

Besinlerle Alınan Nitratların Normoklorhidrik ve Hipoklorhidrik Kobaylar Üzerindeki Etkilen

EFFECTS OF NITRATES TAKEN WITH FOODS ON NORMOCHLORHYDRIC AND HYPOCHLORHYDRIC GUINEA PIGS

Şükrü ŞİMŞİR*, Ali ÇALIŞKUŞU**, A. Nakı ULUSOY***

* Uz.Dr.,Samsun Devlet Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, SAMSUN

** Yrd.Doç.Dr.,Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi İlk ve Acil Yardım AD, KONYA

*** Prof.Dr.,Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD, SAMSUN

Özet

Kanser günümüzde en korkulan ve sık görülen ölüm nedenlerinden biridir. Genetik faktörler yanında çevresel ve besinlerle alınan faktörler de kansere neden olmaktadır. Doğal karsinojenler olan nitrat ve nitritler su, sebzeler, etler ve saklanmış yiyeceklerle bol miktarda alınır. Bunun yanında nitrat ve nitritler konserve yiyecek ve içeceklerde koruyucu olarak kullanılır. Her ne kadar nitratlar ile kanser gelişimi arasındaki ilişki bazı deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiş ise de günümüzde bu ilişki henüz kesinlik kazanmamıştır.

Bu çalışmada yiyeceklerine %5 sodyum nitrat karıştırılan normoklorhidrik ve hipoklorhidrik kobaylar 32 hafta izlendi. Hiçbir hayvanda malignite bulgusuna rastlanmamasına karşın sodyum nitrat ile beslenen hayvanlarda akciğer, adrenal korleks ve overlerde bazı hislopalojik değişiklikler gözlemlendi. Ancak bu değişikliklerin açıklamasının yapılabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Sodyum nitrat, Kanser,
Doğal karsinojenler

T Klin Gastroenterohepatoloji 1999, 45-50

İnorganik nitratların halk sağlığını tehdit edici yönleri ve kanser riskinin ne olduğu sorusu son 20 yıldır giderek artan sayıda araştırmacıyı ilgilendirmeye başlamıştır. Nitrat tuzlarının inert maddeler olduğu ve insan sağlığı açısından risk taşımadığı bilinen bir gerçektir. Ancak bağırsaktaki birçok bakteri nitrat sitrat redüktaz içerir ve nitratların nitritlere redüksiyonunu sağlar. Nitritler nitratlardan daha reaktif iyonlar olup gastrik asit

Geliş Tarihi: 17.06.1997

Yazışma Adresi: Dr.Ali ÇALIŞKUŞU
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
İlk ve Acil Yardım AD, KONYA

T Klin J Gastroenterohepatol 1999, 10

Summary

Cancer is one of the most terrible current diseases that causes frequent death. Environmental and feeding factors cause cancer as well as genetic factors. A large quantity of nitrate and nitrite, which are natural carcinogens, are taken with water, vegetables, meat and stored food. Besides, nitrate and nitrite are used as preservatives in canned food and drinks. Although the relation between nitrate and the development of cancer has been shown in some experimental and epidemiological studies, it is still uncertain.

In this experiment, the normochlorhidric and hypochlorhidric Guinea pigs who have been fed with food added 5% sodium nitrate were observed for 32 weeks. No findings of malignity have been found in any of the animals. However, we have observed some histopathological changes in lung, adrenal cortex and ovaries of the animals fed with sodium nitrate. We need to have some more studies in order to be able to explain the changes.

Key Words: Sodium nitrate, Cancer, Natural carcinogens

T Klin J Gastroenterohepatol 1999, 10:45-50

katalizörlüğünde kolaylıkla N-nitrozo ürünlerine dönüşürler. İşte hayvan deneyleri ile gösterilen ve kanser riskini arttırdığı düşünülen ürün budur (1,2). Gastrik asit seviyesi azalırsa total nitrat redüksiyonu artar (2). Hipoklorhidri, pernisiyöz anemi veya nonspesifik atrofik gastrit gibi gastrik asit seviyelerinde azalma ile seyreden hastalıklarda, midede bakteriyel kolonizasyon artması sonucu alınan nitratlar yoğun olarak nitrite dönüşür (3). Bazı N-nitrozo aminlerin gastrik epitel üzerine etkisi ile mide kanserine neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (1,4-6). Mideden başka özofagus, pankreas, nazofarinks, enfekte mesane ve beyin N-nitrozaminlerin karsinogenetik etkilerinin görüldüğü diğer organlardır (1,4),

45

Nitro/asyomu Oluşturan Faktörler

1. Endojen Nitratlar: Dışardan nitrat alımı yanısıra vücut için önemli nitrat kaynaklarından bin de endojen nitrat oluşumudur. Bazı hastalıklarda nitrat ekskresyonu artabilir (7). Kanserleşik eden kronik enflamasyon, gastrit, özofajit ve şistosomiazis gibi hastalıklar makrofaj stimülasyonu ile endojen nitrozasyona neden olur.

2. Bakteriyel Nitrat Redüksiyonu: Her ne kadar salyada düşük oranda bakteri redüksiyonu meydana gelirse de esas nitrit oluşumu mide ve mesane gibi steril organlarda olur (8). Bakteriyel nitrozasyon midede nötral pH'da optimal olarak gerçekleşir. pH alkaliye kayarsa endojen N-nitrozo ürünlerinin oluşumu değişmez (8-11). Gastrik sıvının asit olması ise gastrik epitelde bakteriyel çoğalmayı kısıtlar. Aynı ilişki mesane şistosomiazisinde mevcuttur (12).

3. Modifiye edici faktörler: Japonya'da yapılan çalışmalarda düşük askorbik asitli gıdalar ile beslenmenin nitrat alan popülasyonda kimyasal nitrozasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (13). Yine Hovvsan ve Forman yüksek askorbik asitli diyetin gastrik kanserde koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir (14,15).

4. Nitroza dönüşebilen substratlar: Nitrozasyona girebilen substratlar biyolojik olarak karsinogen substratlar olarak bilinir. Hill 1988 yılında dimetilamin, piperidin ve pirrolidin gibi bazı sekonder aminleri bu tür substratlar olarak göstermiştir (3,16).

Halk Sağlığı ve Nitratlar

Endojen nitrat oluşumu, gastrit gelişimi gibi faktörler kolaylıkla kontrol edilebilir. Ancak kontrol edilmesi gereken diğer faktör konu dışardan nitrat alımıdır. Nitrat çevreden içme suları, sebzeler ve konserve gıdalarla alınır. İçme suyu nitrat seviyeleri için Pan ve arkadaşlarının 1987 yılında önerdikleri ve Dünya Sağlık Örgütlerinin kabul ettiği miktar 45-50 mg/L'dir. Bu miktar bazı diğer araştırmalarla da belirtilmiştir (17-21). Bu miktarın kanser riski ile ilişkisi yoktur. Çünkü 10 mg/L'den çok az miktarlarda bile gastrik sıvıda nitrozasyon meydana gelebilmektedir. Bu nedenle methemoglobinemia olmayan 50 mg/L sınırı daha akılcı bir yaklaşımdır. Gelecekteki epidemiyolojik çalışmalarını sürükleyecek temel öge dışardan nitrat

alımıdır. Elimizdeki bilgiler henüz sınırlı olup uzun vadeli çalışmalar yoktur. Ancak uzun vadeli çalışmalar sonucu dışardan nitrat alımı ile kanser riski arasındaki ilişki daha da aydınlatılabilecektir,

Materyel ve Metod

Bu deneysel çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezinde yapıldı. Ağırlıkları 600-800 g arasında değişen dişi ve erkek 60 kobay kontrol ve deney grupları olarak 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu olan ve 10 kobaydan oluşan birinci grup ile 20 kobaydan oluşan dördüncü grup normal yem ile beslenirken, 10 kobaydan oluşan ikinci ve 20 kobaydan oluşan üçüncü grup çalışma süresi boyunca %5 sodyum nitrat içeren yem ile beslendiler. Bir ve ikinci gruptaki 20 kobaya hiçbir operasyon uygulanmazken üç ve dördüncü gruptaki 40 kobaya trunkal vagotomi ve Heinekc-Mikulicz piloroplastı yapılarak hipoklorhidri oluşturuldu.

Üç ve dördüncü gruptaki kobaylar cerrahi girişimlerden 12 saat önceden aç ve susuz bırakıldılar. Cerrahi girişimler steril şartlarda ve eter anestezisi kullanılarak yapıldı. Orta hat kesisi ile yapılan laparotomi sonrası klasik Heinekc-Mikulicz piloroplastı ve trunkal vagotomi uygulandı. Operasyon sonrası birinci gün su verilen kobaylar, ikinci günden itibaren normal veya nitratlı yemlerle beslenmeye başlandı. Çalışma süresince ilk bir ay içinde ölen 16 kobay çalışma dışında tutuldu. Böylece 32 haftalık çalışmaya 44 kobay dahil edildi.

32 hafta sonunda kobaylar eter anestezisi ile öldürüldü bazal asit salınım tayini için mide sıvısı alındıktan sonra, özofagusun tüm bölümlerinden ayrı ayrı, midenin kardias, korpus, antrum ve prepylorik bölgeden, ince bağırsak ve kolondan, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, pankreas, mesane, beyin, dalak, sürrenal bezler, över ve testislerden doku örnekleri alındı. Alman örnekler usulüne uygun hazırlanarak Hematoksin-Eosin ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. Gruplar arası farklılıklar student-t ve Khi kare testi ile araştırıldı.

Sonuçlar

Çalışmamızda ameliyat edilen gruplar ile ameliyat edilmeyen grupların yaşam süreleri farklılık gösteriyordu. Ameliyat edilen üç ve dördüncü

Tablo 1. Tüm gruplarda akciğer, sürrenal ve över lezyonların dağılımı

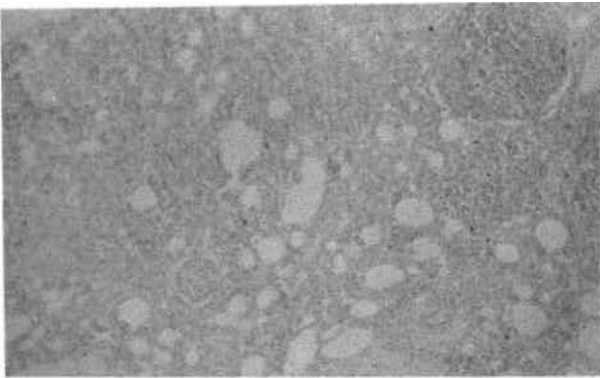
Gruplar	Akciğer Lezyonu		Sürrenal Lezyonu		Över Lezyonu	
	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok
I (K)	-	10	-	10	-	6
II ÇNK)	4	6	3	7	2	4
III (N+H)	6	6	5	7	3	-
IV (H)	-	12	1	11	1	6
Toplam	10	34	9	35	6	16

(K) kontrol grubu, (N) nitratlı yem, (H) hipoklorhidri, (N+H) nitratlı yem ve hipoklorhidri birlikte.

gruplarda her gruptan sekiz kobay ilk bir ay içinde öldü. Çalışma sırasında ölen kobaylarda patolojik inceleme yapılmadı. Trunkal vagotomi ve piloro-plasti yapılan kobaylarda operasyon öncesi ortalama 12 saatlik mide bazal asit outputu 0.415 mEq/L iken deney süresi sonunda ortalama mide bazal asit outputu 0.087 mEq/L olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Deney süresi sonunda tüm gruplardaki kobayların çeşitli organların makroskopik ve histopatolojik değerlendirilmesi sonucunda karaciğer, böbrek, pankreas, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak, mesane, dalak, beyin, özofagus ve testislerde herhangi bir histopatolojik değişiklik gözlenmezken, akciğer, sürrenal ve över örneklerinde bazı değişiklikler gözlemlendi (Tablo 1).

Akciğer örnekleri incelendiğinde normal yem ile beslenen bir ve dördüncü gruplarda akciğer lezyonu gözlenmezken, nitratlı yem ile beslenen iki ve üçüncü gruplardaki 4 ve 6 kobaylarda lenfatik

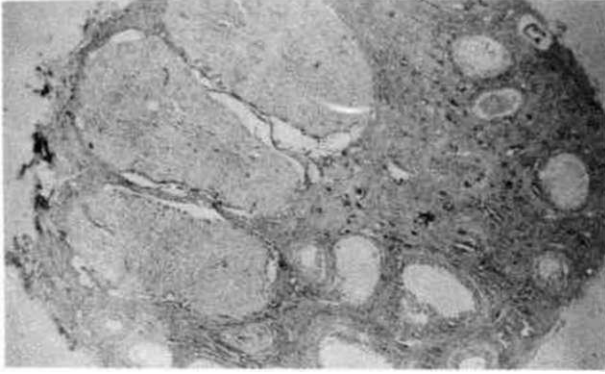
follikül formasyonuna kadar giden lenfosit infiltrasyon alanları ile karakterize interstisyel lenfositik pnömoni bulguları vardı (Şekil 1). Akciğer lezyonları açısından normal yemle beslenen gruplar ile nitratlı yemle beslenen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.05$), öpere edilen ve edilmeyen gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Normal yem ile beslenen bir ve dördüncü grupta sürrenal bezlerde hiçbir değişiklik gözlenmezken nitratlı yemle beslenen iki ve üçüncü gruplardaki 3 ve 5 kobayda sürrenal korteksin zona fasikülatasmda genişleme, hücre kitlesinde artma, hücrelerde boşalma gözlemlendi (Şekil 2). Sürrenal bezlerdeki patolojik değişiklikler yönünden normal yemle beslenen iki ve üçüncü gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.05$), öpere edilen ve edilmeyen gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Över örnekleri incelendiğinde ise bir ve dördüncü grupta hiçbir değişiklik gözlenmezken ikinci gruptaki 2 ve



Şekil 1. HEx100 büyütme ile nitratlı yemle beslenen kobaylarda lenfatik follikül formasyonuna kadar giden lenfosit infiltrasyon alanları ile karakterize interstisyel lenfositik pnömoni bulgusu olan akciğerin görünümü.



Şekil 2. HEx25 büyütme ile nitratlı yemle beslenen kobaylarda zona fasikülatasmda genişleme, hücre kitlesinde artma ve hücrelerde boşalma, olan sürrenal korteksinin görünümü.



Şekil 3. HEx100 büyütme ile nitratlı yemle beslenen kobaylarda folliküllerin kontrollere göre erken matüre olduğu ve corpus luteumların da ekzajere bir şekilde olduğu gözlenen over'in histopatolojik görünümü.

üçüncü gruptaki 3 kobayda folliküllerin erken matüre olduğu gözlendi (Şekil 3). Akciğer ve sürrenal bezlerde olduğu gibi överdeki değişiklikler açısından normal yem ve nitratlı yem yiyen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p < 0.05$), öpere edilen ve edilmeyen gruplar arasındaki fark anlamlı değildi.

Tartışma

Kanser etiyolojisinde genetik faktörlerin yanısıra çevresel faktörler de önemli rol oynar. Besinlerdeki doğal karsinojen maddeler arasında nitrat ve nitritler de yer alır. Nitrat tuzları inert maddeler oldukları için doğrudan karsinojen değildir, vücutta, özellikle bağırsaklardaki bakteri kolonilerinde bulunan "Nitrat Redüktaz" enziminin etkisi ile nitritlere redükte olur, nitritler ise nitratlara göre daha aktif olarak N-nitrozo ürününe dönüşür. Preusmann ve Stewart'm yaptıkları hayvan çalışmalarında gösterdikleri gibi karsinojen etkisini gösteren ürün budur (22).

Mide, endojen nitrozo ürünlerinin primer kaynağı olduğu için kanser için hedef organdır. Hipoklorhidri, pernisiyöz anemi veya atrofik gastrit gibi gastrik asidite azalması ile seyreden hastalıklarda midede oluşan bakteriyel kolonizasyon sonucu nitrat redüktaz aktivitesi artarak nitratlar daha uygun olarak nitrite dönüşür. Hill ve Eisenbrand'm yaptığı çalışmada gösterdiği gibi hipoklorhidri'nin vücut nitritlerini arttırıcı etkisi mevcuttur (3,23).

Normoasidik midede, asit nitrat redüksiyonu üzerinde sadece salyadaki bakterilerin etkisi mevcuttur (2). Kolinerjik ve peptiderjik lifler ihtiva eden vagus siniri mide asit salgısının sefalik fazını oluşturmaktadır. Trunkal vagotomi veya selektif vagotomi yapıldıktan sonra mide asit salgısı azalmaktadır. Biz de sodyum nitrat'ın normoklorhidrik ve hipoklorhidrik mide salgılı kobaylardaki etkilerini araştırmak ve birbirleri ile kıyaslamak amacı ile III. ve IV. gruptaki 40 kobayda trunkal vagotomi ve Heineke-Mikulicz piloroplasti yaptık ve vagotomiden sonra kobayların 12 saatlik mide bazal asit output'unun %79 oranında azaldığını tespit ettik.

Mideden başka özofagus, nazofarinks, enfekte mesane ve beyin, karsinojen etkinin görüldüğü diğer organlardır. Şimdiye değin yapılan çalışmalarda nitratlar ve nitritlerin karsinogenetik etkisinin 6 ay ile 3 yıl arasında değişen sürelerde olduğu gösterilmiştir (24). Ancak karsinojen etki ile ilgili deneysel ve epidemiyolojik sonuçlar birbiri ile çelişkilidir (1,2,6,19,22). Hartman 12 ayrı ülkede nitrat alımları ile kanser gelişimini araştırmış ve katsayısı 0.88 olan bir pozitif korelasyon bulmuştur (25). Ancak bu korelasyon yüksek oranda Japonya ve Romanya'dan gelen bilgilere dayanmaktadır. 1988 yılında yapılan bir uluslararası çalışmada ise istatistiki olarak önemli bir korelasyon bulunamamıştır (26). Fontham ve arkadaşları kronik atrofik gastriti hastalar ile kontrol gruplarında mide sıvılarındaki nitrat ve nitrit miktarını araştırmışlar, kontrol grubunda mide sıvısında nitrat seviyesi gastritli gruba göre daha yüksek bulunurken, hipoasidite arttıkça nitrat seviyesinin azalmasına karşılık nitrit düzeyinin yükseldiğini belirtmişlerdir (27).

Maekavva ve arkadaşlarının ratlar üzerinde 3 yıllık sürede yaptıkları çalışmada; kontrol grubu ile nitratlı yemle beslenen deney grubu arasında tümör insidansı ve tümör tipleri yönünden önemli bir fark tespit edememişlerdir (24). Risch ve arkadaşları ise 246 mide kanserli hastada yedikleri yiyecekler ve nitrat alımlarını sorarak nitrat alımı ile mide kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmışlar, nitratları konserve gibi saklanmış yiyeceklerle alanlarda, kanser riskinin arttığını belirlemişlerdir (28). 1988 yılında 52 ayrı popülasyonda 12 farklı miktarda nitrat alanlarda, 24 saatlik idrar nitrat sekresyonu ve 12 farklı kanser tipi karşılaştırılmış, sadece lösemide po-

zitif bir korelasyon bulunmuştur (26). Cuello ve arkadaşları nitrat oranı yüksek suyu kullanan dört popülasyonda mide kanseri insidansım araştırmışlar, fakat istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (4).

Biz de çalışmamızda trunkal vagotomi ile hipoklorhidri yarattığımız dolayısıyla endojen nitrozasyona ortam hazırladığımız kobaylarda ve kontrol grubunda nitratlı yem vererek nitrat'm karsinojenik ve muhtemel diğer etkilerini araştırdık. 32 hafta sonunda kobayların karaciğer, böbrek, kalp, pankreas, dalak, özofagus, mide, ince bağırsak, kaim bağırsak, mesane, testis, over, sürrenal ve beyin dokularından örnekler alarak histopatolojik olarak değerlendirdik. Fakat hiçbir malignensi bulgusu tespit edemedik. Ancak trunkal vagotomi ile hipoklorhidri oluşturulan ve normoklorhidrik kobayların 8 ay süre ile yüksek oranda nitratlı yem ile beslenmeleri sonucunda akciğer, sürrenal ve overlerin histopatolojik değerlendirilmesinde daha önceki çalışmalarda bahsedilmeyen, önemli gördüğümüz bazı değişiklikler gözledik. Akciğerlerde lenfatik follikül formasyonuna kadar giden lenfosit infiltrasyon alanları ile karakterize interstisyel lenfositik pnömoni gözlenirken, sürrenal korteks'inin zona fasikülatasmda genişleme, hücre kitlesinde artma ve hücrelerde boşalma ile overlerde folliküllerin erken matüre olduğu ve overlerde gözlenen bu histopatolojik değişiklikler ile ilgili literatürlerin taramasında herhangi bir bulguya rastlamadık. Sürrenal ve overde meydana gelen bu histopatolojik bulgular kullanılan sodyum nitrat'm bazı endokrin organlar üzerinde stimulan bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz bu deneysel çalışmada 32 haftalık sürede kobay yemlerine %5 oranında sodyum nitrat karıştırılması ile trunkal vagotomi ile hipoklorhidri oluşturulmuş kobaylarda ve kontrol grubundaki normoklorhidrik kobaylarda; sodyum nitrat'm karsinojen etkisinin olmadığını, buna karşın akciğer, sürrenal ve overlerde daha önceki çalışmalarda bahsedilmeyen önemli olduğu düşünülen histopatolojik değişiklikler saptanmıştır. Bu histopatolojik değişikliklerin oluşma nedenlerinin aydınlatılabilmesi için yeni araştırmaların yapılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Correa P. A humar model of gastric carcinogenesis. *Cancer Research* 1988; 48:3554-60.
3. Hill MJ. Gastric carcinogenesis: Luminal factors. In: Reed PI and Hill MJ, eds. *Gastric Carcinogenesis*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1988: 187-99.
2. Cuello C, Correa P, Haenszel W, Gordillo G, Brown C, Archer M and Tannenbaum S. Gastric cancer in Colombia. 1. Cancer risk and suspect environmental agents. *Journal of the National Cancer Institute* 1976; 57:1015-20.
4. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Archer M and Tannenbaum S. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 58-60.
5. Mettlin C. Epidemiologic studies in gastric adenocarcinoma. In: Douglass HO ed. *Gastric Cancer*. New York: Churchill Livingstone, 1988: 1-25.
6. Mirvish SS. The etiology of gastric cancer-intragastric nitrosamide formation and other theories. *Journal of the National Cancer Institute* 1983; 71:629-47.
7. Wagner DA, Young VR and Tannenbaum SR. Mammalian nitrate biosynthesis: Incorporation of ¹⁵NH₃ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proceedings of the National Academy of the USA* 1983; 80:4518-21.
8. Leach S. Mechanisms of endogenous N-nitrosation. In: Hill MJ ed. *Nitrosamines Toxicology and Microbiology*, Ellis Horwood, Chichester, 1988: 69-87.
9. Pignatelli B, Richard I, Bourgade M-C and Bartsch H. An improved method for analysis of total N-nitroso compounds in gastric juice. In: Bartsch H, O'Neill I and Schulte-Hermann R eds. *The Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer: Exposures and Mechanisms*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1987: 209-15.
10. Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM and Bartsch H. Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains. *Carcinogenesis* 1985; 6:911-5.
11. Leach SA, Thompson M and Hill M. Bacterially catalysed N-nitrosation reactions and their relative importance in the human stomach. *Carcinogenesis* 1987; 8:1907-12.
12. Hicks RM. Nitrosamines as possible etiological agents in bilharzial bladder cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982: 455-71.
13. Kamiyama S, Ohshima H, Shimada A, Saito N, Bourgade MC, Ziegler P and Bartsch H. Urinary excretion of N-nitrosoamino acids and nitrate by inhabitants in high and low risk areas for stomach cancer in Northern Japan. In: Bartsch H, O'Neill IK and Schulte-Hermann R eds. *Relevance of N-nitroso Compounds to Human Cancer: Exposure and Mechanisms*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1987: 497-502.
14. Forman D. The aetiology of gastric cancer. In: Bartsch H and IK O'Neill, eds. *N-nitroso Compounds, Mycotoxins and Tobacco Smoke: Relevance to Human Cancer* International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1989.

15. Howson CP, Hiyama T and Wynder EL. The decline in gastric cancer epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiological Review* 1986; 8:1-27.
16. Tiedink HGM, Davies JAR, van Broekhoven LW, van der Kamp HJ and Jongen WMF. Formation of mutagenic N-nitroso compounds in vegetable extracts upon nitrite treatment: a comparison with the glucosinolate content. *Food and Chemical Toxicology* 1988; 26:947-54.
17. EEC (European Economic Community). Council Directive on the Quality of Water for Human Consumption No: 80/778. *Official Journal of the EEC* 1980; 229:11-29.
18. Fan AM, Willhite CC and Books SL. Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1987; 7:135-48.
19. McKee JE and Wolf HW. *Water Quality Criteria*, 2nd ed. State Water Resources Control Board, Sacramento CA, 1963.
20. Moller H, Landt J, Jensen P, Pedersen E, Autrup H and Jensen OM. Nitrate exposure from drinking water and diet in a Danish rural population. *International Journal of Epidemiology* 1989; 18:206-12.
21. World Health Organization. *Health Hazards from Nitrates in Drinking-water Environmental Health (1)*. World Health Organization, Copenhagen, 1985.
22. Preussmann R and Stewart BW. N-nitroso carcinogens. In: Searle CE ed. *Clinical Carcinogens ACS Monographs* 182, American Chemical Society, Washington DC, 1984: 643-828.
23. Eisenbrand G, Adam B, Peter M, Malfertheiner P and Schlag P. Formation of nitrite in gastric juice of patients with various gastric disorders after ingestion of a standard dose of nitrate-a possible risk factor in gastric carcinogenesis. In: O'Neill, Von Borstel RC, Miller CT, Long J and Bartsch H, eds. *Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1984: 963-8.
24. Maekawa A and Furuta K. Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 Rats. *Fd Chem Toxic* 1982; 20:25-33.
25. Hartman PE. Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality. *Environmental Mutagenesis* 1983; 5:111-21.
26. Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Result for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *British Medical Journal* 1988; 297:319-28.
27. Fontham E, Zavala D, Correa P, Rodriguez E, Hunter F, Haenszel W and Tannenbaum SR. Diet and chronic atrophic gastritis: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute* 1986; 76:621-7.
28. Risch HA, Jain M, Choi NW, Fodor JGY, Pfeiffer G, Howe GR, Harrison LW, Craib KJP and Miller AB. Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. *American Journal of Epidemiology* 1985; 122:947-59.