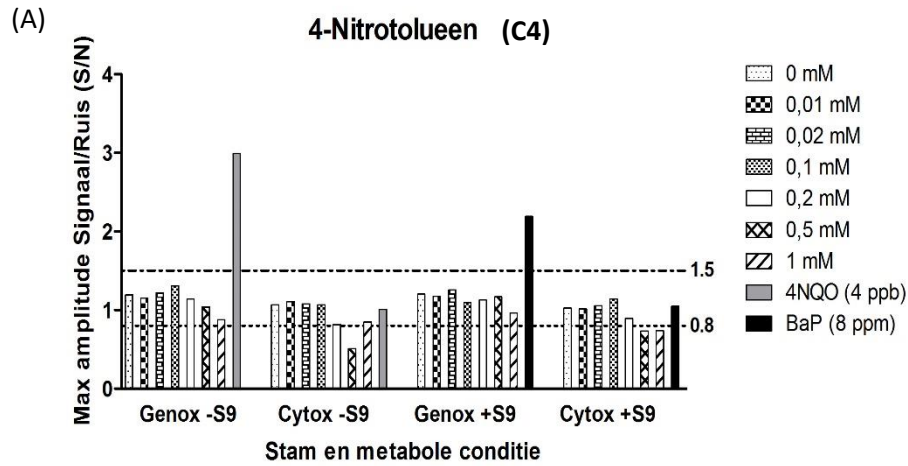
Pre-registerd= no data available

9.6 Resultaten VITOTOX[®]-test



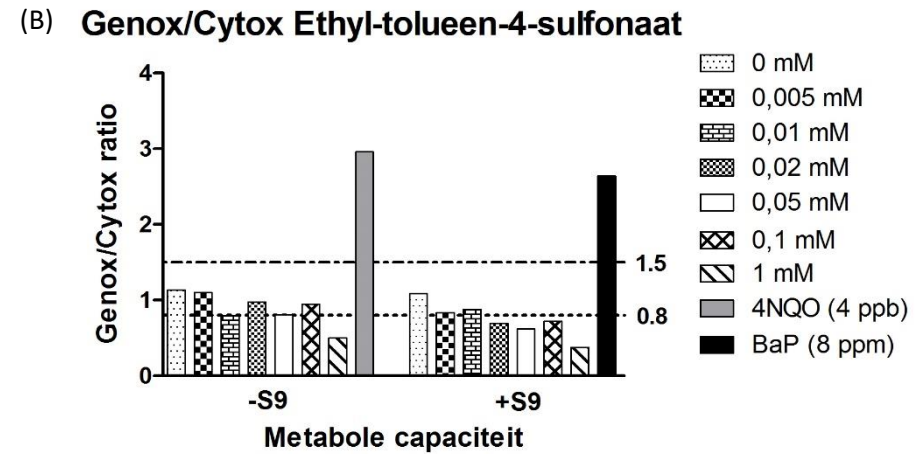
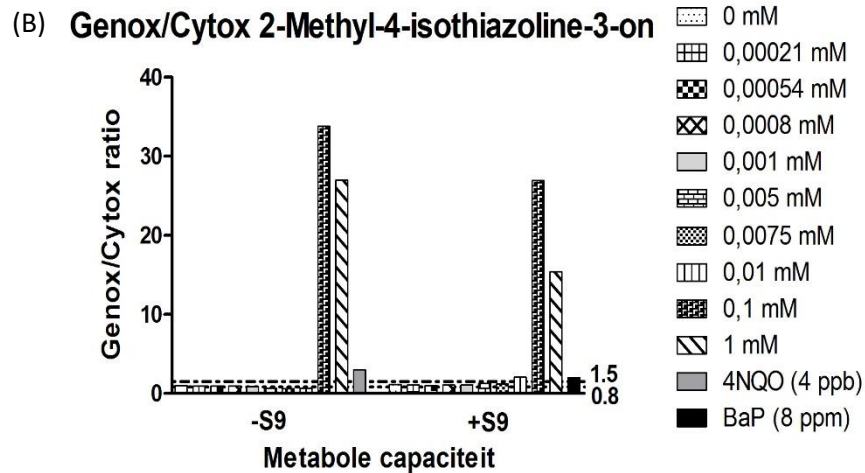
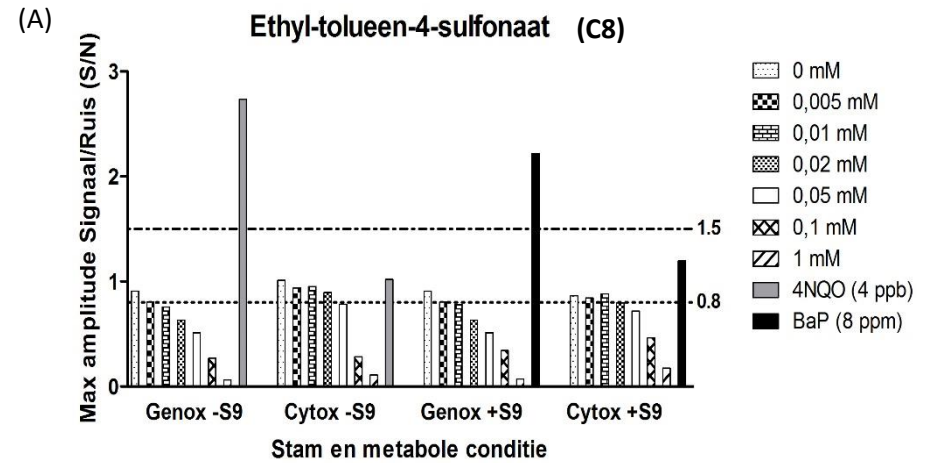
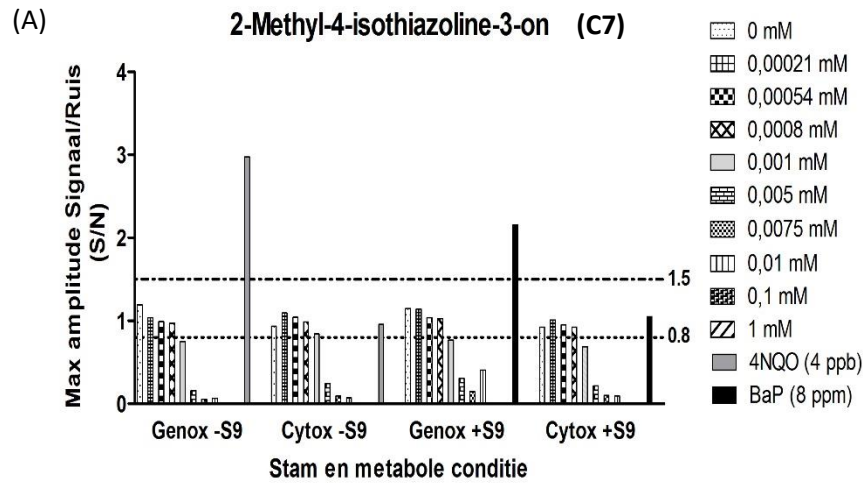
Figuur 22. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 1,10-Fenantroline gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytox ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 1,10-Fenantroline. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

Figuur 23. (A) Maximale S/N ratio's in functie van Furfural gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytox ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van Furfural. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.



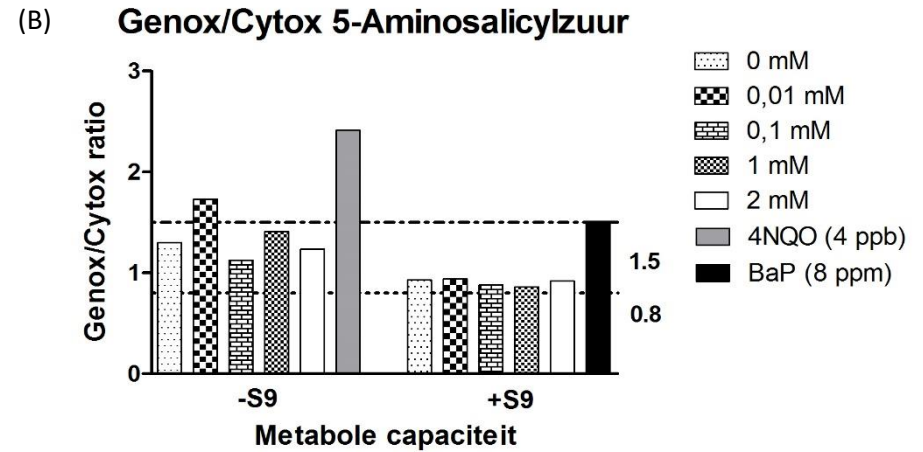
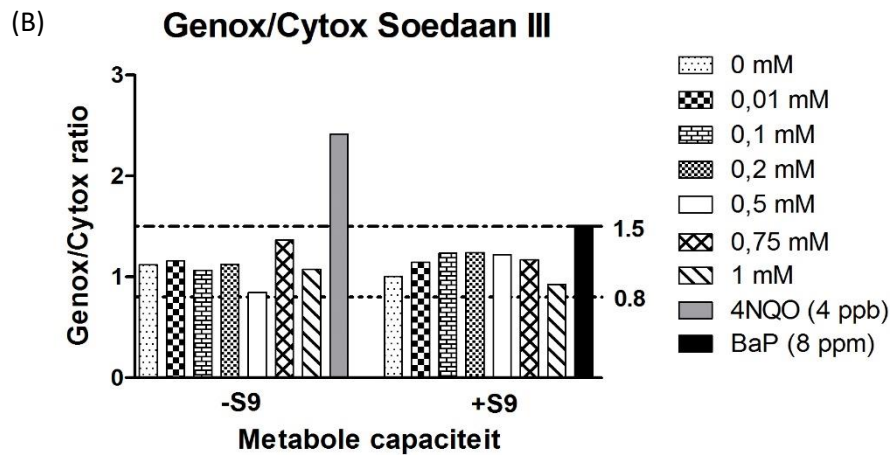
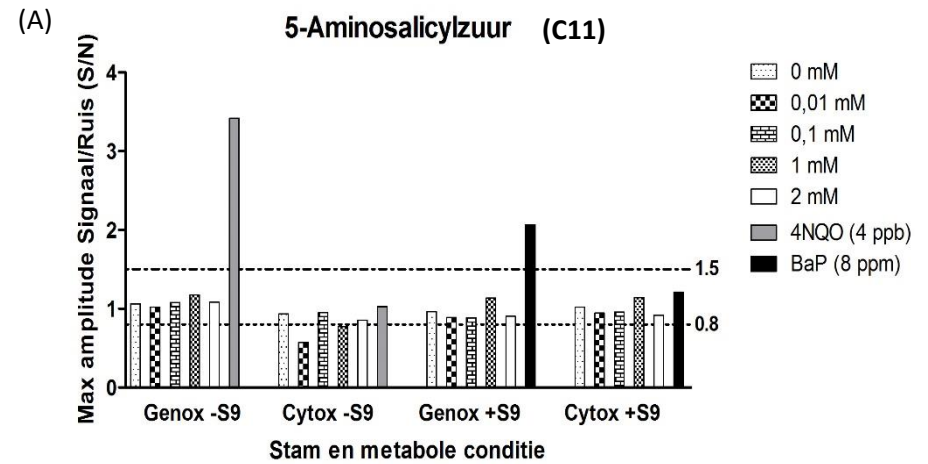
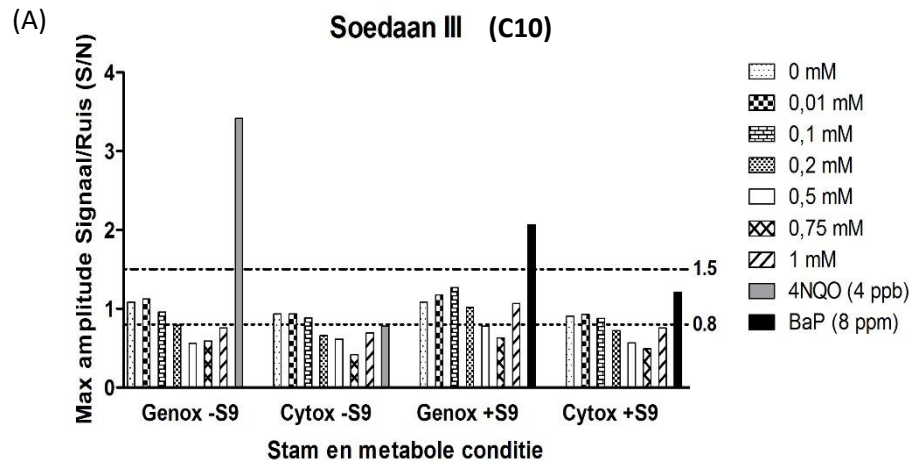
Figuur 24. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 4-Nitrotolueen gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 4-Nitrotolueen. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

Figuur 25. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 1-(Methylamino)antrachinon gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 1-(Methylamino)antrachinon. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.



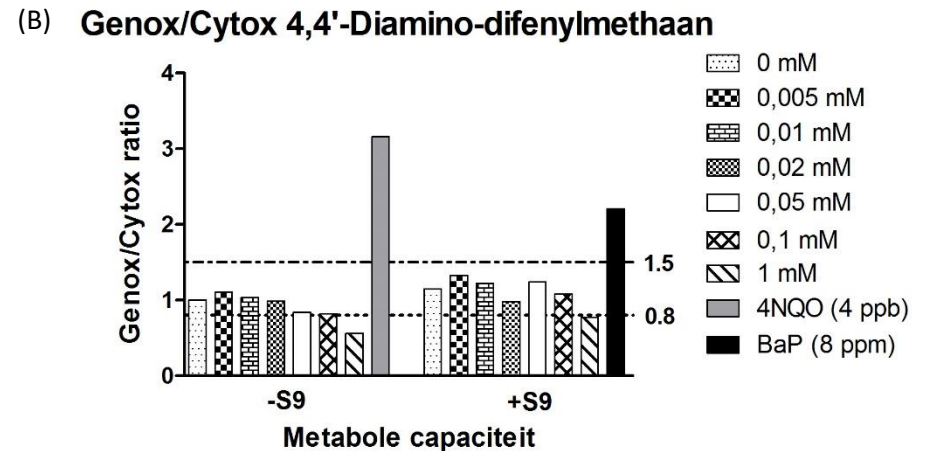
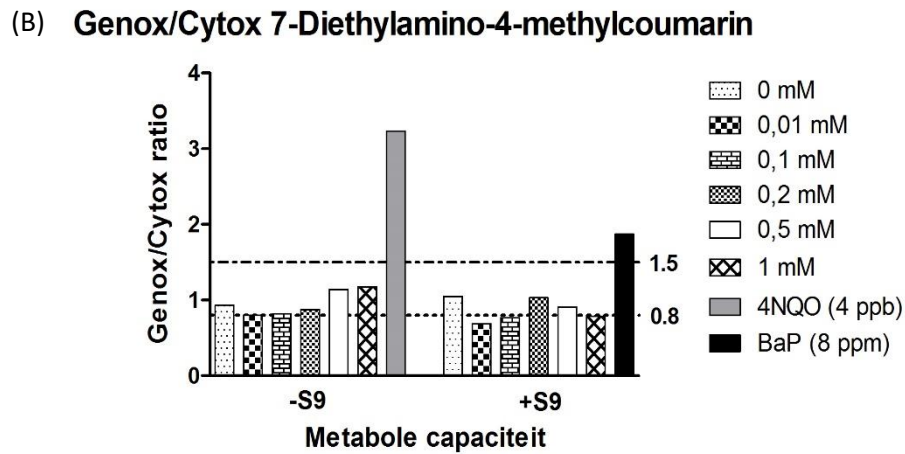
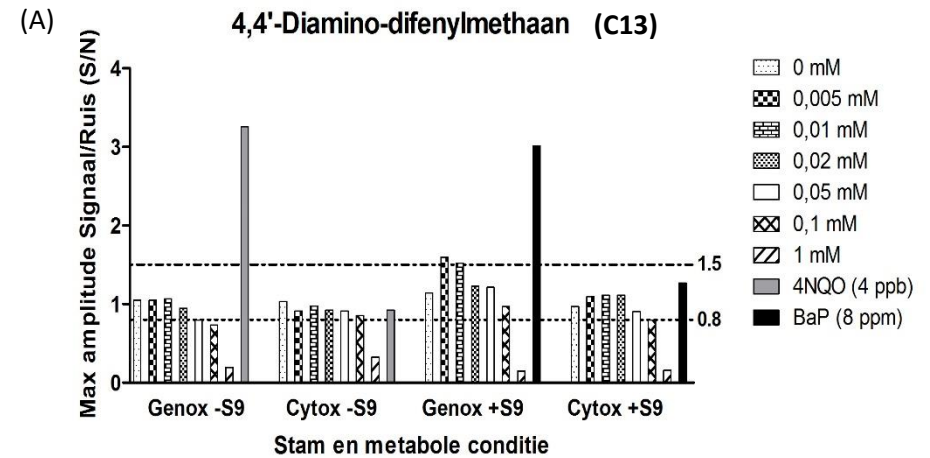
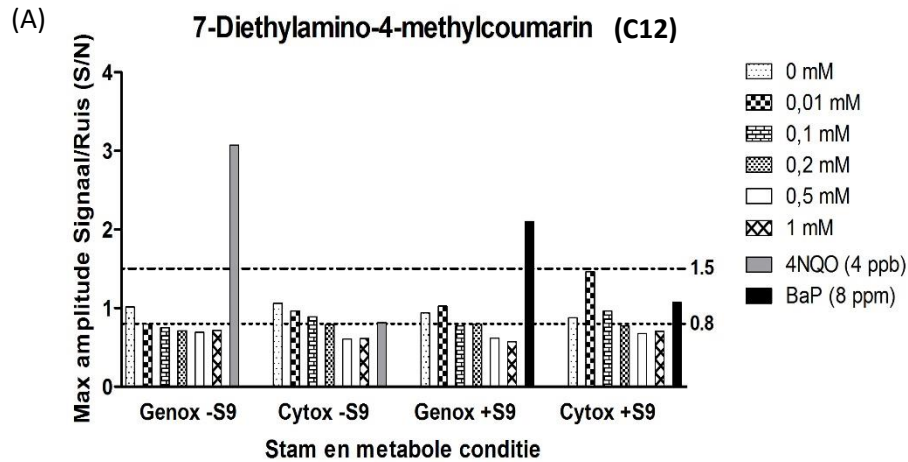
Figuur 26. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 2-Methyl-4-isothiazoline-3-on gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 2-Methyl-4-isothiazoline-3-on. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

Figuur 27. (A) Maximale S/N ratio's in functie van Ethyl-tolueen-4-sulfonaat gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van Ethyl-tolueen-4-sulfonaat. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.



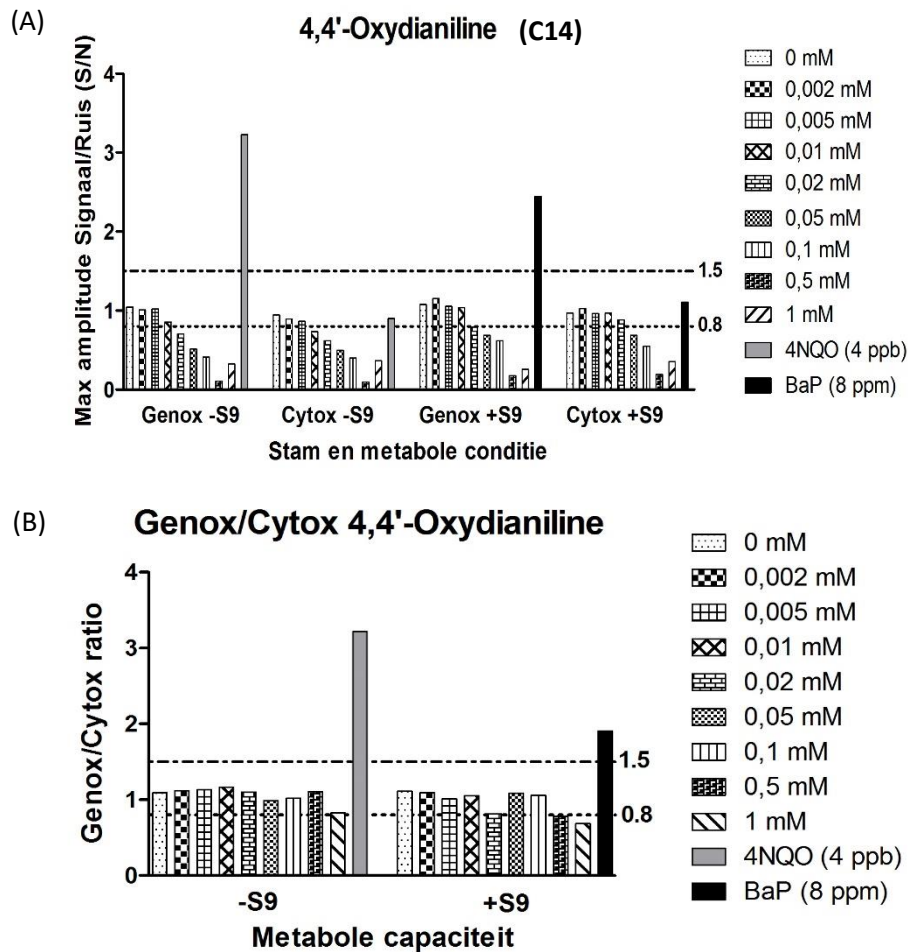
Figuur 28. (A) Maximale S/N ratio's in functie van Soedaan III gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van Soedaan III. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

Figuur 29. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 5-Aminosalicylzuur gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 5-Aminosalicylzuur. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.



Figuur 30. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 7-Diethylamino-4-methylcoumarin gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytox ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 7-Diethylamino-4-methylcoumarin. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

Figuur 31. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 4,4'-Diamino-difenylmethaan gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytox ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 4,4'-Diamino-difenylmethaan. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.



Figuur 32. (A) Maximale S/N ratio's in functie van 4,4'-Oxydianiline gemeten gedurende 4 uur. (B) Maximale Genox/Cytos ratio's in aan- en afwezigheid van S9 in functie van 4,4'-Oxydianiline. 4NQO is de positieve controle in afwezigheid van S9, B(a)P is de positieve controle in aanwezigheid van S9.

9.7 Resultaten micronucleustest

9.7.1 Micronucleustest 1

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	1	24	200 000	4 +	5	23	0	X	DAPI
- Controle		0	1	24	200 000	4 +	5	23	0		AO
- Controle		1	1	24	200 000	4 +	5	23	0	X	DAPI
- Controle		1	1	24	200 000	4 +	5	23	0		AO
Afl-B1	0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg/ml	1	1	24	200 000	4 +	5	23	0	X	DAPI
Afl-B1	0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg/ml	1	1	24	200 000	4 +	5	23	0		AO
B(a)P	1; 2; 10; 20; 40 µg/ml	1	1	24	200 000	4 +	5	23	0	X	DAPI
B(a)P	1; 2; 10; 20; 40 µg/ml	1	1	24	200 000	4 +	5	23	0		AO

Scoring MN:

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		895	20	/
- Controle + 1% S9		560	18	/
Afl-B1	0,25 µg/ml + 1% S9	406	49	/
Afl-B1	0,5 µg/ml + 1% S9	576	28	/
Afl-B1	1 µg/ml + 1% S9	228	96	/
Afl-B1	2 µg/ml + 1% S9	156	90	/
Afl-B1	4 µg/ml + 1% S9	27	148	/
B(a)P	1 µg/ml + 1% S9	950	29	/
B(a)P	2 µg/ml + 1% S9	393	25	/
B(a)P	10 µg/ml + 1% S9	822	34	/
B(a)P	20 µg/ml + 1% S9	177	23	/
B(a)P	40 µg/ml + 1% S9	462	17	/

9.7.2 Micronucleustest 2

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0	X	DAPI
- Controle		0	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0		AO
- Controle		1	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0	X	DAPI
- Controle		1	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0		AO
Afl-B1	0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg/ml	1	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0	X	DAPI
Afl-B1	0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg/ml	1	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0		AO
B(a)P	1; 2; 10; 20; 40 µg/ml	1	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0	X	DAPI
B(a)P	1; 2; 10; 20; 40 µg/ml	1	1	24	200 000	4 + (20 u milieu)	5	23	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		960	6	/
- Controle + 1% S9		1086	26	/
Afl-B1	0,25 µg/ml + 1% S9	879	36	/
Afl-B1	0,5 µg/ml + 1% S9	46	43	/
Afl-B1	1 µg/ml + 1% S9	49	41	/
Afl-B1	2 µg/ml + 1% S9			/
Afl-B1	4 µg/ml + 1% S9			/
B(a)P	1 µg/ml + 1 % S9	1194	27	/
B(a)P	2 µg/ml + 1 % S9	2057	30	/
B(a)P	10 µg/ml + 1 % S9	1156	24	/
B(a)P	20 µg/ml + 1 % S9	247	8	/
B(a)P	40 µg/ml + 1 % S9			/

9.7.3 Micronucleustest 3

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	1	24	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
- Controle		0	1	24	300 000	4 +	5	24	0		AO
- Controle		1	1	24	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
- Controle		1	1	24	300 000	4 +	5	24	0		AO
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	24	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	24	300 000	4 +	5	24	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		999	18	/
- Controle + 1% S9		3142	19	/
Afl-B1	0,5 µg/ml + 1% S9	1040	23	/

9.7.4 Micronucleustest 4

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	1	6	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
- Controle		0	1	6	300 000	4 +	5	24	0		AO
- Controle		1	1	6	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
- Controle		1	1	6	300 000	4 +	5	24	0		AO
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	6	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	6	300 000	4 +	5	24	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		462	104	/
- Controle + 1% S9		4214	18	/
Afl-B1	0,5 µg/ml + 1% S9	710	14	/

9.7.5 Micronucleustest 5

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		1	1	12	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
- Controle		1	1	12	300 000	4 +	5	24	0		AO
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	12	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	12	300 000	4 +	5	24	0		AO
B(a)P	2 µM	1	1	12	300 000	4 +	5	24	0	X	DAPI
B(a)P	2 µM	1	1	12	300 000	4 +	5	24	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle + 1% S9		1917	15	1,788
Afl-B1	0,5 µg/ml + 1% S9	1440	26	1,722
B(a)P	2 µM	2084	26	1,432

9.7.6 Micronucleustest 6

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		1	1	6	300 000	4 +	5	44	0	X	DAPI
- Controle		1	1	6	300 000	4 +	5	44	0		AO
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	6	300 000	4 +	5	44	0	X	DAPI
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	1	6	300 000	4 +	5	44	0		AO
B(a)P	2 µM	1	1	6	300 000	4 +	5	44	0	X	DAPI
B(a)P	2 µM	1	1	6	300 000	4 +	5	44	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle + 1% S9		2217	60	/
Afl-B1	0,5 µg/ml + 1% S9	906	60	/
B(a)P	2 µM	2527	76	/

9.7.7 Micronucleustest 7

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
Afl-B1	2,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
Afl-B1	2,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
Afl-B1	5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
Afl-B1	5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
B(a)P	2 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
B(a)P	2 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		1788	29	1,65
- Controle + 1% S9		1404	23	1,70
Afl-B1	2,5 µg/ml	30	0	1,17
Afl-B1	5 µg/ml		/	1,15
B(a)P	2 µM	1505	19	1,67

9.7.8 Micronucleustest 8

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
Afl-B1	2,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
Afl-B1	2,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
Afl-B1	5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
Afl-B1	5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
B(a)P	2 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
B(a)P	2 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		941	53	1,70
- Controle + 1% S9		1933	39	1,85
Afl-B1	2,5 µg/ml	54	74	1,25
Afl-B1	5 µg/ml		/	1,15
B(a)P	2 µM	1645	49	1,93

9.7.9 Micronucleustest 9

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
Afl-B1	1 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
Afl-B1	1 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
B(a)P	10 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
B(a)P	10 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
B(a)P	20 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
B(a)P	20 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO

Component	Concentratie	Automatische Scoring			Manuele scoring	
		# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen
- Controle		2019	33	1,77	1000	34
- Controle + 1% S9		3910	20	1,86	1000	44
Afl-B1	0,5 µg/ml	1226	34	1,32	1000	64
Afl-B1	1 µg/ml	730	55	1,20	600	73
B(a)P	10 µM	3101	38	1,68	1000	34
B(a)P	20 µM	2514	33	1,45	1000	36

9.7.10 Micronucleustest 10

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
- Controle		1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
Afl-B1	0,5 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
Afl-B1	1 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
Afl-B1	1 µg/ml	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
B(a)P	10 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
B(a)P	10 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO
B(a)P	20 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0	X	DAPI
B(a)P	20 µM	1	0,5	6	300 000	4 -	5	44	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		3567	61	1,94
- Controle + 1% S9		2354	88	1,96
Afl-B1	0,5 µg/ml	1663	41	1,33
Afl-B1	1 µg/ml	753	42	1,35
B(a)P	10 µM	2454	57	/
B(a)P	20 µM	1836	54	/

9.7.11 Micronucleustest 11

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
- Controle		0	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
- Controle		2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
- Controle		2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
B(a)P	10 µM	2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
B(a)P	10 µM	2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
B(a)P	15 µM	2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
B(a)P	15 µM	2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO
B(a)P	20 µM	2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0	X	DAPI
B(a)P	20 µM	2	0,5	6	300 000	4 -	5	24	0		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		2090	11	1,71
- Controle + 2% S9		2046	20	1,78
B(a)P	10 µM	952	25	1,58
B(a)P	15 µM	1640	26	1,62
B(a)P	20 µM	1535	33	1,48

9.7.12 Micronucleustest 12

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
- Controle		0	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
- Controle		2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
- Controle		2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
CP	5 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
CP	5 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
CP	10 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
CP	10 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
CP	20 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
CP	20 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
CP	40 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
CP	40 µg/ml	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
B(a)P	5 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	5 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
B(a)P	10 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	10 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
B(a)P	20 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	20 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
B(a)P	50 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	50 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO
B(a)P	200 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	200 µM	2	0,5	6	500 000	4 -	4	44	1		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		1018	35	1,84
- Controle + 2% S9		1977	40	1,88
CP	5 µg/ml	1859	52	1,65
CP	10 µg/ml	2098	66	1,79
CP	20 µg/ml	1709	59	1,71
CP	40 µg/ml	1136	53	1,41
B(a)P	5 µM	1773	/	1,74
B(a)P	10 µM	2089	40	1,78
B(a)P	20 µM	2046	26	1,56
B(a)P	50 µM	1719	23	1,44
B(a)P	200 µM	939	9	1,37

9.7.13 Micronucleustest 13

Component	Concentratie	S9 (%)	DMSO (%)	Type well plaat	Aantal cellen/ml uitgezaaid	Blootstelling (uur) in milieu met of zonder serum (+ / -)	Cyt-B (µg/ml)	Tijd Cyt-B (uur)	Herstel-periode (uur)	Hypotone shock	Kleuring
- Controle		0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
- Controle		0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
CP	2 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
CP	2 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
CP	5 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
CP	5 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
CP	10 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
CP	10 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
CP	20 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
CP	20 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
CP	40 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
CP	40 µg/ml	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
B(a)P	1 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	1 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
B(a)P	2 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	2 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
B(a)P	5 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	5 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
B(a)P	10 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	10 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO
B(a)P	20 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1	X	DAPI
B(a)P	20 µM	0	0,5	6	500 000	24 +	4	44	1		AO

Component	Concentratie	# binucleaire cellen	# MN / 2000 cellen	CBPI
- Controle		2070	44	1,84
CP	2 µg/ml	2091	31	1,59
CP	5 µg/ml	2036	44	1,61
CP	10 µg/ml	1958	46	1,53
CP	20 µg/ml	1996	21	1,53
CP	40 µg/ml	2105	27	1,50
B(a)P	1 µM	1983	19	1,63
B(a)P	2 µM	2089	32	1,58
B(a)P	5 µM	2005	24	1,14
B(a)P	10 µM	326	18	1,24
B(a)P	20 µM	14	0	1,15

