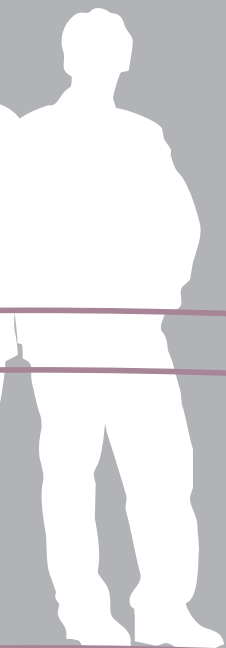


[Faculty of Science
Kennispunt Bètawetenschappen]

Cytostatica in het aquatisch milieu

Eri van Heijnsbergen

P-UB-2008-04



Universiteit Utrecht

Cytostatica in het aquatisch milieu

Aanwezigheid en risico's

Eri van Heijnsbergen

Kennispunt Bètawetenschappen, Universiteit Utrecht

Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), Universiteit Utrecht

September 2008

P-UB-2008-04

Kennispunten slaan een brug tussen universiteit en maatschappij. Zij behandelen onderzoeksvragen van bedrijven, overheden en maatschappelijke organisaties.

Colofon

Rapportnummer	P-UB-2008-04
ISBN	978-90-79589-04-3
Verschenen	September 2008
Druk	eerste
Titel	Cytostatica in het aquatisch milieu Aanwezigheid en risico's
Auteur	H.H.L. van Heijnsbergen, BSc.
Begeleider	dr. H. Schmitt, Institute for Risk Assessment (IRAS), Universiteit Utrecht
Projectcoördinator	dr. V.J. Winter, Kennispunt Bètawetenschappen, Universiteit Utrecht
Opdrachtgever	Stichting Huize Aarde, Enschede
Projectnummer	2007-007
Uitgever	Kennispunt Bètawetenschappen, Universiteit Utrecht Sorbonnelaan 16, 3584 CA Utrecht. tel. 030-253 7363 www.science.uu.nl/kennispunt
Coverfoto	Geoff Coupe, Flickr
Copyright	Het is niet toegestaan (gedeelten van) deze uitgave te vermenigvuldigen door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook. Overname van gedeelten van de tekst, mits met bronvermelding, is wel toegestaan. Toezending van een bewijsexemplaar wordt zeer op prijs gesteld.

Inhoudsopgave

Voorwoord	5
Samenvatting	7
1 Inleiding	9
1.1 Geneesmiddelen in het milieu	9
1.2 Cytostatica	10
1.3 Doel onderzoek	10
2 Emissie, verspreiding en voorkomen van cytostatica in het milieu	13
2.1 Emissie	13
2.2 Verspreiding	14
2.3 Voorkomen van cytostatica in het milieu	15
2.4 Discussie	26
2.5 Conclusie	29
3 Schattingen van concentraties in het milieu	31
3.1 Schattingen ziekenhuiseffluent	31
3.2 Schattingen oppervlaktewater	32
3.3 Discussie	35
3.4 Conclusie	36
4 Effecten cytostatica	37
4.1 Ecotoxicologie	37
4.2 Werkingsmechanismen, farmacokinetiek en bijwerkingen van cytostatica	43
4.3 Discussie	48
4.4 Conclusie	53

5	Risicobeoordeling	55
	5.1 Vergelijking van effect- en milieuconcentraties	55
	5.2 EMEA	57
	5.3 Discussie	58
	5.4 Conclusie	59
	Literatuurlijst	61
	Bijlagen	66
	Bijlage 1 Begrippenlijst	66

Voorwoord

In Nederland en het buitenland zijn diverse geneesmiddelen aangetoond in het aquatisch milieu. In dit rapport zijn de resultaten beschreven van een literatuurstudie naar de aanwezigheid van cytostatica (geneesmiddelen tegen kanker) in rioolwater en oppervlaktewater en de mogelijke risico's van deze stoffen voor aquatische organismen.

Het onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Stichting Huize Aarde. Deze stichting zet zich sinds 1992 in voor een duurzamere wereld. Zij houden onder andere activiteiten die met gezondheidszorg te maken hebben tegen het licht en bekijken deze op hun effecten voor milieu en samenleving. De stichting heeft in dit kader het Kennispunt Bètawetenschappen (voorheen Wetenschapswinkel Biologie) gevraagd om na te gaan of er nadelige effecten te verwachten zijn van cytostatica voor het milieu.

Graag bedank ik Heike Schmitt (onderzoeksgroep IRAS - VPH, Universiteit Utrecht) voor haar uitdagende inhoudelijke begeleiding en Alfons Uijtewaal (Stichting Huize Aarde) en Victor Winter (Kennispunt Bètawetenschappen) voor hun kritische blik op de verslaglegging.

Verder wil ik mevrouw J.G.M. Derksen, mevrouw M.N. Mons, de heer G. van Mill en de heer J.H. Roorda bedanken voor het verstrekken van informatie.

Samenvatting

Cytostatica zijn middelen die gebruikt worden voor de behandeling van kanker (bekend als chemotherapie). Een cytostaticum beoogt de deling van cellen te stoppen en doet dit over het algemeen door in te grijpen op de chemische reacties in de cel die betrokken zijn bij de celdeling. Na toediening worden cytostatica in hun oorspronkelijke vorm of als metabooliet door patiënten uitgescheiden (urine, faeces) in afvalwater.

In Nederland zijn enkel de cytostatica cyclofosfamide en ifosfamide onderzocht en alleen gedetecteerd in ziekenhuiseffluenten tot een concentratie van 9.9 µg/L. In buitenlandse onderzoeken werden verschillende cytostatica gedetecteerd in ziekenhuisafvalwater tot concentraties van 122 µg/L. Cyclofosfamide en ifosfamide werden in het influent en effluent van rwzi's aangetroffen (influent: cyclofosfamide tot 143 ng/L, ifosfamide mediaan 6.2 ng/L, effluent: cyclofosfamide tot 20 ng/L, ifosfamide mediaan 9.3 ng/L).

De concentraties nemen af gaandeweg de route ziekenhuiseffluent, rwzi-influent, rwzi-effluent en oppervlaktewater. Deze concentratieafname kan onder andere verklaard worden doordat de stroom verdund wordt en/of doordat stoffen er bij de zuivering in de rwzi verwijderd worden.

Cytostatica komen waarschijnlijk niet in meetbare hoeveelheden via de zuiveringsinstallaties in het oppervlaktewater terecht want ze zijn tot nu toe niet aangetoond in oppervlakte-wateren. Er waren geen bevindingen boven de detectielimieten (6.25 -10 ng/L).

De Predicted Environmental Concentration's (PEC) in oppervlaktewater voor vier geselecteerde cytostatica liggen in de orde van grootte van nanogrammen (PEC_{CONV}) en microgrammen (PEC_{EMEA}), afhankelijk van de soort berekening. De eerste berekening geeft waarschijnlijk een beter beeld van de werkelijke concentraties in oppervlaktewater omdat de tweede berekening gebruik maakt van onrealistische verbruikswaarden.

Schattingen gedaan voor ziekenhuiseffluent komen redelijk goed overeen met de gemeten waarden.

5-Fluorouracil en cisplatine vertoonden chronische toxiciteit bij vrij lage concentraties (5-fluorouracil: LOEC 0.01 mg/L, groeiremming *Pseudomonas putida* en *Pseudokirchneriella subcapitata*; cisplatine: LOEC 0.1 mg/L, groeiremming *P. putida* en 1 mg/L, groeiremming *P. subcapitata*). Methotrexaat was weinig toxisch met een laagste EC50-waarde van 45 mg/L (groeiremming protozoa). Cyclofosfamide werd niet of nauwelijks toxisch bevonden in de verschillende toxiciteitstesten.

Cisplatine en fluorouracil vertoonden genotoxiciteit bij concentraties vanaf de orde van grootte van tientallen µg/L en cyclofosfamide bij 9.8 mg/L. De verschillende genotoxiciteits-data waren echter niet congruent.

Er lijkt geen schadelijke invloed te zijn van cisplatine voor het milieu maar hier kunnen moeilijk conclusies getrokken worden omdat niet bekend is hoeveel cisplatine voorkomt in oppervlaktewater. De gebruikte schattingen gaan namelijk voorbij aan de bijdrage van uitstoot door auto's van platina in het milieu.

Effect- en (geschatte) milieuconcentraties schelen voor methotrexaat minstens een factor 11.500. Daar komt bij dat methotrexaat goed biologisch afbreekbaar is en hieruit kan opgemaakt worden dat het risico van dit cytostaticum voor aquatische organismen nagenoeg nihil is.

Of cyclofosfamide een risico vormt voor het milieu is slecht in te schatten aan de hand van de metingen naar dit cytostaticum en de gevonden toxiciteitsdata. Onderzoeken zijn namelijk alleen gedaan naar de uitgangsstof terwijl deze zelf niet toxisch is en slechts een klein deel van de toegediende concentratie wordt door de patiënt onveranderd uitgescheiden. Hierdoor wordt dus voorbijgegaan aan de eventuele invloed van toxische metabolieten.

Gezien de geringe marge tussen de verwachte concentratie van 5-fluorouracil in het oppervlaktewater (PEC) en de effectconcentraties in chronische testen, zijn chronische effecten in oppervlaktewater niet uit te sluiten voor dit cytostaticum.

Op basis van de gevonden literatuur wordt dus geen risico voor drie van de vier geselecteerde cytostatica verwacht voor aquatische organismen in het oppervlaktewater. Hierbij is het van groot belang dat opgemerkt wordt dat er zeer weinig toxiciteitsdata beschikbaar zijn en dat onduidelijk is of cytostatica in oppervlaktewater (in Nederland) voorkomen.

Hoofdstuk 1

Inleiding

1.1 Geneesmiddelen in het milieu

Hoewel onderzoek naar geneesmiddelen zich tot voor kort met name op de werkzaamheid van de stof en de mogelijke bijwerkingen richtte, beginnen de effecten van geneesmiddelen op het milieu echter steeds meer de aandacht te krijgen (Derksen et al. 2001). In onderzoeken uit vooral Duitsland maar ook Nederland (RIZA 2003, RIWA 2003, RIVM 2003, 2007) is aangetoond dat geneesmiddelen en hun omzettingsproducten (metabolieten) voorkomen in lage concentraties in rioolwater, oppervlaktewater en zelfs drinkwater.

Na toediening worden geneesmiddelen in hun oorspronkelijke vorm of als metaboliet door patiënten uitgescheiden (urine, faeces) in afvalwater (Derksen et al. 2001). Andere emissiebronnen zijn de industrie (productie geneesmiddelen) en niet geconsumeerde geneesmiddelen. Als de geneesmiddelen niet afgebroken worden in het milieu of geëlimineerd worden in rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi) door biologische afbraak of adsorptie, kunnen ze terecht komen in het aquatisch milieu en het drinkwater.

Kennis over de aanwezigheid van geneesmiddelen in het milieu is belangrijk vanuit het oogpunt van de mogelijk negatieve effecten voor de ecologie van het oppervlaktewater op korte en lange termijn. Vooral aquatische organismen zouden invloed kunnen ondervinden omdat zij hun hele leven worden blootgesteld aan (combinaties van) deze en andere industriële stoffen. Verder zijn er mogelijk consequenties voor rioolwaterzuiveringen, slibverwerking, drinkwaterbereiding, visvangst, schelpenteelt en watertoerisme.

Er bestaan geen specifieke, wettelijke normen voor de aanwezigheid van humane geneesmiddelen in oppervlaktewater, grondwater en drinkwater. Ecotoxicologische aspecten van geneesmiddelen komen wel aan de orde bij toelating van nieuwe stoffen en herziening van bestaande stoffen wanneer deze een uitgebreidere toepassing krijgen en daardoor meer gebruikt zullen worden. Het Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) van het European Medicines Evaluation Agency (EMA¹) heeft een richtlijn opgesteld waarin een procedure voor het bepalen van de mogelijke milieurisico's van humane geneesmiddelen is uitgewerkt (EMA 2006) (zie ook hoofdstukken 3 en 5).

¹ *Ofwel: the European Agency for the evaluation of medicinal products*

1.2 Cytostatica

Eén van de groepen geneesmiddelen die onderzocht werden in de verschillende onderzoeken in het buitenland en in Nederland zijn de cytostatica.

Cytostatica (of oncolytica) zijn middelen die gebruikt worden voor de behandeling van kanker (bekend als chemotherapie). Een cytostaticum beoogt de deling van cellen te stoppen (cytos = cel; stasis = stilstand) (Wikipedia 2008b) en doet dit over het algemeen door in te grijpen op de chemische reacties in de cel die betrokken zijn bij de celdeling (Rang et al. 2007). Vooral sneldelende cellen zoals tumorcellen worden beschadigd. Cytostatica hebben echter ook effect op gezonde delende cellen.

Naast het effect op celdeling kunnen veel cytostatica het genetisch materiaal in (gezonde) cellen beschadigen (genotoxiciteit). Ze kunnen mutageen (induceren van mutaties in het DNA) en soms zelfs carcinogeen (kankerverwekkend) zijn (Martindale 2006). Ongeveer een kwart van de toegepaste cytostatica is momenteel bewezen kankerverwekkend voor de mens. Door de genotoxiciteit, en omdat cytostatica ontwikkeld zijn om snelgroeiende cellen aan te tasten, kunnen deze geneesmiddelen ook schadelijk zijn bij de voortplanting en een risico betekenen voor het nageslacht (teratogeen) (Coens et al. 2003, Martindale 2006).

Een hoge concentratie van een stof in het milieu, de biologische activiteit (toxiciteit, mogelijke effecten op biologische belangrijke functies zoals reproductie) en de mate van biologische afbreekbaarheid (persistentie in het milieu) van een stof geven een indicatie voor het milieurisico (Fent et al. 2006). Met name door de specifieke werkingsmechanismen en doordat van een aantal cytostatica bekend is dat ze slecht biologisch afbreekbaar zijn (Kümmerer 2001a), verdienen cytostatica vanuit milieuoogpunt zeker aandacht.

1.3 Doel onderzoek

Hoewel er steeds meer onderzoek wordt gedaan naar het voorkomen van geneesmiddelen in het aquatisch milieu is er nog maar weinig bekend over de mogelijke ecotoxicologische effecten. Er is met name weinig onderzoek gedaan naar de chronische effecten van geneesmiddelen op aquatische organismen (Fent et al. 2006). Deze effecten zijn juist van belang omdat geneesmiddelen vaak in lage concentraties maar wel continu aanwezig zijn. Daarom zullen ze eerder chronische dan acute effecten hebben.

In dit onderzoek wordt geprobeerd om aan de hand van het voorkomen van cytostatica in het milieu en beschikbare ecotoxicologische gegevens, een risicoschatting te maken van cytostatica voor het aquatisch milieu.

Doelstelling

Een evaluatie geven van de omvang van de mogelijke gevolgen van door patiënten uitgescheiden cytostatica (en eventueel daaruit gevormde metabolieten) voor het aquatisch milieu (oppervlaktewater).

Vraagstelling

In welke concentraties komen cytostatica (en eventueel metabolieten) in het milieu terecht (ziekenhuiseffluent, rwzi-influent/effluent, oppervlaktewater) en zijn deze hoeveelheden schadelijk voor aquatische organismen?

Leeswijzer

In hoofdstuk 2 zal aandacht worden besteed aan de emissie, verspreiding en het voorkomen van cytostatica in het milieu (Nederland en buitenland). Vervolgens worden in hoofdstuk 3 concentraties van cytostatica in het oppervlaktewater geschat. In hoofdstuk 4 komen effectstudies naar cytostatica aan bod (ecotoxiciteit en genotoxiciteit) en wordt er gekeken naar de specifieke werkingsmechanismen, de farmacokinetiek en bijwerkingen van vier geselecteerde cytostatica. Ten slotte vindt in hoofdstuk 5 een evaluatie plaats van de eventuele risico's van cytostatica voor het milieu.

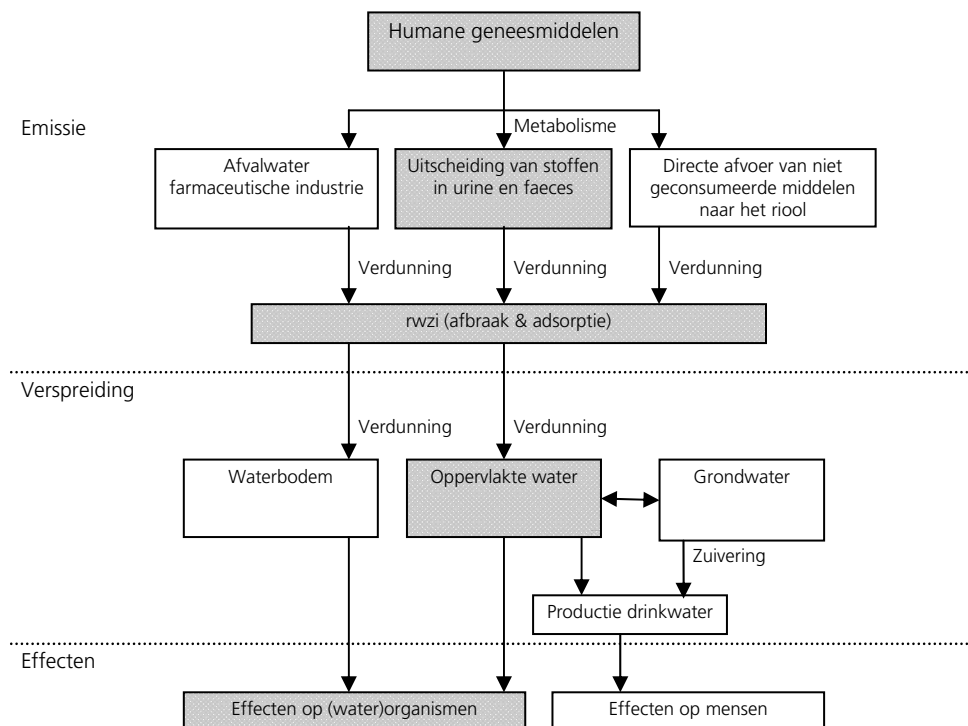
Hoofdstuk 2

Emissie, verspreiding en voorkomen van cytostatica in het milieu

2.1 Emissie

Er zijn drie hoofdbronnen en emissieroutes voor verontreiniging van het aquatisch milieu met humane geneesmiddelen (zie figuur 1) (Derksen et al. 2001).

1. De industriële route (afvalwater dat bij de productie van geneesmiddelen vrijkomt).
2. De huishoudelijke route na gebruik (geneesmiddelen en hun metabolieten die door patiënten worden uitgescheiden in urine en faeces en zo via afvalwater van huishoudens, ziekenhuizen, verzorgings- en verpleeghuizen in het milieu terechtkomen).
3. De route van niet geconsumeerde geneesmiddelen. Een klein deel van de receptplichtige medicijnen wordt niet gebruikt. Het grootste deel hiervan gaat terug naar de apotheek en wordt verbrand. Het deel van de niet geconsumeerde geneesmiddelen wat niet retour wordt gebracht naar apotheken, wordt verzameld als gemeentelijk klein chemisch afval, een deel wordt gestort met huisafval (niet in schema opgenomen) en een deel komt terecht in het riool.



Figuur 1: Bronnen en verspreidingsroutes van humane geneesmiddelen in het (aquatisch) milieu. De voor cytostatica belangrijkste route is in grijs weergegeven.

De huishoudelijke route is kwantitatief het belangrijkste voor verontreiniging van het milieu (Derksen et al. 2001). De route van niet geconsumeerde geneesmiddelen is in het geval van cytostatica niet van belang omdat cytostatica volgens de Europese afvalstoffenlijst ingedeeld zijn bij de 'gevaarlijke afvalstoffen'. Afval van cytostatica of overgebleven cytostatica worden apart ingezameld en behandeld als chemisch afval ('Speciaal Ziekenhuis Afval'; SZA) (Coens et al. 2003, SZW 2004).

Het afval dat ontstaat bij de productie van geneesmiddelen wordt zorgvuldig ingezameld vanwege gevaar voor het milieu en/of omdat de stoffen veel geld waard zijn. De stof die wel overblijft wordt als gevaarlijk afval behandeld en afgevoerd naar afvalverbrandings-installaties. Slechts een klein percentage van het geproduceerde geneesmiddel komt tijdens het productieproces in het rioolwater terecht (Derksen et al. 2001) en de industriële route draagt daarom maar beperkt bij aan de verontreiniging.

Vanwege de gevaren van cytostatica worden de nodige voorzorgen genomen om beroepsmatige blootstelling aan cytostatica te beperken. Er zijn uitgebreide veiligheidsprotocollen opgesteld die gericht zijn op de minimalisatie van direct en indirect contact van verzorgers en patiënten met cytostatica (Coens et al. 2003, SZW 2004). Deze maatregelen hebben tot gevolg dat tijdens de productie, voorbehandeling en toediening, cytostatica via verpakking en vervuilde gebruiksartikelen, nauwelijks in het riool terechtkomen.

Cytostatica komen daarom vrijwel uitsluitend na uitscheiding door de patiënt in het riool terecht. Na de toediening is de behandelde patiënt namelijk een bron van besmetting doordat een deel van het toegediende cytostaticum ongemetaboliseerd wordt uitgescheiden via alle vormen van excreta zoals urine, faeces, zweet en braaksel (Hilhorst et al. 2001).

Er zijn geen maatregelen op dit gebied om emissie van cytostatica in het milieu tegen te gaan. Om blootstelling aan cytostatica te voorkomen worden in Nederland faeces en urine van kankerpatiënten die behandeld zijn met cytostatica niet opgevangen en verwerkt (Hilhorst et al. 2001). Urine van patiënten behandeld met platinahoudende cytostatica (zoals cisplatine) wordt alleen om medische redenen apart ingezameld, namelijk om de nierfunctie te monitoren (Derksen et al. 2007). Voor het verzamelen van urine voor onderzoek wordt rekening gehouden met een risicoperiode (variërend per cytostaticum, van een tot veertien dagen) van de patiënt als besmettingsbron door onderzoek niet in deze periode plaats te laten vinden (Coens et al. 2003, SZW 2004).

Cytostatica worden in ziekenhuizen toegediend maar het aandeel cytostatica dat via ziekenhuizen in het watersysteem terecht komt is volgens Derksen et al. (2007) echter minder groot dan aanvankelijk gedacht. De oorzaak hiervan zou zijn dat toediening van cytostatica poliklinisch plaatsvindt. Deze stoffen worden dus door de patiënt vooral buiten het ziekenhuis uitgescheiden (Hilhorst et al. 2001).

Sommige cytostatica kunnen ook in gemetaboliseerde vorm worden uitgescheiden. Door metabolisme kunnen stoffen geactiveerd of geïnactiveerd worden en metabolieten kunnen toxischer zijn dan de uitgangsstof (Derksen et al. 2001) (zie ook paragraaf 2.3.4 en hoofdstuk 4.2).

2.2 Verspreiding

Cytostatica komen met het rioolwater terecht in een rioolwaterzuiveringinstallatie (rwzi) (zie figuur 1) (Derksen et al. 2001). Bacteriën in het zuiveringsslib van de rwzi kunnen de stoffen die zich in het rwzi-influent bevinden biologisch afbreken of de stoffen kunnen adsorberen aan organisch materiaal in het slib. De mate van reductie van de meetbare concentratie van een stof, is sterk afhankelijk van de adsorptie-eigenschappen en de afbreekbaarheid van de stof in het water. Overgebleven stof wordt vervolgens met het gezuiverde rioolwater (rwzi-

effluent) geloosd op het oppervlaktewater of met het slib afgevoerd. De stoffen kunnen zo ook in het grondwater en drinkwater (na zuivering) terechtkomen.

2.3 Voorkomen van cytostatica in het milieu

Derksen et al. (2001) geeft een uitgebreid overzicht van meetgegevens van humane geneesmiddelen (tot medio 2000) waaronder ook cytostatica. De gegevens zijn voornamelijk afkomstig uit Duitsland maar ook uit Zwitserland, Groot Brittannië, Italië, België en een inventariserende meting in Nederland van Mons et al. (2000). Deze gegevens en andere (Nederlandse en buitenlandse) metingen zijn samengevat in tabel 1 en worden hieronder toegelicht.

Tabel 1: Meetgegevens cytostatica in het milieu. (TMSC = theoretical mean sewage concentrations).

Effluent ziekenhuis	Concentratie in matrix (ng/L)	Mediaan (ng/L)	n	Detectie-limiet (ng/L)	Recovery (%)	Land	Referentie	Toelichting
Cyclofosfamide	19-4486	-	7	6	nb	DL	(Steger-Hartmann et al. 1997)	
	146	-	nb	6	30	DL	(Steger-Hartmann et al. 1996)	
	<100-110	-	4	100	71-73 (voor oppervlakte-water)	NL	(Schrap et al. 2003)	Alleen teruggevonden bij één van de vier ziekenhuizen (groot academisch ziekenhuis)
	9900	-	3	100 - 500	nb	NL	(Mill et al. 2006)	Teruggevonden bij één van de drie ziekenhuizen
Ifosfamide	24	-	nb	7	39	DL	(Steger-Hartmann et al. 1996)	
	50-8500	-	geschat	-	-	DL	(Kümmerer et al. 1997)	
	<6-1914	109	nb	6	nb*	DL	(Kümmerer et al. 1997)	Effluent van ziekenhuis gespecialiseerd in kankerbehandeling
	<100-1400	-	4	100	71-73 (voor oppervlakte-water)	NL	(Schrap et al. 2003)	Teruggevonden bij twee van de vier ziekenhuizen (groot academisch ziekenhuis en een regionaal ziekenhuis)
5-Fluorouracil	2030	-	geschat (TMSC)	-	-	CH	(Hartmann et al. 1998)	
	20000-122000 ng/L 20-122 µg/L	-	nb	1700	80-96	CH	(Mahnik et al. 2004)	Effluent van oncologieafdeling van het Weens universiteits-ziekenhuis (in-patiënt treatment)
Cisplatine	68	-	geschat (TMSC)	-	-	CH	(Hartmann et al. 1998)	
	20-3580 daggemiddelde <10-660	-	13 per meetplek	10	94-112	NL, B, A, DL, I	(Kümmerer et al. 1999)	Vijf ziekenhuizen zijn bemonsterd, daggemiddelde is voor een Duits ziekenhuis met maximale medische voorzieningen
Methotrexaat	~ 1000	-	1	6.25	nb	GB	(Aherne et al. 1985)	Ook 7 riviermonsters en 5 drinkwatermonsters, metingen allen onder detectielimiet

Effluent ziekenhuis	Concentratie in matrix (ng/L)	Mediaan (ng/L)	n	Detectielimiet (ng/L)	Recovery (%)	Land	Referentie	Toelichting
Influent rwzi								
Cyclofosfamide	<6-143	-	21	6	nb	DL	(Steger-Hartmann et al. 1997)	rwzi reinigt water van twee grote en vier kleine/medium ziekenhuizen
Ifosfamide	35-360	-	geschat per jaar	-	-	DL	(Kümmerer et al. 1997)	rwzi behandelt water van twee ziekenhuizen die veel kankerbehandelingen deden en nog vier kleinere ziekenhuizen
	7-29	8.5	6	6	nb	DL	(Kümmerer et al. 1997)	„ meting in mei
	<6-29	6.2	6	6	nb	DL	(Kümmerer et al. 1997)	„ meting in juni
Effluent rwzi								
Cyclofosfamide	6-17	-	21	6	nb	DL	(Steger-Hartmann et al. 1997)	rwzi reinigt water van 2 grote en 4 kleine/medium ziekenhuizen
	<10-20	<10	16	10	nb	DL	(Ternes 1998)	
Ifosfamide	<10	-	2	10	0-20	NL, B	(Mons et al. 2000)	
	8-29	-	geschat per jaar	-	-	DL	(Kümmerer et al. 1997)	rwzi behandelt water van twee ziekenhuizen die veel kankerbehandelingen deden en nog vier kleinere ziekenhuizen
	10-40	9.3	6	6	nb	DL	(Kümmerer et al. 1997)	„ meting in mei
	<6-43	6.5	6	6	nb	DL	(Kümmerer et al. 1997)	„ meting in juni
	<10-2900	<10	16	10	nb	DL	(Ternes 1998)	
Ontvangend oppervlaktewater								
Cyclofosfamide	<10	<10	26	10	nb	DL	(Ternes 1998)	Diverse rivieren
	2500	-	geschat** (PEC _{EMEA})	-	-	NO	(Grung et al. 2007)	
	0.26	-	geschat** (PEC _{conv})	-	-	NO	(Grung et al. 2007)	
Ifosfamide	<10	-	11	10	0-20	NL, B	(Mons et al. 2000)	
	<10	<10	26	10	nb	DL	(Ternes 1998)	Diverse rivieren
	<10	-	4-10 per meetplek	10	86-90	NL	(Versteegh et al. 2007)	10 meetplekken
	0.8	-	geschat** (PEC _{conv})	-	-	DL	(Kümmerer et al. 1997)	
Methotrexaat	<6.25	-	7	6.25	nb	GB	(Aherne et al. 1985)	Rivier

* Recovery rates varieerden sterk en de precisie van de metingen was daardoor laag.

** Zie hoofdstuk 3

2.3.1 Metingen in Nederland

Aandacht in Nederland voor de aanwezigheid van geneesmiddelen in het milieu is van zeer recente datum. In 1999 vond een eerste inventarisatie plaats (Mons et al. 2000). Naar aanleiding van dit onderzoek en voorafgegaan

door twee literatuurstudies (Derksen et al. 2001, Jongbloed et al. 2001) is in 2002 een screening uitgevoerd door het RIZA² (Schrap et al. 2003), Kiwa Water Research (Mons et al. 2003), RIWA³ (Sacher & Stoks 2003) en het RIVM⁴ (Versteegh et al. 2003). Hierbij werden in het Nederlandse watermilieu diverse (dier-)geneesmiddelen aangetoond. In vervolg hierop heeft het RIVM in 2005/2006 opnieuw een inventarisatie gedaan (Versteegh et al. 2007). De RIWA laat sinds 2004 Rijnwater, en door de Rijn gevoed oppervlaktewater, jaarlijks op een groot aantal geneesmiddelen screenen (Stoks et al. 2005, 2006, 2007). STOWA (Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer) laat ook onderzoek uitvoeren naar dit onderwerp.

In het onderzoek van Mons et al. (2000) werd getest op het cytostaticum ifosfamide in rwzi-effluent, oppervlaktewater en drinkwater maar dit werd niet aangetoond (alle metingen lagen onder de detectielimiet (dl); <10 ng/L). Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat de analysemethode nog niet geoptimaliseerd was voor ifosfamide en het percentage stof wat werd teruggevonden erg laag was (recovery: 0-20 %). De werkelijke concentraties zouden dus veel hoger (tot een factor 2-10) kunnen zijn (Derksen & Lahr 2003).

Het RIZA heeft voor het in kaart brengen van de aanwezigheid van humane en veterinaire geneesmiddelen in de Nederlandse oppervlaktewateren op verschillende oppervlaktewateren bemonsterd (Schrap et al. 2003). Om een inzicht te krijgen welke geneesmiddelen in welke hoeveelheden worden geloosd bij enkele potentiële emissiebronnen zijn ook monsters genomen van huishoudelijk rioolwater in een woonwijk, van influenten en effluenten van vier rwzi's, bedrijfsafvalwater van ziekenhuizen (drie regionale en een groot academisch ziekenhuis), twee farmaceutische productiebedrijven en drie viskwekerijen.

De cytostatica cyclofosfamide en ifosfamide werden meegenomen in de screening maar alleen in ziekenhuisafvalwater aangetroffen (in drie van de acht monsters, twee maal bij het academisch ziekenhuis, één maal bij een regionaal ziekenhuis) tot een concentratie van 1.400 ng/L (1,4 µg/L). Verschillende concentraties werden gemeten tussen de ziekenhuizen, van niet aantoonbaar (<dl; 100 ng/L) tot 1.400 ng/l voor ifosfamide (bij één van de regionale ziekenhuizen). Er wordt door de onderzoekers geen verklaring gegeven waarom de cytostatica in twee ziekenhuizen wel worden aangetroffen en in de anderen niet.

Opvallend is dat deze middelen niet in huishoudelijk afvalwater zijn aangetoond terwijl ze veelal poliklinisch worden toegepast.

Door het Kiwa en RIWA is in 2002 op verschillende plekken in Nederland (relevant voor drinkwaterproductie) water geanalyseerd voor respectievelijk 66 en 78 humane en veterinaire geneesmiddelen (Mons et al. 2003, Sacher & Stoks 2003). Cyclofosfamide en ifosfamide werden niet gedetecteerd.

In de jaarlijkse screening van Rijnwater in Nederland wordt alleen cyclofosfamide meegenomen, maar niet aangetroffen (dl; 10 ng/L) (Stoks et al. 2005, 2006, 2007).

Het RIVM heeft in 2005 en 2006 in het kader van het project 'Monitoring en handhaving Waterleidingwet' in opdracht van het Ministerie van VROM een meetprogramma naar geneesmiddelen in drinkwater en drinkwaterbronnen (oppervlaktewater, oevergrondwater en grondwater) uitgevoerd (Versteegh et al. 2007). Ifosfamide is meegenomen in dit onderzoek maar dit cytostaticum kon niet gedetecteerd worden (<dl; 10 ng/L).

² Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling

³ Vereniging van Rivierwaterbedrijven

⁴ Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu

In 2005 is ook in opdracht van het Ministerie van VROM een studie uitgevoerd naar de herkomst en transportroutes van geneesmiddelen naar het watermilieu (Derksen & Roorda 2005). Daarbij zijn onder andere ziekenhuizen als potentieel belangrijke emissiebronnen aangemerkt. Om dit verder te onderzoeken hebben de STOWA en het RIZA een studie gestart (project Verg(h)ulde Pillen) om de daadwerkelijke bijdrage van geneesmiddelen vanuit de ziekenhuizen vast te stellen (Derksen et al. 2007). Deze bijdrage wordt o.a. vastgesteld door metingen bij drie ziekenhuizen. In juni 2008 zullen hiervan een drietal deelrapporten verschijnen (Roorda 2008). De metingen bij het eerste ziekenhuis (een klein regionaal ziekenhuis) zijn afgerond en cyclofosfamide en ifosfamide zijn niet aangetroffen in alle onderzochte afvalwaterstromen (ziekenhuisafvalwater, rwzi-influent en -effluent) (Derksen 2008). De detectielimieten liggen echter erg hoog; meestal 200 ng/L, in een enkel geval 1000 ng/L. Behalve metingen zijn er ook gehalten in het afvalwater, influent en effluent geschat. De rapportage daarover zal eind april 2008 afgerond worden en dan ook openbaar worden.

In het onderzoek van Mill et al. (2006) zijn door het RIZA bij drie locaties van één ziekenhuis in Den Bosch metingen uitgevoerd naar het voorkomen van 46 geneesmiddelen in het afvalwater. Tegelijkertijd zijn er door het Waterschap Aa en Maas ook metingen uitgevoerd bij de ontvangende rwzi en het ontvangende oppervlaktewater.

Cyclofosfamide is meegenomen in dit onderzoek en slechts één keer gedetecteerd in ziekenhuisafvalwater maar wel in een hoge concentratie (9900 ng/L). In het influent van de rwzi en in oppervlaktewater lagen de meetwaarden voor dit cytostaticum onder de detectielimiet (Mill 2008). Voor het rwzi-influent betrof de detectielimiet 150 ng/L.

Mill et al. (2006) berekenden dat cyclofosfamide een tenminste 65 keer hogere concentratie in ziekenhuiseffluent had dan in het influent van de rwzi en concludeerden daaruit dat het afvalwater een belangrijke verontreinigingsbron van het rwzi-influent kan vormen. Het middel is echter in slechts één van de drie ziekenhuizen aangetoond.

Hiervoor wordt geen verklaring gegeven door de onderzoekers. Wel wordt vermeld dat er slechts op één moment is bemonsterd voor het ziekenhuiseffluent en dat de meting dus een momentopname is.

2.3.2 Metingen in het buitenland

Het overgrote deel van de meetgegevens van geneesmiddelen heeft betrekking op metingen in het buitenland (met name in Duitsland) (zie tabel 1).

Steger-Hartmann et al. (1997) toonden aan dat het cytostaticum cyclofosfamide tot 4500 ng/L (4,5 µg/L) voor kan komen in ziekenhuiseffluent. In influenten van een rwzi (welke afvalwater ontvangt van 2 grote ziekenhuizen en 4 ziekenhuizen van gemiddelde grootte) werd cyclofosfamide gemeten tot 140 ng/L. In het rwzi-effluent werd een maximale concentratie gemeten van 17 ng/L.

Steger-Hartmann et al. (1996) detecteerden ifosfamide en cyclofosfamide in effluent van een universiteitsziekenhuis met concentraties van respectievelijk 24 ng/L en 146 ng/L (0.024 µg/L; 0.146 µg/L). Recovery was vrij laag (ifosfamide: 39%, cyclofosfamide: 30%).

Kümmerer et al. (1997) vonden ifosfamide bij een gemiddelde concentratie van 109 ng/L in het effluent van een oncologisch ziekenhuis. In de influenten en effluenten van het ontvangende rwzi werden gemiddelde concentraties gemeten van respectievelijk 6,2 en 9,3 ng/L.

Ternes (1998) detecteerde cyclofosfamide in rwzi-effluenten tot een maximum concentratie van 20 ng/L (0.020 µg/L) bij een rwzi waar afvalwater van een groot universitair ziekenhuis op uitkomt. Ifosfamide had hier een waarde van 88 ng/L (0.088 µg/L). Ifosfamide werd echter in een effluent van een rwzi in een landelijk gebied aangetroffen in een opvallende concentratie van 2900 ng/L (2.9 µg/L). Cyclofosfamide en ifosfamide werden in dit onderzoek niet aangetroffen boven de detectielimiet in oppervlaktewater (rivieren en stromen).

Concentraties 5-fluorouracil zijn in Oostenrijk (AT) gemeten in ziekenhuiseffluenten in de zeer hoge concentraties van 20.000-122.000 ng/L (20-122 µg/L) (Mahnik et al. 2004). Hierbij moet opgemerkt worden dat Mahnik et al. effluent onderzochten van een oncologie-afdeling met in-patiënt treatment.

In het onderzoek van Kümmerer et al. (1999) zijn concentraties cisplatine in het effluent van vijf Europese ziekenhuizen gemeten (België, Duitsland, Italië, Nederland, Oostenrijk). Deze varieerden van onder de detectielimiet (dl; 10 ng/L) (B, I) tot ~3500 ng/L (A, DL) met een daggemiddelde van <10-660 ng/L in een Duits ziekenhuis met maximale medische voorzieningen. Kleinere ziekenhuizen en/of ziekenhuizen met minder medische voorzieningen hebben lagere emissies.

Ook de influenten van een rwzi in Duitsland zijn in het onderzoek meegenomen (waar afvalwater van 6 ziekenhuizen wordt ontvangen) maar de concentraties lagen onder de detectielimiet (<10 ng/L).

Platina komt niet alleen in het milieu terecht door uitscheiding van platinahoudende cytostatica zoals cisplatine en carboplatine. Een belangrijke bron van vervuiling zijn auto's met katalysatoren (Kümmerer 2004). Kümmerer et al. (1999) berekenden dat de totale platina emissie van ziekenhuizen in 1996 12% bedroeg in verhouding tot het totale emissievolume van auto's (DL). In Nederland en Oostenrijk is de ziekenhuisemissie geschat op respectievelijk 6% en 3.3%. Hierbij moet opgemerkt worden dat cytostatica vooral buiten het ziekenhuis worden uitgescheiden en deze bijdrage wordt in de hiervoor genoemde verhouding niet meegerekend.

Kümmerer et al. stellen dat ondanks dat de ziekenhuiseffluenten slechts een beperkte bijdrage leveren aan de platina emissie naar het milieu, deze bron niet genegeerd mag worden. De onderzoekers geven tevens aan dat platina afkomstig van platinahoudende cytostatica andere eigenschappen (gedrag en toxiciteit in het aquatisch milieu) heeft dan platina afkomstig van andere bronnen zoals auto's.

Aherne et al. (1985) hebben een methotrexaatconcentratie van ~1000 ng/L (1 µg/L) gemeten in ziekenhuiseffluent. Concentraties van methotrexaat in rivier- en drinkwater liggen allemaal onder de detectielimiet (<6.25 ng/L). Volgens Kümmerer (2004) werden deze metingen gedaan in een riool direct downstream van een oncologiekliniek en heeft behandeling van het water in de rwzi, verdunning en degradatie deze concentratie waarschijnlijk aanzienlijk verlaagd. Methotrexaat wordt bijna volledig biologisch afgebroken door actief slib in een model-rwzi (Kiffmeyer et al. 1998) (zie ook paragraaf 2.3.3) dus dit zou inderdaad een belangrijke verwijderingstap kunnen zijn.

In de tabel op de volgende pagina (tabel 2) worden de maximaal gemeten concentraties ingedeeld in concentratieklassen (ng/L), per milieucompartiment en type cytostaticum.

Een realistischer beeld van de milieuconcentraties zou gegeven worden door de gemiddelde concentraties weer te geven in plaats van de maximaal gemeten concentraties. In de hier gerapporteerde onderzoeken worden gemiddelden echter zelden vermeld.

Tabel 2: Maximaal gemeten concentraties ingedeeld in concentratieklassen (ng/L), per milieucompartiment en type cytostaticum.

Milieucompartiment	Maximum > 1000	Maximum > 100	Maximum > 10	Maximum < detectielimiet
Effluent ziekenhuis	cyclofosfamide (NL, DL) 5-fluorouracil (AT) methotrexaat (GB) ifosfamide (NL, DL) cisplatine (AT, DL)			
Influent rwzi		cyclofosfamide (DL)	ifosfamide (DL)	
Effluent rwzi	ifosfamide (DL)		cyclofosfamide (DL)	
Oppervlaktewater				cyclofosfamide (DL) ifosfamide (NL, DL, B) methotrexaat (GB)

2.3.3 Gedrag cytostatica in rwzi's en het aquatisch milieu

In bovenstaande paragraaf is behandeld dat cyclofosfamide en ifosfamide in Duitsland in meetbare hoeveelheden zijn aangetroffen in influenten van waterzuiveringsinstallaties en ook in de bijbehorende effluenten (Kümmerer et al. 1997, Steger-Hartmann et al. 1997, Ternes 1998) (zie tabel 1 en 2).

Ternes (1998) onderzocht Duitse rwzi-influenten en -effluenten op 32 geneesmiddelen en metabolieten om meer inzicht te krijgen in het gedrag van deze stoffen tijdens hun passage door een rwzi. Verwijderingpercentages varieerden sterk; tussen de 7 en 99% (Ternes 1998). In rwzi's kunnen stoffen verwijderd worden uit het influent (door biologische afbraak en adsorptie aan het actief slib) en de mate van verwijdering is afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van de stof (Derksen et al. 2007). Geneesmiddelen worden vaak slechts ten dele verwijderd en worden daarom aangetroffen in het effluent van de rwzi's.

Mill et al. (2006) rapporteerden een gemiddeld zuiveringsrendement (n=10) in een rwzi voor cyclofosfamide van ongeveer 30%.

Biologische afbraak

Cyclofosfamide

Steger-Hartmann et al. (1996) detecteerden cyclofosfamide in effluent van een universiteitsziekenhuis en onderzochten tevens de degradatie van dit cytostaticum in twee LSSTP's (LSSTP=labarotory-scale sewage treatment plant, OECD 303A) (recovery cyclofosfamide: 72%).

Aan het influent van de LSSTP werd 10 µg/L cyclofosfamide toegevoegd. Deze waarde is door de onderzoekers gebaseerd op de upper limit van de geschatte concentratie range voor ziekenhuiseffluent. De waarde komt goed overeen met de metingen in ziekenhuiseffluent; in Duitsland werd cyclofosfamide tot 4.5 µg/L aangetoond in ziekenhuiseffluent (Steger-Hartmann et al. 1997) en in Nederland werd 9.9 µg/L gedetecteerd (Mill et al. 2006). De gemeten waarden voor cyclofosfamide in rwzi-influent ligt echter veel lager; tot 143 ng/L (Steger-Hartmann et al. 1997).

De resultaten tonen aan dat er geen significante degradatie van cyclofosfamide plaatsvindt in de LSSTP's (gemiddeld werd 86% van cyclofosfamide teruggevonden). De onderzoekers verwachten daarom dat cyclofosfamide niet afgebroken wordt in een rwzi.

In navolging van boven genoemd onderzoek onderzochten Steger-Hartmann et al. (1997) de reductie van meetbaar cyclofosfamide in water door een rwzi. Ze detecteerden cyclofosfamide in het influent van een waterzuiveringsinstallatie als ook in het bijbehorende effluent (respectievelijk <6-143 ng/L en 6-17 ng/L, zie tabel 1). Om de biologische afbreekbaarheid van cyclofosfamide vast te stellen werden twee modeltestsystemen gebruikt; een Zahn-Wellens/EMPA test (OECD 302B) en een LSSTP test (OECD 303A).

Bij de Zahn-Wellens test wordt een teststof geïnoculeerd met actief slib van een rwzi. Eliminatie van DOC (dissolved organic carbon) wordt daarbij gemeten en is de maat voor biologische afbraak. De geteste substanties zijn de enige organische koolstofbron in het medium.

Er vond geen eliminatie plaats van cyclofosfamide in een looptijd van 28 dagen (cyclofosfamide 160 mg/L, corresponderend met een DOC van 51.7 mg/L werd opgelost in een medium). Een controle stof waarvan bekend is dat deze biologisch afbreekbaar is, diethyleenglycol (DEG), werd wel verwijderd met dit systeem (DEG 115 mg/L; DOC van 52.1 mg/L, 100% DOC eliminatie na 7 dagen).

Uit de Zahn-Wellens test bleek ook dat cyclofosfamide geen toxische invloed had op de micro-organismen in het slib. Diethyleenglycol werd samen met cyclofosfamide toegevoegd (cyclofosfamide 115 mg/L, DEG 160 mg/L; elke substantie bedroeg 50% van het totale DOC). Er vond in dit geval geen reductie plaats van de afbraak van DEG door bacteriën in het slib in vergelijking met de afbraak bij toevoeging van DEG alleen (DOC eliminatie van 50%).

De onderzoekers concluderen uit bovenstaande resultaten dat cyclofosfamide in rioolwater geen negatieve invloed heeft op de degradatiecapaciteit van de bacteriën in het actieve slib en dat cyclofosfamide zelf niet of slechts zeer beperkt biologisch afbreekbaar is.

De resultaten van Zounkova et al. (2007) ondersteunen de eerst genoemde conclusie. Zij vonden geen effect (NOEC= no observed effect concentration) van cyclofosfamide op de groei van de bacterie *Pseudomonas putida* tot 1000 mg/L (zie hoofdstuk 4, tabel 6).

Bij de LSSTP test inoculeerde Steger-Hartmann et al. twee LSSTP's met actief slib van een rwzi. Twaalf liter synthetisch rioolwater werd er doorheen geleid (500 mL/h). Eén LSSTP functioneerde als controle en aan de andere LSSTP werd continu cyclofosfamide toegevoegd (10 µg per liter rioolwater). Ook hier werd de mate van DOC degradatie bepaald in de effluenten (de geteste substanties zijn nu niet de enige organische koolstofbron in het medium) en werd de cyclofosfamide concentratie gemeten.

Gedurende 39 dagen waarin cyclofosfamide werd toegevoegd aan de LSSTP werd gemiddeld 83% van het cyclofosfamide teruggevonden in het effluent. Hieruit concludeerden de onderzoekers dat cyclofosfamide slecht afbreekbaar is in de LSSTP's. De reductie van cyclofosfamide in het effluent van 17% is volgens Steger-Hartmann et al. te wijten aan het gebruik van een andere analysemethode dan bij de Zahn-Wellens test en niet aan de biologische degradatie in de LSSTP.

Cyclofosfamide had geen significante remming op de DOC degradatie van het synthetische rioolwater (47 dagen looptijd) in vergelijking tot de controle LSSTP. Cyclofosfamide heeft dus geen invloed op de activiteit van het slib.

De resultaten van de LSSTP test ondersteunen de eerder genoemde conclusies van de onderzoekers dat cyclofosfamide in rioolwater geen negatieve invloed heeft op de degradatiecapaciteit van de bacteriën en dat cyclofosfamide zelf niet of slechts zeer beperkt biologisch afbreekbaar is.

Er werden twee meetsessies gedaan van cyclofosfamide in rwzi-influent en -effluent waaruit naar voren kwam dat er veel variatie in de influent-metingen zat. Deze data hebben volgens de onderzoekers een hoge

analytische onzekerheid omdat metingen in rioolwater bemoeilijkt worden door interferentie van allerlei andere stoffen die zich in het water bevinden. Steger-Hartmann et al. hebben deze data daarom niet gebruikt om een inschatting te maken van de afbreekbaarheid in de rwzi voor cyclofosfamide. Het voorkomen van cyclofosfamide in het effluent ondersteunt wel de modeltestresultaten dat dit cytostaticum maar gedeeltelijk (of helemaal niet) wordt afgebroken in een rwzi.

Kiffmeyer et al. (1998) onderzochten voor verschillende cytostatica de biologische afbreekbaarheid (cyclofosfamide, fluorouracil, methotrexaat, cisplatine). Cyclofosfamide werd onderzocht in een rwzi-modelsysteem (OECD confirmatory test, OECD 303A) en bleek daarbij niet afbreekbaar (looptijd 14 dagen).

Ifosfamide

Steger-Hartmann et al. (1996) onderzochten naast cyclofosfamide ook de degradatie van ifosfamide in twee LSSTP's (recovery ifosfamide: 99%). Aan het influent van de LSSTP werd 11 µg/L ifosfamide toegevoegd. Deze waarde komt volgens de onderzoekers overeen met de upper limit van de geschatte concentratie range voor ziekenhuiseffluent. De gemeten concentratie ifosfamide in ziekenhuiseffluent ligt slechts een factor 10 lager; 1.9 µg/L (Kümmerer et al. 1997). De gemeten waarden voor ifosfamide in rwzi-influent liggen echter veel lager; 7-29 ng/L (Kümmerer et al. 1997).

De resultaten tonen aan dat er geen significante degradatie van ifosfamide plaatsvindt in de LSSTP's (gemiddeld werd 97% van ifosfamide teruggevonden). De onderzoekers verwachten daarom dat dit cytostaticum niet afgebroken wordt in een rwzi.

Kümmerer et al. (1997) vonden ifosfamide bij een gemiddelde concentratie van 109 ng/L in het effluent van een oncologisch ziekenhuis. Er vond geen significante reductie van ifosfamide plaats tijdens de zuivering in de ontvangende rwzi (influent: 6,2 ng/L gemiddeld, effluent: 9,3 ng/L gemiddeld, zie tabel 1). Om de biologische afbreekbaarheid van ifosfamide vast te stellen werden dezelfde modeltestsystemen gebruikt als in het onderzoek van Steger-Hartmann et al. (1997); een Zahn-Wellens/EMPA test (OECD 302B) en een LSSTP test (OECD 303A).

Er vond geen biologische afbraak plaats van ifosfamide in de Zahn-Wellens test (ifosfamide 160 mg/L; DOC van 51.7 mg/L). Ook in de LSSTP (56 dagen, 11.4 µg/L ifosfamide toegevoegd; concentratie gebaseerd op schatting voor ifosfamide-concentratie in ziekenhuiseffluent) bleek eliminatie van ifosfamide minder dan 3% te zijn. De onderzoekers concluderen uit deze resultaten dat ifosfamide niet biologisch wordt afgebroken in een rwzi.

In de toxiciteitcontrole van de Zahn-Wellens test (ifosfamide 160 mg/L en DEG 155 mg/L) werd DEG volledig geëlimineerd wat erop duidt dat ifosfamide niet toxisch is voor de organismen in het slib.

5-Fluorouracil

Kümmerer en Al-Ahmad (1997) onderzochten de biologische afbreekbaarheid van 5-fluorouracil met een Closed bottle test (CBT, OECD 301D) en een Zahn-Wellens test (OECD 302B). Een bacteriële groeiremming-test (DIN 38 412-L8; 16 h) werd uitgevoerd om te testen of 5-fluorouracil toxisch is voor micro-organismen in het slib. In de CBT werd het aantal colony forming units (CFU) bijgehouden als aanvullende toxiciteitscontrole.

In de groeiremming-test met *P. putida* (zie hoofdstuk 4, tabel 6) werd een inhibitie concentratie bepaald van 128 mg/L of meer ($IC_{50} > 128$ mg/L). De onderzoekers vonden dit in overeenstemming met de literatuur; daar werd een lage toxiciteit van 5-fluorouracil ten opzichte van gram-negatieve bacteriën gerapporteerd (Ueda et al. 1983, uit

Kümmerer en Al-Ahmad 1997). Gram-negatieve bacteriën komen volgens Kümmerer en Al-Ahmad het meest voor in slib van rwzi's. Als gram-negatieve bacteriën inderdaad de overhand hebben in slib dan is op basis van dit resultaat te verwachten dat fluorouracil weinig invloed heeft op de activiteit van het slib. Zounková et al. (2007) vonden echter een NOEC (no observed effect concentration) van 0.003 mg/L in een *P. putida* groeiremming-test (16 h).

Tevens leverde groeiremming van *P. putida* in ziekenhuiseffluent met fluorouracil een veel lagere IC₀ op: 0,5 mg/L (er is niet lager getest) (Kümmerer & Al-Ahmad 1997).

In een Closed bottle test wordt een testsubstanties geïnoculeerd met micro-organismen in een afgesloten fles (OECD 1992). Degradatie wordt bepaald aan de hand van zuurstofafname door verbruik door de micro-organismen. Voor de CBT werd inoculum van rwzi-effluent gebruikt (rwzi behandeld effluent van het Freiburg universiteitsziekenhuis en vijf andere ziekenhuizen) met een fluorouracil concentratie van 9.02 mg/L. Fluorouracil werd niet biologisch afgebroken in deze test tot een looptijd van 40 dagen en er werd geen toxiciteit van fluorouracil voor micro-organismen in het slib waargenomen.

In de Zahn-Wellens test werd fluorouracil niet biologisch afgebroken (fluorouracil 854 mg/L; DOC van 316 mg/L, inoculum: water).

De test werd ook gedaan met fluorouracil en ziekenhuiseffluent in plaats van water (DOC 115 mg/L). De biologische degradatie was in dit geval lager dan de berekende degradatie (berekening op basis van de volgende twee testen: fluorouracil met water, ziekenhuiseffluent alleen), respectievelijk 17 en 38,5%. De onderzoekers verwachten dat dit komt door een versterkt toxisch effect van 5-fluorouracil op de micro-organismen in het slib. Er werd echter wederom geen toxiciteit van fluorouracil aangetoond met de toxiciteitscontroles (o.a. ziekenhuiseffluent + fluorouracil + ethyleenglycol).

Uit de CBT en de Zahn-Wellens test blijkt dat 5-fluorouracil niet biologisch afbreekbaar is. Verder is dit cytostaticum volgens Kümmerer en Al-Ahmad waarschijnlijk niet toxisch voor micro-organismen in het slib omdat er geen significante toxische effecten aangetoond werden in de toxiciteitscontroles (CBT, Zahn-Wellens) en de groeiremming met *P. putida* ligt pas bij een vrij hoge concentratie van fluorouracil (IC₀ >128 mg/L).

De onderzoekers concluderen daarom dat de remming van de degradatie in het ziekenhuiseffluent waarschijnlijk toe te schrijven is aan de synergistische⁵ effecten van fluorouracil in combinatie met bepaalde antibiotica. Synergistische toxische effecten van fluorouracil met β -lactam antibiotica, de antibiotica cefalosporinen en norfloxacin en andere antibiotica tegen pathogenen zijn gerapporteerd in de literatuur (Ueda et al. 1983, Gieringer et al. 1986, Bergstrom et al. 1994, uit Kümmerer en Al-Ahmad 1997). Kümmerer en Al-Ahmad gaan er vanuit dat deze antibiotica voorkomen in het gebruikte ziekenhuiseffluent maar hebben dit niet getest.

In tegenstelling tot de resultaten van Kümmerer en Al-Ahmad (1997) blijkt uit de resultaten van Kiffmeyer et al. (1998) dat 5-fluorouracil wel biologisch afbreekbaar is. Fluorouracil werd in een rwzi-modelsysteem (OECD confirmatory test, OECD 303A) binnen een paar dagen volledig afgebroken maar dit was wel afhankelijk van de beginconcentratie die aan het modelsysteem werd toegevoegd. Hoe hoger de beginconcentratie, hoe langzamer de degradatie (5, 10, 20 mg/L).

⁵ Synergisme (het); samenwerking tussen systemen, organen of geneesmiddelen. VanDale (2008) Online woordenboek, geraadpleegd op 17-03-2008

Door de niet congruente biodegradatie-testresultaten is niet vast te stellen of fluorouracil biologisch afbreekbaar is.

Methotrexaat

Kiffmeyer et al. (1998) onderzochten ook de degradatie van methotrexaat in een rwzi-modelsysteem (OECD confirmatory test, OECD 303A). De afbraak van methotrexaat nam continue toe in de eerste week en bereikte een constante waarde van 95% na ongeveer 8 dagen (dit was nauwelijks afhankelijk van de beginconcentraties). Op de tweede dag van het experiment werd een metaboliet van methotrexaat, 7-hydroxymethotrexaat, gedetecteerd. Deze metaboliet wordt zelf waarschijnlijk niet verder afgebroken want de concentratie 7-hydroxymethotrexaat nam toe met dezelfde snelheid als de methotrexaatconcentratie afnam. Methotrexaat wordt dus niet afgebroken in het rwzi-modelsysteem maar omgezet in een metaboliet (zie ook paragraaf 2.3.4).

Cisplatine

Kiffmeyer et al. (1998) onderzochten de biologische afbreekbaarheid van cisplatine met een OECD screening test (OECD 301E). In de screening test wordt een testsubstantie (DOC bron) geïnoculeerd met effluent (OECD 1992). Degradatie wordt bepaald aan de hand DOC-afname. Cisplatine bleek met deze test niet afbreekbaar (looptijd 14 dagen).

Adsorptie

Naast biologische afbraak is ook de adsorptie aan het slib een belangrijk verwijderings-mechanisme voor hydrofobe en positief geladen geneesmiddelen in een rwzi (Derksen et al. 2007). Het adsorptiegedrag kan voorspeld worden door het vaststellen van de sorptiecoëfficiënt (K_d). De K_d is afhankelijk van de eigenschappen van het geneesmiddel én van de eigenschappen van het slib. Middelen met een K_d lager dan 300-500 L/kg zullen niet adsorberen. Ifosfamide en cyclofosfamide hebben een K_d van respectievelijk 22 en 55 L/kg en adsorberen daarom niet (Ternes et al. 2004). Dit is in overeenstemming met het onderzoek van Kümmerer et al. (1997). In de LSSTP bleek eliminatie door adsorptie van ifosfamide aan het slib verwaarloosbaar.

In de Zahn-Wellens test werd voor fluorouracil geen significante adsorptie gemeten (Kümmerer & Al-Ahmad 1997).

2.3.4 Metabolisatie

Cytostatica kunnen ook in gemetaboliseerde vorm worden uitgescheiden door patiënten en in het milieu terecht komen (zie ook hoofdstuk 4.2). Deze metabolieten worden meestal niet meegenomen in metingen.

In deze paragraaf wordt aan de hand van de metabolisatie geanalyseerd of de metingen die gedaan worden naar cytostatica in het milieu een correct beeld geven van het voorkomen van cytostatica en bijbehorende metabolieten in het milieu. De metabolisatie wordt alleen toegelicht voor de volgende vier cytostatica; cisplatine, cyclofosfamide, 5-fluorouracil, methotrexaat. Deze inperking is gebaseerd op effectgegevens welke behandeld worden in hoofdstuk 4.

Cisplatine

De metabolisatie van cisplatine is niet opgehelderd (FK 2008). Het is dus niet vast te stellen of bij metingen naar dit cytostaticum voorbijgegaan wordt aan eventueel toxische metabolieten die in het milieu terecht komen.

Binnen 2-4 uur is 90% van het toegediende platina in het lichaam gebonden aan eiwit en excretie vindt voornamelijk plaats via de urine maar het is incompleet en verlengd (ongebonden en gebonden) (Martindale 2006).

Het is de vraag wat er bij de metingen wordt gedetecteerd; alleen het ongebonden of ook het aan eiwit gebonden cisplatine. Alleen ongebonden stof heeft namelijk significante cytostatische effecten (Martindale 2006). Wanneer beide fracties terug te vinden zijn in de meting kan dit een verkeerd beeld geven ten aanzien van de mogelijk risico's van cisplatine voor het milieu.

Cyclofosfamide

Cyclofosfamide is zelf inactief en wordt in het lichaam omgezet in de actieve metabolieten fosforamide mosterd en acrolein (De Jonge et al. 2005b, Rang et al. 2007). Fosforamide mosterd wordt beschouwd als de voornaamste alkylerende metaboliet. De metabolieten kunnen via verschillende routes omgezet worden in inactieve metabolieten (De Jonge et al. 2005b).

Metabolieten van cyclofosfamide kunnen net als cyclofosfamide in het milieu terecht komen (Martindale 2006). In de literatuur wordt tot 20% onveranderde stof in urine gerapporteerd (Anderson et al. 1995, De Jonge et al. 2005a). Het merendeel van het toegediende cyclofosfamide wordt echter uitgescheiden als inactieve metabolieten (Anderson et al. 1995).

Om een volledig beeld te krijgen van de gevolgen van het cytostaticum cyclofosfamide voor het milieu zouden ook metingen gedaan moeten worden naar het voorkomen van de actieve metabolieten van cyclofosfamide in het milieu. Dit voorkomen is ook eventueel af te leiden (schatting) als de excretieverhouding tussen cyclofosfamide en deze metabolieten bekend is.

Voor de metingen in het milieu naar cyclofosfamide en bijbehorende metabolieten is het belangrijk om te weten hoe schadelijk de uitgangsstof of metabolieten zijn voor aquatische organismen. Kennis over de opname of (in)activatie van de verschillende stoffen in niet-doelorganismen is daarbij van belang (zie ook hoofdstuk 4). Wanneer organismen bijvoorbeeld de uitgangsstof niet kunnen activeren of opnemen, zijn metingen naar deze stof in het milieu zinloos.

5-Fluorouracil

5-Fluorouracil wordt in de cel omgezet naar actieve metabolieten (5-fluorouridine trifosfaat en 5-fluorodeoxyuridine monofosfaat) (Martindale 2006). In de lever vindt inactivatie plaats (inactieve metabolieten zijn o.a. CO₂ en ureum) (FK 2008). Minder dan 10% van de toegediende stof wordt onveranderd uitgescheiden met de urine; 60-90% via de longen als CO₂ (T_{1/2} = 5-20 min).

Onduidelijk is of de actieve metabolieten ook worden uitgescheiden. Wanneer dit een substantieel deel bedraagt in verhouding tot de hoeveelheid uitgescheiden fluorouracil dan is het nuttig om ook metingen te doen aan de hoeveelheid actieve metabolieten die in het milieu voorkomen. Kennis van de eventuele toxiciteit van fluorouracil en de actieve metabolieten voor niet-doelorganismen en de mogelijkheid tot opname door niet-doelorganismen van deze stoffen, is hierbij ook van belang. Wanneer fluorouracil zelf niet toxisch is en organismen het niet op kunnen nemen of kunnen activeren, heeft het weinig nut om in het milieu te zoeken naar de uitgangsstof en zou beter op de metabolieten geconcentreerd worden.

Methotrexaat

Metabolisering van methotrexaat vindt plaats in de lever en intracellulair tot actieve gepolyglutamineerde vormen en 7-hydroxymethotrexaat (FK 2008).

Aangezien de uitscheiding van methotrexaat voornamelijk onveranderd plaatsvindt (Martindale 2006, FK 2008), zijn de metingen naar het voorkomen van methotrexaat in het milieu waarschijnlijk voldoende om het eventuele risico van dit cytostaticum voor aquatische organismen in te schatten. Bij hoge toedieningsconcentraties

wordt de metaboliet 7-hydroxymethotrexaat in een aanzienlijke verhouding tot methotrexaat uitgescheiden (30%) (Jacobs et al. 1976). Deze metaboliet is echter veel minder toxisch dan methotrexaat (Jacobs et al. 1976, Kiffmeyer et al. 1998) en vormt dus waarschijnlijk geen groot risico voor aquatische organismen. Het is daarom de vraag of het nuttig is om metingen te doen naar het voorkomen van deze metaboliet in het milieu. Geen data zijn gevonden over de eventuele uitscheiding van de actieve gepolyglutamineerde vormen van methotrexaat.

2.4 Discussie

In de Nederlandse onderzoeken worden cytostatica nauwelijks aangetroffen. Dat ze niet gemeten worden geeft echter geen zekerheid dat ze ook werkelijk niet voorkomen in het milieu (Schrap et al. 2003). De volgende aspecten kunnen van invloed zijn op het aantreffen van cytostatica in het milieu en worden hieronder verder toegelicht: nauwkeurigheid van de metingen, metabolisatie, oplosbaarheid van cytostatica, uitvoering bemonstering. Vervolgens wordt in deze discussie nog aandacht besteed aan de biodegradatie-testresultaten en de invloed van cytostatica op micro-organismen in de rwzi's.

Het aantreffen van stoffen in het milieu is afhankelijk van de nauwkeurigheid van de metingen. Opvallend is dat er grote verschillen zitten tussen de detectielimieten van de verschillende onderzoeken; 6-10 ng/L in de Duitse onderzoeken (zie tabel 1) en 100-500 ng/L in de Nederlandse onderzoeken van Schrap et al. (2003) en Mill et al. (2006).

De concentraties cytostatica die voorkomen in ziekenhuiseffluent kunnen nog wel met deze laatste detectielimieten gedetecteerd worden (maximumconcentraties >1000 ng/L; zie tabel 2) al liggen enkele waarden ook lager (bijvoorbeeld ifosfamide 24 ng/L). De concentraties in rwzi-influenten en -effluenten vallen over het algemeen niet meer boven deze detectielimieten (maximumconcentraties >10 ng/L; zie tabel 2). Wellicht zouden cytostatica met andere meetmethoden (lagere dl) wel aangetroffen worden in Nederlandse rwzi-influenten en -effluenten. Mons et al. (2000) en Versteegh et al. (2007) hadden echter meetmethoden met detectielimieten van 10 ng/L en de concentraties ifosfamide in rwzi-effluent en oppervlakte-water lagen hieronder. Ifosfamide wordt wel weinig gebruikt in Nederland.

Kümmerer et al. (1997) en Grung et al. (2007) schatten de concentraties van ifosfamide en cyclofosfamide in oppervlaktewater onder de nanogram. Als cytostatica inderdaad in zulke lage concentraties aanwezig zijn, is het voorkomen van cytostatica in oppervlaktewater zeer moeilijk te testen omdat deze waarden onder de laagst gebruikte detectielimiet liggen (6 ng/L; zie tabel 1).

Het niet aantreffen van cytostatica in het milieu kan ook verklaard worden doordat cytostatica in het lichaam omgezet kunnen worden en dat de omzettingsproducten in het milieu terecht komen. De metabolisatie van cisplatine is onduidelijk en methotrexaat wordt voornamelijk onveranderd uitgescheiden. Van het toegediende cyclofosfamide en 5-fluorouracil wordt respectievelijk tot 20 en minder dan 10% onveranderde stof geexcreteerd.

De cytostatica kunnen ook nog in het milieu worden omgezet (Schrap et al. 2003). Dit proces hoeft niet vergelijkbaar te zijn aan de metabole omzetting in de mens en hierover is zeer weinig bekend.

Stoffen die slecht oplosbaar zijn in water hechten aan sediment en zwevende stof waardoor ze niet gedetecteerd worden. Methotrexaat en fluorouracil zijn beperkt oplosbaar in water (Martindale 2006). Mahnik et al. (2004) stellen echter dat fluorouracil niet adsorbeert aan zwevende stof in water en in de Zahn-Wellens degradatie-

test werd voor fluorouracil geen significante adsorptie aan slib gemeten (Kümmerer & Al-Ahmad 1997). Cyclofosfamide is goed oplosbaar (Martindale 2006) en adsorbeert niet aan slib in de rwzi's (Ternes et al. 2004). Cyclofosfamide en fluorouracil adsorberen waarschijnlijk dus niet aan de waterbodem en de zogenaamde vaste verspreidingsroute is daarom voor deze stoffen niet van belang (figuur 1). Het gedrag van cisplatine in water is complex en daarom is het moeilijk in te schatten waar dit cytostaticum zich in het aquatisch milieu zal bevinden (opgelost of gebonden aan stof).

Of cytostatica gedetecteerd worden bij metingen in het milieu is tevens afhankelijk van de tijd van bemonstering (Steger-Hartmann et al. 1996) en de stoffen waarnaar gezocht wordt.

Metingen zijn vaak een momentopname en geven daardoor geen volledig beeld van het voorkomen van cytostatica in het milieu. Het kan bijvoorbeeld een nat of droog seizoen zijn wat verschil in verdunning veroorzaakt. Regenval kan ook tot een sterke daling van het zuiveringsrendement van rwzi's leiden (Ternes, 1998). Verder zou het aantal kankerpatiënten onder behandeling per tijd kunnen verschillen en metabolisatie en excretie zijn niet constant maar verschillen tussen patiënten (Kümmerer et al. 1997).

Bij de metingen naar cytostatica in ziekenhuisafvalwater worden deze stoffen vaak aangetroffen bij bepaalde ziekenhuizen (Schrap et al. 2003, Mill et al. 2006). Het is mogelijk dat deze ziekenhuizen bijvoorbeeld in verhouding meer (interne) kankerbehandelingen uitvoeren dan de andere gemeten ziekenhuizen. Door de betreffende onderzoekers wordt hier echter geen informatie over gegeven.

In Nederlandse onderzoeken wordt alleen gekeken naar de cytostatica cyclofosfamide en ifosfamide terwijl deze laatste stof in Nederland niet zoveel gebruikt wordt (Derksen et al. 2007). Raadzam is om metingen te doen naar stoffen die wel vaak toegepast worden. Methotrexaat werd door een Nederlands ziekenhuis aangemerkt als frequent gebruikt en cyclofosfamide en 5-fluorouracil als redelijk frequent gebruikt (Boheemen et al. 2006, Derksen et al. 2007).

Bij de vertaling van de buitenlandse meetgegevens naar de Nederlandse situatie moet rekening gehouden worden met een aantal verschillen (Derksen & Lahr 2003). Zo wordt ifosfamide in Duitsland bijvoorbeeld meer gebruikt dan in Nederland (Derksen et al. 2007). Daarnaast zijn de plaats en omstandigheden van de metingen in de onderzoeken vaak niet te achterhalen. De relevantie van de gegevens voor de Nederlandse situatie is daarom moeilijk vast te stellen.

Uit de biodegradatie-testen bleek dat ifosfamide, cyclofosfamide en cisplatine slecht biologisch afbreekbaar zijn en methotrexaat juist goed biologisch afbreekbaar is. De biodegradatie-testen leveren geen congruente resultaten op voor 5-fluorouracil (OECD confirmatory test, closed bottle test, Zahn-Wellens test). In de confirmatory test was de degradatie volledig bij de geteste concentraties (5, 10 en 20 mg/L), al verliep de degradatie langzamer naarmate de beginconcentratie hoger was (Kiffmeyer et al. 1998). In de Zahn-Wellens test vond geen degradatie plaats maar de testconcentratie lag vrij hoog, 854 mg/L (Kümmerer & Al-Ahmad 1997). Wellicht is er daarom geen degradatie waargenomen. In de CBT werd fluorouracil echter ook niet afgebroken bij een testconcentratie van 9.02 mg/L (Kümmerer & Al-Ahmad 1997). Deze concentratie zou aan de hand van de resultaten van Kiffmeyer et al. wel volledig afgebroken moeten worden.

Steger-Hartmann et al. (1996) en Kümmerer et al. (1997) baseren de concentratie toegediend cytostaticum in de LSSTP-testen op de maximaal geschatte concentratie in ziekenhuiseffluent. Dit is een worst case aanname (ziekenhuiseffluent wordt immers verdund voor het in rwzi's terecht komt). Een realistischere concentratie zou gebaseerd zijn op gemeten en geschatte concentraties in rwzi-influent in plaats van ziekenhuiseffluent. Aangezien degradatie afhankelijk kan zijn van de testconcentratie (fluorouracil) kan hierdoor misschien een ander afbraakpercentage gevonden worden in de LSSTP-testen.

Biodegradatie-testen onderzoeken vaak één enkele stof (CBT en Zahn-Wellens). Cytostatica in het milieu komen uiteraard niet geïsoleerd voor maar in combinatie met andere stoffen. Het is mogelijk dat de stoffen elkaar beïnvloeden en dat dit gevolgen heeft voor de degradatie van de stoffen (zoals 5-fluorouracil; Kümmerer & Al-Ahmad 1997). Voor een correcter beeld zouden testen ook uitgevoerd moeten worden met ziekenhuiseffluent als inoculum zoals bij het onderzoek van Kümmerer en Al-Ahmad (Zahn-Wellens).

De biologische afbraak kan dus variëren per test, afhankelijk van de concentratie van de stof (fluorouracil) en het soort inoculum. In werkelijkheid variëren concentraties en inoculum samenstelling ook en dit zal een rol spelen bij de mate van degradatie van de cytostatica in rwzi's.

Bij de degradatie-testen met model-rwzi's (LSSTP; ifosfamide, cyclofosfamide, 5-fluorouracil, methotrexaat) wordt een reeks dagen achtereen een cytostaticum toegevoegd. Micro-organismen hebben dan de tijd om zich aan te passen en zo wordt wellicht een hogere degradatie bereikt dan in werkelijkheid. Een continue aanvoer van cytostatica is in werkelijkheid namelijk onwaarschijnlijk (Kiffmeyer et al. 1998). Dit zou alleen van invloed kunnen zijn op de methotrexaat- en fluorouracildegradatie omdat alleen deze cytostatica biologisch afbreekbaar bleken met deze testen.

Wanneer degradatie van een stof wordt aangetoond met de beschreven biodegradatie-testen, is het nog niet duidelijk of er werkelijke afbraak plaatsvindt van de cytostatica of dat ze omgezet worden in (toxische) metabolieten. Van methotrexaat is bekend dat het werd omgezet in het minder toxische 7-hydroxymethotrexaat. Cyclofosfamide, ifosfamide en cisplatine waren nauwelijks afbreekbaar maar fluorouracil was dat wel in de confirmatory test. 5-Fluorouracil is inactief tot het wordt omgezet in de cel naar actieve metabolieten. Bij een degradatie-test is het daarom van belang om te kijken of dit cytostaticum wordt omgezet naar de metabolieten die een hogere toxiciteit vertonen.

Uit de toxiciteitscontroles die gedaan zijn in de biodegradatie-onderzoeken bleken de cytostatica ifosfamide, cyclofosfamide en fluorouracil geen toxische invloed te hebben op bacteriën in rwzi's (Kümmerer & Al-Ahmad 1997, Kümmerer et al. 1997, Steger-Hartmann et al. 1997).

Voor fluorouracil zijn deze resultaten in strijd met het onderzoek van Zounková et al. (2007). Deze vonden een NOEC voor fluorouracil van 0.003 mg/L in een *P. putida* groeiremming-test. Kümmerer en Al-Ahmad vonden zelf ook een lager effect van fluorouracil op de groei van *P. putida* in ziekenhuiseffluent; IC_{0} van 0,5 mg/L (in tegenstelling tot $IC_{0} > 128$ mg/L van fluorouracil in water). Mede op basis van de resultaten van de Zahn-Wellens test verklaren de onderzoekers dit aan de hand van synergistische toxische effecten van fluorouracil in combinatie met een aantal antibiotica (Kümmerer & Al-Ahmad 1997). Kümmerer en Al-Ahmad hebben het gebruikte ziekenhuiseffluent echter niet getest op de desbetreffende antibiotica en er werd geen toxiciteit van fluorouracil aangetoond met de toxiciteitscontrole: ziekenhuiseffluent + fluorouracil + ethyleenglycol. Aangezien fluorouracil hier ook samen met de antibiotica voor zou komen, zou je hier ook een negatief effect op de micro-organismen in het slib verwachten.

Voor cisplatine en methotrexaat zijn geen toxiciteitscontroles gedaan. Zounková et al. (2007) vond een NOEC van 0.03 mg/L en een LOEC van 0.1 mg/L voor cisplatine in een *P. putida* groeiremming-test (zie hoofdstuk 4, tabel 6). Methotrexaat is inactief in bacteriën omdat ze geen transportmechanisme hebben om deze stof in hun cel op te nemen (Rang et al. 2007) (zie ook hoofdstuk 4.2).

2.5 Conclusie

In Nederland is het voorkomen van cytostatica slechts beperkt onderzocht. Alleen cyclofosfamide en ifosfamide zijn onderzocht maar slechts in twee van de zes onderzoeken aangetoond (Schrap et al. 2003, Mill et al. 2006). Ze werden alleen gedetecteerd in ziekenhuiseffluenten tot een concentratie van 9.9 µg/L.

Slechts een klein deel van het toegediende cyclofosfamide en 5-fluorouracil wordt onveranderd uitgescheiden (respectievelijk tot 20% en <10%). De metabolisatie van cisplatine is onduidelijk en methotrexaat wordt voornamelijk onveranderd geexcreteerd.

Uit de buitenlandse data kwam naar voor dat cytostatica worden gedetecteerd in ziekenhuisafvalwater tot concentraties van 4,5 µg/L (Aherne et al. 1985, Steger-Hartmann et al. 1996, Kümmerer et al. 1997, Steger-Hartmann et al. 1997, Kümmerer et al. 1999). Voor 5-fluorouracil werd zelfs een maximale concentratie gemeten van 122 µg/L maar dit betrof het effluent van een oncologieafdeling van een ziekenhuis (Mahnik et al. 2004).

Cyclofosfamide en ifosfamide komen via het riool terecht in zuiveringsinstallaties. In het influent van rwzi's werden deze cytostatica aangetroffen (cyclofosfamide tot 143 ng/L; ifosfamide mediaan 6.2 ng/L). In het effluent van rwzi's werden deze cytostatica ook nog gedetecteerd. Daar lag met name de concentratie van cyclofosfamide een stuk lager dan in de influenten (cyclofosfamide tot 20 ng/L; ifosfamide mediaan 9.3 ng/L).

Op grond van de resultaten beschreven in paragraaf 2.3.3 kan gesteld worden dat de cytostatica ifosfamide, cyclofosfamide en cisplatine een lage biologische afbreekbaarheid hebben. Ifosfamide en cyclofosfamide adsorberen niet aan slib en zullen dus onveranderd door de rwzi's gaan en in oppervlaktewater terecht komen (Kümmerer 2001a). Adsorptie van cisplatine is niet bekend.

Het is onwaarschijnlijk dat methotrexaat in oppervlaktewater terecht komt omdat deze stof biologisch afbreekbaar bleek in het onderzoek van Kiffmeyer et al. (1998). In een model-rwzi werd methotrexaat omgezet in een minder toxische metaboliet. Methotrexaat en de metaboliet zijn slecht oplosbaar in water en zullen dus waarschijnlijk hechten aan stof in het milieu en daardoor nauwelijks beschikbaar zijn voor aquatische organismen.

Over het gedrag van fluorouracil in rwzi's kunnen geen uitspraken gedaan worden door tegenstrijdige onderzoeksresultaten.

Verwacht wordt dat cyclofosfamide en methotrexaat in rioolwater geen negatieve invloed hebben op de degradatiecapaciteit van de bacteriën in het actieve slib. Cisplatine vertoont toxiciteit voor de bacterie *P. putida* vanaf een concentratie van 0,1 mg/L en heeft daarom misschien wel invloed op micro-organismen in rwzi's. De resultaten voor fluorouracil zijn tegenstrijdig.

De hoogste concentraties cytostatica worden gedetecteerd in ziekenhuiseffluenten. Hier zijn ook de meeste metingen aan gedaan. De concentraties nemen af gaandeweg de route ziekenhuiseffluent, rwzi-influent, rwzi-effluent en oppervlaktewater (zie tabel 2). Het resultaat van Ternes (1998) is hier een uitzondering op. De concentratieafname kan onder andere verklaard worden doordat de stroom verdund wordt (zie figuur 1) en/of doordat stoffen er bij de zuivering in de rwzi verwijderd worden.

Cytostatica komen waarschijnlijk niet in meetbare hoeveelheden via de zuiveringsinstallaties in het oppervlaktewater terecht want ze zijn tot nu toe niet aangetoond in oppervlakte-wateren. Kümmerer et al. (1997) berekenden voor ifosfamide een PEC (Predicted Environmental Concentration, zie ook hoofdstuk 3) van 0,8 ng/L in Duits oppervlaktewater. Grung et al. (2007) berekende voor cyclofosfamide een PEC van 0.26 ng/L.

Hoofdstuk 3

Schattingen van concentraties in het milieu

Er zijn verschillende manieren om concentraties van geneesmiddelen in het milieu te schatten. In de literatuur welke gebruikt is voor hoofdstuk 2 zijn naast concentratiemetingen in het milieu ook verschillende schattingen voor concentraties in het milieu gedaan. Deze schattingen werden vooral gedaan voor ziekenhuiseffluent.

3.1 Schattingen ziekenhuiseffluent

Hartmann et al. (1998) hebben de theoretical mean sewage concentration (TMSC) geschat van ziekenhuiseffluent voor cisplatine en 5-fluorouracil (zie hoofdstuk 2, tabel 1). Hiervoor werd de totale jaarlijkse verkoop (Zwitserland) gedeeld door de gemiddelde jaarlijkse afvalwaterstroom van het ziekenhuis. Er werd geen rekening gehouden met metabolisatie of inactivatie van deze stoffen in het lichaam (worst case scenario).

De schatting van Hartmann et al. (1998) voor cisplatine in ziekenhuiseffluent bedraagt 68 ng/L (0.07 µg/L). In het artikel wordt een waarde van 90 ng/L vermeld voor cisplatine maar dat is een fout in de berekening (sales/mean waste water flow). De metabolisatie van cisplatine is niet opgehelderd (FK 2008) en het is dus niet te zeggen hoe precies deze schatting is. De schatting valt wel binnen de metingen van Kümmerer et al. (1999) (0.02-3.58 µg/L, tabel 1).

De berekende concentratie voor fluorouracil was 2030 ng/L (2.03 µg/L). Minder dan 10% van het toegediende fluorouracil wordt onveranderd uitgescheiden met de urine (FK 2008) en de schatting voor dit cytostaticum zal zonder rekening te houden met de metabolisatie minstens een factor 10 te hoog liggen. Concentraties 5-fluorouracil zijn in Oostenrijk gemeten in ziekenhuiseffluenten in concentraties van 20.000-122.000 ng/L (20-122 µg/L) (Mahnik et al. 2004). De schatting ligt dan juist minstens een factor tien te laag. Hierbij moet opgemerkt worden dat Mahnik et al. effluent onderzochten van een oncologie-afdeling met in-patiënt treatment.

Steger-Hartmann et al. (1996) maakten ook een schatting voor cyclofosfamide- en ifosfamideconcentraties in ziekenhuiseffluent op basis van jaarlijks medicijn- en watergebruik van een (medium tot groot) ziekenhuis. Hier werd echter een excretie van de cytostatica van 20% ingecalculerd. De schatting voorspelt concentraties tussen 1-10 µg/L (niet weergegeven in tabel 1). De door Steger-Hartmann et al. gemeten concentraties liggen lager (ifosfamide 0.024 µg/L, cyclofosfamide 0.146 µg/L, zie tabel 1). Volgens de onderzoekers zou dit o.a. kunnen liggen aan de mate van excretie van ongemetaboliseerde stof. De Jonge et al. (2005a) rapporteren voor cyclofosfamide tot 20% onveranderde stof in urine maar volgens Anderson et al. (1995) wordt 70% van het toegediende cyclofosfamide

terugggevonden in de urine en daarvan bestaat slechts 10% uit onveranderde stof (zie ook hoofdstuk 4). Voor cyclofosfamide zou de ingecalculerde 20% daarom inderdaad te hoog kunnen liggen maar deze iets hogere metabolisatie kan echter niet het verschil tussen de metingen en schattingen verklaren.

De schattingen van Steger-Hartmann et al. komen wel goed overeen met andere metingen van ifosfamide en cyclofosfamide in ziekenhuiseffluent (ifosfamide tot 1.9 µg/L, cyclofosfamide tot 9.9 µg/L, zie tabel 1).

3.2 Schattingen oppervlaktewater

3.2.1 PEC_{EMEA}

Het Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) van het European Medicines Evaluation Agency (EMA) heeft een richtlijn opgesteld waarin een procedure voor het bepalen van de mogelijke milieurisico's van humane geneesmiddelen is uitgewerkt; Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use (EMA 2006). De risicobeoordeling vindt plaats in twee fases. In de eerste fase wordt de te verwachten concentratie in het oppervlaktewater (PEC: Predicted Environmental Concentration) bepaald met behulp van een berekening (estimation of exposure; blootstellingsschatting).

$$PEC_{\text{oppervlaktewater}} (\text{mg/L}) = \text{DOSE}_{\text{ai}} \times \text{Fpen} / (\text{WASTEWinhab} \times \text{DILUTION})$$

DOSE_{ai} = maximale dagelijkse dosis geconsumeerd per inwoner (mg/i/d)

Fpen = percentage marktpenetratie (0.01: aanname dat 1% van de populatie dagelijks wordt behandeld met de stof)

WASTEWinhab = hoeveelheid afvalwater per inwoner per dag (130 L)

DILUTION = verdunningsfactor van afvalwater door oppervlaktewater (10)

De maximale dagelijkse dosissen zijn opgezocht voor de volgende vier cytostatica; cisplatine, cyclofosfamide, 5-fluorouracil, methotrexaat (Martindale 2006, CBG-MEB 2008). Deze inperking is gebaseerd op effect-gegevens welke behandeld worden in hoofdstuk 4. Met de dagelijkse maximale dosissen kunnen de DOSE_{ai}-waarden berekend worden. Hierbij moet opgemerkt worden dat DOSE_{ai} een dagelijkse dosis betreft terwijl cytostatica niet dagelijks worden toegediend maar in bepaalde perioden.

Een overzicht van deze waarden en de daaruit berekende PEC_{EMEA} staan in tabel 3.

Tabel 3: Maximale dagelijkse dosissen, DOSE_{ai}- en PEC_{EMEA}-waarden voor de vier geselecteerde cytostatica.

Cytostaticum	Maximale dagelijks dosis	DOSE _{ai} (mg/i/d)*	PEC _{EMEA} (µg/L)
Cisplatine	20 mg/m ²	34	0.3
Cyclofosfamide	7.5 mg/kg	450	3.5
5-Fluorouracil	12 mg/kg	720	5.5
Methotrexaat	300 mg/m ²	510	3.9

*Gemiddeld lichaamsgewicht = 60 kg, gemiddeld lichaamsoppervlak = 1.7 m² (Wikipedia 2008a).

Ecotoxicologische data zijn bij bovenstaande schatting nog niet van toepassing. Ligt de berekende concentratie lager dan 0.01 µg/L dan wordt verondersteld dat het geneesmiddel geen gevaar vormt voor het milieu. Als de concentratie hoger is dan deze waarde is er aanvullende ecotoxicologische informatie vereist (fase 2). Dit is hier voor alle cytostatica het geval (zie ook hoofdstuk 5).

3.2.2 *PEC*_{conventioneel}

Kümmerer et al. (1997) berekenden een PEC van 0.8 ng/L voor ifosfamide voor oppervlaktewater in Duitsland. Zij gebruikten echter een andere berekening dan in de EMEA richtlijn, waarbij rekening wordt gehouden met de mate van excretie (van ongemetaboliseerde stof). Deze berekening wordt in deze tekst de conventionele PEC genoemd (PEC_{conv}).

$$PEC_{oppervlaktewater} \text{ (g/L)} = A \times (100 - R) / (365 \times P \times V \times D \times 100)$$

A = voorspelde hoeveelheid gebruikt per jaar in het land (290 kg)

R = verlies door adsorptie, biodegradatie, metabolisme etc. (80% voor metabolisme)

P = inwoners van het land (80.000.000 voor Duitsland)

V = volume afvalwater per capita per dag (0.15-0.30 m³)

D = verdunningsfactor van afvalwater door oppervlaktewater (10)

De onderzoekers berekenden met behulp van bovenstaande formule ook de concentraties ifosfamide in rwzi-influent en -effluent. Volgens de onderzoekers liggen deze berekende concentraties in dezelfde orde van grootte als de gemeten concentraties (zie hoofdstuk 2, tabel 1). Hieruit trekken zij de conclusie dat de schattingen een redelijk beeld geven van de werkelijke concentraties en dat de berekening dus geen grove fout bevat (20% excretie is waarschijnlijk redelijk voor ifosfamide).

Het probleem bij een schatting is vaak dat de consumptiedata voor cytostatica niet bekend zijn. De hoeveelheid actieve stof⁶ die per jaar verbruikt wordt is van belang maar deze gegevens zijn vaak niet voor derden beschikbaar (Derksen et al. 2001). Derksen et al. vroegen verbruiksgegevens van verschillende geneesmiddelen op via het bedrijf FarmInform. Voor cyclofosfamide was dat 92 kg/jaar.

A = 92 kg

R = 0 (worst case scenario)

P = 16.400.000 (Centraal Bureau voor de Statistiek)

V = 0.13 m³ (= 130 L)

D = 10

$$PEC_{oppervlaktewater} = 92 / (365 \times 16.400.000 \times 0.13 \times 10) = 12 \text{ ng/L}$$

Op basis van de rapportages van De Jonge et al. (2005a) en Anderson et al. (1995) (zie ook paragraaf 3.1 en hoofdstuk 4) wordt voor het verlies door metabolisme hier 80% gerekend (R = 80).

$$PEC_{oppervlaktewater} = (92 \times 20) / (365 \times 16.400.000 \times 0.13 \times 10 \times 100) = 2 \text{ ng/L}$$

Bovenstaande waarde voor cyclofosfamide ligt in dezelfde orde van grootte als wat Kümmerer et al. (1997) voor ifosfamide berekende in oppervlaktewater (0.8 ng/L).

⁶ Een geneesmiddel bestaat uit een werkzame of actieve stof en een aantal hulpstoffen om het medicijn hanteerbaar en doseerbaar te maken.

Het aantal gebruikers van cyclofosfamide in Nederland is afgenomen van 2100 tot 1700 gebruikers in de periode 2002 tot 2006 (GIPdatabank 2008). De gebruikte hoeveelheid cyclofosfamide per jaar is dus waarschijnlijk afgenomen en de schattingen zijn daardoor wellicht aan de hoge kant.

Om een PEC_{conv} uit te rekenen voor cisplatine, 5-fluorouracil en methotrexaat zijn voor de vier geselecteerde cytostatica de DDD's (defined daily doses) opgezocht in de GIPdatabank. DDD is een statistische maat voor geneesmiddelgebruik van de World Health Organisation. De DDD-waarden uit de GIPdatabank geven het aantal dagelijkse dosissen gebruikt in heel Nederland in een jaar weer. Met behulp van de DDD en de gemiddelde dagelijkse dosissen (Martindale 2006, CBG-MEB 2008) kan het verbruik per jaar in Nederland voor de verschillende cytostatica berekend worden ($DDD/jaar * xx \text{ mg/kg lichaamsgewicht} * \text{gemiddeld lichaamsgewicht in kg}$, of $DDD/jaar * xx \text{ mg/m}^2 \text{ lichaamsoppervlak} * \text{gemiddeld lichaamsoppervlak in m}^2$).

Een overzicht van de verschillende waarden en de daaruit berekende PEC_{conv} staan in tabel 4. In de GIPdatabank zijn geen data voor het gebruik van ifosfamide in Nederland gevonden.

Tabel 4: DDD, gemiddelde dagelijkse dosissen, verbruik per jaar en PEC's voor de vier geselecteerde cytostatica.

Cytostaticum	DDD / jaar	Gemiddelde dagelijks dosis	Gemiddelde dagelijks dosis per persoon*	Verbruik per jaar	PEC_{conv} (ng/L) R = 0 %	PEC_{conv} (ng/L) R = X %
Cisplatine	3 (2003)	15 mg/m ²	25.5 mg	7.6*10 ⁻⁵ kg	9.8*10 ⁻⁶	-
Cyclofosfamide	124.030 (2006)	6 mg/kg	360 mg	45 kg	5	1 (R = 80 %)
5-Fluorouracil	680.630 (2006)	7.5 mg/kg	450 mg	306 kg	39	4 (R = 90 %)
Methotrexaat	169.740 (2006)	100 mg/m ²	170 mg	29 kg	3	-

*Gemiddeld lichaamsgewicht = 60 kg, gemiddeld lichaamsoppervlak = 1.7 m² (Wikipedia 2008a).

In tabel 4 is voor cyclofosfamide voor 2006 een verbruik per jaar berekend van 45 kg. Het jaarlijkse verbruik van 92 kg/jaar van Derksen et al. (2001) ligt dus een factor twee hoger. Tussen de PEC-waarden ligt ook een factor twee verschil en de waarden liggen voor beide verbruiksaantallen in dezelfde orde van grootte (11 ng/L, 5 ng/L).

Voor cyclofosfamide en fluorouracil is naast een worst case PEC (R = 0%) ook een PEC berekend waarin wel rekening wordt gehouden met metabolisatie (respectievelijk R = 80% en 90%). Methotrexaat wordt voornamelijk onveranderd via de urine uitgescheiden (Martindale 2006, FK 2008) behalve bij hoge toedieningsconcentraties (> 50 mg/kg) (Jacobs et al. 1976) maar dat was hier niet het geval en daarom is voor dit cytostaticum geen rekening gehouden met verlies door metabolisatie (zie ook hoofdstuk 4).

Cisplatine wordt volgens bovenstaande data (GIPdatabank 2008) zeer weinig gebruikt in Nederland (DDD = 3). Er werden ook geen data gevonden voor de jaren na 2003, wellicht is het verbruik nog verder afgenomen. Cisplatine is echter niet de enige bron voor platina in het milieu. In verhouding is er ook veel uitstoot door auto's (Kümmerer et al. 1999) (zie ook hoofdstuk 2). De mogelijke risico's van platina in het milieu zijn dus niet te bepalen aan de hand van alleen een schatting voor de concentratie cisplatine in het milieu.

3.3 Discussie

De berekende PEC_{EMEA}'s liggen veel hoger dan de PEC_{conv}'s (nanogrammen versus microgrammen). Dit is in overeenstemming met de resultaten van Grung et al. (2007) (Noorwegen) die zelfs nog een iets extremer verschil vonden.

Grung et al. hebben een ERA (Environmental Risk Assessment) uitgevoerd gebaseerd op de EMEA richtlijn naar een aantal geneesmiddelen. Zij berekenden een PEC_{oppervlaktewater} van 2.5 µg/L voor cyclofosfamide. Met de conventionele berekening vonden ze echter een PEC_{oppervlaktewater} van 0.00026 µg/L (0.26 ng/L).

De PEC_{EMEA}-waarde berekend door Grung et al. ligt in dezelfde orde van grootte als bovenstaande PEC_{EMEA}-waarde voor cyclofosfamide (3.5 µg/L, zie tabel 3). De gebruikte waarden voor de berekening komen redelijk goed overeen (DOSE_{Ei} 500 mg, WASTEWinhab 200 L, DILUTION 10). De PEC_{conv}-waarde ligt een factor 20 lager (5 ng/L, zie tabel 4).

De PEC_{EMEA}-berekening geeft een zeer ruwe schatting (worst case) voor concentraties geneesmiddelen in oppervlaktewater. Deze berekening is voor cytostatica in het bijzonder erg onnauwkeurig. Grung et al. beschouwen de PEC-schatting van EMEA voor minder frequent toegepaste geneesmiddelen (zoals cytostatica) aan de hoge kant. De consumptie wordt geschat door een marktpenetratiepercentage van 1%. Cyclofosfamide wordt echter zeker niet door 1% van de bevolking gebruikt (Grung et al. 2007).

Wanneer het aantal gebruikers in 2006 voor cyclofosfamide (GIPdatabank 2008, zie ook paragraaf 3.2.2) gedeeld wordt door het totale aantal inwoners in Nederland, levert dit een marktpenetratie op van 0.01% (1700/16.400.000*100=0.01%). Op basis hiervan zou de marktpenetratie in de PEC_{EMEA}-berekening en dus ook de schatting die daar uit volgt een factor 100 te hoog liggen.

Met de DOSE_{Ei}-waarden kan het verbruik van een cytostaticum in Nederland per jaar worden berekend (DOSE_{Ei}*365 d*16.400.000 i). Dit is het verbruik wanneer alle inwoners dit geneesmiddel zouden gebruiken. Een marktpenetratiewaarde kan bepaald worden door deze verbruiksdata te delen door de verbruiksdata per jaar welke gebruikt zijn bij de PEC_{conv}-berekening. Op basis hiervan blijkt ook dat de marktpenetratiewaarde van 1% welke aangehouden wordt in de PEC_{EMEA}-berekening, veel te hoog ligt.

In tabel 5 staan de verschillende waarden weergegeven.

Tabel 5: Verbruik per jaar berekend aan de hand van de DOSE_{Ei}-waarden, verbruik per jaar berekend aan de hand van DDD-waarden en de hieruit berekende marktpenetratie per cytostaticum.

Cytostaticum	DOSE _{Ei} (mg/i/d)	Verbruik per jaar in Nederland (EMEA) (kg)	Verbruik per jaar in Nederland (conv) (kg)	Verbruik _{conv} /verbruik _{EMEA} *100 = marktpenetratie (%)
Cisplatine	34	203524	2.6*10 ⁻⁵ kg	1.3*10 ⁻⁸
Cyclofosfamide	450	2693700	45 kg	0.002
5-Fluorouracil	720	4309920	306 kg	0.007
Methotrexaat	510	3052860	29 kg	0.0009

De berekende PEC_{EMEA}-concentraties voor cisplatine en fluorouracil (respectievelijk 0.3 µg/L en 5.5 µg/L) liggen in dezelfde orde van grootte als de geschatte concentraties in ziekenhuiseffluent door Hartmann et al. (1998) (respectievelijk: 0.07 µg/L en 2.03 µg/L). Deze schattingen kwamen redelijk goed overeen met de metingen voor cisplatine in ziekenhuiseffluent door Kümmerer et al. (1999) (0.02-3.58 µg/L). De PEC_{EMEA}-berekening is daarom wellicht wel nuttig om concentraties te schatten op plekken waar hogere concentraties cytostatica worden verwacht

(hotspots) zoals in afvalwater van ziekenhuizen. Mahnik et al. (2004) vonden echter hogere concentraties voor fluorouracil (20-122 µg/L; in acht nemend dat Mahnik et al. effluent onderzochten van een oncologie-afdeling met in-patiënt treatment) (zie hoofdstuk 2, tabel 1).

De conventionele berekening is gebaseerd op het jaarlijkse gebruik en niet op welk deel van de bevolking waarschijnlijk het geneesmiddel gaat gebruiken (marktpenetratie). Om deze reden is de PEC_{conv}-berekening bruikbaar voor het berekenen van concentraties van cytostatica in oppervlaktewater dan de PEC_{EMEA}. De moeilijkheid bij de conventionele berekening is echter dat consumptiedata meestal niet beschikbaar zijn.

Voordeel bij de PEC_{conv}-berekening is dat er rekening gehouden wordt met metabolisatie of adsorptie en biologische afbraak in rwzi's of het milieu (R). Bij bovenstaande PEC_{conv}-berekeningen voor cyclofosfamide en fluorouracil maakt het echter weinig verschil of er rekening wordt gehouden met metabolisatie (cyclofosfamide 5 versus 1 ng/L; fluorouracil 39 versus 4 ng/L).

In de conventionele berekeningen die gedaan zijn is geen rekening gehouden met eventuele eliminatie van cytostatica in rwzi's. Cisplatine en cyclofosfamide zullen waarschijnlijk onveranderd door de rwzi gaan (lage biologische afbreekbaarheid en slechte adsorptie aan slib, zie hoofdstuk 2) en dit heeft dus geen invloed op de berekening. De PEC_{conv} wordt voor methotrexaat waarschijnlijk te hoog ingeschat omdat methotrexaat wel biologisch afbreekbaar is in een model-rwzi volgens het onderzoek van Kiffmeyer et al. (1998) (zie hoofdstuk 2). Of fluorouracil afgebroken wordt in rwzi's is niet duidelijk; volledige degradatie werd waargenomen in het onderzoek van Kiffmeyer et al (1998) in tegenstelling tot geen degradatie in het onderzoek van Kümmerer en Al-Ahmad (1997).

3.4 Conclusie

De berekende PEC_{conv}'s in oppervlaktewater voor de vier cytostatica liggen in de orde van grootte van een paar nanogrammen (cyclofosfamide, methotrexaat) tot een tiental nanogrammen (5-fluorouracil). De PEC berekend voor cisplatine was extreem laag ($3.3 \cdot 10^{-6}$ ng/L) omdat het verbruik aan de hand van de DDD-waarden en de gemiddelde dagelijkse dosis niet boven één gram per jaar uit kwam.

Met de PEC_{EMEA} worden hogere concentraties berekend; van een concentratie van 0.3 µg/L voor cisplatine tot een concentratie van 5.5 µg/L voor fluorouracil.

De concentraties berekend met de conventionele PEC-berekening geven waarschijnlijk een realistischer beeld van de werkelijke concentraties van cytostatica in het oppervlaktewater. Wanneer cytostatica in microgrammen aanwezig zouden zijn in het oppervlaktewater (PEC_{EMEA}), zouden ze wel aangetoond zijn in de verschillende onderzoeken waarbij metingen naar cytostatica in oppervlaktewater zijn gedaan (Aherne et al. 1985, Ternes 1998, Mons et al. 2000, Versteegh et al. 2007) (detectielimieten; 6.2/10 ng/L, zie hoofdstuk 2 en tabel 1).

De schattingen die zijn gedaan voor het voorkomen van cytostatica in ziekenhuiseffluent, komen voor de meeste stoffen redelijk goed overeen met de metingen die zijn gedaan (tot een factor 10 verschil). Uitzondering hierop is de schatting voor fluorouracil, deze ligt tot een factor 60 lager dan de metingen van Mahnik et al. (2004). Een andere uitzondering is de meting door Steger-Hartmann et al. (1996) voor ifosfamide, de gemeten concentratie ligt minstens een factor 40 lager dan de schattingen.

Hoofdstuk 4

Effecten cytostatica

In hoofdstuk 2 en 3 zijn gemeten en geschatte concentraties van cytostatica in het milieu gerapporteerd. De vraag is of deze concentraties gevolgen hebben voor het aquatisch milieu. Hiervoor wordt gekeken naar toxiciteitsdata (ecotoxiciteit en genotoxiciteit) en eigenschappen van cytostatica (werkingsmechanismen, farmacokinetiek en bijwerkingen).

4.1 Ecotoxicologie

Om een risicoschatting te maken van de mate van schadelijkheid van cytostatica voor het milieu zijn met name chronische toxiciteitgegevens van belang. In het aquatisch milieu worden organismen immers over langere tijd, wellicht hun hele levensduur, blootgesteld aan lage concentraties geneesmiddelen.

Chronische toxiciteitstesten zijn testen waarbij organismen gedurende langere tijd (ten minste één volledige levenscyclus) worden blootgesteld aan verschillende concentraties van een stof (Rand & Petrocelli 1985). Er zijn ook partiële chronische testen waarbij organismen een deel van hun levenscyclus worden blootgesteld. De organismen worden dan meestal niet blootgesteld in de vroege juveniele periode maar wel tijdens een aantal gevoelige levensstadia daarna (groei en reproductie).

Acute toxiciteitstesten zijn bedoeld om korte termijn effecten in te schatten en lopen gedurende een fractie van de levensduur van het testorganisme. Daarbij wordt vaak gekeken naar zeer uitgesproken effecten als dood en immobilisatie. Bij chronische testen zijn andere testparameters van belang zoals groei, reproductie en morfologische deformaties.

Toxiciteitstesten worden doorgaans op verschillende trofische niveaus uitgevoerd (bacteriën, algen, kreeftachtigen, vis) om een goede inschatting te krijgen van alle mogelijke effecten (Rand & Petrocelli 1985).

Acute toxiciteitsdata worden vaak uitgedrukt in EC50 (50% effect concentratie, ook wel IC_x = x% inhibitie concentratie) of LC50 (50% lethaal concentratie) waarden (Rand & Petrocelli 1985).

Chronische toxiciteitsdata worden vaak uitgedrukt in:

- NOEC (No Observed Effect Concentration): de hoogst geteste concentratie waarbij geen significant effect waar te nemen is in vergelijking tot de controlegroep.
- LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): de laagste concentratie die een statistisch significant effect heeft op het onderzoeksorganisme.
- EC10 (10% effect concentratie).

Genotoxiciteitstesten zijn in het geval van cytostatica ook van belang omdat de meeste cytostatica carcinogene en mutagene effecten kunnen hebben welke gevolgen hebben voor organismen en/of hun nageslacht (Martindale 2006).

4.1.1 Ecotoxiciteit

Verschillende chronische en acute ecotoxiciteitsdata van cytostatica zijn verzameld uit de literatuur. Zie tabel 6 voor een overzicht.

In de VICH⁷ guideline (Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products - Fase 2), die in de EU toegepast wordt bij registratie van diergeneesmiddelen, worden algengroei testen en *Daphnia magna*-reproductie testen aanbevolen om de chronische toxiciteit van een (dier)geneesmiddel vast te stellen (VICH 2004). In navolging van deze richtlijn worden in deze literatuurstudie de in tabel 6 beschreven algengroei testen en *D. magna*-reproductie testen opgevat als chronisch. Rand en Petrocelli (1985) beschouwen de 21 dagen reproductie test met *D. Magna* ook als een chronische test (partieel).

De bacterie- en protozoa-groei remming testen worden in deze literatuurstudie ook als chronisch beschouwd omdat de testorganismen in ieder geval één levenscyclus lang worden blootgesteld aan de onderzochte stof.

Tabel 6: Overzicht van chronische en acute ecotoxiciteitsdata van cytostatica uit de literatuur.

Cytostaticum	Testorganisme en soort	Testparameter en -duur	n	Laagste en hoogste geteste concentraties (aantal er tussen in) (mg/L), [x] = aantal meetpunten tussen 20% en 80% immobilisatie	Nominal (-) / Measured (+)	EC50 (mg/L)	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)	Referentie
Cyclofosfamide	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i> (juveniel, < 24 h oud)	immobilisatie, 48 h (A)	20	5 concentraties getest (alle meetpunten onder 20% immobilisatie)	-	>1000	≥1000	>1000	(Zounková et al. 2007)
	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i> alg,	groei remming, 16 h (CH)	3/4	6 concentraties getest [0]	-	>1000	1000	>1000	
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> alg,	groei remming, 96 h (CH)	3/4	5 concentraties getest [2]	-	930 (700-1100)	250	500	
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	groei remming, 72 h (CH)	3	3.2-100 (5)	+ (bij twee concentraties op twee momenten in de test)	> 100	> 100		(Grung et al. 2007)
	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i> (juveniel, 24 h oud)	reproductie test, 21 d (CH)	nb	10-100 (3)	+ (bij twee concentraties op twee momenten in de test)		56	100	
5-Fluorouracil	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i>	immobilisatie, 48 h (A)	20	6 concentraties getest [2]	-	36 (12-70)	1	10	(Zounková et al. 2007)
	kikker, <i>Xenopus laevis</i>	embryo groei remming, 120 h (A)	2	nb	-			200	(DeYoung et al. 1996)
	vis, <i>Pimephales promelas</i>	embryo groei remming, 120 h (A)	2	nb	-			200	
	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i>	groei remming, 16 h (CH)	3/4	6 concentraties getest [2]	-	0.027 (0.015-0.045)	0.003	0.01	(Zounková et al. 2007)
	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i>	groei remming, 16 h (CH)	?	1-256 (7)	-		IC0 > 128		(Kümmerer & Al-Ahmad 1997)

⁷ International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

Cytostaticum	Testorganisme en soort	Testparameter en -duur	n	Laagste en hoogste geteste concentraties	Nominal (-) / Measured (+)	EC50 (mg/L)	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)	Referentie
Cisplatine	alg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	groeiremming, 96 h (CH)	3/4	6 concentraties getest [3]	-	0.11 (0.03-0.3)	0.001	0.01	(Zounková et al. 2007)
	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i>	immobilisatie, 48 h (A)	20	6 concentraties getest [3]	-	0.64 (0.4-0.85)	0.2	0.5	
	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i>	groeiremming, 16 h (CH)	3/4	6 concentraties getest [3]	-	1.2 (1.0-1.40)	0.03	0.1	
Cisplatine	protozoa, <i>Tetrahymena pyriformis</i>	groeiremming, 9 h (CH)	3	5-70 (6)	-	37.31 (mean IC50)			(Bonnet et al. 2003)
	alg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	groeiremming, 96 h (CH)	3/4	5 concentraties getest [2]	-	2.3 (1.7-2.9)	0.1	1	(Zounková et al. 2007)
Methotrexaat	bacterie, <i>Vibrio fischeri</i>	luminescence inhibition, 30 min (A)	nb	nb	-	1220			(Henschel et al. 1997)
	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i>	immobilisatie, 48 h (A)	nb	nb	-	>1000			
	vis, <i>Brachydanio rerio</i> (embryo's)	mortaliteit, 96 h (A)	20	nb	-	85			
	BF-2 viscellen, <i>Lepomis macrochirus</i>	proliferatie, 48 h	nb	nb	-	3			
	protozoa, <i>Tetrahymena pyriformis</i>	groeiremming, 48 h (CH)	3	nb	-	45			
Methotrexaat	alg, <i>Scenedesmus subspicatus</i>	groeiremming, 72 h (CH)	nb	nb	-	260			

Per cytostaticum worden acute testen (A) eerst genoemd, dan de chronische testen (CH). De testen zijn uitgevoerd met adulte testorganismen tenzij anders vermeld. (nb = niet bekend).

De resultaten uit de tabel worden hieronder behandeld. De meest gedetailleerde publicaties zijn van Zounková et al. (2007) en Henschel et al. (1997). Zounková et al. hebben de ecotoxiciteit onderzocht van vijf cytostatica (cyclofosfamide, cisplatine, 5-fluorouracil, doxorubicine, etoposide). Er werden testen gedaan met bacteriën (*P. putida*, groeiemmingtest, 16 h), een alg (*Pseudokirchneriella subcapitata*, groeiemmingtest, 96 h) en een kreeftachtige (*D. magna*, acute immobilisatietest, 48 h). Henschel et al. onderzochten de acute toxiciteit van methotrexaat bij bacteriën (*Vibrio fischeri*), *D. Magna* en vissen (*Brachydanio rerio*); en de chronische toxiciteit van methotrexaat op protozoa (*Tetrahymena pyriformis*) en een alg (*Scenedesmus subspicatus*). Ook het onderzoek van Grung et al. (2007) is belangrijk omdat ze twee chronische toxiciteitstesten hebben uitgevoerd voor cyclofosfamide.

5-Fluorouracil

In de chronische testen van Zounková et al. was 5-fluorouracil het meest toxisch (*P. putida*: EC50 0.027 mg/L, LOEC 0.01 mg/L en *P. subcapitata*: EC50 0.11 mg/L, LOEC 0.01 mg/L). Dit is tegenstrijdig met het resultaat van Kümmerer en Al-Ahmad (1997) (*P. putida* groei-remmingtest, 16 h: IC₀ >128 mg/L).

Fluorouracil vertoont pas acute toxische effecten bij vrij hoge concentraties (*D. magna* immobilisatie: EC50 36 mg/L; groeiemming kikker- en visembryo's: LOEC 200 mg/L) (DeYoung et al. 1996, Zounková et al. 2007).

Cisplatine en doxorubicine

Cisplatine en doxorubicine zijn het meest acuut toxisch (*D. magna*: EC50 0.64 mg/L en 2.0 mg/L respectievelijk) (Zounková et al. 2007).

Doxorubicine heeft een lage chronische toxiciteit (groeiemming *P. putida*: EC50 >1000 mg/L, *T. pyriformis*: IC50 43.28 mg/L, *P. subcapitata*: EC50 13 mg/L) (Bonnet et al. 2003, Zounková et al. 2007). Cisplatine heeft

daarentegen een redelijke chronische toxiciteit voor *P. putida* (EC50 1.2 mg/L) en *P. subcapitata* (EC50 2.3 mg/L) (Zounková et al. 2007). Dit is niet in overeenstemming met het resultaat van Bonnet et al. (2003) welke een groeiremmingstest uitvoerden met *T. pyriformis* en een IC50 waarde voor cisplatine berekende van 37.31 mg/L. Deze hoge concentratie zou wellicht verklaard kunnen worden door de korte duur (9 h) van deze test. Deze test is echter wel op te vatten als een chronische test omdat de testorganismen in de controlegroep drie generaties voortbrachten.

Cyclofosfamide

In alle testen uitgevoerd door Zounková et al. (2007) was cyclofosfamide het minst toxisch. In overeenstemming hiermee vond in het onderzoek van Grung et al. (2007) geen groeiremming van de alg *P. subcapitata* plaats na 72 h blootstelling met cyclofosfamide (EC50 en NOEC >100 mg/L, geteste concentraties: 3.2 – 100 mg/L).

De toxiciteit van cyclofosfamide zou zo laag kunnen zijn omdat dit cytostaticum biologisch ineffectief is totdat het geactiveerd wordt door metabolisering. Activatie vindt plaats in de lever door het cytochrome P450 (CYP) enzym systeem (De Jonge et al. 2005b). Actieve metabolieten van cyclofosfamide kunnen net als cyclofosfamide in het milieu terecht komen. Er is nog geen ecotoxiciteitsonderzoek gedaan naar de metabolieten van cyclofosfamide (Zounková et al. 2007).

Grung et al. (2007) voerden ook een reproductietest uit voor *D. magna* bij blootstelling aan cyclofosfamide (21 dagen). De gemiddelde productie van nakomelingen was lager dan bij de controles voor alle geteste concentraties (10-100 mg/L) maar alleen bij 100 mg/L was het verschil significant (NOEC/EC10 56 mg/L en LOEC 100 mg/L).

Cyclofosfamide veroorzaakte geen groeiremming in *P. subcapitata* maar wel reproductieremming bij *D. Magna*. Dit zou verklaard kunnen worden door een verschil in opname van de stof door de twee testorganismen. Een andere mogelijkheid is dat *P. subcapitata* niet het juiste enzymstelsel heeft voor activatie van cyclofosfamide.

Methotrexaat

Methotrexaat is net als cyclofosfamide niet erg toxisch voor de testorganismen. Uit het onderzoek van Henschel et al. (1997) is op te maken dat methotrexaat geen acute effecten op *D. magna* en *V. fisheri* veroorzaakt (EC50 >1000 mg/L en 1220 mg/L). Het acuut effect bij *B. rerio* ligt ook pas bij een EC50 van 85 mg/L.

Er is wel een sterk effect op de proliferatie van in vitro viscelculturen (EC50 3 mg/L) en een redelijk (chronisch) effect op celgroei bij protozoa (EC50 45 mg/L). Chronische toxiciteit voor de alg ligt echter weer veel lager (EC50 260 mg/L).

4.1.2 Genotoxiciteit

Verschillende genotoxiciteitsdata van cytostatica zijn verzameld uit de literatuur. Zie tabel 7 voor een overzicht. Zounková et al. (2007) hebben wederom uitgebreide testen uitgevoerd voor de vijf cytostatica (cyclofosfamide, cisplatine, 5-fluorouracil, doxorubicine, etoposide). Daarnaast zijn ook de onderzoeken van Quillardet et al. (1985), McCann et al. (1975), Steger-Hartmann et al. (1997), Nakano et al. (2003), Hartmann et al. (1998), DeYoung et al. (1996) en Henschel et al. (1997) meegenomen.

Zounková et al. (2007) hebben twee verschillende genotoxiciteitstesten uitgevoerd; *Escherichia coli* SOS-chromotest (prokaryotisch, bacterie) (Quillardet et al. 1982) en de *Saccharomyces cerevisiae* GreenScreen Assay (eukaryotisch, gist) (Afanassiev et al. 2000). Genotoxiciteit wordt uitgedrukt in MGC (Minimum Genotoxic Concentration).

Bij de SOS-chromotest wordt β -galactosidase activiteit gemeten. In genetisch gemodificeerde *E. coli* stammen wordt dit enzym samen met het DNA-repair systeem geïnduceerd. Het DNA-repair systeem van een cel wordt actief als er DNA-beschadigingen voorkomen (DNA-beschadigingen worden o.a. veroorzaakt door genotoxische stoffen zoals cytostatica). β -galactosidase functioneert daarom als een reporterenzym voor genotoxiciteit. Deze test werd met en zonder metabole activatie door toevoeging van rattenlever-homogenaat uitgevoerd (de lever kan stoffen bevatten die zorgen voor metabolische omzetting van cytostatica).

Met de GreenScreen assay (GSA) kunnen ook genotoxische stoffen die het DNA-repair systeem activeren aangetoond worden. Hiervoor wordt een giststam zo gemodificeerd dat het gen voor GFP (Green Fluorescent Protein; een groen fluorescerend eiwit) tot expressie wordt gebracht bij DNA schade (Afanassiev et al. 2000).

Tabel 7: Genotoxiciteit van de geteste cytostatica in de bacteriële SOS-chromotest, umuC-test, Ames-test, de gist GreenScreen Assay, mollusk dominant lethal test, FETAX en een visembryo-test.

Cytostaticum	Metabole activatie	Test	Testorganisme en soort	n	Laagste/hogste geteste concentraties (aantal er tussenin) mg/L tenzij anders vermeld	MGC (mg/L)	MEC (mg/L)	Referentie
Cyclofosfamide	-	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	10 – 1000 (1)	NS		(Zoukova et al. 2007)
	+	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	10 – 1000 (1)	NS		
	+	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	nb	nb	NS		(Quillardet et al. 1985)
	+	Ames	bacterie, <i>Salmonella typhimurium</i>	nb	100 - 500 (1) μ g/plaat	SG		(McCann et al. 1975)
	+	umuC	bacterie, <i>Salmonella typhimurium</i>		10 μ g/L – 1 g/L (4)	NS		(Steger-Hartmann et al. 1997)
	-	GSA	gist, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	250 – 1000 (1)	470 (270-750)		(Zoukova et al. 2007)
	+ (door organisme)	Dominant lethal test*	weekdier, <i>Biomphalaria glabrata</i>	13	9.8 – 980 (1)		9.8	(Nakano et al. 2003)
5-Fluorouracil	-	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	1 – 10 (1)	1.4 (1.2-29)		(Zoukova et al. 2007)
	+	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	1 – 10 (1)	NS		
	-	GSA	gist, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	0.008 – 0.031	0.02 (0.018-0.021)		
	-	umuC	bacterie, <i>Salmonella typhimurium</i>	nb	nb		>26 (LOEC)	(Hartmann et al. 1998)
	n.v.t.	FETAX	kikker, <i>Xenopus laevis</i>	2	nb		80 (EC ₅₀)	(DeYoung et al. 1996)
	n.v.t.	FETAX	vis, <i>Pimephales promelas</i>	2	nb		400 (EC ₅₀)	
Cisplatine	-	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	0.1 – 10 (1)	0.17 (0.1-0.37)		(Zoukova et al. 2007)
	+	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	0.1 – 10 (1)	0.09 (0.03-0.37)		
	-	GSA	gist, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	0.25 – 1 (1)	0.44 (0.32-1.6)		
	-	umuC	bacterie, <i>Salmonella typhimurium</i>	nb	nb		1.25 (LOEC)	(Hartmann et al. 1998)
Methotrexaat	n.v.t.	Visembryo-test**	vis, <i>Brachydanio rerio</i> (embryo's)	20			≥ 70	(Henschel et al. 1997)
Doxorubicine	-	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	0.03 – 3 (1)	0.074 (0.02-0.12)		(Zoukova et al. 2007)
	+	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	0.03 – 3 (1)	0.098 (0.05-0.5)		
	-	GSA	gist, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	2.5 – 10 (1)	2.8 (2.0-3.6)		(Zoukova et al. 2007)

Cytostaticum	Metabole activatie	Test	Testorganisme en soort	n	Laagste/hogste geteste concentraties	MGC (mg/L)	MEC (mg/L)	Referentie
Etoposide	-	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	0.3 – 30 (1)	2.4 (1.3-7.7)		
	+	SOS	bacterie, <i>Escherichia coli</i>	3	0.3 – 30 (1)	6.4 (4.8-20)		
	-	GSA	gist, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	12 – 500 (1)	150 (140-168)		
	-	umuC	bacterie, <i>Salmonella typhimurium</i>	nb	nb		25 (LOEC)	(Hartmann et al. 1998)

(NS = no significant genotoxicity; MEC = minimum effectieve concentratie; MGC = minimum genotoxische concentratie; SG = significant genotoxisch; nb = niet bekend)

* Frequentie misvormingen nakomelingen na 10 dagen blootstelling ouders.

** Sublethale effecten op ontwikkeling.

5- Fluorouracil

Van alle cytostatica getest door Zounková et al. (2007) was 5-fluorouracil het meest genotoxisch in de gist essay (MGC 0.02 mg/L). Dit cytostaticum was ook relatief genotoxisch in de SOS-test zonder metabole activatie (MGC 1.4 mg/L). Met metabole activatie (toevoeging van rattenleverhomogenaat) is geen significante genotoxiciteit waarneembaar wat verklaard kan worden doordat 5-fluorouracil in de lever juist wordt geïnactiveerd (door het enzym dihydropyrimidine dehydrogenase) (McLeod et al. 1998, Martindale 2006).

Hartmann et al. (1998) voerden een genotoxiciteitsonderzoek uit voor ziekenhuiseffluent en onderzochten daarbij de genotoxiciteit van diverse geneesmiddelen (waaronder fluorouracil) in dit effluent. Voor het aantonen van genotoxiciteit gebruikten zij de umuC-test met de bacterie *Salmonella typhimurium* (zonder metabole activatie). Genotoxiciteit wordt uitgedrukt in MEC (minimum effectieve concentratie). Bij de umuC-test wordt het gen voor β -galactosidase (*lacZ*) onder controle gesteld van het umuC-gen (vergelijkbaar met de SOS-chromotest). Dit gen wordt geïnduceerd bij DNA schade (het gen codeert voor een DNA polymerase welke betrokken is bij DNA reparatie) (Reuven et al. 1999). Hartmann et al. vonden voor fluorouracil een vrij hoge MEC (LOEC >26 mg/L) in vergelijking tot het resultaat van de SOS-test met *E. coli* (MGC 1.4 mg/L).

DeYoung et al. (1996) voerden een embryo genotoxiciteitstest uit (FETAX = Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) voor 5-fluorouracil met kikker- (*Xenopus laevis*) en visembryo's (*Pimephales promelas*) (120 h). Misvormingen (uitgedrukt in EC50) en groeiremming (uitgedrukt in LOEC) werden gebruikt als maat voor teratogenese⁸. 5-Fluorouracil had pas effect bij vrij hoge concentraties; 10 mg/L (lichte tot gemiddelde afwijkingen, *X. laevis*) en 50 mg/L (gemiddelde tot ernstige afwijkingen, *P. promelas*) met EC50 waarden van respectievelijk 80 mg/L en 400 mg/L en een LOEC van 200 mg/L voor beide testorganismen.

Doxorubicine en cisplatine

Van alle cytostatica getest door Zounková et al. (2007) was doxorubicine het meest genotoxisch in de SOS-chromotest (MGC 0.07 mg/L, activatie had geen effect). Cisplatine vertoonde genotoxiciteit in zowel de SOS-chromotest (MGC 0.09 mg/L, activatie had geen effect) als de GSA-test (MGC 0.44 mg/L). In het onderzoek van Hartmann et al. (1998) naar genotoxiciteit van ziekenhuiseffluent (umuC-test) werd een LOEC waarde voor cisplatine gevonden van 1.25 mg/L.

⁸ Abnormale ontwikkeling resulterend in aangeboren misvormingen. Henderson's (2000) Henderson's Dictionary of Biological Terms. In: Lawrence E (ed). Pearson Education Limited, Edinburgh, p 719 .

Cyclofosfamide

Cyclofosfamide vertoonde wel genotoxiciteit in de GSA-test maar werd niet genotoxisch bevonden in de SOS-chromotest met of zonder metabole activatie⁹ (Zounková et al. 2007). Het kan zijn dat de SOS-test minder geschikt is om genotoxiciteit van cyclofosfamide aan te tonen. Quillardet en Hofnung (1993) vergeleken SOS-test responsen met mutageniteitresultaten uit de Ames-test. De Ames-test maakt ook gebruik van bacteriën om mutageniteit van een stof aan te tonen (Mortelmans & Zeiger 2000). Gemodificeerde *S. typhimurium* stammen worden gebruikt welke een mutatie bevatten waardoor ze niet in staat zijn om het aminozuur histidine te maken. Op een medium zonder histidine, maar met een mogelijk mutagene stof kunnen alleen de cellen groeien die opnieuw een mutatie hebben ondergaan (op of in de buurt van de oude mutatie) waardoor de genfunctie hersteld is.

Cyclofosfamide wordt met de Ames-test wel genotoxisch bevonden (McCann et al. 1975) terwijl er geen SOS-respons is (Quillardet et al. 1985).

Steger-Hartmann et al. (1997) toonden cyclofosfamide aan in ziekenhuiseffluenten (zie hoofdstuk 2) maar konden geen genotoxische effecten toeschrijven aan cyclofosfamide in afvalwater. Voor het aantonen van genotoxiciteit gebruikten zij de umuC-test met *S. typhimurium*.

Nakano et al. (2003) toonde aan dat cyclofosfamide mutaties in geslachtscellen van zoetwatermollusken induceert (*Biomphalaria glabrata*) bij drie geteste concentraties: 9,8, 98, 980 mg/L (3.6×10^{-5} , 3.6×10^{-4} , 3.6×10^{-3} M, dominant lethal test, 10 d). In dit onderzoek werden embryonale misvormingen gebruikt als biomarker voor mutageniteit omdat dit één van de effecten is van de inductie van mutaties in geslachtscellen. De positieve respons in deze studie met cyclofosfamide toont aan dat *B. glabrata* in staat is om cyclofosfamide te activeren.

Opvallend is dat cyclofosfamide in de hiervoor genoemde studie een genotoxisch effect heeft bij een veel lagere concentratie dan in de GSA-test van Zounková et al. (2007) (9,8 mg/L versus 470 mg/L). Dit zou verklaard kunnen worden doordat *B. glabrata* cyclofosfamide kan activeren en gist niet. De resultaten van de dominant lethal test en de GSA-test zijn moeilijk te vergelijken met de uitkomst van de Ames-test omdat het cytostaticum bij de laatste test toegevoegd wordt per plaat en niet per volume (Steger-Hartmann et al. 1997).

Methotrexaat

Door Henschel et al. (1997) werd een visembryo-test uitgevoerd (*B. rerio*). Naast acute mortaliteit (zie tabel 6) werden ook sublethale effecten op embryo-ontwikkeling bestudeerd (zie tabel 7) omdat dit een indicatie zou kunnen geven voor eventuele teratogene effecten van methotrexaat. Significante teratogene effecten (remming celdeling, effecten op blastula en gastrula, edema) werden waargenomen bij concentraties ≥ 70 mg/L.

4.2 Werkingsmechanismen, farmacokinetiek en bijwerkingen van cytostatica

Voor stoffen met een hoge biologische activiteit of een specifieke farmacologische werking is het mogelijk dat de gebruikelijke standaard toxiciteitstesten geen goede indicatie geven van de eventuele milieubezwaarlijkheid voor waterorganismen (Derksen et al. 2001).

Omdat geneesmiddelen een specifiek biologisch effect hebben zouden de werkingsmechanismen in overweging moeten worden genomen wanneer naar de mogelijke effecten van geneesmiddelen op organismen wordt gekeken met behulp van standaardtesten (Kümmerer 2001a). Ook bijwerkingen van geneesmiddelen zouden een indicatie kunnen geven voor mogelijke risico's voor het aquatisch milieu.

⁹ Dit cytostaticum is biologisch ineffectief totdat het geactiveerd wordt door metabolisering (zie ook paragraaf 4.2.2).

In de volgende paragrafen wordt ingegaan op de werkingsmechanismen, farmacokinetiek en bijwerkingen van de volgende cytostatica; cisplatine, cyclofosfamide, 5-fluorouracil en methotrexaat. Ifosfamide wordt niet meegenomen omdat er geen chronische toxiciteitsdata zijn gevonden en omdat het in Nederland weinig wordt toegepast (Derksen et al. 2007).

4.2.1 Werkingsmechanismen

Geneesmiddelen zijn biologisch actieve stoffen die ook een uitwerking kunnen hebben op organismen in het milieu. Voor een vergelijkbaar effect als in de mens is het echter noodzakelijk dat de biologische processen of structuren waar de geneesmiddelen hun uitwerking op hebben, vergelijkbaar zijn in de niet-doelorganismen (Seiler 2002). Basale cellulaire functies zoals signaaltransductie en celdeling zijn over het algemeen geconserveerd gebleven in de evolutie en worden teruggevonden bij alle organismen, van eencelligen tot zoogdieren. Cytostatica grijpen in op de celdeling (VIKC 2005, Rang et al. 2007) en het is daarom waarschijnlijk dat ze ook effect hebben in niet-doelorganismen.

De werkingsmechanismen van cytostatica kunnen betrekking hebben op:

- Remming DNA- en RNA-synthese. Voorafgaand aan de celdeling vindt verdubbeling van het erfelijk materiaal (DNA) van de cel plaats. Daarnaast moeten er diverse eiwitten gevormd worden en daar gaat RNA-synthese aan vooraf.
- Beschadiging van mitosespoelfiguur. Als er verdubbeling van het DNA heeft plaatsgevonden wordt in de cel de zogenaamde mitosespoelfiguur gevormd. Met behulp van deze spoelfiguur worden het verdubbelde DNA verdeeld in de cel waarna de cel zich deelt.

Op basis van het werkingsmechanisme kunnen de volgende categorieën cytostatica worden onderscheiden: alkylerende stoffen, antimetaboliëten, anti-mitotische cytostatica, antitumor-antibiotica, topoisomerase remmers (Martindale 2006). Alkylerende cytostatica en antimetaboliëten worden het meest gebruikt (Martindale 2006).

Alkylerende stoffen (VIKC 2005, Rang et al. 2007)

Dit zijn sterk reactieve stoffen die verbindingen aangaan met eiwitten en nucleïnezuren waaruit het DNA is opgebouwd. Alkylerende stoffen vormen dwarsverbindingen tussen de twee DNA-strengen waaruit DNA bestaat. De DNA-strengen kunnen hierdoor niet worden gescheiden wat noodzakelijk is voor het proces van DNA-verdubbeling en daardoor ook voor de celdeling. De schade induceert apoptose (geprogrammeerde celdood) in de cel.

Cyclofosfamide is een alkylarend cytostaticum. Cisplatine is een platinabevattende structuur en werkt na hydrolyse in het lichaam ook als alkylerende stof (Martindale 2006). Dit cytostaticum vormt platinadwarsverbindingen tussen DNA-ketens (FK 2008).

Antimetaboliëten (VIKC 2005, Rang et al. 2007)

Een antimetaboliëet heeft een structuur die vergelijkbaar is met een bepaalde stof (metaboliëet) die betrokken is bij een biochemische reactie in de cel. De antimetaboliëet verschilt echter zodanig van de metaboliëet dat de normale functies in de cel verstoord worden.

In het geval van cytostatica verstoren de antimetaboliëten de biosynthese of de functie van nucleïnezuren. DNA en RNA bestaan uit nucleïnezuurpolymeren (Campbell & Reece 2002) en de vorming van DNA en RNA wordt dus geremd (waardoor de celdeling wordt verstoord).

De antimetaboliëten kunnen worden onderscheiden in (VIKC 2005, Rang et al. 2007):

- Stoffen die interfereren met de opbouw van nucleïne-zuren; de purine- en pyrimidineantagonisten (5-fluorouracil). Pyrimidines en purines (stikstofbasen) worden in de cel ingebouwd in zogenaamde nucleotiden. Nucleotiden zijn de monomeren (bouwstenen) waaruit de polymeer nucleïnezuur wordt gevormd (Campbell & Reece 2002).
- Stoffen die door hun structurele gelijkenis met foliumzuur de synthese van pyrimidine en purine verstoren; de foliumzuurantagonisten (methotrexaat).

De werkingsmechanismen van alkylerende cytostatica zullen waarschijnlijk hetzelfde zijn in aquatische organismen als in de mens omdat ze hun werking hebben op DNA en DNA is geconserveerd gebleven in evolutie.

De werkingsmechanismen van antimetaboliëten zouden in niet-doelorganismen hetzelfde kunnen zijn mits deze organismen vergelijkbare metaboliëten hebben waarmee de antimetaboliëten interfereren. In de volgende paragraaf wordt hier verder op ingegaan.

4.2.2 Farmacokinetiek

Ook al is het werkingsmechanisme van een stof in theorie gelijk in aquatische organismen, de kinetiek van de stof moet ook vergelijkbaar zijn. Farmacokinetiek beschrijft hoe een stof wordt opgenomen (absorptie), verspreid (distributie), gemetaboliseerd en geëxcreteerd (eliminatie) door het lichaam (FK 2008).

In deze paragraaf wordt de metabolisatie van cytostatica bekeken om te analyseren wat de werkelijk actieve, en dus wellicht schadelijke stoffen zijn. In de discussie wordt besproken wat de eventuele gevolgen zijn van de farmacologische eigenschappen van de verschillende cytostatica.

Cisplatine

Cisplatine wordt gebruikt bij de behandeling van o.a. testistumoren, longkanker, metastaserende ovariatumoren, blaaskanker, baarmoederhalstumoren en plaveiselcel-carcinomen van hoofd en hals (Martindale 2006).

In het lichaam is binnen 2-4 uur 90% van het platina van een dosis gebonden aan eiwit; alleen ongebonden heeft het significante cytostatische effecten (Martindale 2006). Excretie vindt voornamelijk plaats via de urine maar het is incompleet en verlengd; tot 50% van een dosis wordt in 5 dagen via de urine uitgescheiden en platina kan nog maanden na toediening worden getraceerd in weefsel. De ongebonden fractie wordt sneller uitgescheiden. De metabolisatie is niet opgehelderd (FK 2008).

Cyclofosfamide

Cyclofosfamide wordt gebruikt bij de behandeling van allerlei soorten kanker (FK 2008). Naast de alkylerende cytostatische werking heeft dit middel ook een immunosuppressieve werking¹⁰ welke berust op het remmende effect op B-cellen, CD4+T-cellen en CD8+T-cellen¹¹. Cyclofosfamide wordt daarom ook gebruikt als voorbereiding op beenmergtransplantatie en bij auto-immuunziekten. Het is oplosbaar in water (Martindale 2006).

Na orale toediening wordt 75% opgenomen door het maag-darmstelsel. Activatie vindt plaats in de lever door het cytochrome P450 (CYP) enzym systeem (verschillende CYP isoenzymen zijn betrokken waarvan CYP2B6 de hoogste activiteit heeft) (De Jonge et al. 2005b).

¹⁰ Remming van het immuunsysteem.

¹¹ Deze cellen zijn betrokken bij de immuunrespons. Campbell NA, Reece JB (2002) *Biology*, Vol. Pearson Education, San Francisco.

De initiële metabolieten die worden gevormd zijn 4-hydroxycyclofosfamide en zijn tautomeer aldofosfamide (De Jonge et al. 2005b, Rang et al. 2007). 4-Hydroxycyclofosfamide gaat vanuit de lever naar andere weefsels en is erg onstabiel (De Jonge et al. 2005a). Het wordt omgezet in actieve fosforamide mosterd en acrolein. Fosforamide mosterd wordt beschouwd als de voornaamste alkylerende metaboliet. Fosforamide mosterd kan in tegenstelling tot 4-hydroxycyclofosfamide niet de cel binnengaan dus alleen het intracellulair gevormde fosforamide mosterd is cytotoxisch (De Jonge et al. 2005b). Cyclofosfamide, 4-hydroxycyclofosfamide en aldofosfamide kunnen vervolgens via verschillende routes omgezet worden in inactieve metabolieten (bijna geheel irreversibel) (De Jonge et al. 2005a).

Actieve metabolieten van cyclofosfamide kunnen net als cyclofosfamide in het milieu terecht komen. Cyclofosfamide wordt voornamelijk via de urine uitgescheiden (metabolieten en een klein deel onveranderde stof) (Martindale 2006). $T_{1/2}$ = 4-8 uur (cyclofosfamide), onbekend (actieve metabolieten) (FK 2008). In patiënten die radioactief gelabeld cyclofosfamide toegediend hadden gekregen werd 70% teruggevonden in de urine (Anderson et al. 1995). Daarvan bestond 10% uit onveranderde stof. Het merendeel werd uitgescheiden als inactieve metabolieten. De Jonge et al. (2005a) rapporteren tot 20% onveranderde stof in urine. In het artikel van De Jonge et al. wordt aan meerdere onderzoeken gerefereerd die aantonen dat cyclofosfamide voornamelijk werd geëxcreteerd als één bepaalde inactieve metaboliet. Er werd echter ook een onderzoek aangehaald waarin fosforamide mosterd als belangrijkste metaboliet in urine werd gerapporteerd. Een mogelijke verklaring hiervoor is volgens De Jonge et al. dat de inactieve metaboliet en fosforamide mosterd onstabiel zijn in urine bij lage pH.

5-Fluorouracil

Dit cytostaticum wordt toegepast bij maagdarmkanker, borstkanker en tumoren in hoofd, nek, lever en pancreas (Martindale 2006). Het is beperkt oplosbaar in water. Bij de mens is opname via maag-darmstelsel onvoorspelbaar en toediening is daarom intraveneus.

5-Fluorouracil is een pyrimidine-antagonist en werkt dus als antimetaboliet door in te grijpen in de DNA-synthese (FK 2008). In de cel wordt 5-fluorouracil omgezet in 5-fluorouridine monofosfaat en floxuridine monofosfaat (5-fluorodeoxyuridine monofosfaat) (Martindale 2006). De eerste metaboliet wordt omgezet naar trifosfaat welke in het RNA kan worden geïncorporeerd. De tweede metaboliet remt thymidylaat synthetase welke een functie heeft bij de DNA synthese. In de lever vindt inactivatie plaats (inactieve metabolieten zijn o.a. CO₂ en ureum) (FK 2008). Minder dan 10% van de toegediende stof wordt onveranderd uitgescheiden met de urine; 60-90% via de longen als CO₂ ($T_{1/2}$ = 5-20 min).

Methotrexaat

Dit cytostaticum wordt gebruikt bij de behandeling van leukemie, borstkanker, longkanker en tumoren van hoofd, nek en blaas (Martindale 2006). Het is praktisch onoplosbaar in water.

Methotrexaat is een foliumzuurantagonist (Martindale 2006). Mensen nemen foliumzuur op via voedsel en speciale transportmechanismen zijn geëvolueerd voor opname in de cel (Rang et al. 2007). Methotrexaat wordt via dit transportsysteem opgenomen in de cel. In de cel wordt foliumzuur omgezet naar dihydrofoliumzuur en vervolgens naar tetrahydrofoliumzuur. Methotrexaat remt competitief het enzym dihydrofolate reductase en voorkomt daarmee vorming van tetrahydrofoliumzuur wat nodig is voor purine en pyrimidine synthese (Rang et al. 2007, FK 2008).

Lage dosissen worden snel geabsorbeerd door het maag-darmstelsel, hoge dosissen worden minder goed opgenomen. Intramusculaire dosissen worden snel en volledig geabsorbeerd (Martindale 2006). Ongeveer 50% wordt gebonden aan plasma-eiwit.

Metabolisering vindt plaats in de lever en intracellulair tot actieve gepolyglutamineerde vormen en 7-hydroxymethotrexaat (Rang et al. 2007, FK 2008). Eliminatie gaat voornamelijk (onveranderd) via de urine en een

klein deel via faeces ($T_{1/2}$ = 3–10 uur bij lage doseringen, 8–15 uur bij hoge doseringen) (Martindale 2006, FK 2008). Bij een hoge toedieningsconcentratie (> 50 mg/kg) wordt tot 30% van de toegediende concentratie methotrexaat uitgescheiden als 7-hydroxymethotrexaat binnen 24 uur (Jacobs et al. 1976). Deze metaboliet is nog slechter oplosbaar in water dan methotrexaat zelf. Hydroxy-methotrexaat heeft dezelfde werking als methotrexaat maar een lagere toxiciteit (Jacobs et al. 1976, Kiffmeyer et al. 1998).

4.2.3 Bijwerkingen

Cytostatica grijpen ook aan op normale (gezonde) cellen en dan met name op snel delende cellen zoals die van het maagdarmkanaal, het beenmerg, de huid, de haren en de geslachtsorganen. Dit verklaart de belangrijkste bijwerkingen op deze organen (VIKC 2005). Ook al worden deze effecten van cytostatica bij de mens opgevat als bijwerkingen, in feite behoren deze effecten tot de gewone farmacologische werking van cytostatica (effect op celdeling).

De bijwerkingen die mogelijk schadelijke effecten kunnen voorspellen in aquatische organismen worden hieronder opgesomd per cytostaticum (Martindale 2006, FK 2008). De onderstaande cytostatica hebben nog meer bijwerkingen maar die zijn waarschijnlijk niet van belang voor het functioneren van een (aquatisch) organisme (bijvoorbeeld Alopecia: haarverlies).

Cisplatine

- Beenmergdepressie¹²
- Nierfunctiestoornissen (nefrotoxiciteit)
- Invloed op maag-darmstelsel (misselijkheid, braken, diarree)

Cyclofosfamide

- Beenmergdepressie
- Invloed op maag-darmstelsel (misselijkheid, braken)
- Blaasaandoeningen

5-Fluorouracil

- Beenmergdepressie
- Invloed op maag-darmstelsel (misselijkheid, braken, bloedingen, diarree)

Methotrexaat

- Beenmergdepressie
- Invloed op maag-darmstelsel (ontsteking, bloedingen, diarree)
- Lever schade (zowel acuut als chronisch)

Bijwerkingen met effecten op celdeling zijn uiteraard ecotoxicologisch van belang omdat celdeling een fundamenteel proces is. Bacteriën, protozoa en algen zullen waarschijnlijk direct beïnvloed worden in hun groei en reproductie. In niet-doelorganismen zoals vissen is bijvoorbeeld te verwachten dat de bloedcelproductie wordt

¹² *Beenmergdepressie: de productie van bloedcellen in het beenmerg wordt verstoord. Dit kan met name leiden tot leukopenie (verminderd aantal witte bloedcellen; verhoogd risico op infectie) en thrombocytopenie (verminderd aantal bloedplaatjes). Martindale (2006) Martindale - The complete drugs reference Vol 1. Pharmaceutical Press.*

geremd. Dit zijn te verwachten effecten van alle vier genoemde cytostatica. Wanneer het maag-darmstelsel van vissen vergelijkbaar is met dat van zoogdieren (gekenmerkt door snelle celdeling) is ook hier een effect te verwacht.

4.3 Discussie

Ecotoxiciteit

Uit het onderzoek van Zounková et al. (2007) lijkt 5-fluorouracil het meest van belang wat betreft chronische toxiciteit (*P. putida*: EC50 0.027 mg/L, LOEC 0.01 mg/L en *P. subcapitata*: EC50 0.11 mg/L, LOEC 0.01 mg/L). Dit is echter in strijd met het resultaat van Kümmerer en Al-Ahmad (1997) (*P. putida* groeiremmingstest, 16 h: IC₀ >128 mg/L).

Cisplatine heeft na fluorouracil de laagste waarden wat betreft chronische toxiciteit (*P. putida*: EC50 1.2 mg/L, LOEC 0.1 mg/L en *P. subcapitata*: EC50 2.3 mg/L, LOEC 1 mg/L) al liggen deze waarden wel een factor 10-100 hoger. Uit de groeiremmingstest van Bonnet et al. (2003) *T. pyriformis* kwam een IC50 waarde voor cisplatine van 37.31 mg/L.

Cisplatine en doxorubicine zijn het meest acuut toxisch (*D. magna*: EC50 0.64 mg/L en 2.0 mg/L respectievelijk) (Zounková et al. 2007).

Methotrexaat heeft alleen op de proliferatie van in vitro viscelculturen een redelijk effect (EC50 3 mg/L, Henschel et al. 1997). Aan de resultaten van testen met celculturen kunnen echter maar beperkte conclusies verbonden worden omdat met dergelijke testen voorbijgegaan wordt aan hoe de geteste stoffen zich zullen gedragen in het organisme (opname, metabolisatie, uitscheiding).

Cyclofosfamide vertoonde nauwelijks of geen toxiciteit in de verschillende testen.

Concentraties die chronische effecten veroorzaken liggen doorgaans lager dan concentraties die acute effecten veroorzaken (Rand & Petrocelli 1985). Dit komt echter in de resultaten in tabel 6 niet duidelijk naar voren. Opgemerkt moet worden dat deze vergelijking ook moeilijk te maken is omdat veel verschillende test(organism)en zijn gebruikt.

Voor cyclofosfamide gaat het wel op voor de *D. magna*-testen. De concentratie van de stof die immobilisatie zou kunnen veroorzaken ligt boven de 1000 mg/L (Zounková et al. 2007) terwijl er een effect op de reproductie is vanaf 100 mg/L (Henschel et al. 1997) (minstens een factor 10 verschil). Voor 5-fluorouracil liggen de concentraties bij de acute testen (DeYoung et al. 1996, Zounková et al. 2007) hoger dan bij de *P. putida* en *P. subcapitata* groeiremming van Zounkova et al. (2007) (vanaf een factor 1000) maar niet hoger dan de NOEC van *P. putida* groeiremming van Kümmerer en Al-Ahmad (1997). Cisplatine heeft een lagere EC50 concentratie voor de immobilisatie van *D. magna* dan voor de groeiremmingstesten met *P. putida*, *T. pyriformis* en *P. subcapitata*. De behorende NOEC en LOEC waarden zijn vergelijkbaar. Voor methotrexaat liggen de effecten op luminescence, immobilisatie en mortaliteit bij hogere concentraties dan de proliferatie en groeiremming-testen. Deze waarden zijn echter moeilijk te vergelijken omdat alle testen verschillend zijn.

Combinatietoxiciteit van geneesmiddelen is naast de chronische toxiciteit van de afzonderlijke middelen een belangrijk punt van aandacht aangezien aquatische organismen in het milieu blootgesteld worden aan meerdere geneesmiddelen tegelijkertijd. Combinatietoxiciteit van stoffen is echter nog nauwelijks onderzocht (Schrap et al. 2003). Er zijn wel enkele onderzoeken bekend waaruit blijkt dat stoffen elkaar kunnen versterken zoals 5-fluorouracil (zie ook hoofdstuk 2) (Kümmerer & Al-Ahmad 1997, Kümmerer 2004).

Combinatietoxiciteit kan een belangrijk aspect zijn omdat veel geneesmiddelen aangetoond worden in lage concentraties. Individueel zullen deze wellicht weinig risico's veroorzaken maar het zou kunnen zijn dat de combinatie van de stoffen wel voor een effect zorgt (Schrap et al. 2003).

Genotoxiciteit

De genotoxiciteitsdata lopen sterk uiteen voor 5-fluorouracil. Fluorouracil was het meest genotoxisch in de gist essay (MGC 0.02 mg/L) en ook relatief genotoxisch in de bacteriële SOS-test zonder metabole activatie (MGC 1.4 mg/L) (Zounková et al. 2007). In de bacteriële umuC-test uitgevoerd door Hartmann et al. (1998) werd echter een LOEC gemeten van >26 mg/L. 5-Fluorouracil had ook pas effect bij vrij hoge concentraties in de kikker- en visembryo genotoxiciteitstesten; met EC50 waarden van respectievelijk 80 mg/L en 400 mg/L en een LOEC van 200 mg/L voor beide testorganismen (DeYoung et al. 1996). Dit zou wellicht verklaard kunnen worden doordat de embryo's het cytostaticum minder goed op kunnen nemen uit het milieu of doordat ze in staat zijn om het te inactiveren in de lever.

Doxorubicine en cisplatine vertoonden genotoxiciteit bij vrij lage concentraties in de SOS-chromotest (respectievelijk MGC 0.07 mg/L en 0.09 mg/L) en cisplatine vertoonde ook genotoxiciteit in de GSA-test bij een lage concentratie (MGC 0.44 mg/L) (Zounková et al. 2007). In de umuC-test uitgevoerd door Hartmann et al. (1998) lag de concentratie waarbij genotoxiciteit gemeten werd voor cisplatine echter hoger (LOEC 1.25 mg/L).

De genotoxiciteitsdata van cyclofosfamide zijn niet eenduidig. Cyclofosfamide vertoonde wel genotoxiciteit in de GSA-test (470 mg/L) maar werd niet genotoxisch bevonden in de SOS-chromotest met of zonder metabole activatie¹³ (Zounková et al. 2007). Cyclofosfamide wordt met de (bacteriële) Ames-test echter wel genotoxisch bevonden (McCann et al. 1975) en dit kan een aanwijzing zijn dat de SOS-test minder geschikt is om genotoxiciteit van cyclofosfamide aan te tonen. Quillardet en Hofnung (1993) geven aan dat dit aan verschillend gedrag van de gebruikte activatiemengsels in de testen zou kunnen liggen.

Steger-Hartmann et al. (1997) konden echter ook geen genotoxische effecten toeschrijven aan cyclofosfamide in afvalwater met behulp van de umuC-test (cyclofosfamide was wel aangetoond in het afvalwater). Het zou kunnen dat de umuC-test minder gevoelig is aangezien het onderzoek met deze test veel hogere LOEC-waarden oplevert voor fluorouracil en etoposide (Hartmann et al. 1998) in vergelijking tot de MGC-waarden voor deze cytostatica met de SOS-test (Zounková et al. 2007). Door Steger-Hartmann zijn wellicht te lage concentraties getest (10 µg/L tot 1 g/L). Concentraties bij de Ames-test lagen binnen deze range (100-500 µg/L) (McCann et al. 1975) maar de umuC-test en de Ames-test zijn moeilijk te vergelijken omdat het cytostaticum bij de Ames-test toegevoegd wordt per plaat en niet per volume (Steger-Hartmann et al. 1997).

Nakano et al. (2003) toonden een genotoxisch effect (mutaties in geslachtscellen bij weekdieren) van cyclofosfamide aan bij een opvallend lage concentratie in vergelijking met de GSA-test van Zounková et al. (2007) (respectievelijk 9.8 mg/L en 470 mg/L).

Genotoxiciteitsdata zijn in dit hoofdstuk ook meegenomen omdat bekend is dat een deel van de cytostatica het genetisch materiaal kunnen beschadigen. Cyclofosfamide en cisplatine bijvoorbeeld zijn potentieel mutageen, teratogeen en cyclofosfamide is tevens carcinogeen (Martindale 2006).

¹³ Dit cytostaticum is biologisch ineffectief totdat het geactiveerd wordt door metabolisering (zie ook paragraaf 4.2.2).

Genotoxische en carcinogene effecten hebben beiden te maken met beschadiging van erfelijk materiaal en moeten daarom als ernstig worden beschouwd (Derksen & Lahr 2003). De vraag is hoe bezwaarlijk het is dat aquatische organismen blootgesteld worden aan genotoxische stoffen. Blootstelling aan carcinogene stoffen vergroot de kans op een tumor. Mochten aquatische organismen tumoren ontwikkelen dan heeft dit echter waarschijnlijk geen grote gevolgen voor de populatie. De inductie van mutaties in geslachtscellen daarentegen is wel ernstig omdat dit direct effect kan hebben op de reproductiepotentieel van een populatie (Nakano et al. 2003). Mutagenen in het milieu kunnen op de lange termijn een risico betekenen voor ecosystemen om hiervoorgenoemde reden.

Werkingsmechanismen, farmacokinetiek en bijwerkingen

Aan de hand van de werking van cytostatica kunnen de verschillende soorten toxiciteitstesten op waarde geschat worden. Aangezien de werkingsmechanismen van cytostatica de celdeling beïnvloeden zijn toxiciteitstesten waarbij gekeken wordt naar groei van groot belang. Ook bij reproductie is celdeling uiteraard belangrijk en deze testen zijn daarom ook nuttig. Acute immobilisatietesten (*D. magna*) geven in dit licht waarschijnlijk minder bruikbare resultaten voor de mogelijke toxiciteit van cytostatica. In chronische testen wordt minstens een volledige levenscyclus doorlopen en wordt dus zowel groei als reproductie meegenomen.

Aan de hand van de belangrijkste bijwerkingen van cisplatine, cyclofosfamide, fluorouracil en methotrexaat zou in specifiekere testen wellicht gelet kunnen worden op de invloed van de cytostatica op bloedcelproductie en eventueel op het maag-darmstelsel. Verder zouden onderzoeken naar effecten van cisplatine en methotrexaat op aquatische organismen gespecificeerd kunnen worden op respectievelijk nefrotoxiciteit en leverschade. Specificering van ecotoxiciteitsonderzoeken is alleen noodzakelijk als blijkt uit de huidige groei- en reproductietesten dat de gemeten (en/of geschatte) concentraties in het milieu nadelige effecten kunnen hebben op aquatische organismen (zie ook hoofdstuk 5).

Alkylerende cytostatica

Alkylerende cytostatica zullen waarschijnlijk hetzelfde effect hebben in aquatische organismen als in de mens omdat ze hun werking hebben op DNA en DNA is geconserveerd gebleven in evolutie. Om nadelige effecten te ondervinden van deze cytostatica is het voor niet-doelorganismen noodzakelijk dat ze blootgesteld worden aan de stof in het milieu en dat ze deze stof op kunnen nemen en eventueel om kunnen zetten naar de actieve vorm.

Ondanks dat **cisplatine** in het lichaam gebonden wordt aan eiwit (waardoor het geen cytostatisch effect meer heeft) komt platina in het milieu waarschijnlijk voornamelijk ongebonden voor aangezien het overgrote deel platina in het milieu komt door vervuiling van auto's met katalysator. De ziekenhuisbijdrage is in Nederland geschat op respectievelijk 6% in verhouding tot het totale emissievolume van auto's (Kümmerer et al. 1999). Hierbij moet opgemerkt worden dat platina afkomstig van platinahoudende cytostatica andere eigenschappen (gedrag en toxiciteit in het aquatisch milieu) heeft dan platina afkomstig van andere bronnen zoals auto's.

Verwacht wordt dat aquatische organismen in het milieu dus voornamelijk blootgesteld worden aan de niet eiwit-gebonden alkylerende stof. Het is echter mogelijk dat cisplatine in het milieu ook snel bindt aan stoffen zoals in het lichaam en dus niet opgelost is in het water, wat een beperkte blootstelling zou betekenen van cisplatine voor organismen in het aquatisch milieu.

Geen literatuur is gezocht betreffende de opname van cisplatine door niet-doelorganismen maar waarschijnlijk nemen organismen dit cytostaticum wel op aangezien het toxische effecten heeft op de blootgestelde testorganismen (zie tabel 6 en 7). Het blijft echter wel de vraag of organismen cisplatine op kunnen nemen als eiwit-cisplatinecomplex. Wanneer opname wel mogelijk is zou het kunnen zijn dat de gebonden fractie van cisplatine, net

als in de mens, geen effect heeft in het organisme. Deze opname-route is zoals gezegd waarschijnlijk van ondergeschikt belang omdat het merendeel van het platina in het milieu van auto's met katalysatoren komt.

Een groot deel van het toegediende **cyclofosfamide** wordt uitgescheiden door de patiënt. Cyclofosfamide ondergaat metabolisatie in het lichaam en organismen kunnen in het aquatisch milieu blootgesteld worden aan cyclofosfamide of (in)actieve metabolieten van cyclofosfamide.

Cyclofosfamide is goed oplosbaar in water en zal daarom waarschijnlijk niet hechten aan sediment of zwevende stof in het milieu maar beschikbaar zijn voor opname in niet-doelorganismen. De uitgangsstof wordt zeer goed opgenomen in de mens (75%) en dit zou kunnen betekenen dat de stof ook gemakkelijk door aquatische organismen wordt opgenomen. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat de toediening bij patiënten vaak oraal plaatsvindt. Aquatische organismen nemen de stof wellicht eerder op via de huid of kieuwen.

In alle ecotoxiciteitstesten was cyclofosfamide het minst toxisch (LOEC vanaf 100 mg/L, Grung et al. 2007, Zounková et al. 2007) en dit zou verklaard kunnen worden doordat dit cytostaticum biologisch ineffectief is totdat het geactiveerd wordt door metabolisme (Rang et al. 2007). Uit de resultaten zou opgemaakt kunnen worden dat de testorganismen (*D. magna*, *P. putida*, *P. subcapitata*) zelf niet in staat zijn om cyclofosfamide te activeren. *B. glabrata* kan cyclofosfamide wel activeren (MEC 9,8 mg/L, Nakano et al. 2003). Uitgezocht zou moeten worden of niet-doelorganismen het CYP enzymstelsel bevatten wat nodig is voor de activatie. De resultaten van Grung et al. en Zounková et al. zouden echter ook een indicatie kunnen zijn dat de organismen niet in staat zijn dit cytostaticum op te nemen uit het milieu.

Actieve metabolieten van cyclofosfamide komen ook in het milieu terecht (De Jonge et al. 2005b) en kunnen wellicht worden opgenomen door aquatische organismen. Het effect van deze metabolieten op niet-doelorganismen is onbekend aangezien er nog geen ecotoxiciteitsonderzoek gedaan is naar de metabolieten van cyclofosfamide (Zounková et al. 2007). Fosforamide mosterd heeft wellicht geen invloed op de organismen omdat het zelf niet de cel binnen kan gaan. De actieve metaboliet acroleïne zorgt in de mens voor ernstige neveneffecten (Rang et al. 2007) en is daarom wellicht ook toxisch voor aquatische organismen. Het effect van de actieve metabolieten zou afgeleid kunnen worden uit testen waarbij leversubstraat is toegevoegd. Het is dan echter niet duidelijk welke metabolieten de effecten veroorzaken en leversubstraat is alleen toegevoegd bij de genotoxiciteitstesten. Daarbij zijn tegenstrijdige resultaten gevonden (zie paragraaf: discussie genotoxiciteit) en hier kunnen daarom geen conclusies aan verbonden worden.

Belangrijk is om te weten in welke verhoudingen cyclofosfamide en actieve metabolieten in het milieu voorkomen.

Antimetabolieten

Voor niet-doelorganismen om nadelige effecten te ondervinden van antimetabolieten is het noodzakelijk dat deze organismen blootgesteld worden aan de stof in het milieu, ze vergelijkbare metabolieten hebben waarmee de antimetabolieten interfereren en dat ze deze stof op kunnen nemen en eventueel om kunnen zetten naar de actieve vorm.

Slechts een klein deel van het toegediende **5-fluorouracil** komt via de patiënt in het milieu terecht. Fluorouracil is slecht oplosbaar in water maar het is echter niet waarschijnlijk dat het in het milieu aan andere stoffen bindt waardoor er slechts beperkte blootstelling zou zijn voor aquatische organismen. Mahnik et al. (2004) stellen namelijk dat fluorouracil niet adsorbeert aan zwevende stof in water en in de Zahn-Wellens degradatie-test werd voor fluorouracil geen significante adsorptie aan slib gemeten (Kümmerer & Al-Ahmad 1997) (zie hoofdstuk 2).

Er is geen literatuur gezocht over of en hoe niet-doelorganismen fluorouracil opnemen uit het milieu. Bij de mens is opname via maag-darmstelsel onvoorspelbaar en toediening is daarom intraveneus. Bij vissen is niet te verwachten dat opname oraal is maar via de huid en kieuwen en de opname en verspreiding in het lichaam zou daarom vergelijkbaar kunnen zijn.

Fluorouracil kan pas schadelijk zijn in niet-doelorganismen wanneer het in het organisme omgezet wordt naar de actieve metabolieten en wanneer organismen het enzym bevatten waar dit cytostaticum zijn uitwerking op heeft (thymidylaat synthetase). Omdat fluorouracil een groeiremmend effect heeft op *P. putida* en *P. subcapitata* (Zounková et al. 2007) is het waarschijnlijk dat bacteriën en algen in staat zijn de stof op te nemen en te activeren en dat ze thymidylaat synthetase bevatten. Wanneer bekend is van organismen dat ze geen thymidylaat synthetase hebben is ook geen toxisch effect te verwachten van fluorouracil.

Inactivatie vindt plaats in de lever en het is de vraag of aquatische organismen over dezelfde enzymen beschikken die deze inactivatie tot stand brengen. Aangezien fluorouracil een groeiremmend effect heeft op *P. putida* en *P. subcapitata* beschikken alg en bacterie waarschijnlijk niet over deze inactiverende enzymen. DeYoung et al. (1996) vonden pas groeiremming van fluorouracil bij kikker- en visembryo's bij 200 mg/L. Wellicht is dit te verklaren doordat deze organismen wel over de goede leverenzymen beschikken.

De manier van opname kan invloed hebben op snelle of langzame inactivatie in een organisme. In de mens vindt bij orale toediening van een stof, opname van de stof in de darm plaats. De stof gaat van hieruit met het bloed eerst door de lever en dan pas naar de rest van het lichaam (Campbell & Reece 2002). Wanneer inactivatie in de lever plaats vindt wordt eventuele schade alleen aangericht in de maag en een deel van de darm, maar niet de rest van het lichaam.

Geen gegevens zijn gevonden over de eventuele uitscheiding van actieve metabolieten in het milieu. Onderzocht zou moeten worden of deze metabolieten een gevaar vormen voor aquatische organismen.

Doordat de helft van het toegediende **methotrexaat** in het lichaam gebonden wordt aan eiwit, wordt deze stof wellicht ook in het milieu gebonden (daarbij komt dat methotrexaat slecht oplosbaar is). Daardoor zou dit cytostaticum slechts beperkt beschikbaar zijn voor opname door aquatische organismen.

Methotrexaat was nauwelijks toxisch voor *D. Magna*, *B. rerio*, *S. subspicatus* en *T. pyriformis* (EC50 respectievelijk >1000 mg/L, 85, 260 en 45 mg/L) (Henschel et al. 1997). Dit zou verklaard kunnen worden door het ontbreken van een transportmechanisme in de cel voor foliumzuur(antagonisten) zoals bij de meeste bacteriën het geval is (Rang et al. 2007). De meeste bacteriën synthetiseren zelf foliumzuur en hebben daarom geen transportmechanisme om foliumzuur of foliumzuurantagonisten zoals methotrexaat in hun cel op te nemen. Het ontbreken van een transportmechanisme is een verklaring voor de lage toxiciteit van dit cytostaticum voor de bacterie *V. fischeri* (EC50 1220 mg/L, Henschel et al. 1997). Het is de vraag of andere niet-doelorganismen zelf foliumzuur synthetiseren of het ook opnemen via voeding, en dus of er transportmechanismen aanwezig zijn die beïnvloed kunnen worden door methotrexaat.

Wanneer methotrexaat wel in de cel terecht komt zou het nog kunnen dat de organismen niet in staat zijn het cytostaticum in de cel te activeren (tot gepolyglutamineerde vormen).

De metaboliet 7-hydroxymethotrexaat heeft dezelfde werking als methotrexaat maar een lagere toxiciteit (Jacobs et al. 1976, Kiffmeyer et al. 1998) en zal dus minder schadelijk zijn voor niet-doelorganismen. Hier zijn geen ecotoxiciteitsdata voor gevonden.

4.4 Conclusie

Er zijn weinig chronische ecotoxiciteitsdata beschikbaar en de meeste gegevens hebben betrekking op bacteriën, algen of kreeftachtigen. Met name data over invloed van cytostatica op hogere taxa missen (vissen). Alleen kikker en visembryo's zijn getest voor fluorouracil en methotrexaat. Deze testen moeten echter opgevat worden als acute testen omdat niet een volledige levenscyclus wordt getest (Rand & Petrocelli 1985). Rand en Petrocelli geven aan dat de duur van een chronische test voor de fathead minnow (vis, *P. promelas*) ongeveer 300 dagen duurt. Dit stelt uiteraard beperkingen aan de mogelijkheid tot onderzoek met vissen. De beperkte chronische data die er zijn, zijn moeilijk te vergelijken aangezien verschillende testen en verschillende testorganismen worden gebruikt.

In het onderzoek van Zounková et al. (2007) vertoonden 5-fluorouracil en cisplatine chronische toxiciteit bij vrij lage concentraties (LOEC 5-fluorouracil 0.01 mg/L; cisplatine 0.1 en 1 mg/L). Methotrexaat was weinig toxisch met een laagste EC50-waarde van 45 mg/L (groeiremming protozoa) (Henschel et al. 1997). Cyclofosfamide werd niet of nauwelijks toxisch bevonden in de verschillende toxiciteitstesten (Grung et al. 2007, Zounková et al. 2007). De resultaten voor cyclofosfamide geven echter waarschijnlijk een vertekend beeld omdat cyclofosfamide eerst geactiveerd moet worden voor het schadelijk is. De testen zouden ook met de actieve metabolieten moeten worden gedaan omdat deze ook uitgescheiden worden door patiënten.

Cisplatine en fluorouracil vertoonden genotoxiciteit bij concentraties vanaf de orde van grootte van tientallen µg/L en cyclofosfamide bij 9.8 mg/L (zie tabel 7). De verschillende genotoxiciteitsdata waren echter niet congruent. Voor cyclofosfamide kon vaak geen genotoxiciteit aangetoond worden en genotoxiciteit van fluorouracil werd ook waargenomen bij veel hogere concentraties (EC50 tot 400 mg/L). Concentraties waarbij genotoxiciteit werd gevonden voor cisplatine liepen van 0.03 mg/L tot 1.25 mg/L.

Het is mogelijk dat geneesmiddelen hetzelfde farmacologisch effect veroorzaken in niet-doelorganismen als in de mens en aan de hand van de werking van cytostatica kunnen toxiciteitstesten gekozen en aangepast worden. Maar er moet ook rekening gehouden worden met de mogelijkheid dat andere, niet bedoelde, neveneffecten veroorzaakt worden. Hier wordt met de huidige testen die voornamelijk gebaseerd zijn op invloed van cytostatica op celtgroei waarschijnlijk aan voorbij gegaan.

Hoofdstuk 5

Risicobeoordeling

In hoofdstuk 2 en 3 zijn de gemeten en geschatte milieuconcentraties van cytostatica behandeld. In hoofdstuk 4 is vervolgens gekeken naar de effecten van cytostatica in het milieu op blootgestelde organismen. In dit hoofdstuk worden de ecotoxicologische gegevens vergeleken met de schattingen en metingen en dit geeft een indicatie voor het milieurisico van cytostatica.

5.1 Vergelijking van effect- en milieu-concentraties

In onderstaande tabellen (tabel 8 en 9) zijn de laagste effectconcentraties samengevat voor de verschillende cytostatica uit tabel 6. Hierbij moet opgemerkt worden dat de resultaten niet altijd eenduidig waren en dat er dus ook hogere effectconcentraties zijn aangetroffen (zie hoofdstuk 4).

Binnen de toxicologie wordt een ratio gebruikt tussen de acute toxiciteit en de chronische toxiciteit (A/C-ratio) (Schrapp et al. 2003). Deze ratio is meestal 10 en deze aanpassing wordt weergegeven in tabel 9.

Effectconcentraties boven de 100 mg/L zijn niet meegenomen omdat niet te verwachten is dat cytostatica in dergelijke concentraties in het milieu voorkomen.

In tabel 10 zijn de maximaal gemeten en de geschatte concentraties van hoofdstuk 2 en 3 samengevat.

Tabel 8: Laagste chronische effectconcentraties van de vier geselecteerde cytostatica.

Cytostaticum	Testorganisme en soort	EC50 (mg/L)	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)	Referentie
Cyclofosfamide	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i>	-	56	100	(Grung et al. 2007)
5-Fluorouracil	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i>	0.027 (0.015-0.045)	0.003	0.01	(Zouneková et al. 2007)
	alg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0.11 (0.03-0.3)	0.001	0.01	(Zouneková et al. 2007)
Cisplatine	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i>	1.2 (1.0-1.40)	0.03	0.1	(Zouneková et al. 2007)
	alg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	2.3 (1.7-2.9)	0.1	1	(Zouneková et al. 2007)
Methotrexaat	protozoa, <i>Tetrahymena pyriformis</i>	45	-	-	(Henschel et al. 1997)

Tabel 9: Laagste acute effectconcentraties van drie cytostatica en correctie voor A/C-ratio.

Cytostaticum	Testorganisme en soort	EC50 (mg/L)	LOEC (mg/L)	:10 (A/C-ratio)	Referentie
5-Fluorouracil	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i>	36 (12-70)	10	1 (LOEC, mg/L)	(Zouneková et al. 2007)
Cisplatine	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i>	0.64 (0.4-0.85)	0.5	0.05 (LOEC, mg/L)	(Zouneková et al. 2007)
Methotrexaat	vis, <i>Brachydanio rerio</i> (embryo's)	85	-	8.5 (EC50, mg/L)	(Henschel et al. 1997)

Tabel 10: De maximaal gemeten concentraties en geschatte concentraties van de vier geselecteerde cytostatica in het milieu.

Cytostaticum	Nederland		Buitenland			
	Ziekenhuiseffluent (µg/L)	Oppervlaktewater (µg/L)	Ziekenhuiseffluent (µg/L)	Influent rwzi (µg/L)	Effluent rwzi (µg/L)	Oppervlaktewater (µg/L)
Cyclofosfamide	9.9	3.5 PEC _{EMEA} 0.005 PEC _{conv}	4.5	0.14	0.02	<0.01 (dl) 2.5 PEC _{EMEA} 0.00026 PEC _{conv}
5-Fluorouracil		5.5 PEC _{EMEA} 0.039 PEC _{conv}	2.03 (geschat) 122			
Cisplatine		0.3 PEC _{EMEA} 0 PEC _{conv}	0.07 (geschat) 3.58			
Methotrexaat		3.9 PEC _{EMEA} 0.003 PEC _{conv}	1			<6.25 (dl)

Cyclofosfamide

De laagst gemeten effectconcentratie van cyclofosfamide (LOEC 100 mg/L) scheelt een factor 10.000 met de hoogst aangetroffen milieuconcentratie (ziekenhuiseffluent 9.9 microgram). De concentraties in rwzi-influent en -effluent liggen nog een factor 70 tot 500 lager dan de hoogst gemeten concentratie en in oppervlaktewater is dit cytostaticum niet aangetoond. De schattingen voor oppervlaktewater variëren van een aantal microgrammen (PEC_{EMEA}) tot een aantal nanogrammen (PEC_{conv}). De NOEC voor cyclofosfamide is 56 mg/L.

Op basis van deze resultaten kan gesteld worden dat cyclofosfamide geen risico vormt voor aquatische organismen. De effectresultaten voor cyclofosfamide geven echter waarschijnlijk een vertekend beeld omdat cyclofosfamide eerst geactiveerd moet worden voor het schadelijk is. Voor een completere risicoschatting zouden ook effecttesten en concentratiemetingen voor de actieve metabolieten van cyclofosfamide gedaan moeten worden.

5-Fluorouracil

De chronische effectconcentraties voor 5-fluorouracil liggen vrij laag: 10 µg/L (LOEC 0,01 mg/L). De hoogst gemeten concentratie in het milieu is 122 µg/L voor ziekenhuiseffluent (Mahnik et al. 2004). Als deze metingen correct zijn (de schatting voor ziekenhuiseffluent ligt namelijk veel lager: 2,03 µg/L) zou dit cytostaticum dus zeker een risico kunnen vormen voor aquatische organismen (in ieder geval de bacterie, *P. putida* en de alg, *P. subcapitata*) die voorkomen bij hotspots (ziekenhuis) waar dergelijke hoge concentraties fluorouracil aangetroffen kunnen worden.

In oppervlaktewater is 5-fluorouracil niet aangetroffen en de schattingen variëren sterk (PEC_{EMEA} 5,5 µg/L, PEC_{conv} 0.039 µg/L). De PEC_{EMEA} ligt waarschijnlijk aan de hoge kant ten opzichte van de werkelijkheid (zie hoofdstuk 3). De PEC_{conv} ligt ruim 250 keer lager dan de laagst gemeten effectconcentratie.

Cisplatine

De hoogst gemeten concentratie voor cisplatine in het milieu was 3.58 µg/L in ziekenhuis-effluent wat een factor 28 scheelt met de laagste chronische effectconcentratie (100 µg/L voor *P. putida*) en een factor 14 met het toxiciteitsresultaat van de acute *D. magna* test afgeleid met behulp van de A/C-ratio (50 µg/L).

Geen gegevens zijn gevonden over het voorkomen van cisplatine in oppervlaktewater. In Nederland wordt weinig cisplatine gebruikt en de schattingen voor oppervlaktewater liggen dan ook extreem laag ($PEC_{conv} 9.8 \cdot 10^{-6}$ ng/L). Op basis hiervan is geen risico van dit cytostaticum te verwachten voor aquatische organismen. Cisplatine is echter niet de enige bron voor platina in het milieu (auto's) en de schattingen zijn dus waarschijnlijk aan de lage kant.

Methotrexaat

Methotrexaat werd alleen aangetoond in ziekenhuiseffluent in een concentratie van 1 µg/L en de schattingen waren 3.9 en 0.003 µg/L. De laagste chronische effectconcentratie lag echter pas bij 45 mg/L (45000 µg/L). Door deze grote marge tussen effect- en milieuconcentraties is geen groot risico te verwachten voor aquatische organismen.

5.2 EMEA

In hoofdstuk 3 zijn PEC's berekend voor de geselecteerde cytostatica op basis van de EMEA richtlijn¹⁴ (EMEA 2006) (fase 1). Als de berekende PEC lager is dan 0.01 µg/L dan wordt verondersteld dat het geneesmiddel geen gevaar vormt voor het milieu. Ligt de concentratie hoger dan deze waarde dan is er aanvullende ecotoxicologische informatie vereist (fase 2). Dit is hier voor alle geselecteerde cytostatica het geval (zie ook tabel 10 en hoofdstuk 3).

In fase 2 wordt in eerste instantie een ruwe risicobeoordeling uitgevoerd waarbij de PNEC (Predicted No Effect Concentration) wordt berekend op basis van verschillende toxiciteitstesten. De PNEC geeft de concentratie aan waarop geen nadelige effecten te verwachten zijn. Toxiciteitsgegevens (van chronische toxiciteitstesten) worden hiervoor geëxtrapoleerd naar veilige niveau's met behulp van veiligheidsfactoren. Als de ratio PEC/PNEC groter is dan 1 dan is er nog een gedetailleerdere aanvullende ecotoxicologische risicobeoordeling vereist waarbij PEC en PNEC nog nauwkeuriger worden bepaald.

De PNEC wordt berekend door een veiligheidsfactor of assessment factor (AF) toe te passen op de No Observed Effect Concentration (NOEC). De AF wordt gebruikt omdat de extrapolatie van de testdata (waarbij een beperkt aantal soorten zijn gebruikt) naar het milieu een bepaalde onzekerheid bevat. De PNEC wordt gebaseerd op de laagste NOEC bij de chronische testen.

In tabel 11 zijn de assessment factoren, PNEC's en PEC/PNEC ratio's weergegeven voor de geselecteerde cytostatica. In de EMEA richtlijn worden geen testen met bacteriën en protozoa vermeld en daardoor ook geen assessment factoren voor deze testen. Hier worden daarom factoren van 10 aangehouden net als bij de andere testen.

¹⁴ *Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use.*

Tabel 11: Assessment factoren, PEC's, NOEC's, PNEC's en PEC/PNEC ratio's voor de vier geselecteerde cytostatica.

Cytostaticum	Testorganisme en soort	AF	PEC (µg/L)	NOEC (mg/L)	PNEC (mg/L)	(µg/L)	PEC/PNEC
Cyclofosfamide	kreeftachtige, <i>Daphnia magna</i>	10	3.5	56	5.6	5600	0.000625
5-Fluorouracil	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i>	10	5.5	0.003	0.0003	0.3	18.3
	alg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	10		0.001	0.0001	0.1	55
Cisplatine	bacterie, <i>Pseudomonas putida</i>	10	0.3	0.03	0.003	3	0.1
	alg, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	10		0.1	0.01	1	0.3
Methotrexaat	protozoa, <i>Tetrahymena pyriformis</i>	10	3.9	45 (EC50)	4.5	4500	0.00087

De PEC/PNEC ratio ligt alleen boven de 1 voor fluorouracil wat betekent dat alleen voor dit cytostaticum een aanvullende ecotoxicologische risicobeoordeling vereist zou zijn. Als de PEC/PNEC ratio onder de 1 ligt kan volgens de EMEA richtlijn geconcludeerd worden dat het niet te verwachten is dat de stof een risico vormt voor het aquatisch milieu.

Voor cyclofosfamide en methotrexaat zou dit kunnen kloppen omdat de milieuveilige concentraties (PNEC's) zeer hoog liggen; in de orde van grootte van milligrammen. De gemeten concentraties in het milieu liggen in de orde van grootte van microgrammen (tabel 10). Voor cisplatine zijn echter concentraties in ziekenhuiseffluent gemeten van 0.02-3.58 µg/L. De PNEC's van cisplatine liggen in dezelfde orde van grootte.

Grung et al. (2007) hebben een ERA (Environmental Risk Assessment) uitgevoerd gebaseerd op de EMEA richtlijn naar een aantal geneesmiddelen waaronder cyclofosfamide. De onderzoekers concludeerden dat er geen problemen met deze stof in het milieu te verwachten zijn omdat de berekende PNEC-waarde (1120 µg/L) boven de detectielimiet ligt voor cyclofosfamide. Grung et al. gebruikten een AF van 50.

De hier berekende PNEC-waarden liggen ook allemaal boven de detectielimieten die in de onderzoeken naar cytostatica in het milieu werden gebruikt (meestal 10 ng/L, zie ook tabel 1).

5.3 Discussie

Een gebrek aan met name chronische toxiciteitsdata is het primaire struikelblok voor een goede risicoschatting van geneesmiddelen voor het milieu (Fent et al. 2006, Grung et al. 2007). De hier berekende PNEC-waarden zijn bepaald op basis van zeer beperkte toxiciteitsdata en deze data geven waarschijnlijk onvoldoende inzicht in de chronische effecten van cytostatica op aquatische organismen. Er zijn nauwelijks testen gedaan met hogere taxa en de risico's voor deze organismen kunnen dus helemaal niet ingeschat worden. Een bijkomend probleem is dat in de gebruikte toxiciteitstesten geen rekening wordt gehouden met de specifieke werkingsmechanismen van de cytostatica of met metaboliëten van de stoffen.

Toxiciteitstesten worden over het algemeen niet met milieurelevante concentraties uitgevoerd (toegevoegde concentraties cytostatica liggen meestal in de orde van grootte van milligrammen, soms microgrammen; zie tabel 6). Wanneer lagere concentraties gebruikt worden is het onwaarschijnlijk dat er effecten gevonden worden in de korte tijdspanne waarin een test meestal uitgevoerd wordt.

Over het algemeen wordt binnen de toxicologie een A/C-ratio van 10 voor gebruikt. Webb (in: Kümmerer 2001b) heeft voor een aantal geneesmiddelen uitgerekend dat deze ratio veel groter dan 10 kan zijn, oplopend tot

zelfs 1400. Dit betekent dat een risicoschatting op basis van acute toxiciteitsgegevens weinig zinvol is en chronische toxiciteitsgegevens noodzakelijk zijn om tot een goede beoordeling te kunnen komen (Schrap et al. 2003).

In de risicobeoordeling gebaseerd op de EMEA richtlijn wordt geen aandacht besteed aan genotoxiciteit van cytostatica. Cisplatine en fluorouracil vertoonden genotoxiciteit bij concentraties vanaf de orde van grootte van tientallen µg/L en cyclofosfamide bij 9.8 mg/L (zie tabel 7). De verschillende genotoxiciteitsdata waren echter niet congruent.

Het is de vraag of de genotoxiciteit van cytostatica van belang is voor het milieu in vergelijking met andere stoffen. Steger-Hartmann et al. (1997) detecteerden wel cyclofosfamide in ziekenhuiseffluent maar konden geen genotoxische effecten toeschrijven aan cyclofosfamide in afvalwater (zie hoofdstukken 2 en 4). Hieruit concluderen de onderzoekers dat genotoxiciteit aangetoond in ziekenhuiseffluent niet toegeschreven kan worden aan cyclofosfamide. Hartmann et al. (1998) onderzochten de genotoxiciteit van diverse geneesmiddelen in ziekenhuiseffluent en zij concludeerden dat de genotoxiciteit voornamelijk toe te schrijven was aan bepaalde antibiotica in het afvalwater en niet aan de geteste cytostatica (o.a. cisplatine, 5-fluorouracil en etoposide).

5.4 Conclusie

Op basis van de gevonden literatuur wordt geen risico voor drie van de vier geselecteerde cytostatica verwacht voor aquatische organismen in het oppervlaktewater. Hierbij is het van groot belang dat opgemerkt wordt dat er zeer weinig toxiciteitsdata beschikbaar zijn en dat onduidelijk is of cytostatica in oppervlaktewater (in Nederland) voorkomen doordat de verwachte concentraties onder de detectielimieten van de testen liggen.

5-Fluorouracil is aangetroffen in ziekenhuiseffluent in aanzienlijke concentraties en risico's voor aquatische organismen zijn daarom waarschijnlijk voornamelijk te verwachten bij zogenaamde hotspot (benedenstrooms van een ziekenhuis). Het afvalwater van ziekenhuizen gaat echter naar rwzi's en concentraties worden verdund en wellicht wordt het cytostaticum verwijderd. Deze hoge concentraties vormen daarom waarschijnlijk alleen een gevaar in bijzondere situaties; als riolen overstromen bijvoorbeeld.

Er zijn echter geen onderzoeken gevonden waarbij gezocht werd naar 5-fluorouracil in oppervlaktewater en het is dus onbekend in welke concentraties dit cytostaticum hier voorkomt. Gezien de geringe marge tussen de verwachte concentratie in het oppervlaktewater (PEC) en de effectconcentraties in chronische testen zijn chronische effecten in oppervlaktewater niet uit te sluiten voor dit cytostaticum. Het berekende verbruik per jaar van 5-fluorouracil is in Nederland het hoogst van de vier geselecteerde cytostatica (306 kg, zie hoofdstuk 3) en het zou nuttig zijn om meer onderzoek te doen naar het voorkomen van dit cytostaticum in het milieu.

Op basis van de literatuur lijkt er geen schadelijke invloed te zijn van cisplatine voor het milieu maar hier kunnen moeilijk conclusies getrokken worden omdat niet bekend is hoeveel cisplatine voorkomt in oppervlaktewater. De gebruikte schattingen gaan namelijk voorbij aan de bijdrage van uitstoot door auto's van platina in het milieu.

Effect- en (geschatte) milieuconcentraties schelen voor methotrexaat minstens een factor 11.500. Daar komt bij dat methotrexaat goed biologisch afbreekbaar is (Kiffmeyer et al. 1998) (zie hoofdstuk 2.3.3) en slecht oplosbaar in water (Martindale 2006) en hieruit kan opgemaakt worden dat het risico van dit cytostaticum voor aquatische organismen nihil is.

Of cyclofosfamide een risico vormt voor het milieu is slecht in te schatten aan de hand van de metingen naar dit cytostaticum en de gevonden toxiciteitsdata. Onderzoeken zijn namelijk alleen gedaan naar de uitgangsstof terwijl

deze zelf niet toxisch is en slechts een klein deel van de toegediende concentratie wordt onveranderd uitgescheiden. Hierdoor wordt dus voorbijgegaan aan de eventuele invloed van toxische metabolieten.

Literatuurlijst

Afanassiev V, Sefton M, Anantachaiyong T, Barker G, Walmsley R, Wöfl S (2000) Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the RAD54 or RNR2 promoter as a test for the genotoxic potential of chemical substances. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 464:297-308

Aherne GW, English J, Marks V (1985) The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9:79-83

Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB (1995) Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 330:115-181

Bergstrom P, Holm S, Grankvist K, Henriksson R (1994) Interaction between antibiotics and antineoplastic drugs on antibacterial activity in vitro: Estramustine phosphate sensitizes pneumococci to amikacin. *International Journal of Oncology* 4:435-439

Boheemen Cv, Bruinsma B, Pockele S (2006) Emissiereductie van geneesmiddelen in ziekenhuizen naar het watermilieu: onderzoek naar maatregelen. Unpublished Bachelor's Thesis. Open Universiteit Nederland, Heerlen.

Bonnet JL, Dusser M, Bohatier J, Laffosse J (2003) Cytotoxicity assessment of three therapeutic agents, cyclosporin-A, cisplatin and doxorubicin, with the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Research in Microbiology* 154:375-385

Campbell NA, Reece JB (2002) *Biology*, Vol. Pearson Education, San Francisco

CBG-MEB (2008) Geneesmiddelen informatiebank. College ter beoordeling van geneesmiddelen - Medicins evaluation board

Coens S, Balen Pv, Dubbelman R, Foekema J, Hilhorst S, Lunn B (2003) *Kwaliteitshandboek cytostatica*, NKI-AVL (het Nederlands Kanker Instituut - Antonie van Leeuwenhoek Ziekenhuis), Amsterdam

De Jonge ME, Huitema ADR, Rodenhuis S, Beijnen JH (2005a) Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics* 44:1135-1164

De Jonge ME, Huitema ADR, Van Dam SM, Rodenhuis S, Beijnen JH (2005b) Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites 4-hydroxycyclophosphamide, 2-dechloroethylcyclophosphamide, and phosphoramidate mustard in a high-dose combination with thiotepa and carboplatin. *Therapeutic Drug Monitoring* 27:756-765

Derksen JGM (2008) Senior adviseur, Grontmij|AquaSense, Persoonlijke toelichting

Derksen JGM, Eijnatten GMv, Lahr J, Linde Pvd, Kroon AGM (2001) Milieu-effecten van humane geneesmiddelen. Aanwezigheid en risico's. Report No. 2000.51, Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIVA, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling - RIZA, Lelystad

Derksen JGM, Lahr J (2003) Review oestrogenen en geneesmiddelen in het milieu: stand van zaken en kennislacunes. Report No. 2003.09, Stichting toegepast onderzoek waterbeheer - STOWA, Utrecht

Derksen JGM, Roorda JH (2005) Ketenganalyse humane en veterinaire geneesmiddelen in het watermilieu. Indicatieve kwantitatieve analyse en mogelijkheden voor reductie van belasting van het watermilieu. In opdracht van het Ministerie van VROM, onder begeleiding van de LBOW-werkgroep '(dier)geneesmiddelen en watermilieu', Grontmij Nederland bv, Amsterdam/ De Bilt/Houten

Derksen JGM, Roorda JH, Swart D (2007) Verg(h)ulde pillen: onderzoek naar de emissie van geneesmiddelen uit ziekenhuizen. Report No. 2007.03, Stichting toegepast onderzoek waterbeheer - STOWA, Utrecht

DeYoung DJ, Bantle JA, Hull MA, Burks SL (1996) Differences in sensitivity to developmental toxicants as seen in *Xenopus* and *Pimephales* embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56:143-150

EMA (2006) Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Report No. EMA/CHMP/SWP/4447/00 The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), London

Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76:122-159

FK (2008) Farmacotherapeutisch Kompas. College voor zorgverzekeringen (CVZ)

Gieringer JH, Wenz AF, Just HM, Daschner FD (1986) Effect of 5-fluorouracil, mitoxantrone, methotrexate, and vincristine on the antibacterial activity of ceftriaxone, ceftazidime, cefotiam, piperacillin, and netilmicin. *Chemotherapy* 32:418-424

GIPdatabank (2008). een themasite van het College voor zorgverzekeringen (CVZ)

Grung M, Källqvist T, Sakshaug S, Skurtveit S, Thomas KV (2007) Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1998) Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:377-382

Henderson's (2000) Henderson's Dictionary of Biological Terms. In: Lawrence E (ed). Pearson Education Limited, Edinburgh, p 719

Henschel KP, Wenzel A, Diedrich M, Fliedner A (1997) Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25:220-225

Hilhorst SKM, Miedema E, Tijssen SCHA, Mossink JCM, Kromhout H, (2001) Blootstelling aan cytostatica in ziekenhuizen. Stand der techniek op het gebied van beheersmaatregelen., Ministerie van Sociale Zaken en Werkgelegenheid, Den Haag

Jacobs SA, Stoller RG, Chabner BA, Johns DG (1976) 7 Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate. *Journal of Clinical Investigation* 57:534-538

Jongbloed RH, Blankendaal VG, Kan CA, Dokkum HPv, Bernhard R, Rijs GBJ (2001) Environmental risks of veterinary drugs and animal feed additives in surface water; an inventory study. Report No. 2001.053, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling - RIZA, Lelystad

Kiffmeyer T, Götze HJ, Jursch M, Lüders U (1998) Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 361:185-191

Kümmerer K (2001a) Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - A review. *Chemosphere* 45:957-969

Kümmerer K (2001b) Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks., Vol. Universitätsklinikum Freiburg, Springer, Heidelberg

Kümmerer K (2004) Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks., Vol. Universitätsklinikum Freiburg, Springer, Heidelberg

Kümmerer K, Al-Ahmad A (1997) Biodegradability of the anti-tumour agents 5-fluorouracil, cytarabine, and gemcitabine: Impact of the chemical structure and synergistic toxicity with hospital effluent. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 25:166-172

Kümmerer K, Helmers E, Hubner P, Mascart G, Milandri M, Reinthaler F, Zwakenberg M (1999) European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources. *Science of the Total Environment* 225:155-165

Kümmerer K, Steger-Hartmann T, Meyer M (1997) Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research* 31:2705-2710

Mahnik SN, Rizovski B, Fuerhacker M, Mader RM (2004) Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380:31-35

Martindale (2006) *Martindale - The complete drugs reference Vol 1*. Pharmaceutical Press

McCann J, Simmon V, Streitwieser D, Ames BN (1975) Mutagenicity of chloroacetaldehyde, a possible metabolic product of 1,2 dichloroethane (ethylene dichloride), chloroethanol (ethylene chlorohydrin), vinyl chloride, and cyclophosphamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72:3190-3193

McLeod HL, Sludden J, Hardy SC, Lock RE, Hawksworth GM, Cassidy J (1998) Autoregulation of 5-fluorouracil metabolism. *European Journal of Cancer* 34:1623-1627

Mill Gv (2008) *Onderzoeksmidewerker watersystemen, Waterschap Aa en Maas, Persoonlijke toelichting*

Mill Gv, Verhoeven B, Rijs GBJ (2006) *Monitoring geneesmiddelen en oestrogenen waterschap AA en Maas., Waterschap Aa en Maas, Den Bosch*

Mons MN, Genderen Jv, Dijk-Looijaard AMv (2000) *Inventory on the presence of pharmaceuticals in Dutch water, Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA, VEWIN - Vereniging voor Waterbedrijven in Nederland, Kiwa Water Research, Nieuwegein*

Mons MN, Hoogenboom A, Noij THM (2003) *Pharmaceutical and drinking water supply in the Netherlands Report No. 2003.040, Kiwa Water Research*

Mortelmans K, Zeiger E (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455:29-60

Nakano E, Watanabe LC, Ohlweiler FP, De Braganca Pereira CA, Kawano T (2003) Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 536:145-154

OECD (1992) *OECD Guideline for testing of chemicals: Ready biodegradability (301)*, Paris

Quillardet P, De Bellecombe C, Hofnung M (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Validation study with 83 compounds. *Mutation Research* 147:79-95

Quillardet P, Hofnung M (1993) The SOS chromotest: A review. *Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology* 297:235-279

Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung M (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:5971-5975

Rand GM, Petrocelli SR (1985) *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*, Vol. Hemisphere Publications, Washington D.C.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ (2007) *Rang and Dale's Pharmacology*, Vol. Churchill Livingstone, Edinburgh

Reuven NB, Arad G, Maor-Shoshani A, Livneh Z (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *Journal of Biological Chemistry* 274:31763-31766

Roorda JH (2008) *Hoofd Technologie / Senior Adviseur Water & Energie, Grontmij Nederland bv, Persoonlijke toelichting*

Sacher F, Stoks PG (2003) Pharmaceutical Residues in Waters in the Netherlands, Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA, Nieuwegein

Schrap SM, Rijs GBJ, Beek MA, Maaskant JFN, Staeb J, Stroomberg G, Tiesnitsch J (2003) Humane en veterinaire geneesmiddelen in Nederlands oppervlaktewater en afvalwater. Een screening in 2002. Report No. 2003.023, Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling - RIZA, Lelystad

Seiler JP (2002) Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology - Can the two be connected? Toxicology Letters 131:105-115

Steger-Hartmann T, Kümmerer K, Hartmann A (1997) Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. Ecotoxicology and Environmental Safety 36:174-179

Steger-Hartmann T, Kümmerer K, Schecker J (1996) Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 726:179-184

Stoks PGM, Haar Gvd, Renout AC, Smits AH (2005) Jaarrapport 2004. De Rijn., Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA

Stoks PGM, Haar Gvd, Renout AC, Smits AH (2006) Jaarrapport 2005. De Rijn., Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA

Stoks PGM, Haar Gvd, Renout AC, Smits AH (2007) Jaarrapport 2006. De Rijn., Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA

SZW (2004) De Richtlijn cytostatica, een praktische uitwerking en een onderdeel van het "Werkpakket Gevaarlijke stoffen". Sectorenfonds Zorg en Welzijn, Utrecht

Ternes TA (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research 32:3245-3260

Ternes TA, Herrmann N, Bonerz M, Knacker T, Siegrist H, Joss A (2004) A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. Water Research 38:4075-4084

Ueda Y, Saito A, Fukuoka Y (1983) Interactions of β -lactam antibiotics and antineoplastic agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 23:374-378

VanDale (2008) Online woordenboek, geraadpleegd op 17-03-2008

Versteegh JFM, Aa NGFMvd, Dijkman E (2007) Geneesmiddelen in drinkwater en drinkwaterbronnen. Resultaten van het meetprogramma 2005/2006. Report No. 703719016/2007, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - RIVM, Bilthoven

Versteegh JFM, Stolker AMM, Niesing W, Muller JJA (2003) Geneesmiddelen in drinkwater en drinkwaterbronnen. Resultaten van het meetprogramma 2002. Report No. 703719004/2003, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - RIVM, Bilthoven

VICH (2004) Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) - Phase II, International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products

VIKC (2005) Zakboekje middelen bij maligne aandoeningen, Vol. Vereniging van Integrale Kankercentra, Utrecht

Wikipedia (2008a) Gemiddeld lichaamsoppervlak, <http://nl.wikipedia.org/wiki/Lichaamsoppervlak>, geraadpleegd op 05-04-2008.

Wikipedia (2008b) Uitleg over cytostatica, <http://nl.wikipedia.org/wiki/Cytostaticum>, geraadpleegd op 18-01-2008

Zouneková R, Odráška P, Doležalová L, Hilscherová K, Maršálek B, Bláha L (2007) Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:2208-2214

Bijlagen

Bijlage 1

Begrippenlijst

A/C-ratio	Acuut/chronisch ratio
AF	Assessment factor
CBT	Closed bottle test
CFU	Colony forming units
DDD	Defined daily doses
DEG	Diethyleenglycol
Dg	Detectiegrens
DI	Detectielimiet
DOC	Dissolved organic carbon
ECx	X% effect concentratie
EG	Ethyleenglycol
ERA	Environmental Risk Assessment
FETAX	Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus
ICx	X% inhibitie concentratie
Kd	Sorptiecoëfficiënt
LC50	50% lethaal concentratie
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
LSSTP	Labarotory-scale sewage treatment plant
MGC	Minimum Genotoxic Concentration
NOEC	No Observed Effect Concentration
PEC	Predicted Environmental Concentration
PNEC	Predicted No Effect Concentration
Rwzi	Rioolwaterzuiveringsinstallatie
TMSC	Theoretical mean sewage concentration

