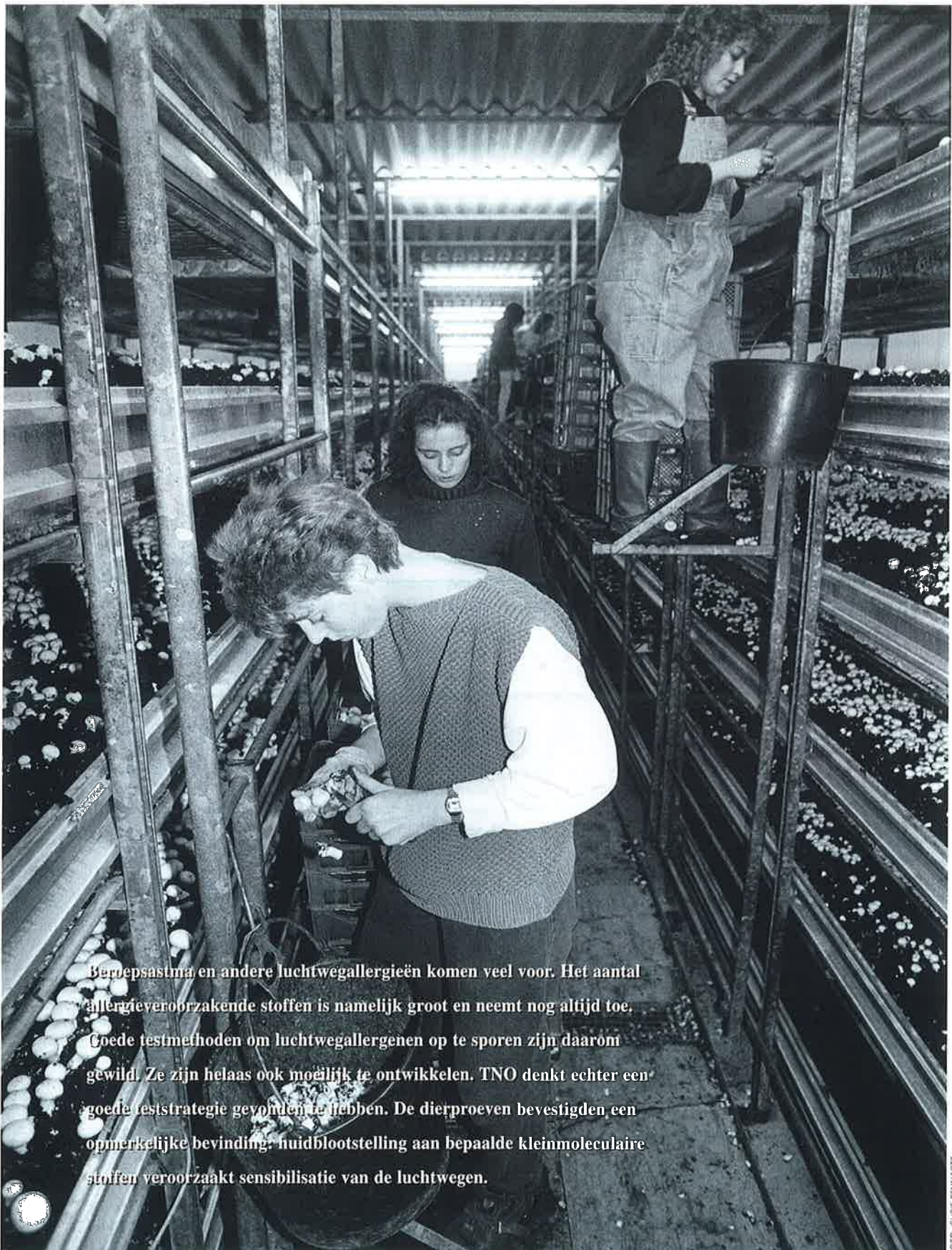


TNO ontwikkelt bruikbare teststrategie voor allergenen

# Huidblootstelling is een **risico**



Beroepsastma en andere luchtwegallergieën komen veel voor. Het aantal allergieveroorzakende stoffen is namelijk groot en neemt nog altijd toe.

Goede testmethoden om luchtwegallergenen op te sporen zijn daarom gewild. Ze zijn helaas ook moeilijk te ontwikkelen. TNO denkt echter een goede teststrategie gevonden te hebben. De dierproeven bevestigden een opmerkelijke bevinding: huidblootstelling aan bepaalde kleinmoleculaire stoffen veroorzaakt sensibilisatie van de luchtwegen.

FOTO: CHRIS PENNAERTS



# 0 voor luchtwegallergie

Josje Arts en Frieke Kuper

200013900

**L**uchtwegallergie, en dan met name astma, is de meest gestelde diagnose van luchtwegaandoeningen op de werkplek in het Verenigd Koninkrijk. En ook in Nederland scoort deze aandoening hoog. Naar schatting ontwikkelen in ons land jaarlijks zo'n vijfhonderd tot tweeduizend werknemers beroepsastma. De meerderheid van deze patiënten herstelt niet volledig, zelfs niet na ettelijke jaren na de laatste blootstelling. Beroepsastma kan zelfs fataal zijn.

Allergie is een verzamelnaam voor een groep van ziekten die wordt veroorzaakt door ongewenste immuunreacties tegen lichaamsvreemde stoffen. Uiteindelijk kunnen die reacties leiden tot weefselontstekingen en een verminderd functioneren van het lichaam. Deze stoffen, allergenen genoemd, komen voor in voedsel en in de ingeademde lucht of dringen via de huid het lichaam binnen. Allergie ontstaat door een zogenaamd bifasisch proces. In de eerste fase wordt na herhaalde blootstelling aan een allergeen een overgevoeligheid voor het betreffende allergeen opgebouwd (sensibilisatie). In de tweede fase ontstaat na verdere blootstellingen ('challenges' of 'provocaties') een versnelde en sterkere immuunreactie, die uiteindelijk kan leiden tot klinische symptomen.

## Testmethoden

Door de continue introductie van nieuwe chemicaliën op de werkplek en de ernstige gezondheidseffecten van luchtwegallergie, is een vroege opsporing van luchtwegallergenen uitermate belangrijk. Het is niet goed mogelijk om alleen op basis van de structuurformule te voorspellen of een stof luchtwegallergie kan veroorzaken. De meeste luchtwegallergenen zijn pas geïdentificeerd na (h)erkenning van luchtwegklachten bij blootgestelde werknemers. Om niet langer werknemers als proefdieren te laten fungeren, zijn daarom geschikte testmethoden nodig.

Het aantal bekende luchtwegallergenen neemt toe en omvat zowel groot-moleculaire

(meestal eiwitten; > 5.000 Dalton) als klein-moleculaire stoffen (< 5.000 Dalton; Dalton is een gewichtseenheid en komt overeen met 1/12e van het gewicht van een koolstofatoom). De laatstgenoemde moeten zich eerst binden aan een lichaamseiwit voordat ze allergene activiteit vertonen. Bekende voorbeelden van klein-moleculaire luchtwegallergenen zijn diisocyanaten, bepaalde kleurstoffen en zure anhydriden. Deze stoffen worden veel in de industrie gebruikt.

De ontwikkeling van testmethoden voor de identificatie van dergelijke luchtwegallergenen wordt bemoeilijkt omdat een goede definitie van beroepsastma ontbreekt. De oorzaak hiervan ligt in een slecht begrip van werkingsmechanismen en verwarring over terminologie. Uit epidemiologisch onderzoek is gebleken dat irriterende, niet allergene, klein-moleculaire stoffen een allergische luchtwegreactie sterk kunnen beïnvloeden, zeer waarschijnlijk door het opwekken van ontstekingsreacties in de luchtwegen. Daarnaast kunnen irriterende stoffen luchtwegklachten veroorzaken die lijken op luchtwegallergie, waardoor het vaak moeilijk is om luchtwegirritatie te onderscheiden van luchtwegallergie. De huidige regelgeving maakt dan ook geen duidelijk onderscheid tussen verschillende mechanismen die tot dezelfde klinische symptomen leiden.

## Nieuwe teststrategie

Er bestaat een aantal testen om stoffen te onderzoeken op hun allergene potentie. Elke test richt zich slechts op één bepaald aspect van (luchtweg)allergie, maar de testen kunnen tezamen een goede indruk van de allergene potentie van een stof, en dus een goede teststrategie vormen.

TNO Voeding ontwikkelde in samenwerking met dr. N. Bloksma van de Rijksuniversiteit van Utrecht zo'n strategie. De eerste stap is de 'Local Lymph Node Assay' (LLNA), een test die de allergene eigenschappen van een stof voorspelt. Het is een test om na te gaan of een stof sensibiliseert nadat deze is aangebracht op de huid. Een aantal rattenstammen werd getest om een indruk te krijgen van de

invloed van genetische verschillen op sensibilisatie. De dieren kregen een behandeling met een van de volgende modelstoffen: trimellietzuuranhydride (TMA; bekend luchtwegallergeen), 2,4-dinitrochlorbenzeen (DNCB; bekend huidallergeen), methylsalicylaat (MS; huidirriterende stof zonder allergene eigenschappen) of formaldehyde (FA; huidallergeen en mogelijk ook luchtwegallergeen). In alle vijf de rattenstammen, waaronder Wistar en Brown Norway (BN), werden de stoffen correct geclassificeerd. De BN-rat leek het minst gevoelig, dat wil zeggen, de relatieve respons in deze stam was duidelijk minder dan die bij de andere stammen. Dit betekent dat bij marginale resultaten hogere doseringen moeten worden genomen voor testen op de BN-rat, of dat de onderzoekers voor een andere stam moeten kiezen. Het feit echter dat alle rattenstammen goede resultaten in de LLNA lieten zien, suggereert dat de LLNA een betrouwbare test is. Echter, omdat zowel een huidallergeen (DNCB) als een luchtwegallergeen (TMA) positief was in de LLNA, is deze test niet geschikt voor het maken van een onderscheid tussen huid- en luchtwegallergenen: daarvoor is verder onderzoek nodig.

## Blootstelling via huid en luchtweg

De IgE-test berust op het vermogen van een luchtwegallergeen om na huidapplicatie de immuunglobuline E (IgE)-spiegel te verhogen. Van de twee rattenstammen heeft de BN-rat een goede IgE-respons ('high IgE-respondering'); de andere geselecteerde stam, de Wistar-rat, is 'low IgE-respondering'. Deze twee stammen werden, gebruikmakend van TMA, DNCB, MS en FA, getest op hun vermogen om IgE-spiegels in het serum te verhogen. De 'high IgE-respondering' BN-rat vertoonde verhoogde IgE-spiegels in het serum na huidapplicatie van TMA, maar niet na huidapplicatie van DNCB, FA of MS. De 'low IgE-respondering' Wistar-rat vertoonde geen enkele maal verhoogde IgE-spiegels. Deze resultaten geven aan dat het meten van het totaal-IgE-gehalte in 'high IgE-responders' een geschikte >>

manier is om (sterke) luchtwegallergene activiteit van stoffen vast te stellen.

De volgende vraag is: als het opbrengen van een allergeen op de huid leidt tot verhoogde IgE-gehalten in het serum, betekent dat dan ook dat inhalatoire blootstelling (provocatie of challenge) aan hetzelfde allergeen leidt tot functionele en histologische veranderingen van de luchtwegen? De resultaten van de studies met TMA, DNCB en MS wezen erop dat dit inderdaad zo is. Inhalatoire blootstelling aan TMA van met TMA-geïmmuniseerde BN-ratten leidde tot functionele veranderingen, namelijk een vertraagde ademfrequentie en een verandering van het adempatroon tijdens de blootstelling, een toegenomen ademfrequentie en een verlaagd teugvolume 24 en 48 uur na de blootstelling, alsmede a-specifieke luchtweghyperreactiviteit 24 uur na de blootstelling. In het longspoelsel waren de aantallen eosinofielen en neutrofielen en de hoeveelheden eiwit, lactaatdehydrogenase en N-acetyl-glucosaminidase verhoogd. De histologische veranderingen bestonden uit ontstekingshaarden in de luchtwegen, gekenmerkt door infiltratie van witte bloedcellen karakteristiek voor astma (eosinofielen) rond de kleine bronchiën en bloedvaten, en een toename in aantal en een vergroting van de slijmbekercellen. Naast deze met allergische astma geassocieerde ziekteverschijnselen vonden de onderzoekers bloedingen en ontstekingen in de longen die wezen op een andere allergische luchtwegaandoening (extrinsieke allergische alveolitis; EAA). Verder troffen zij in het strottenhoofd (larynx) een karakteristieke ontsteking (laryngitis) aan. Blootstelling van TMA-geïmmuniseerde Wistar-ratten aan TMA leidde daarentegen niet tot functionele reacties. Ook met allergische astma geassocieerde ziekteverschijnselen bleven uit. Wel werden op EAA gelijkende ontstekingen in de longen aangetroffen, alsmede een karakteristieke ontsteking van de larynx. Bovendien resulteerde zowel sensibilisatie aan de huid als inhalatoire blootstelling aan het typische huidallergeen DNCB in laryngitis, althans bij Wistar-ratten. Het verschil in luchtwegpathologie was goed verklaarbaar op basis van het verschil in genetische aanleg van de twee gebruikte rattenstammen.

Hoewel extrinsieke allergische alveolitis noch allergische laryngitis luchtwegvernauwing met zich meebrengen, als gevolg van contractie van gladde spieren – zoals bij astma –, zijn de twee toch belangrijke allergische beroepsziekten die uiteindelijk ook tot ernstige benauwdheid kunnen leiden. Aanmendend dat de Wistar-rat model staat voor een bepaald deel van de beroepsbevolking (namelijk voor de ‘on gevoelige’ personen),

betekent dit dat deze personen ook gesensibiliseerd kunnen worden en ontstekingen in de luchtwegen kunnen vertonen. Dit houdt tevens in dat beroepsallergie niet is te voorkomen door gevoelige (atopische) personen de toegang te ontzeggen tot werkplekken waar blootstelling aan luchtwegallergenen kan plaatsvinden. Iedere werknemer, gevoelig of ongevoelig, loopt immers risico. Een verdere conclusie is dat inademing van typische huidallergenen een risico vormt voor luchtwegallergie.

## Irritatie en allergie

Uit bovengenoemde en andere dierstudies is gebleken dat het opbrengen van de stof op de huid een heel effectieve manier is om de luchtwegen te sensibiliseren. Dit suggereert dat deze route een belangrijk risico is voor het ontwikkelen van luchtwegallergie in de mens. Hierover is nog steeds discussie gaande. Het omgekeerde, namelijk een huidreactie tegen luchtwegallergenen, is al wel geaccepteerd en is in feite de basis van de zogenoemde ‘skin prick test’. Hoewel er sterke aanwijzingen zijn dat huidblootstelling kan leiden tot luchtwegsensibilisatie en vice versa, is niet bekend wat het effect van de sensibilisatieroute is op het type allergie en op dosis-responsrelaties. Bijvoorbeeld, huidcontact in de IgE test vereist een drie tot dertig maal hogere dosis voor het opwekken van IgE dan nodig is voor algemene sensibilisatie/immunisatie. Dit zou kunnen impliceren dat via de huid hogere doses nodig zijn voor antilichaam (IgE)-gemedieerde dan voor cel-gemedieerde allergische reacties. In termen van risicoschatting: lokale hoge doses allergeen, zoals bij morsen op de huid, zijn een mogelijk risico voor het ontwikkelen van IgE-gemedieerde luchtwegallergie.

## Morsen op de huid mogelijk risico voor luchtwegallergie

Zijn de door allergeen geïnduceerde veranderingen in de luchtwegen te onderscheiden van de door irritatie geïnduceerde veranderingen? TMA-provocatie van met TMA-geïmmuniseerde BN-ratten induceerde een voor astma kenmerkend adempatroon dat goed te onderscheiden was van door irritatie veroorzaakte veranderingen in controledieren. Eerst-

genoemde dieren vertoonden langere in- en uitademingstijden. Ook traden er pauzes op van onregelmatige duur tussen een variabel aantal ademhalingen. Dit leidde tot een verlaagde ademfrequentie. Het door irritatie veroorzaakte ademhalingspatroon van niet-geïmmuniseerde ratten bestond uit een spitse in plaats van een golvende vorm en uit een geringe toename van de duur van de pauze tussen elke ademhaling aan het eind van de uitademing. De duur van de pauze nam toe met de TMA-concentratie. Daardoor nam ook de frequentie af bij hoge concentraties TMA. Tevens was het mogelijk de concentratie vast te stellen waarbij geen acute luchtwegirritatie meer waarneembaar was. De conclusie is dan ook dat het onderscheid tussen door TMA-geïnduceerde allergische luchtwegreacties en irritatiereacties zeer wel te maken is. Het verdient daarom aanbeveling luchtwegreacties van geïmmuniseerde dieren altijd te vergelijken met die van niet-geïmmuniseerde dieren.

Met de hierboven beschreven teststrategie was het mogelijk om een luchtwegallergeen (trimellietzuuranhydride of TMA) te onderscheiden van een typisch huidallergeen (dinitrochlorobenzeen of DNCB) en een irriterende, niet-allergene stof (methyalsalicylaat). Testen met andere (luchtweg)allergenen zullen moeten uitwijzen in hoeverre de ontwikkelde teststrategie algemeen bruikbaar is. ■

**Josje Arts en Frieke Kuper**  
onderzoekers TNO Voeding, Zeist