

# Verlag

## Gezondheidseffecten over generaties door (beroepsmatige) blootstelling?

Verlag bijeenkomst Contactgroep Chemie (CGC) en de Nederlandse Vereniging voor Toxicologie NVT sectie arbeidstoxicologie donderdag 13 maart 2014

Jolanda Rijnkels<sup>1</sup> en Jeroen Terwoert<sup>2</sup>

Epigenetica is een betrekkelijk nieuw en uitdagend onderzoeksgebied dat zich in toenemende belangstelling mag verheugen. Er zijn bijvoorbeeld aanwijzingen dat door omgevingsfactoren prenataal veroorzaakte epigenetische veranderingen geassocieerd zijn met een verhoogde kans op later in het leven optredende (chronische) ziekten. Als relevante omgevingsfactoren voor het induceren van deze veranderingen worden voedingsfactoren, microbiële factoren en luchtverontreiniging genoemd. Epigenetica werpt hiermee een nieuw licht op bijvoorbeeld de reprotoxiciteit. Dit vormde het thema van een gezamenlijke bijeenkomst van de Sectie Arbeidstoxicologie van de Nederlandse Vereniging voor Toxicologie en de Contactgroep Gezondheid en Chemie, op 13 maart 2014.

### Wat is Epigenetica?

Lode Godderis; Universiteit Leuven

Lode Godderis begint de middag met het voorbeeld van de giraffen. Deze dieren hebben een lange nek, zodat ze beter bij de acaciabladeren kunnen dan andere dieren. Maar hoe is de lange nek ontstaan? Volgens de theorie van Darwin is sprake van natuurlijke genetische selectie: de giraffen met de langste nek werden uitgeselecteerd. Volgens een tijdgenoot Lamarck gaat het echter om een generatielange aanpassing aan de omgeving die voortkomt uit het voortdurend moeten reiken naar eten. Dit laatste verwijst naar epigenetische veranderingen door omgevingsfactoren.

Een gen komt tot expressie via transcriptie (DNA wordt omgezet in RNA) en translatie (RNA wordt omgezet in een eiwit). Als dat gen codeert voor een enzym of eiwit wat betrokken is bij het stimuleren of afremmen van de celdeling, dan is voor te stellen dat schade aan het DNA in deze genen tot functieverlies van deze genen leidt, waardoor de cel zich in principe kan gaan ontwikkelen tot een tumorcel. Er is dan sprake van genetische veranderingen. Epigenetische veranderingen kunnen ook leiden tot functieverlies van de genen, maar dan zonder het DNA te beschadigen. Ze doen dat via allerlei mechanismen waarvan DNA-methylatie, histonmodificatie en 'non-coding' RNA het meest genoemd zijn. In een vereenvoudigd model wordt genexpressie sterk gereguleerd; er is een 'schakelaar' vlak voor het gen die aan of uit gezet kan worden al naar gelang de behoefte van de cel. Deze schakelaars bestaan uit nucleotiden (CpG eilanden) waaraan methylgroepen kunnen binden (DNA-methylatie).

<sup>1</sup> Gezondheidsraad; email: jm.rijnkels@gr.nl

<sup>2</sup> TNO; email: jeroen.terwoert@tno.nl

Is zo'n schakelaar gemethyleerd dan kunnen transcriptiefactoren niet aan de nucleotiden binden en kan het gen niet afgelezen worden en dus ook niet tot expressie komen. Er zijn beperkte aanwijzingen dat bepaalde nano-deeltjes op deze manier de expressie van bepaalde genen kunnen beïnvloeden. Andersom kan hypomethylatie tot overexpressie leiden. Een ander mechanisme is de histonmodificatie. DNA is omgeven door eiwitten, de histonen, die mede bepalen hoe toegankelijk het DNA is voor transcriptiefactoren. Hoe compacter het DNA rond de histonen zitten hoe minder genactiviteit er is. Bepaalde metalen (arsen, nikkel, cobalt, chroom) blijken aan de histonen methyl-, acetyl- en andere chemische structuren te kunnen binden, waardoor histonen worden gemodificeerd en de toegankelijkheid van het DNA verandert. Een derde mechanisme is de rol van het 'non-coding' RNA, dat is RNA dat niet wordt vertaald naar een eiwit. Ze zijn betrokken bij normale moleculaire processen, zoals het reguleren van 'coding' RNA. Recent is gebleken dat een aantal van die 'non-coding' RNA-moleculen de expressie van genen kunnen up- of downreguleren. Dit zou betekenen dat chemische stoffen die in staat zijn te reageren met de 'non-coding' RNA, tevens de expressie van die genen kunnen beïnvloeden.

Epigenetische processen zijn natuurlijke processen die zorgen voor variatie in genexpressie in verschillende typen cellen. Er vinden bijvoorbeeld veel epigenetische veranderingen plaats in de embryonale ontwikkeling. In hoeverre omgevingsfactoren, zoals blootstelling aan chemische stoffen, kunnen aanzetten tot onbedoelde epigenetische veranderingen en vervolgens tot nadelige gezondheidseffecten, zoals kanker, hart- en vaatziekten en longziekten, is nog grotendeels onduidelijk.

### Het geheugen van onze genen: lessen uit Hongerwinteronderzoek

Bas Heijmans; Leids Universitair Medisch Centrum

Naar aanleiding van voorgaande presentatie legt Bas Heijmans uit dat in zijn onderzoek vooral is gekeken naar DNA-methylatieveranderingen. Een reden daarvoor is dat DNA-methylatie goed en snel meetbaar is vergeleken met metingen van andere epigenetische veranderingen, en dat DNA-methylatie de meest stabiele verandering is. Als eerste voorbeeld van zijn onderzoek noemt hij roken. Zo is bij rokers sprake van meer DNA-methylatie op bepaalde genen dan bij niet rokers. Door te stoppen met

roken neemt de DNA-methylatie af, maar is het niveau na bijvoorbeeld 20 jaar nog steeds hoger dan bij mensen die nooit gerookt hebben. Prenatale blootstelling door rokende moeders toonde aan dat in bepaalde genen van de pasgeborenen meer DNA-methylatie had plaatsgevonden dan in pasgeborenen van moeders die niet rookten. Uit dierexperimenten bleek verder dat een dieet verrijkt met methylsupplementen, bij muizen een hogere graad aan methylatie van het agouti-gen veroorzaakte. Het gevolg was dat deze muizen niet de karakteristieke agoutikleur hadden, terwijl ze wel genetisch identiek waren met de muizen die een normaal dieet kregen.

Dit verschil bleef zo tot in de volwassen leeftijd.

Tijdens de Hongerwinter van 1944/1945 lag de dagelijkse calorie inname lager dan 700 kcal per dag. Dit terwijl een volwassen persoon gemiddeld 2200 kcal per dag nodig heeft. Jaren later vonden onderzoekers een relatie tussen de Hongerwinter en het optreden van hart- en vaatziekten en schizofrenie bij nakomelingen van vrouwen die toen zwanger waren. De onderzoeksgroep van Heijmans stelde daarbij vast dat bij de nakomelingen in de genen die coderen voor groeifactoren (bijvoorbeeld IGF2) – zo'n 60 jaar na de Hongerwinter – minder DNA-methylatie voorkwam dan in de genen van hun broers en zussen die daarvoor of ruim na de Hongerwinter zijn geboren. De hypomethylatie was het duidelijkst bij die nakomelingen die in de vroege embryonale fase zijn 'blootgesteld' (eerste tien dagen na conceptie). Meer recent en in aansluiting op voorgaande bevinding is onderzoek verricht onder een groep zwangere vrouwen die rondom het begin van hun zwangerschap extra foliumzuur als voedingssupplement slikten. Vervolgens is bij de pasgeborenen gekeken naar de DNA-methylatiegraad in genen die coderen voor groeifactoren (IGF2). In pasgeborenen van vrouwen die het supplement slikten waren deze genen veel meer gemethyleerd dan in pasgeborenen van vrouwen die geen extra foliumzuur slikten.

Een belangrijke vraag is of epigenetische effecten overerfbaar zijn. Volgens Heijmans zijn daarvoor tot nu toe geen duidelijke aanwijzingen gevonden. Een reden daarvoor zou kunnen zijn dat het DNA van geslachtscellen in een voorstadium in principe volledig worden gedemethyleerd en pas bij uitrijping weer gemethyleerd worden.

### **Impact van blootstelling aan fijnstof op DNA-methylatie in de placenta**

*Bram Janssen; Universiteit Hasselt, Centre for Environmental Sciences*

Ook Bram Janssen ging verder in op de DNA-methylatie en wel op zijn lopend cohortonderzoek onder – tot nu toe – 600 zwangere vrouwen in Belgisch Limburg. In dit onderzoek kijkt men naar de invloed van onder meer roken en blootstelling aan fijnstof in relatie tot DNA-methylatie in de placenta als mogelijk vroege biomarker van blootstelling. In de literatuur zijn hierover wisselende resultaten gerapporteerd: na blootstelling aan tabaksrook en verkeersgerelateerd fijnstof is zowel hyper- als hypomethylatie van DNA in de placenta gevonden, en beide op

zowel genspecifiek als op globaal ('totaal') niveau.

Een eerste onderzoeksvraag was "Beïnvloedt blootstelling aan fijnstof tijdens de zwangerschap de globale DNA-methylatie in het placentaal weefsel van pasgeborenen?". Het lijkt er sterk op, dat de meest gevoelige periode voor DNA-methylatie vlak na de bevruchting ligt. Echter, de metingen in de placenta konden logischerwijs pas na de geboorte plaatsvinden. De blootstelling aan fijnstof moest daarom retrospectief worden bepaald voor de implantatiefase, het eerste, tweede en het derde trimester van de zwangerschap. Bij moeders met een hoge blootstelling aan fijnstof werd een lagere globale DNA-methylatie in de placenta gevonden. Dit effect was het sterkst bij blootstelling in het eerste trimester (inclusief de implantatiefase) en bleef aanwezig na correctie voor confounders als leeftijd van de moeder, rookgedrag en sekse van de pasgeborene. De analyse liet zien, dat het effect vooral optreedt in de implantatiefase.

Een tweede onderzoeksvraag luidde "Zijn het mitochondriale DNA-gehalte en mitochondriale DNA-methylatie in de placenta gevoelige parameters voor blootstelling aan fijnstof in utero?". Mitochondriaal DNA is gevoeliger voor beschadiging door zuurstofradicalen die ontstaan na blootstelling aan fijnstof dan nucleair DNA, omdat beschermingsmechanismen ontbreken. Beschadiging van mitochondriaal DNA is geassocieerd met ziekten als Parkinson's en diabetes. De studie liet zien dat blootstelling aan fijnstof tijdens de zwangerschap leidde tot een lager mitochondriaal DNA gehalte in de placenta. De vraag die hiermee nog niet was beantwoord, was wat het mechanisme hierachter was en, meer specifiek, of mitochondriaal DNA ook gemethyleerd kan worden. In studies onder werknemers in de staalindustrie en zwangere vrouwen werd inderdaad een relatie gezien tussen blootstelling aan fijnstof en DNA-methylatie in de mitochondriën. Dit beïnvloedt op zijn beurt de transcriptie van mitochondriaal DNA en andere processen in de mitochondriën. Methylatie van mitochondriaal DNA bleek voor ongeveer 80% verantwoordelijk te zijn voor het effect dat blootstelling aan fijnstof heeft op het mitochondriaal DNA-gehalte. Samengevat werd gesteld dat DNA-methylatie en het mitochondriaal DNA-gehalte in de placenta kunnen dienen als 'moleculaire footprint' van blootstelling van de foetus in de baarmoeder. Echter, de mogelijke consequenties hiervan voor de latere gezondheid moeten nader worden onderzocht. Gedacht wordt aan cardiovasculaire effecten. Voortgaande monitoring na de geboorte moet hierover meer duidelijkheid geven.

Vanuit de zaal werd gevraagd of in de genoemde studies rekening is gehouden met andere vormen van blootstelling en wat de invloed is van mobiliteit in geval van blootstelling aan fijnstof. De spreker antwoordde dat in de studies de gegevens gecorrigeerd worden voor bijvoorbeeld roken en verhuizingen. Op variaties in de blootstelling gedurende dag kan niet worden gecorrigeerd. Wel is weer rekening gehouden met beroepsmatige blootstelling aan fijnstof, zoals bij laswerkzaamheden.

Een andere vraag is waarom eigenlijk gezondheidseffecten

te verwachten zijn bij verandering in mitochondriaal DNA (in de placenta). Volgens Janssen is dat gebaseerd op de hypothese 'fetal origin of health'. Hij vult aan dat nader onderzocht moet uitwijzen of de mitochondriale effecten die zijn gezien in de placenta ook optreden in ander (foetal) weefsel.

## **Epigenetica en blootstelling aan chemicaliën; Betekenis voor de bedrijfsgezondheidszorg**

*Roel Vermeulen; IRAS - Universiteit Utrecht*

Roel Vermeulen ging verder in op de praktische betekenis van epigenetische veranderingen en op de toepasbaarheid als biomarker voor het aantonen van blootstelling (DNA-methylatie, eenvoudig te meten) ten behoeve van de bedrijfsgezondheidszorg, 'health surveillance' en het traceren van gevoelige individuen. Biomonitoring met markers voor gezondheidsrisico's kan in principe op diverse punten in de 'chronologische reeks' DNA – RNA – eiwitten – fenotype (eindpunt, optreden ziekte) worden uitgevoerd. Er zijn aanwijzingen dat epigenetische veranderingen kunnen leiden tot auto-immuun ziekten, kanker, diabetes en neurodegeneratieve ziekten, en dat blootstelling aan bijvoorbeeld tabaksrook, fijnstof, zware metalen, ioniserende straling en diverse virussen, epigenetische veranderingen teweeg kunnen brengen. Direct bewijs dat dit vervolgens tot ziekte kan lijden is er eigenlijk nog nauwelijks. In principe hoeven epigenetische veranderingen niet tot gezondheidsschade te leiden. Ook lijkt het erop dat deze veranderingen weleens weefsel-specifiek kunnen zijn, zodat geen uitspraken over effecten in andere weefsels gedaan kan worden. Daarnaast kan het ook zo zijn dat epigenetische veranderingen een gevolg zijn en niet de oorzaak van de ziekte.

Vermeulen noemde twee prospectieve cohortstudies naar de effecten van roken en DNA-methylatie als blootstellingsmarker. Hierin bleek dat de mate en de locatie van DNA-methylatie bij rokers, voormalige rokers en 'nooit rokers' verschilde. De verschillen waren deels tijdelijk, aangezien zij het grootst waren tussen rokers en 'nooit rokers'. Echter, een deel van de verschillen bleef zichtbaar als 'sporen' van historische blootstelling. Dit opent volgens Vermeulen de mogelijkheid om ook in andere gevallen de historische blootstelling in kaart te brengen aan de hand van epigenetische markers. Verder onderzoek is echter nog nodig om de gevoeligheid en de specificiteit van deze marker te toetsen.

Wat betreft de toepassing van DNA-methylatie bij vroegtijdige signalering van gezondheidseffecten wordt aangenomen dat veel carcinogene stoffen via epigenetische veranderingen de tumorontwikkeling op gang kunnen brengen. Echter, de aanwijzingen hiervoor stammen voornamelijk uit onderzoek met cellijnen (in vitro) en dieren, en veel minder met mensen. Bovendien zijn vaak de effecten van 'extreme' doses bestudeerd in plaats van reële blootstellingen. Verder zijn er ook hier nog vragen omtrent de gevoeligheid en specificiteit van de methoden. Het onderzoeken naar de rol van epigenetische mechanismen bij individuele gevoeligheid voor bloot-

stelling aan stoffen roept een aantal lastige vragen op, zoals de vraag of epigenetische variabiliteit voldoende aanleiding is om bijvoorbeeld een 'gevoelig' individu uit te sluiten van bepaalde typen werk. Genetische - of epigenetische - screening roept ook ethische vragen op: hoe zit het met de privacy van de betrokkene, en met de eigen verantwoordelijkheid en keuzevrijheid? En bestaat niet het gevaar dat men gestigmatiseerd wordt, of dat het ontdekken van een 'epigenetische gevoeligheid' leidt tot een zware psychische belasting van de betrokkene? Vermeulen concludeerde dat de wetenschap van epigenetica interessant is, maar dat de praktische betekenis nog lang niet altijd duidelijk is. Echter, in specifieke gevallen kan het gebruik van epigenetische biomarkers bijdragen aan een betere preventie.

## **Discussie**

De dagvoorzitter trapte de discussie af met drie vragen. De belangrijkste discussiepunten zijn hieronder samengevat.

### *1) Moeten we de huidige tests voor reproductietoxiciteit uitbreiden met epigenetische effecten?*

De sprekers antwoorden dat de nieuwe kennis over epigenetische veranderingen er inderdaad toe kan leiden dat de toxiciteitstests aangepast of aangevuld moeten worden, maar dat ook hiervoor nog veel werk gedaan moet worden. Als voorbeeld kan de regulering van endocriene 'disruptors' genoemd worden, waarvoor mogelijk ook een relatie met epigenetische mechanismen bestaat. Een aansluitende vraag is of ook niet gekeken moet gaan worden naar eventuele effecten die pas later in het leven optreden, terwijl de epigenetische veranderingen al plaats vonden in de foetale fase. Heijmans bevestigt dat de implantatiefase en het eerste trimester van de zwangerschap de gevoeligste periode voor epigenetische veranderingen lijkt te zijn, en dat die veranderingen op latere leeftijd mogelijk relevant zijn. Maar kennis hierover ontbreekt nog grotendeels.

Iemand uit de zaal merkt op dat het RIVM de tweegeneratiestudies wil laten vervallen en vraagt zich af of dit wel verstandig is met de nieuwe kennis en zorgen over epigenetische veranderingen. Heijmans zou dit type dierstudie niet zonder meer schrappen, al was het maar omdat er aanwijzingen zijn dat blootstelling van de vader, via de gameten, tot epigenetische veranderingen bij zijn nakomelingen kan leiden tot in de 2de generatie.

### *2) Zouden op grond van de nieuwe kennis de grenswaarden van stoffen verlaagd moeten worden?*

Vanuit de zaal werd opgemerkt dat veel van de in deze middag genoemde stoffen al via de regelgeving worden gereguleerd en dat er voor sommige van die stoffen vaak al een lage grenswaarde gelden. De aanwezigen vroegen zich daarbij af of nieuwe kennis over de gevolgen van epigenetische veranderingen dan nog zullen leiden tot aanscherping van de grenswaarden. Vermeulen benadrukt dat epigenetische veranderingen niet perse nadelig

hoeven te zijn voor de gezondheid. Verder zullen eerst voldoende onderbouwde gegevens geproduceerd moeten worden (gegevens over blootstellingen effectgegevens en validatiegegevens) voordat de regelgeving eventueel aangescherpt kan worden. Godderis voegt hieraan toe dat via onderzoek naar epigenetische effecten mogelijk ook 'nieuwe' carcinogene stoffen geïdentificeerd kunnen worden. In de zaal wordt opgemerkt dat de regelgeving voor carcinogene stoffen al heel streng is. Wat is dan de toegevoegde waarde van het testen op epigenetische veranderingen. Godderis antwoordt dat op dit moment hij tests over dit soort veranderingen als aanvulling ziet en niet als beslissend voor het bepalen of een stof carcinogeen is of niet.

*3) Kunnen en moeten wij pre- en postnatale epigenetische effecten onderscheiden?*

Hierover wordt niet gediscussieerd.

### *Overige vragen*

Een deelnemer stelt de vraag of epigenetische veranderingen zouden kunnen verklaren waarom bijvoorbeeld kinderen en ouderen gevoeliger voor blootstelling en ziekte lijken te zijn dan andere groepen mensen. Volgens Vermeulen zijn daarvoor nog weinig concrete aanwijzingen. Wel wordt hier in verschillende onderzoeken naar gekeken.

Een andere deelnemer vraagt of epigenetische veranderingen ook ten grondslag kan liggen aan het optreden van allergische klachten. Godderis beaamt dat dit mogelijk zou kunnen zijn: astma is namelijk één van de aandoeningen waarvoor mogelijke relaties tussen immunologische parameters en epigenetische mechanismen worden bestudeerd.