

**Healthy Living**

Princetonlaan 6  
3548 CB Utrecht  
The Netherlands

[www.tno.nl](http://www.tno.nl)

T +31 88 866 42 56

**TNO-rapport****TNO2020 R10180****Aantonen van blootstelling aan het di-  
isocyaan HDI en HDI-prepolymeren**

Datum	10 maart 2020
Auteur(s)	E.R. Verheij
Goedgekeurd door	M.A.J. Rennen
Exemplaarnummer	-
Oplage	-
Aantal pagina's	31
Aantal bijlagen	-
Opdrachtgever	RIVM
Projectnaam	HDI Defensie WP7.1
Projectnummer	060.34380

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van TNO.

Indien dit rapport in opdracht werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de Algemene Voorwaarden voor opdrachten aan TNO, dan wel de betreffende terzake tussen de partijen gesloten overeenkomst.

Het ter inzage geven van het TNO-rapport aan direct belanghebbenden is toegestaan.

© 2020 TNO

Dit rapport maakt onderdeel uit van een serie van acht rapporten over het onderzoek naar HDI uit CARC op de POMS-locaties van Defensie. Dit rapport bevat geen afzonderlijke publiekssamenvatting. Een overkoepelende publiekssamenvatting van de acht rapporten is te vinden op de website van het RIVM:

“CARC op de POMS-locaties van Defensie: blootstelling en gezondheidsrisico's. Bevindingen uit het onderzoek op hoofdlijnen, met speciale aandacht voor het bestanddeel HDI”

[RIVM Rapport 2020-0017](#)

## Samenvatting

Dit rapport beschrijft de mogelijkheden om de arbeidsgerelateerde blootstelling aan het di-isocyaan hexamethyleen di-isocyaan (HDI) en HDI-prepolymeren aan te tonen middels laboratorium onderzoek, en daarmee een antwoord te geven op de onderzoeksvraag: "Kan blootstelling aan HDI of HDI-prepolymeren in het lichaam worden aangetoond/gemeten (zowel tijdens de blootstellingsperiode als achteraf)?"

Op een aantal manieren kan blootstelling worden aangetoond. De eerste is een analytisch-chemische bepaling van de stof, of van één of meer metabolieten, in lichaamsvloeistoffen of weefsels. De tweede is de bepaling van specifieke biomarkers die ontstaan als reactie op de blootstelling aan HDI.

Voor de beantwoording van de onderzoeksvraag volgens de eerste methodiek is het essentieel om te weten wat er met HDI in het lichaam gebeurt: metabolisme, de verdeling over het lichaam en de uitscheidingsroutes. Heel kort samengevat zijn de belangrijkste processen bij blootstelling aan HDI:

- Ontleding van HDI door reactie met water tot het corresponderende di-amine HDA.
- Reacties met laagmoleculaire stoffen, bijvoorbeeld glutathion, en eiwitten waardoor covalent gebonden eiwit-adducten ontstaan. Relevante eiwitten voor dit onderzoek naar HDI zijn keratine (huid), albumine (plasma) en hemoglobine (bloed).
- Door deze ontleding en adductvorming verdeelt HDI zich niet over het lichaam
- HDA en zijn metabolieten (waarbij N-acetylering de belangrijkste route is) verdelen zich wel over het lichaam.
- HDA metabolieten worden voornamelijk door uitscheiding in de urine geëlimineerd. Dit is een efficiënt proces waardoor concentraties van metabolieten in bloed laag zijn.
- Eiwit-adducten van HDI worden afgebroken, en de producten worden ook voornamelijk via de urine geëlimineerd.
- De eliminatie via de urine verloopt bijzonder snel, de halfwaardetijd van metabolieten in urine is ca. 2 uur. De eliminatie van de eiwitadducten verloopt trager, dagen tot weken, en maanden voor hemoglobine adducten.

Bovenstaande verklaart waarom de analyse van HDA in urine in alle onderzoeken naar blootstelling aan HDI toegepast is. In de literatuur zijn een stuk of 10 methodes beschreven waarbij gebruik wordt gemaakt van gaschromatografie of vloeistofchromatografie met massaspectrometrische detectie (GC-MS of LC-MS). Een essentiële stap in die methode is de hydrolyse van metabolieten en adducten tot HDA waardoor een totaal, en niet alleen vrij, HDA gehalte gemeten wordt. De detectiegrenzen van deze methodes zijn veel minder dan 1 µg/l. Dat is voldoende laag om gehalten in urine van enkele tot tientallen µg/l na arbeidsgerelateerde blootstelling van werknemers te kunnen meten. Voor toepassing als biomonitoringmethode is het van belang dat urinemonsters direct na uitvoering genomen worden. De correlatie tussen de gemeten HDA concentratie en de HDI concentratie in de lucht op de werkplek is matig. Ondanks de matige kwantitatieve relatie tussen de HDA concentratie en de HDI blootstelling (gehalte in de lucht) worden in Duitsland en Engeland hiervoor wel normen voor biomonitoring gehanteerd. In Duitsland wordt een biologische grenswaarde (BGW) van 15 µg HDA per gram kreatinine gehanteerd als norm voor een werkplekgrenswaarde van 0,035 mg/m<sup>3</sup> (Leng, 2015). Vergelijkbare waarden worden in het Verenigd Koninkrijk

gehanteerd: hier wordt voor alle di-isocyanaten, dus niet specifiek HDI, een norm van 1  $\mu\text{mol}$  van het corresponderende di-amine per mol kreatinine, ofwel circa 1  $\mu\text{g}$  per gram kreatinine, gehanteerd als indicator voor blootstelling (HSE, 2005).

De analyse van HDA in urine is alleen geschikt om blootstelling aan HDI aan te tonen als monsters snel na beëindiging van de blootstelling genomen worden. Na een dag is HDA niet of nauwelijks meer meetbaar.

Eiwitadducten zijn in dat kader interessant omdat bepaalde eiwitten een relatief lange halfwaardetijd hebben, zoals albumine (19 dagen), keratine in de opperhuid (ca 1 maand) en hemoglobine (ca. 63 dagen, strikt genomen is dit geen halfwaardetijd, maar de helft van de levensduur van hemoglobine). Er zijn een aantal publicaties die succesvol aantonen dat adducten aan deze eiwitten gemeten kunnen worden na HDI-blootstelling, echter in geen van die onderzoeken is uitgezocht hoe lang dat na blootstelling kan. Mogelijk is een termijn van weken (albumine) tot enkele maanden (hemoglobine) dan haalbaar indien de adducten chemisch stabiel zijn. Het is door het ontbreken van voldoende data niet mogelijk om adductmetingen te vertalen naar een kwantitatieve maat van blootstelling.

De urine-analyse en adductmetingen zijn de enige directe chemische bepalingsmethodes die in de literatuur gevonden zijn voor het meten van beroepsmatige blootstelling aan HDI in het lichaam.

De tweede, indirecte, manier om blootstelling te meten is via biomarkers die als reactie op de blootstelling gevormd worden. In deze categorie zijn de antilichamen IgG en IgE gevonden als meest geschikte biomarkers. Blootstelling aan HDI (en prepolymeren) leidt zoals genoemd tot de vorming van eiwitadducten, bijvoorbeeld met albumine. Deze eiwitadducten kunnen resulteren in een reactie van het immuunsysteem, waarbij het HDI-eiwit adduct als lichaamsvreemde stof (antigeen) wordt herkend waarbij antigeen-specifieke T cel activatie kan leiden tot aanmaak van IgG antilichamen. Naast deze reacties kan ook sensibilisatie optreden waarbij IgE antilichamen gevormd worden. Deze antilichamen kunnen met serologische bepalingen gemeten worden.

Grote voordelen van serologische assays zijn dat ook enige tijd (aantal maanden) na beëindiging van de HDI-blootstelling deze nog aangetoond kan worden. Bovendien kan ook blootstelling worden aangetoond die gemist zou kunnen zijn met lucht sampling indien de blootstelling bv. via de huid heeft plaatsgevonden. Echter, deze bepalingen hebben ook een aantal nadelen. Ten eerste zijn er door methodologische oorzaken veel vals-negatieve testresultaten. De belangrijkste oorzaken hiervoor zijn 1) dat er meerdere (non-)immuun reacties al dan niet gelijktijdig kunnen optreden, waardoor de mogelijkheid bestaat dat er in de individuele gevallen getoetst wordt op verkeerde eindpunten (bv. IgE kan alleen in een minderheid van HDI-astmatische patiënten worden aangetoond), en 2) dat niet het juiste antigeen (verkeerd gekozen lichaamseigen eiwit voor het genereren van de eiwitadduct) gebruikt wordt en daardoor niet wordt herkend door de antilichamen. Ten tweede kan er sprake zijn van vals-positieve testresultaten als gevolg van kruisreactiviteit: iemand die is blootgesteld aan een ander di-isocynaat kan positief testen op een serologische bepaling op HDI-specifieke antilichamen. Tenslotte is het van belang dat de serologische bepalingen binnen een bepaalde tijd na de beëindiging van de blootstelling uitgevoerd moeten worden aangezien de antilichamen uit de circulatie

verdwijnen. In de geraadpleegde literatuur wordt een halfwaardetijd van serum IgG van 1 maand aangegeven.

In het geval dat sensibilisatie heeft plaatsgevonden kan ook gebruik gemaakt worden van het geheugen van het immuunsysteem. Dit gebeurt met specifieke provocatietesten zoals plak-, huidprik- en inhalatietesten. In deze provocatietesten wordt een persoon bewust opnieuw blootgesteld aan de stof of een geschikt antigeen (HDI gemodificeerd albumine). Als deze persoon gesensibiliseerd is, zoals het geval is bij HDI-geïnduceerde allergische astma, rhinitis of dermatitis, kan de hernieuwde blootstelling leiden tot een immunologische reactie. De meest gebruikte specifieke provocatietest in het onderzoek naar isocyanaten en allergische astma is blootstelling via de luchtwegen door inhalatie. Deze test is de gouden standaard in de diagnose van beroepsastma. Parallel aan de provocatietest worden ook serologische bepalingen gedaan.

Provocatietesten hebben een aantal nadelen. Een belangrijk nadeel is dat ze niet algemeen toepasbaar zijn maar alleen bij mensen die gesensibiliseerd zijn. Daarnaast zijn het complexe intensieve testen die vaak meerdere dagen duren en alleen in een aantal specialiseerde centra onder medische begeleiding uitgevoerd worden. In Nederland zijn deze testen niet gebruikelijk. Als niet met het juiste antigeen getest wordt leidt dat tot een vals negatief resultaat.

Het belangrijkste voordeel van deze testen is dat deze de enige mogelijkheid zijn om lang na beëindiging van de blootstelling aan te tonen dat er blootstelling heeft plaatsgevonden. Op basis van gegevens in de literatuur is dat na 5 tot 10 jaar nog mogelijk.

Serologische bepalingen en provocatietesten geven bij een positief testresultaat geen kwantitatieve informatie over de mate van blootstelling. Het testresultaat wordt namelijk alleen bepaald door de individuele gevoeligheid en de respons op blootstelling.

## Inhoudsopgave

	<b>Samenvatting</b> .....	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Inleiding</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Methode</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Achtergrondinformatie over HDI</b> .....	<b>9</b>
3.1	Wat is HDI? .....	9
3.2	Wat is HDA? .....	10
3.3	Wat gebeurt er met HDI en prepolymeren in het lichaam? .....	10
3.4	Biomarkers .....	15
<b>4</b>	<b>Aantonen van blootstelling aan HDI</b> .....	<b>17</b>
4.1	Tijdens/kort na blootstelling .....	17
4.2	Retrospectief, niet direct na blootstelling .....	19
<b>5</b>	<b>Conclusie</b> .....	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>Referenties</b> .....	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>Ondertekening</b> .....	<b>31</b>

# 1 Inleiding

Het ministerie van Defensie heeft aan het RIVM gevraagd om te onderzoeken wat de mogelijke effecten voor de gezondheid zijn voor (ex-) medewerkers van Defensie na gebruik van chroom-6 en Chemical Agent Resistant Coating (CARC): “Gezondheidsonderzoek gebruik gevaarlijke stoffen bij Defensie; POMS, chroom-6 en CARC”.

Alle belanghebbenden, zoals (ex-)medewerkers van Defensie, vakbonden, ministerie van Defensie, register-experts, letselschadeadvocaten, Onderzoeksraad voor de Veiligheid en Nederlands Centrum voor Beroepsziekten, zijn uitgenodigd om hun vragen voor het onderzoek door te geven. Deze vragen vormen de basis van het onderzoek en zijn gebundeld in een kortere lijst van onderzoeksvragen.

Het RIVM coördineert het onderzoek en betreft op basis van de onderzoeksvragen bij het onderzoek ook andere organisaties en externe onderzoekers met relevante kennis voor zover nodig om het onderzoek zorgvuldig uit te voeren. De betrokken organisaties zijn:

- RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu)
- Universiteit Utrecht
- TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)
- Universiteit Maastricht

Het onderzoek wordt begeleid door een Paritaire Commissie bestaande uit vier vertegenwoordigers van zowel werkgevers- als werknemerszijde, een onafhankelijk voorzitter en een onafhankelijk (wetenschappelijk) expert. De Paritaire Commissie stelt ook vast welke onderzoeksvragen onderzocht en beantwoord moeten worden. Het onderzoek wordt getoetst door een inhoudelijke klankbordgroep.

In een eerder onderzoek is de onderzoeksvraag “Kan blootstelling aan chroom-6 in het lichaam worden aangetoond/gemeten (zowel tijdens blootstellingsperiode als achteraf)?”, beantwoord (TNO, 2016). Op de POMS-sites is ook gewerkt met andere stoffen die schadelijk voor de gezondheid zijn, waaronder Chemical Agent Resistant Coating (CARC). In een onderzoek van het RIVM (RIVM, 2018) is geconcludeerd dat HDI (hexamethyleen diisococyaan) en de HDI-prepolymeren de hoogste prioriteit hebben voor vervolgonderzoek naar CARC.

Deze rapportage geeft een overzicht van de relevante informatie voor de beantwoording van de volgende onderzoeksvraag:

“Kan blootstelling aan HDI of HDI-prepolymeren in het lichaam worden aangetoond/gemeten (zowel tijdens de blootstellingsperiode als achteraf)?”

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Ministerie van Defensie, in het kader van het “Gezondheidsonderzoek gebruik gevaarlijke stoffen bij Defensie; POMS, Chroom-6 en CARC”.

## 2 Methode

Voor de beantwoording van de onderzoeksvraag is gebruik gemaakt van literatuuronderzoek. Een belangrijke bron in dat onderzoek is een document van Office of Environmental Health Hazard Assessment uit 2017 (OEHHA, 2017). Daarnaast is via PubMed, Scopus en internet (Google) gezocht naar publicaties waarin beschreven wordt hoe blootstelling aan HDI en HDI-prepolymeren gemeten kan worden. De gebruikte zoektermen waren HDI, biomonitoring, analysis, biomarkers, en mogelijk relevante matrices als urine, blood/plasma, hair. Naast zoekopdrachten is ook gebruik gemaakt van citaties in publicaties, en 'geciteerd door' informatie.

Idealiter wordt blootstelling aan (toxische) verbindingen bepaald door het meten van de verbinding in makkelijk te bemonsteren lichaamsvloeistoffen/weefsels. Indien een stof grotendeels of volledig in het lichaam wordt omgezet is het ook mogelijk om de metabolieten te bepalen. Een belangrijke voorwaarde is dat de metabolieten specifiek zijn voor de verbinding waaraan blootstelling heeft plaatsgevonden, en geen andere oorsprong kunnen hebben. Of dit voor HDI mogelijk is hangt in sterke mate af van de eigenschappen van HDI en wat er met HDI bij blootstelling in het lichaam gebeurt. Belangrijke aspecten zijn de blootstellingsroute, de opname van HDI, de verdeling over het lichaam, het metabolisme, de uitscheidingsroute(s) en de snelheid waarmee de eliminatie verloopt. Middels literatuuronderzoek is deze informatie verzameld (zoektermen HDI, metabolisme). Daarbij is ook in belangrijke mate gebruik gemaakt van het RIVM rapport (RIVM, 2020) waarin deze aspecten worden beschreven en eerder genoemd OEHHA document.


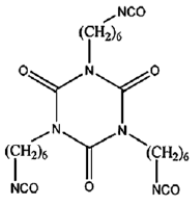
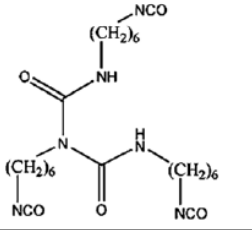
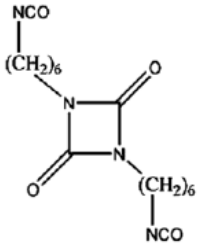
Naast analytisch-chemische bepalingen van HDI en/of metabolieten is ook onderzoek gedaan naar andere biomarkers die gevormd worden als reactie op blootstelling aan HDI. Voor een geschikte biomarker geldt dat deze, net als voor metabolieten, specifiek moet zijn voor de stof waaraan iemand is blootgesteld.



## 3 Achtergrondinformatie over HDI

### 3.1 Wat is HDI?

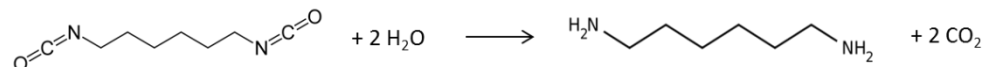
HDI is een di-isocyaanaat, een stof met twee isocyaanaat groepen (zie Figuur 1 voor de structuur). In combinatie met polyolen vormt HDI een polymeer (polyurethaan) door reactie met de hydroxylgroepen (-OH). De belangrijkste toepassingen van HDI zijn in verf, coatings en kisten. De jaarlijkse productie ligt tussen de 10.000 tot 100.000 ton (ECHA). Vanwege de schadelijkheid voor de gezondheid wordt HDI niet meer als zodanig toegepast maar in de vorm van prepolymeren (zie Figuur 1) die een lagere dampspanning hebben en daardoor minder vluchtig zijn.

Stof	Structuurformule
HDI 1,6-Hexamethyleen diisocyaanaat	
HDI isocyanuraat (prepolymeer)	
HDI biuret (prepolymeer)	
HDI uretidon (prepolymeer)	

Figuur 1 Structuurformules van HDI en drie HDI-prepolymeren

Deze prepolymeren bevatten ook isocyaanaat-groepen voor verdere polymerisatie. Tevens bevatten de prepolymerproducten vaak nog 1 à 2% vrij HDI. Bij de verwerking van deze producten kunnen de prepolymeren en vrij HDI in de lucht komen door verdamping, en vooral bij spuiten, waardoor blootstelling kan optreden. De mate en route van blootstelling is afhankelijk van de aard van het product, de verwerkingsmethode, beheersmaatregelen, en duur van de werkzaamheden. De belangrijkste blootstellingsroutes zijn via de ademhaling en de huid. Bij inademing van deze stoffen komen deze ook in speeksel terecht waardoor ook orale blootstelling plaatsvindt.

Een belangrijke eigenschap van HDI is dat het in contact met water door hydrolyse ontleedt tot 1,6-hexaandiamine (HDA) en CO<sub>2</sub> (Figuur 2).



Figuur 2 Hydrolyse van HDI tot HDA en CO<sub>2</sub>.

Bij blootstelling waarbij HDI in een fysiologisch milieu komt zal deze hydrolyse tot HDA optreden. Dit is vooral het geval bij inhalatoire en orale blootstelling omdat het slijmvlies in de luchtwegen en speeksel veel water bevatten. Dit betekent dat blootstelling aan HDI feitelijk voor een belangrijk deel blootstelling aan HDA is. In dat licht is het van belang te weten wat HDA is.

### 3.2 Wat is HDA?

HDA wordt op grote schaal gesynthetiseerd, en is door ECHA ingedeeld in de categorie van chemicaliën waarvan de jaarproductie ligt tussen 100.000 – 1.000.000 ton. De werkelijke productie ligt aan de bovenkant van dit bereik. De industriële toepassingen van HDA zijn de productie van Nylon 66 en HDI (inclusief HDI prepolymeren). Andere toepassingen van HDA zijn niet bekend. Deze stof komt niet voor in het milieu, consumentenproducten en voeding. De achtergrondblootstelling is daardoor verwaarloosbaar dan wel niet aanwezig. Alleen personeel dat werkzaam is bij bedrijven die HDA produceren of verwerken kan aan deze stof blootgesteld worden. Door de ontleding van HDI tot HDA (zie hierboven) geldt dit ook, indirect, voor personeel in de HDI verwerkende industrie/bedrijfstacken. Dat er geen achtergrondblootstelling aan HDA is wordt onderbouwd door de observatie dat in metingen van HDA in urine deze stof niet wordt aangetroffen indien er geen beroepsmatige blootstelling is geweest aan HDI (of HDA).

### 3.3 Wat gebeurt er met HDI en prepolymeren in het lichaam?

Om de onderzoeksvraag te beantwoorden is het van belang om te weten wat er met HDI en de diverse prepolymeren gebeurt in het lichaam. Helaas is dit voor de prepolymeren grotendeels onbekend en wordt HDI als surrogaat voor de prepolymeren beschouwd (OEHHA, 2017).

Deze paragraaf beschrijft de kinetiek van HDI, d.w.z. de opname bij blootstelling, de verdeling over het lichaam, het metabolisme en de eliminatie uit het lichaam. Omdat HDI, in tegenstelling tot de meeste stoffen waaraan mensen worden blootgesteld, instabiel en reactief is, wordt dit ook beschreven.

#### 3.3.1 Reactiviteit van HDI

Alle isocyanaten, en daarmee ook HDI, zijn alleen onder bepaalde omstandigheden stabiel. In de aanwezigheid van water ontleden isocyanaten tot het corresponderende amine en koolzuur (Figuur 2). Als HDI bij water wordt gevoegd vormt het olieachtige druppels en is het binnen 30 minuten voor 90% gehydrolyseerd. Deze ontleding geschiedt op het grensvlak van de HDI druppel en water en de omzettingssnelheid is daardoor afhankelijk van de verhouding van de oppervlakte en het volume van de druppels; hoe kleiner de druppels hoe sneller deze reactie verloopt. Voor opgelost of fijn gedispergeerd HDI in waterig milieu gaat deze hydrolyse aanzienlijk sneller.

Uit HDI wordt op deze wijze 1,6-hexaandiamine (HDA) gevormd. Bij de inhalatoire en orale blootstelling aan relatief geringe hoeveelheden HDI wordt een groot deel van het HDI tot HDA omgezet door reactie met water in slijmvliezen, speeksel en de maag. Bij dermale blootstelling is het aannemelijk dat de huidvochtigheid een bepalende factor is voor de mate waarin dit gebeurt.

Bij zeer hoge blootstelling, bijvoorbeeld in geval van een calamiteit, is het waarschijnlijk dat een substantieel deel van het HDI niet op deze wijze snel wordt omgezet. Dit is niet onderzocht omdat dit buiten de doelstelling ligt van dit onderzoek naar de blootstelling onder reguliere werkomstandigheden.

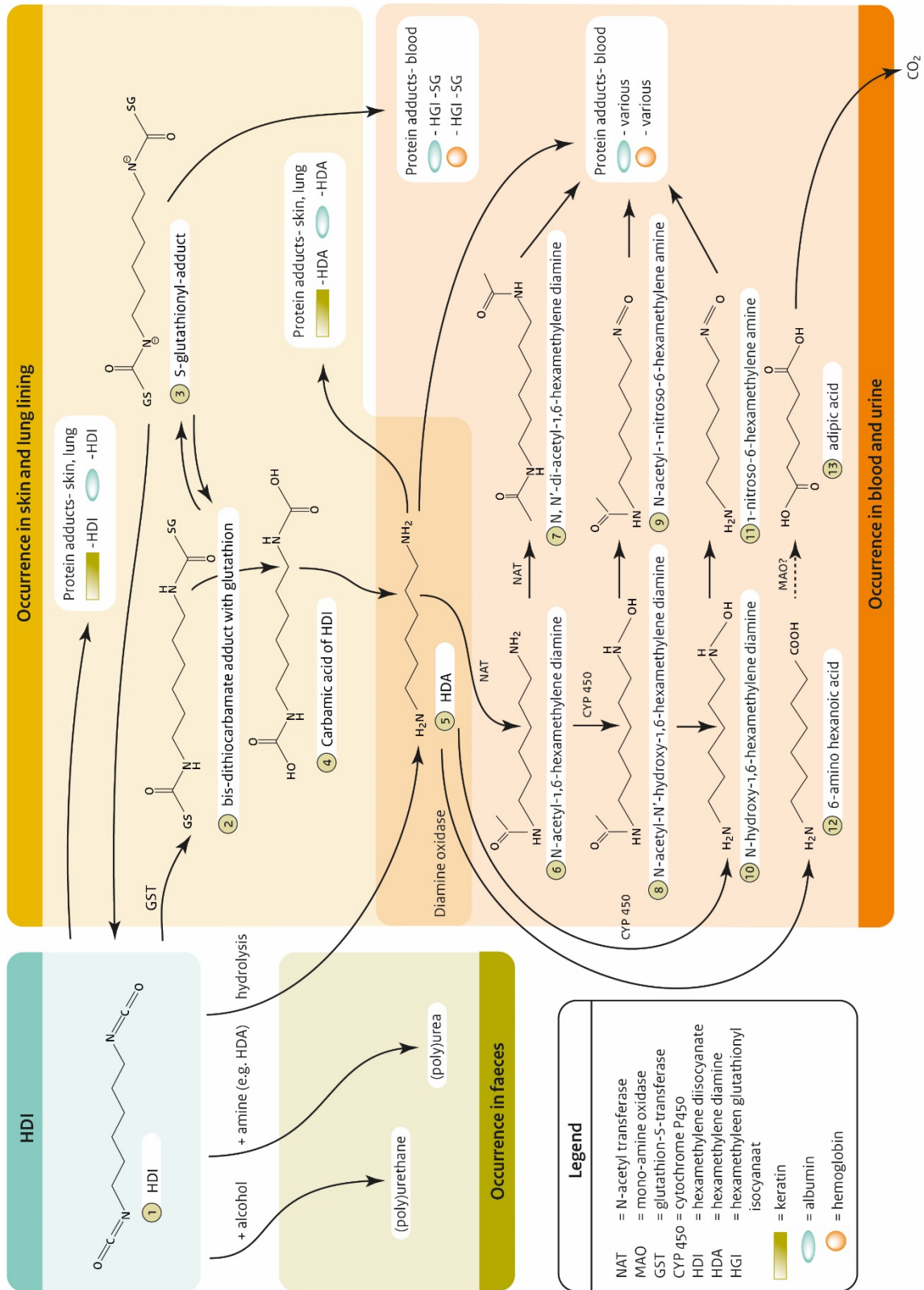
Naast water reageert HDI, net als andere isocyanaten, ook met andere verbindingen. De belangrijkste functionele groepen in deze verbindingen waarmee HDI reageert zijn hydroxyl (-OH), primaire en secundaire amine (-NH<sub>2</sub> en -NHR) en thiol/sufhydryl (-SH) groepen. Deze groepen zijn aanwezig in een breed scala aan laagmoleculaire endogene verbindingen zoals bijvoorbeeld aminozuren (-OH in serine en threonine, -NH<sub>2</sub> in lysine), glutathion (-SH) en suikers (-OH). Al deze groepen zijn ook aanwezig in alle eiwitten waardoor HDI via een reactie met deze groepen een covalente binding vormt met eiwitten, en zo leidt tot eiwit-adducten.

HDI kan ook met zijn eigen afbraakproduct HDA reageren tot oligomeren of zelfs polymeren. Bij lage blootstelling lijkt de kans dat dit gebeurt gering omdat er een (grote) overmaat aan andere verbindingen t.o.v. HDA aanwezig is.

De reactie met eiwitten is om twee redenen relevant. De eerste reden is dat de kinetiek van deze adducten anders is dan die van metabolieten en de reactieproducten met kleine moleculen. De tweede reden is dat eiwitadducten tot immunologische sensibilisatie kunnen leiden.

### 3.3.2 *Opname, verdeling en metabolisme van HDI*

Als gevolg van de reactiviteit is het niet waarschijnlijk dat bij inhalatoire en orale blootstelling intact HDI wordt opgenomen en systemisch beschikbaar komt. HDI zal daardoor de lever, het belangrijkste orgaan voor metabole omzettingen, niet bereiken. Lokaal kan metabolisme ook plaatsvinden, bijvoorbeeld als gevolg van het voorkomen van glutathion-S-transferase (GST) in de longen. In Figuur 3 is schematisch het metabolisme van HDI weergegeven, zoals is voorgesteld door Flack (2010b). Daarin staat als één van de eerste stappen de omzetting van HDI door GST tot het di-glutathion conjugaat van HDA. HDI kan ook direct reageren met de -SH groep in glutathion. Tevens hoeft dit niet *per se* te leiden tot het di-glutathion conjugaat, en wordt ook het mono-glutathion conjugaat gevormd.



Figuur 3 Metabolisme van HDI (RIVM, 2020), aangepast van Flack et al. (2010b; 2011) en Brorson et al. (1990a).

In het metabole schema in Figuur 3 zijn ook de eerder besproken hydrolyse tot HDA en de adductvorming met eiwitten weergegeven. Verder metabolisme van HDA en de glutathion conjugaten leidt tot de vorming van metabolieten die ook weer kunnen binden aan eiwitten. Dit verklaart waarom na blootstelling aan HDI, ook adducten van albumine in bloed en hemoglobine in de rode bloedlichaampjes aangetoond kunnen worden.

Een andere belangrijke metabole route is N-acetylering door het enzym N-acetyl transferase (NAT). Deze metabolieten hiervan, mono- en di-acetyl-HDA, worden ook in de urine uitgescheiden.

Het metabolisme weergegeven in Figuur 3 is niet volledig. Door Brorson (1990a) is ook de vorming van 6-aminohexaanzuur door het enzym diamine-oxidase gerapporteerd.

Omdat de hydrolyse van HDI tot HDA een belangrijk proces is bij blootstelling aan HDI is er in de literatuur ook gezocht naar publicaties over het metabolisme en de kinetiek van HDA. Helaas is hier weinig over bekend. Eén van de weinige bronnen is een ECHA dossier (nummer 16081) waarin de resultaten staan van een studie waarin ratten zijn blootgesteld aan <sup>14</sup>C-gelabeld HDA. Daarin is gevonden dat ca. 20% van de <sup>14</sup>C activiteit in de vorm van CO<sub>2</sub> wordt uitgescheiden. Dit is door Flack en Brorson niet gerapporteerd voor HDI, wellicht omdat de omzetting van HDA tot CO<sub>2</sub> wel bij de rat en niet bij de mens voorkomt: er zijn geen publicaties gevonden waarin met <sup>14</sup>C-gelabeld HDA of HDI onderzoek bij de mens is gedaan waarbij de uitgeademde lucht verzameld en geanalyseerd is.

Aangezien HDI snel hydrolyseert en reageert met andere verbindingen zal het zich niet verdelen over het lichaam. Dit geldt wel voor de afbraakproducten en metabolieten. HDA wordt goed opgenomen en kan zich via de bloedbaan verdelen over het lichaam. In eerder genoemd ECHA dossier 16081 is beschreven dat bij ratten de <sup>14</sup>C-activiteit in het totale lichaam wordt aangetroffen, met uitzondering van de hersenen. De meeste activiteit is aangetroffen in de lever, nieren en prostaat.

### 3.3.3 *Eliminatie van HDI*

De belangrijkste eliminatieroute van HDI-metabolieten is via de urine. Het is niet bekend of bij de mens eliminatie ook via de gal en uiteindelijk feces verloopt. In het eerder genoemde ECHA dossier over HDA is gerapporteerd dat deze stof bij ratten voor 47% via de nieren wordt uitgescheiden en voor 27% via de feces (en circa 20% via de longen als CO<sub>2</sub>). Op basis van chromatografische data bestaat 30% van de activiteit in urine uit HDA, de overige 70% bestaat uit metabolieten en HDA-adducten.

De halfwaardetijd van HDA in urine na inhalatie van HDI is bij de mens iets meer dan een uur: 1,2 uur volgens Brorson (1990b) en 1,5 uur volgens Maitre (1996). Na circa 7,5 uur was er geen HDA meer aantoonbaar in de urine in de studie van Brorson.; in de studie van Maitre was HDA na 15-20 uur nog aantoonbaar. Gaines (2010) en Flack (2010b) hebben gerapporteerd dat de eliminatie in twee fasen verloopt, de eerste snelle fase is waarschijnlijk van ongebonden HDA (en andere metabolieten) en de tweede tragere fase is waarschijnlijk van eiwitgebonden HDA.

De eliminatie van vrij HDA en metabolieten via de urine betekent dat de non-invasieve analyse van HDA in urine geschikt is om blootstelling aan HDI vast te kunnen stellen.

In een studie met vrijwilligers is aangetoond dat blootstelling aan het prepolymeer HDI-biuret ook leidt tot de aanwezigheid van HDA in de urine (Liu, 2004), waarbij de concentratie correleerde met het blootstellingsniveau. Bij blootstelling van verfspuiters aan het prepolymeer HDI-isocyanuraat is het hydrolyseproduct trisaminohexyl isocyanuraat (TAHI) gevonden in de urine (Robbins 2018). Dit betekent dat HDI-prepolymeren worden opgenomen en ook via de urine (deels) geëlimineerd worden. Daarmee is het mogelijk om middels analyse van urinemonsters ook blootstelling aan deze prepolymeren te bepalen.

### 3.3.4 *Kinetiek van HDI adducten*

#### Eiwitadducten van HDI

Alle eiwitten in het lichaam hebben een zekere levensduur. Voor veel intracellulaire en (cel)membraangebonden eiwitten is deze in de orde van 1 à 2 dagen. Overtollige of beschadigde intracellulaire eiwitten worden door het ubiquitine-proteasoom systeem afgebroken tot peptiden van circa 8 aminozuren. Deze peptiden worden vervolgens afgebroken tot aminozuren, welke weer beschikbaar komen voor eiwitsynthese. Een aminozuur met een adduct is niet beschikbaar voor eiwitsynthese omdat het niet als zuiver aminozuur herkend wordt. Wat er in dit systeem van aminozuur hergebruik precies gebeurt met peptiden met een HDI adduct is niet duidelijk. Er is een aantal mogelijkheden:

- 1) Het peptide met het adduct wordt niet of onvolledig afgebroken, en het peptide wordt uit de cel verwijderd (naar het bloed).
- 2) Het peptide met het adduct wordt wel volledig afgebroken, waarna het aminozuur met het adduct uit de cel wordt verwijderd.
- 3) Het adduct wordt in de cel van het peptide of aminozuur afgesplitst (tot HDA ingeval van HDI), waarna het, eventueel na verdere metabole omzettingen, uit de cel wordt verwijderd.

Het exacte verloop van dit proces hangt onder andere af van het type adduct, het eiwit, de locatie van het adduct in het eiwit, het type cel (in het bijzonder de metabole capaciteit van de cel). Dit is niet bekend voor HDI/HDA eiwitadducten (en ook niet voor andere adductvormende verbindingen). Voor dit onderzoek volstaat dat deze processen uiteindelijk leiden tot de eliminatie van peptide/aminozuur-adducten en/of het ontbonden adduct naar de bloedbaan, waarna deze, na eventueel verder metabolisme in de lever, via de urine en/of feces uitgescheiden worden.

Voor extracellulaire eiwitten zijn er andere, veelal specifieke, systemen voor het recyclen van eiwitten. Voor het doel van dit onderzoek gaat het te ver om deze allemaal in detail te behandelen en volstaat de conclusie dat ook deze processen leiden tot het systemisch beschikbaar komen van aminozuur/peptide-adducten van HDI en mogelijk ook HDA zoals hierboven beschreven is. Eenmaal systemisch beschikbaar worden deze verder gemetaboliseerd en uitgescheiden in de urine en/of feces.

Deze eliminatie van de eiwit-adducten via de urine is de eerder genoemde tweede fase (vorige paragraaf).

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag of blootstelling aan HDI tijdens of kort, maar in het bijzonder ook langer, na de blootstelling gemeten kan worden is het van belang om de levensduur van eiwitten te kennen. Indien eiwitten bijzonder stabiel zijn (doordat ze in mindere mate of geheel niet onderhevig zijn aan het eiwit recyclingproces) is de analyse van HDI-adducten van deze eiwitten mogelijk een middel om blootstelling na langere tijd te kunnen vaststellen. Dit wordt in paragraaf 4.2 behandeld.

Een nadeel van de analyse van eiwitadducten in bijvoorbeeld bloed, in vergelijking met de analyse van HDA (en/of andere metabolieten) in urine, is dat dit een invasieve methode is.

### 3.4 Biomarkers

Zoals hierboven aangegeven resulteert blootstelling aan isocyanaten in de vorming van eiwitadducten in het lichaam, bijvoorbeeld met albumine. Bij langdurige blootstelling aan HDI of HDI-prepolymeren kunnen de eiwitadducten leiden tot een reactie van het immuunsysteem, waarbij het HDI-eiwitadduct (bijvoorbeeld met albumine) als lichaamsvreemde stof (antigeen) wordt herkend. Dit leidt tot antigeen-specifieke T cel activatie (Maestrelli, 1994; Finotto, 1991; Herrick, 2003) wat de opmaat kan zijn tot aanmaak van IgG antilichamen. Naast deze reactie kan ook sensibilisatie optreden waarbij IgE antilichamen gevormd worden. Deze sensibilisatie kan leiden tot het ontstaan van allergische astma. Het is bekend dat in slechts ca. 14-20% van de mensen met isocyanaat-geïnduceerde beroepsastma specifieke IgE's kunnen worden aangetoond (Baur, 1983 en Keskinen, 1988). Een verklaring voor dit lage percentage is dat IgE wel gevormd wordt maar dat dit niet gemeten is met de gebruikte methodes (Wisnewski, 2007). Een andere verklaring hiervoor is dat naast IgE-gemedieerde allergie ook andere mechanismen een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van allergische astma (Jones, 2006; Lummus, 1998; Lummus 2015).

Na de beëindiging van de blootstelling verdwijnen deze antilichamen. De halfwaardetijd van HDI geïnduceerd IgE (vrije vorm in bloed) is een aantal dagen, en voor IgG is deze in de orde ongeveer een maand (Wisnewski, 2012). De oorzaak dat IgG langer kunnen circuleren is omdat ze gebonden worden aan FcRn receptoren die hen beschermen tegen een snelle afbraak. In een onderzoek van Tee (1998) is een halfwaardetijd van isocyanaat-specifieke IgE's gevonden van ca. 5 tot 6 maanden. Daaruit kan geconcludeerd worden dat celgebonden IgE's een veel langere halfwaardetijd hebben. Er zijn methodes om deze antilichamen te meten in bloed, zogenaamde serologische bepalingen, waarmee blootstelling aan HDI aangetoond kan worden. Echter, hierbij moet worden opgemerkt dat een minderheid van alle individuen die blootgesteld zijn aan HDI vormen tegen HDI.

Het immuunsysteem heeft een geheugen en kan bij hernieuwde blootstelling aan het antigeen reageren met de aanmaak van nieuwe antilichamen. Van dit mechanisme wordt gebruik gemaakt bij specifieke provocatietesten waarin gesensibiliseerde personen, in het bijzonder mensen met allergische astma, opnieuw worden blootgesteld aan het antigeen en/of de stof die tot de sensibilisatie heeft geleid. Als isocyanaat specifieke antilichamen worden gevonden in het bloed is dat een bewijs dat die persoon blootgesteld is geweest aan isocyanaten. Andere allergische aandoeningen die veroorzaakt kunnen worden door blootstelling aan isocyanaten zijn allergische rhinitis, conjunctivitis en contactdermatitis.

Naast HDI-specifieke activatie van het adaptieve immuunsysteem (resulterend in T cel activatie en antilichaam productie), zijn er duidelijke aanwijzingen dat ook het aspecifieke (innate) immuunsysteem geactiveerd wordt (Bernstein, 2002; Lummus, 1998; Wisnewski, 2008; Verstraelen, 2008), waarbij een duidelijke scheidslijn tussen de activatie van het adaptieve versus het innate immuunsysteem lastig is te duiden. Echter, voor het innate immuunsysteem zijn vooral mechanistische studies beschreven, waarbij geen duidelijke biomarkers voor HDI-exposure zijn geïdentificeerd (Jones, 2006; Wisnewski, 2008).

In de literatuur geen informatie gevonden over het gebruik van andere specifieke biomarkers dan IgG en IgE om blootstelling aan HDI aan te tonen.



## 4 Aantonen van blootstelling aan HDI

### 4.1 Tijdens/kort na blootstelling

#### 4.1.1 *Bepaling van HDA in urine*

Uit hoofdstuk 3 volgt dat HDI in het lichaam wordt omgezet in HDA, HDA metabolieten en HDA adducten, en dat deze primair via de urine en in mindere mate via de feces worden uitgescheiden. De analyse van HDA in urine is daardoor een goede manier om blootstelling aan HDI te bepalen en wordt om die reden ook voor biomonitoring gebruikt. De meest toegepaste techniek is gaschromatografie met massaspectrometrische detectie (GC-MS). Ook is de toepassing van vloeistofchromatografie met massaspectrometrische detectie (LC-MS) beschreven. In de gepubliceerde methodes wordt een hydrolysestap toegepast om HDA metabolieten, zoals N-acetyl HDA, en HDA-adducten om te zetten in HDA. Het is gebruikelijk om HDA niveau's in urine uit te drukken ten opzichte van het kreatinine gehalte om te corrigeren voor de verdunningsgraad van het urinemonster. Een overzicht van geschikte methodes voor de analyse van HDA wordt gegeven in een review van Cocker (2011) en het proefschrift van Flack (2010c). De detectiegrenzen van de gepubliceerde methodes liggen tussen 0,02 – 3,0 µg/l. Dit is toereikend om de HDA concentraties, die in de orde van enkele tot tientallen µg/l liggen, te kunnen meten na beroepsmatige blootstelling aan HDI. In alle onderzoeken is een positieve correlatie ( $r=0,49$ ) gevonden tussen de HDA concentratie en de mate van blootstelling (Maitre, 1996 en Liu, 2004). Daarbij is het essentieel om direct na de werkzaamheden, niet *per se* aan het eind van de werkdag, urine te verzamelen vanwege de korte halfwaardetijd van HDA in urine (circa 2-3 uur) t.o.v. de duur van een werkdag. Afhankelijk van de aard van werkzaamheden hoeft de blootstelling niet gelijkmatig plaats te vinden, en kan het pieken en dalen hebben. Bij meting aan het eind van de werkdag kan het zijn dat een eenmalig hoge blootstelling in de ochtend resulteert in een lager HDA-gehalte in de urine dan een significant lagere blootstelling in de uren vlak voor afname van een urinemonster.

De associatie tussen HDA concentratie in urine en HDI blootstelling (de luchtconcentratie op de werkplek) is met een correlatiecoëfficiënt van 0.49 matig, onder andere door grote inter-individuele verschillen. Deze worden veroorzaakt door verschillen tussen personen in ademhaling, metabolisme en kinetiek (Flack proefschrift, 2010c; Heringa 2020). Naast deze verschillen tussen werknemers beïnvloeden werkplekfactoren en de uitvoering van de werkzaamheden in grote mate de gemeten HDA concentraties in urine, waardoor de interpretatie van testresultaten bemoeilijkt wordt (Pronk, 2006). Ondanks de matige kwantitatieve relatie tussen de HDA concentratie en de HDI blootstelling (gehalte in de lucht) worden in Duitsland en Engeland hiervoor wel normen voor biomonitoring gehanteerd. In Duitsland wordt een biologische grenswaarde (BGW) van 15 µg HDA per gram kreatinine gehanteerd als norm voor een werkplekgrenswaarde van 0,035 mg/m<sup>3</sup> (Leng, 2015). Vergelijkbare waarden worden in het Verenigd Koninkrijk gehanteerd. In het Verenigd Koninkrijk wordt voor alle di-isocyanaten, dus niet specifiek HDI, een norm van 1 µmol van het corresponderende di-amine per mol kreatinine, ofwel circa 1 µg per gram kreatinine, gehanteerd als indicator voor blootstelling (HSE, 2005).

Samengevat kan geconcludeerd worden dat het aantonen van blootstelling aan HDI door het bepalen van HDA in urine kort na uitvoering van werkzaamheden met HDI bevattende producten mogelijk is. Alleen als urine direct na de werkzaamheden wordt afgenomen is de gemeten concentratie een indicator voor de mate van de blootstelling.

#### 4.1.2 *Bepaling van HDA in plasma*

De analyse van HDA in urine is het meest toegepast in onderzoeken naar blootstelling aan HDI. Het is ook mogelijk om HDA in plasma te meten (Flack, 2010a). De concentraties van vrij HDA in bloed zijn na blootstelling bijzonder laag (vaak onder detectiegrens van de meeste GC-MS methodes), daarom wordt hydrolyse gebruikt om ook eiwitgebonden HDA vrij te maken. Een potentieel voordeel van de analyse in bloed is dat de eiwitadducten aanzienlijk langere halfwaardetijden hebben dan HDA in urine, waardoor het niet noodzakelijk is om direct na blootstelling te meten, en dat deze metingen een beter beeld geven van de gemiddelde blootstelling. De analyse van eiwitadducten in bloed wordt in 4.2 behandeld.

#### 4.1.3 *Specificiteit van HDA analyse*

De analyse van HDA in urine en ook in bloed waarbij hydrolyse wordt toegepast is geschikt om blootstelling aan HDI te bepalen. Deze manier is echter niet specifiek voor HDI omdat HDA in urine ook het gevolg van blootstelling aan HDA kan zijn. Dit kan uitgesloten worden met kennis over de samenstelling van de door werknemers gebruikte producten en materialen. Als deze geen HDA bevatten dan is het aannemelijk dat HDA in urine afkomstig is van HDI en de methode specifiek is voor blootstelling aan HDI.

Een andere manier om HDA blootstelling uit te sluiten is het meten van HDA in urine met en zonder hydrolysestap. HDA bindt net als HDI aan eiwitten maar in mindere mate. Het HSE rapport (2012) beschrijft dit uitvoerig voor een andere di-isocyanaat, 2,4-TDI en het corresponderende di-amine 2,4-TDA, maar meldt dat dit ook voor andere di-isocyanaten toepasbaar is. Als bij deze dubbele meting de hydrolysestap resulteert in een hogere HDA concentratie is dat een bewijs voor blootstelling aan HDI.

## 4.2 Retrospectief, niet direct na blootstelling

### 4.2.1 Eiwitadducten

Zoals in 3.3.6 al is vermeld zijn eiwitadducten van HDI mogelijk geschikt om de blootstelling aan HDI retrospectief aan te tonen. Dit is uitvoerig beschreven in de literatuur voor veel andere adductvormende stoffen. In algemene zin kan dit op een aantal manieren, bijvoorbeeld:

- 1) Destructie van alle eiwitten in een biologisch monster, bijv. bloed of weefsel, waarbij de adductvormende verbinding wordt vrijgemaakt en gemeten kan worden. In het geval van HDI zal bij destructie door hydrolyse van de eiwitten HDA vrijkomen en gemeten worden. Dit kan uiteraard ook na isolatie van een specifiek eiwit uit het monster.
- 2) Als de destructie niet leidt tot het vrijkomen van het adduct, of bij gebruik van enzymatische digestie (bijv. met pronase), maar tot aminozuren met en zonder adduct, kan het aminozuuradduct of kunnen meerdere aminozuuradducten gemeten worden. Welke aminozuren hangt af van de selectiviteit van de verbinding voor bepaalde aminozuren. Vaak zijn dat de aminozuren met een aminegroep; lysine en/of histidine. Van isocyanaten is bekend dat ze o.a. met lysine adducten vormen (HSE, 2012).
- 3) Isolatie van een specifiek eiwit, bijvoorbeeld hemoglobine, uit een biologisch monster. Vervolgens wordt het geïsoleerde eiwit enzymatisch geknipt tot peptide, en worden de peptiden met een of meerdere adducten gemeten.

In onderzoeken naar eiwitadducten na beroepsmatige blootstelling van di-isocyanaten is alleen de eerste analysestrategie toegepast. Het gebruik van de tweede strategie betrof een specifiek onderzoek naar de mogelijkheden om onderscheid te kunnen maken tussen blootstelling aan het di-isocyanaat TDI en aan het corresponderende di-amine TDA (HESE 2012, zie ook paragraaf 4.1.3). Voor zover bekend is deze specifieke meetmethode niet toegepast op monsters uit onderzoeken naar blootstelling van werknemers aan di-isocyanaten. Wel is deze methode gebruikt in een studie met MDI bij ratten waarbij het MDA adduct aan het N-terminale aminozuur van hemoglobine is gemeten (Sabbioni, 2000; Bolognesi, 2011).

Voor het beantwoorden van de deelvraag of het ook mogelijk is om langer na HDI blootstelling deze nog aan te kunnen tonen is het van belang om te weten welke eiwitten in de mens (relatief) stabiel zijn en hoe lang. De meeste eiwitten in het lichaam hebben een korte levensduur van een aantal dagen (sommige zelfs veel korter). Eiwitten die minder snel vervangen worden zijn:

- Eiwitten in de celkern zoals histonen en nucleoporines. Een aantal van deze eiwitten blijven nagenoeg intact gedurende de levensduur van de cel. De levensduur van cellen varieert van dagen (witte bloedcellen), een jaar (lever) tot 10 jaar (bot).
- Hemoglobine in bloedlichaampjes. Rode bloedlichaampjes hebben een levensduur van gemiddeld circa 126 dagen. Gedurende die tijd is hemoglobine stabiel.
- Albumine in bloed. Dit eiwit heeft het hoogste gehalte in bloed en een halfwaardetijd van gemiddeld 19 dagen.

Voor de eerstgenoemde groep, eiwitten in de celkern, zijn er geen publicaties gevonden over de aanwezigheid van HDI adducten. Dit is om een aantal redenen goed te verklaren. Door de reactiviteit van HDI zal slechts een heel klein gedeelte tot de celkern weten door te dringen. In een studie met ratten blootgesteld aan MDI zijn

DNA adducten gevonden in weefsel van de luchtwegen (neusepitheel) (Bolognesi, 2011). Dat betekent dat ook adducten met eiwitten in de celkern gevormd kunnen worden. Echter, de hoeveelheid van de DNA adducten was in die studie bijzonder gering, net boven de detectiegrens van de methode. Dat kan veroorzaakt worden door DNA-reparatiemechanismen en/of de geringe hoeveelheden die doordringen tot de celkern. In het laatste geval is het aannemelijk dat er ook geringe hoeveelheden celkerneiwit-adducten gevormd worden. Een ander belangrijk praktisch nadeel van deze methode is dat hiervoor weefsel uit de luchtwegen genomen moet worden.

Voor albumine en hemoglobine, beide eiwitten in bloed, is bekend dat blootstelling aan isocyanaten leidt tot adducten (Sepai, 1995; Lind, 1997; Pauluhn, 2002). De verhouding tussen albumine en hemoglobine adducten na blootstelling aan MDI is ca. 450 (Sepai, 1995).

In de in 4.1.2 genoemde analyse van HDA in plasma wordt gebruik gemaakt van hydrolyse waarmee HDA uit albumine-adducten (en andere eiwitten in bloed) wordt vrijgemaakt. In essentie is deze methode een bepaling van HDA-eiwit adducten (volgens manier 1 in de bovenstaande opsomming van analysestrategieën voor eiwitadduct bepalingen) omdat de concentratie van vrij HDA in plasma bijzonder laag is. In die studie zijn de bloedmonsters afgenomen direct na de uitvoering van de werkzaamheden. Daardoor geeft dat onderzoek geen inzicht in de mogelijkheid om op deze wijze langer, en hoeveel langer, na blootstelling aan HDI deze nog aan te tonen.

In een vervolgstudie (Flack, 2011) is onderzoek gedaan naar HDI-hemoglobine adducten bij verfspuiters. In deze studie zijn de rode bloedcellen geïsoleerd en zijn hieruit met behulp van precipitatie met ethanol eiwitten geïsoleerd (voornamelijk hemoglobine, maar ook andere eiwitten). Na hydrolyse van de geïsoleerde eiwitten is HDA gemeten. Uit deze studie volgt dat HDA-hemoglobine adducten bepaald kunnen worden na beroepsmatige blootstelling aan HDI. Ook in deze studie zijn de bloedmonsters direct na uitvoering van de werkzaamheden genomen waardoor er geen informatie is of het op deze wijze mogelijk is om retrospectief blootstelling aan te kunnen tonen. Het doel van de genoemde onderzoeken was gericht op verbetering van de kwantitatieve relatie tussen het gehalte van eiwit-adducten en de mate van blootstelling als mogelijk alternatief voor de analyse van HDA in urine. Op basis van de beschreven resultaten kan geconcludeerd worden dat deze methode niet beter is dan de analyse van HDA in urine. De auteurs postuleren wel dat, gelet op de halfwaardetijden van albumine en hemoglobine, het mogelijk moet zijn om langer na de blootstelling deze nog aan te kunnen tonen. Voor andere di-isocyanaten, MDI en TDI is de analyse van hemoglobine-adducten ook toegepast (onder andere Ogawa, 2006; Sabbioni, 2010; Gries, 2013). In die publicaties zijn de bloedmonsters ook kort na blootstelling genomen waardoor er geen informatie beschikbaar over de toepasbaarheid van deze methode weken tot maanden na beëindiging van de blootstelling. Net als Flack (2011) beweren deze experts dat dit mogelijk is. Echter, hoe lang dat na blootstelling nog kan, wordt bepaald door de hoogte van de blootstelling, de stabiliteit van de hemoglobine-adducten en de detectiegrenzen van de gebruikte analysemethode.

Andere langlevende eiwitten zijn keratines. Deze komen voor in de huid, haar en nagels maar ook in endotheel. Het is bekend dat HDI reageert met keratine in het long-endotheel en de huid (Wisnewski, 2000). Door middel van de 'tape stripping' techniek kan de bovenste huidlaag verwijderd worden. Na hydrolyse is het mogelijk om in dit huidmonster HDA te meten. Fent (2006) heeft dit toegepast bij één werknemer (een verfspuiter in de auto-industrie) om te onderzoeken of op deze wijze blootstelling aan di-isocyanaten gemeten kan worden. Bij die werknemer zijn op 36 plekken op het lichaam monsters genomen, en in ruim 40% van die monsters kon HDA gemeten worden. Daarmee is bewezen dat de analyse van huid geschikt is om dermale blootstelling te meten. Voor andere blootstellingsroutes is deze methode niet

geschikt. Omdat de opperhuid in circa 1 maand wordt vervangen is het in theorie mogelijk om een aantal weken na blootstelling deze nog aan te kunnen tonen. Hierover is in de literatuur niets gevonden. Omdat dit niet langer is dan wat in theorie met bloedeiwitten mogelijk zou kunnen zijn heeft huidanalyse op dat punt geen voordeel boven bloedmetingen. Het enige voordeel is dat monsternamen met tapestrippen minder invasief is dan bloedafname. In de literatuur is niets gevonden over adductvorming van HDI met keratine in het haar en de analyse van deze adducten. Ook niet voor andere isocyanaten.

Samengevat is de conclusie dat eiwitadducten in bloed en huid na blootstelling aan HDI gemeten kunnen worden. Deze meetmethode is in grote mate kwalitatief van aard (wel/geen blootstelling). Er is geen informatie beschikbaar in de literatuur over hoe lang dit na beroepsmatige blootstelling aan di-isocyanaten mogelijk en reproduceerbaar is.

#### 4.2.2 *Immunologische tests*

##### 4.2.2.1 *Serologische bepalingen*

Bij een deel van de mensen die langdurig worden blootgesteld aan HDI kunnen IgG en IgE gevormd gaan worden die kunnen resulteren in beroepsastma of een andere allergische aandoening op. Dit is een reactie op eiwit-adducten van HDI. Bij werknemers met allergische astma wordt bij ca. 14-20% isocyanaat specifieke IgE's gevonden (zie 3.4).

Het is met serologische assays mogelijk om de aanwezigheid en het gehalte van deze antilichamen te meten. Daarvoor wordt bloed afgenomen waaruit de antilichamen geïsoleerd worden met behulp van een antigeen, bijvoorbeeld met HDI-behandeld albumine. Met een immunoassay wordt vervolgens de hoeveelheid IgG en/of IgE met affiniteit voor het antigeen bepaald (specifiek IgG/IgE, en niet totaal IgG/IgE).

Een groot voordeel van serologische assays is dat enige tijd na HDI-exposure (aantal maanden) de blootstelling nog bepaald kan worden. Bovendien kan ook blootstelling worden aangetoond die gemist zou kunnen zijn met lucht sampling indien de blootstelling bv. via de huid heeft plaatsgevonden.

Er zijn ook enkele nadelen te noemen: i) Een voorwaarde voor de toepasbaarheid van deze bepalingen is dat de proefpersoon immunologisch gereageerd moet hebben op de HDI-blootstelling. Dat is niet bij iedereen het geval. In de praktijk zijn er een aantal problemen met deze of vergelijkbare methode(s) (Wisnewski, 2008). ii) Een cruciaal onderdeel van deze serologische testen is dat het juiste antigeen wordt gebruikt; het is echter niet bekend tegen welke epitopen van HDI-albumine adducten de antilichamen van een testpersoon gericht zijn. Het kan dan zijn dat het met HDI behandelde albumine niet de juiste epitopen, of onvoldoende van deze epitopen, bevat. Het testresultaat wordt daardoor sterk beïnvloed door de keuze van het type HDI gemodificeerd albumine (Pronk, 2007). iii) de immunologische reactie kan het gevolg zijn van HDI adducten met andere eiwitten dan albumine. Zo zou het kunnen dat een blootstelling via de luchtwegen resulteert in een ander HDI adduct dan een blootstelling via de huid. In deze gevallen heeft testen met HDI-albumine geen zin en zullen deze leiden tot een vals negatief testresultaat. iv) Vals positieve testresultaten kunnen ook optreden als gevolg van kruisreactiviteit als de testpersoon blootgesteld is geweest aan een ander isocyanaat dan HDI en daar antilichamen tegen heeft gevormd. Dit maakt de interpretatie van de uitkomst van deze test niet eenduidig.

Een andere beperking van deze serologische bepalingen is dat deze niet bij iedereen toepasbaar zijn omdat slechts bij een minderheid van aan di-isocyanaten blootgestelde werknemers IgG en IgE gevonden worden. In een onderzoek bij 581

verfspuiters (Pronk, 2007) is bij slechts 4,2% de aanwezigheid van specifieke IgE's aangetoond. Voor IgG's varieerde dat tussen 2 tot 50,4 % afhankelijk van het gebruikte type HDI-albumine. De auteurs van die publicatie concludeerden dat specifieke IgG's een biomarker voor isocyanaat-blootstelling zijn.

In een studie van Tee (1998) zijn bij 6 patiënten met isocyanaat-geïnduceerde beroepsastma IgE's gemeten gedurende een periode van 2 jaar na beëindiging van de blootstelling (eerder benoemd in 3.4). Uit de meetresultaten concludeerden zij dat de gevoeligheid van deze methode maximaal is wanneer deze toegepast wordt binnen 30 dagen na beëindiging van de blootstelling. In deze publicatie wordt ook de bovengenoemde kruisreactiviteit gerapporteerd.

Voor IgG's is deze informatie niet gevonden. Omdat de halfwaardetijd van IgG's (een aantal maanden, zie 3.4) vergelijkbaar is met de door Tee gevonden halfwaardetijd van IgE's is een vergelijkbare periode waarschijnlijk ook van toepassing voor IgG metingen.

Uit bovenstaande kan geconcludeerd worden dat metingen van HDI-specifieke IgG's en IgE's niet geschikt zijn om lang na beëindiging van de blootstelling, d.w.z. vele maanden tot jaren, deze alsnog aan te tonen, tenzij het serum 'kort' na blootstelling is afgenomen en vervolgens opgeslagen bij <-80 °C. Het feit dat deze methode niet generiek is en alleen van toepassing is voor medewerkers die immunologisch hebben gereageerd op HDI-blootstelling is een groot nadeel. En binnen de groep medewerkers met HDI-geïnduceerde allergische astma zijn slechts in 14-20% van de gevallen IgE's aantoonbaar. Door vals negatieve en positieve uitslagen is de interpretatie van testresultaten niet eenduidig.

#### 4.2.2.2 *Specifieke provocatietesten*

In specifieke provocatietesten, bijvoorbeeld plak-, huidprik- en inhalatietesten, wordt een persoon bewust blootgesteld aan de stof of een geschikt antigeen (HDI gemodificeerd albumine). Als deze persoon gesensibiliseerd is, zoals het geval is bij HDI-geïnduceerde allergische astma rhinitis of dermatitis, kan de hernieuwde blootstelling leiden tot een immunologische reactie. Deze testen maken gebruik van het geheugen van het immuunsysteem en een negatieve uitslag betekent niet dat een geconstateerde aandoening zoals rhinitis, dermatitis of astma niet door HDI is veroorzaakt, alleen maar dat ze niet allergisch van aard is.

Plaktesten en huidpriktesten zijn niet veel beschreven in de literatuur over blootstelling aan isocyanaten (Baur, 1983; Kanerva, 1989). Een plaktest waarbij HDI en/of prepolymeren op de huid worden aangebracht is gericht op het aantonen van allergische contactdermatitis als gevolg van blootstelling. Een belangrijk aspect is de gebruikte hoeveelheid; deze moet voldoende zijn om een huidreactie op te wekken zonder dat dit het gevolg is van directe irritatie. Bij een priktest wordt het antigeen, bijvoorbeeld HDI-albumine adducten, in de huid aangebracht (intracutaan).

De meest gebruikte specifieke provocatietest in het onderzoek naar isocyanaten en allergische astma is blootstelling via de luchtwegen door inhalatie. Eenvoudige methodes bestaan uit het herhaald uitvoeren van werkzaamheden, bijv. verf spuiten (Tee 1998), maar in de regel worden deze inhalatietesten uitgevoerd in speciaal daarvoor gemaakte ruimtes waarin de stof nauwkeurig in de gewenste concentratie(s) kan worden verspreid. Longfunctie, i.h.b. FEV1 (uitgeademd volume lucht na 1 seconde) is in dergelijke testen een belangrijk uitleesparameter. Daarnaast wordt bij provocatie-onderzoeken bloed afgenomen voor serologische bepalingen van IgE's en IgG's. De specifieke inhalatie-provocatietest is de gouden standaard voor de diagnose van beroepsastma en de identificatie van de verbinding die deze veroorzaakt heeft. Het is een complexe test die één of meerdere dagen kost en alleen kan worden uitgevoerd in daartoe uitgeruste ziekenhuizen.

In het kader van dit onderzoek zijn twee aspecten van belang, ten eerste hoe lang na beëindiging van de werkzaamheden dit nog kan en wat de specificiteit is.

De responsiviteit van patiënten met beroepsastma op deze testen kan afnemen als zij lang niet meer zijn blootgesteld aan de stof die de astma veroorzaakt heeft. Deze kan ook verdwijnen (Vandenplas, 1993a). In een aantal studies bij werknemers met isocyanaat-geïnduceerde beroepsastma bijv. in het kader van compensatieregelingen, zijn deze testen uitgevoerd. Echter, hier betrof het werknemers met astma die nog steeds blootgesteld werden in de uitvoering van hun werk. In een studie van Vandenplas (1993b) is de specifieke provocatietest uitgevoerd bij 20 ex-werknemers die 0,1 – 8 jaar niet meer waren blootgesteld aan HDI en HDI-prepolymeren (gemiddeld ca. 3 jaar). Binnen de groep van mensen die positief reageerden op een specifieke provocatietest (n=10) was één persoon die 8 jaar niet meer was blootgesteld. Er waren 5 personen die 2-5 jaar niet meer waren blootgesteld met een positief resultaat. Andere publicaties over de periode na beëindiging van blootstelling aan isocyanaten, waarbinnen een provocatietest nog zinvol is, zijn niet gevonden.

Over de specificiteit van deze methode, d.w.z. de test geeft een positief resultaat op blootstelling aan HDI of HDI-prepolymeren als de beroepsastma daardoor is ontstaan, en niet door andere isocyanaten, is geen informatie gevonden. Van serologische bepalingen is bekend dat kruisreactiviteit voorkomt, en mogelijk is dat voor specifieke provocatietesten ook het geval. Als dat zo is, dan is een positief testresultaat geen hard bewijs voor blootstelling aan HDI.

Op basis van bovenstaande onderzoeksresultaten kan geconcludeerd worden dat specifieke provocatietesten de enige manier zijn om 5-10 jaren na blootstelling aan di-isocyanaten deze blootstelling nog aan te tonen. Het resultaat van deze test kwalitatief en geeft informatie over de hoogte van de blootstelling. Deze test geeft niet bij iedereen uitsluitend over het al dan niet lijden aan een door HDI veroorzaakte ziekte, maar alleen bij ex-medewerkers die gesensibiliseerd zijn.

## 5 Conclusie

Dit onderzoek was gericht op de beantwoording van de onderzoeksvraag “Kan blootstelling aan HDI of HDI-prepolymeren in het lichaam worden aangetoond/gemeten (zowel tijdens de blootstellingsperiode als achteraf)?” Uit de geraadpleegde literatuur kan geconcludeerd worden dat het antwoord op deze vraag positief is: ja, het is mogelijk om de blootstelling aan te tonen, zowel tijdens de blootstelling als retrospectief. Hieronder worden de diverse mogelijkheden om blootstelling aan HDI en HDI-prepolymeren aan te tonen samengevat.

Blootstelling aan HDI en HDI-prepolymeren tijdens de uitvoering van werkzaamheden kan aangetoond kan worden middels de analyse van de metabooliet HDA in urine. Dit kan alleen indien urine direct na uitvoering van de werkzaamheden wordt afgenomen omdat de eliminatie van HDA en andere metaboolieten snel verloopt. Na enkele dagen is HDA niet meer aantoonbaar in de urine. Uit de gemeten HDA concentratie kan een indicatie voor de mate van blootstelling verkregen worden.

De analyse van eiwitadducten, bijv. aan keratine (huid), aan albumine (plasma) en in het bijzonder hemoglobine (bloed), maakt het in theorie mogelijk om weken tot maanden na mogelijke blootstelling aan te tonen dat er daadwerkelijk blootstelling is geweest. Echter, voor HDI, en ook voor andere di-isocyanaten, zijn in de literatuur geen praktijkvoorbeelden gevonden waarin deze methode is toegepast op bloedmonsters die weken tot maanden na beëindiging van de blootstelling zijn genomen. De consensus onder experts op het gebied van de analyse van hemoglobine-adducten is dat dit mogelijk is. Dat geldt ook voor adducten met keratine in haar. Met deze adductmetingen is het niet mogelijk om een meetwaarde te vertalen naar een blootstellingsniveau omdat daar onvoldoende data voor is.

Serologische testmethodes, de bepaling van antilichamen tegen eiwitadducten van HDI, zijn ook toepasbaar om blootstelling aan te tonen. Grote voordelen van serologische assays zijn dat enige tijd na HDI-exposure (aantal maanden) de blootstelling nog bepaald kan worden. Bovendien kan ook blootstelling worden aangetoond die gemist zou kunnen zijn met lucht sampling indien de blootstelling bv. via de huid heeft plaatsgevonden. Echter, belangrijke nadelen van deze methodes ten opzichte van bovenstaande analytisch-chemische methodes zijn mogelijke vals-negatieve testresultaten (methodologische oorsprong). Een ander nadeel is dat antilichamen, in het bijzonder IgE's, niet bij iedereen gevormd worden als reactie op blootstelling aan HDI (biologisch vals negatief resultaat). Als gevolg van kruisreactiviteit kunnen ook vals-positieve testresultaten verkregen worden. Met serologische methodes is het ook niet mogelijk om bijvoorbeeld een jaar of langer na blootstelling aan HDI deze nog aan te tonen. Dit is beperkt tot enkele maanden, mogelijk iets langer, na beëindiging van de blootstelling, tenzij sera kort na blootstelling wordt afgenomen en bij <-80 °C wordt opgeslagen

Specifieke provocatietesten, het opnieuw aan HDI (of prepolymeren) blootstellen van oud-werknemers met mogelijk HDI-geïnduceerde allergische astma of andere aandoening, is de enige manier om blootstelling vele jaren na beëindiging alsnog aan te tonen. Op basis van de literatuur is dat na 5-10 jaar nog mogelijk. Een nadeel van deze testen is dat sensibilisatie een voorwaarde is voor een positief testresultaat waardoor deze test maar voor een beperkte groep toepasbaar is.



Serologische bepalingen en provocatietesten geven bij een positief testresultaat geen kwantitatieve informatie over de mate van blootstelling. Het testresultaat wordt namelijk alleen bepaald door de individuele gevoeligheid en respons op blootstelling.

Opgesplitst naar tijd sinds de laatste blootstelling zijn de mogelijkheden voor het aantonen van blootstelling aan HDI:

- 1) Tijdens/direct na blootstelling
  - a. Analyse van HDA in urine
  - b. Analyse van eiwitadducten in bloed
  - c. Serologische metingen van specifiek IgG/IgE
- 2) Weken tot maanden na beëindiging van de blootstelling
  - a. Analyse van eiwitadducten in bloed
  - b. Serologische metingen van specifiek IgG/IgE
- 3) Jaren na beëindiging van de blootstelling, 5-10 jaar mogelijk langer:
  - a. Specifieke provocatietesten (eventueel in combinatie met Serologische metingen van specifiek IgG/IgE)

## 6 Referenties

ATSDR. 1998. Toxicological profile for hexamethylene diisocyanate

Baur, X. 1983. Immunologic cross-reactivity between different albumin-bound isocyanates. *Allergy Clin. Immunol.* 71:197–205.2.

Baur X, Dewair M, Fruhmann G (1984) Detection of immunologically sensitized isocyanate workers by RAST and intracutaneous skin tests. *J Allergy Clin Immunol* 73: 610–618

Bernstein DI, Cartier A, Cote J, Malo JL, Boulet LP, Wanner M, et al. Diisocyanate antigen-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 synthesis has greater test efficiency than specific antibodies for identification of diisocyanate asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166:445–50.

Bolognesi, Claudia & Baur, Xaver & Marczynski, Boleslaw & Norppa, Hannu & Sepai, Ovnair & Sabbioni, Gabriele. (2001). Carcinogenic risk of toluene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate: epidemiological and experimental evidence. *Critical reviews in toxicology.* 31. 737-72. 10.1080/20014091111974.

Brorson T, Skarping G, Sandstrom JF, Stenberg M. 1990a. Biological monitoring of isocyanates and related amines. I. Determination of 1,6-hexamethylene diamine (HDA) in hydrolysed human urine after oral administration of HDA. *Int Arch Occup Environ Health* 62: 79-84.

Brorson T, Skarping G, Nielsen J. 1990b. Biological monitoring of isocyanates and related amines. II. Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Int Arch Occup Environ Health* 62: 385-389.

Cocker J. Biological monitoring for isocyanates. *Ann Occup Hyg* 2011; 55(2): 127-31.

ECHA dossier 16081, (<https://echa.europa.eu/nl/registration-dossier/-/registered-dossier/16081>)

Finotto S, Fabbri LM, Rado V, Mapp CE, Maestrelli P. Increase in numbers of CD8 positive lymphocytes and eosinophils in peripheral blood of subjects with late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Br J Ind Med* 1991;48:116-21.

Fent KW, Jayaraj K, Gold A, Ball LM, Nylander-French LA., Tape-strip sampling for measuring dermal exposure to 1,6-hexamethylene diisocyanate. , *Scand J Work Environ Health.* 2006;32:225.

Fent KW, Jayaraj K, Ball LM, Nylander-French LA. 2008. Quantitative monitoring of dermal and inhalation exposure to 1,6-hexamethylene diisocyanate monomer and oligomers. *J Environ Monit* 10: 500-507.

Flack SL, Fent KW, Trelles Gaines LG, Thomasen JM, Whittaker S, Ball LM, Nylander-French LA. 2010a. Quantitative plasma biomarker analysis in HDI exposure assessment. *Ann Occup Hyg* 54: 41-54.

Flack SL, Ball LM, Nylander-French LA. 2010b. Occupational exposure to HDI: progress and challenges in biomarker analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878: 2635-2642.

Flack SL, Fent KW, Gaines LG, Thomasen JM, Whittaker SG, Ball LM, Nylander-French LA. 2011. Hemoglobin adducts in workers exposed to 1,6-hexamethylene diisocyanate. *Biomarkers* 16: 261-270.

Flack SL, BIOLOGICAL MONITORING OF OCCUPATIONAL EXPOSURE TO MONOMERIC 1,6-HEXAMETHYLENE DIISOCYANATE, Proefschrift, University of North Carolina at Chapel Hill , 2010c  
([cdr.lib.unc.edu/indexablecontent/uuid:796c066c-5f39-4740-a2bd-21655c029676](http://cdr.lib.unc.edu/indexablecontent/uuid:796c066c-5f39-4740-a2bd-21655c029676))

Gaines LG, Fent KW, Flack SL, Thomasen JM, Ball LM, Richardson DB, Ding K, Whittaker SG, Nylander-French LA. 2010. Urine 1,6-hexamethylene diamine (HDA) levels among workers exposed to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Ann Occup Hyg* 54: 678-691.

Gezondheidsraad, 2017. Di- and triisocyanates. Health-based recommendation on occupational exposure limits. DRAFT.

Gries W., Leng L. Analytical determination of specific 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate hemoglobin adducts in human blood. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013;405(23):7205–7213.

HSE, WATCH/2005/4, Biological monitoring for isocyanates, Annex 1  
(<http://www.hse.gov.uk/aboutus/meetings/iacs/acts/watch/130105/p4annex1.pdf>)

HSE, Research Report 947, 2012, Investigation of techniques to discriminate between TDI and TDA exposures in biological samples  
(<http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr947.pdf>)

Jones MG, Floyd A, Nouri-Aria KT, Jacobson MR, Durham SR, Taylor AN, Cullinan P. Is occupational asthma to diisocyanates a non-IgE mediated disease? *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Mar;117(3):663-9.

Kanerva L, Lähteenmäki M-T, Estlander T, Jolanki R, Keskinen H (1989) Allergic contact dermatitis from isocyanates. In: Frosch PJ, Dooms-Goossens A, Lachapelle J-M, Rycroft RJG, Scheper RJ (eds) *Current topics in contact dermatitis*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 368–373

Karol MH, Hauth BA. 1982. Use of hexyl isocyanate antigen to detect antibodies to hexamethylene diisocyanate (HDI) in sensitized guinea pigs and in a sensitized worker. *Fundam Appl Toxicol* 2: 108-113.

Keskinen, H., O. Tupasela, U. Tiikkainen, and H. Nordman. 1988. Experiences of specific IgE in asthma due to diisocyanates. *Clin. Allergy* 18:597–604.

Leng G., Isocyanatexposition in Produktion und Anwendung: Biomonitoring, *Zbl Arbeitsmed* 2016 · 66:293–296, (BauA website, [www.baua.de](http://www.baua.de)).

Lind P, Dalene M, Lindstrom V, Grubb A and Skarping G, *Analyst*, 1997, 122, 151-154.

Liu Y, Berode M, Stowe MH, Holm CT, Walsh FX, Slade MD, Boeniger MF, Redlich CA. 2004. Urinary hexane diamine to assess respiratory exposure to hexamethylene diisocyanate aerosol: a human inhalation study. *Int J Occup Environ Health* 10: 262-271.

Lummus ZL, Alam R, Bernstein JA, Bernstein DI. Diisocyanate antigen-enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and tumor necrosis factor-alpha by peripheral mononuclear cells of workers with occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:265-74

Lummus ZL, Wisnewski AV, Bernstein DI. Pathogenesis and disease mechanisms of occupational asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2011 Nov;31(4):699-716, vi. doi: 10.1016/j.iac.2011.07.008.

Maestrelli P, Del Prete GF, De Carli M, D'Elis MM, Saetta M, Di Stefano A, et al. CD8 T-cell clones producing interleukin-5 and interferon-gamma in bronchial mucosa of patients with asthma induced by toluene diisocyanate. *Scand J Work Environ Health* 1994;20:376-81

Maitre A, Berode M, Perdrix A, Stoklov M, Mallion JM, Savolainen H. 1996. Urinary hexane diamine as an indicator of occupational exposure to hexamethylene diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 69: 65-68.

NIOSH. 1989. National Occupational Exposure Survey. Cincinnati, OH: U.S., Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health.

OECD. 2001. Hexamethylene Diisocyanate. CAS N°:822-06-0. SIDS Initial Assessment Report.

OEHHA. 2017. Hexamethylene Diisocyanate (Monomer and Polyisocyanates) Reference Exposure Levels. Air Toxics Hot Spots Program, Office of Environmental Health Hazard Assessment.

Ogawa M, Oyama T, Isse T, Yamaguchi T, Murakami T, Endo Y, Kawamoto T., Hemoglobin adducts as a marker of exposure to chemical substances, especially PRTR class I designated chemical substances, *J Occup Health*. 2006 Sep;48(5):314-28.

Parmeggiani, L. 1983. *Encyclopedia of Occupational Health and Safety*. Geneva, Switzerland, International Labour Office.

Pauluhn J and Lewalter J, *Exp Toxicol Pathol*, 2002, 54, 135-146.

Pronk A, Tielemans E, Skarping G, Bobeldijk I, Van Hemmen J, Heederik D, Preller L. 2006. Inhalation exposure to isocyanates of car body repair shop workers and industrial spray painters. *Ann Occup Hyg* 50: 1-14.

Pronk A, Preller L, Raulf-Heimsoth M, Jonkers IC, Lammers JW, Wouters IM, Doekes, G, Wisnewski AV and Heederik D (2007). Respiratory symptoms, sensitization, and exposure response relationships in spray painters exposed to isocyanates. *Am J Respir Crit Care Med* 176(11): 1090-7.

RIVM (2018) Evaluatie en prioritering schadelijke stoffen in Chemical Agent Resistant Coating (CARC), gebruikt op de Nederlandse POMS locaties. Heringa, M.B., Bakker, J., Hoogendoorn, E. RIVM rapport 2018-0050.

RIVM (2020) Achtergrondinformatie over HDI: gebruik, voorkomen in het leefmilieu en gedrag in het lichaam. Heringa, M.B., Guichelaar, S., ter Burg, W. RIVM rapport 2020-0007.

Robbins Z, Bodnar W, Zhang Z, Gold A, Nylander-French LA. 2018. Trisaminohexyl isocyanurate, a urinary biomarker of HDI isocyanurate exposure. *Journal of Chromatography B* 1076: 117-129.

Sabbioni, G., Hartley, R., Henschler, D., Hoellriegl-Rosta, A., Koeber, R., and Schneider, S., Isocyanate-specific hemoglobin adduct in rats exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate, *Chem. Res. Toxicol.*, 2000; 13: 82–89

Sabbioni G., Dongari N., Kumar A. Determination of a new biomarker in subjects exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Biomarkers*. 2010;15(6):508–515.

Sepai O, Henschler D and Sabbioni G, *Carcinogenesis*, 1995, 16, 2583-2587.

Tee RD, Cullinan P, Welch J, Burge PS, Newman-Taylor AJ, Specific IgE to isocyanates: a useful diagnostic role in occupational asthma, *J Allergy Clin Immunol*. 1998 May;101(5):709-15.

Tinnerberg H, Skarping G, Dalene M, Hagmar L. 1995. Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate and isophorone diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 67: 367-374.

TNO (2016) Aantonen van blootstelling aan chroom-6 verbindingen middels analytisch laboratoriumonderzoek, Verheij ER en Kroese ED. TNO Rapport TNO2016 R11817, Zeist.

Vandenplas O, Malo JL, Saetta M, et al. Occupational asthma and extrinsic alveolitis due to isocyanates: current status and perspectives. *Br J Ind Med*. 1993;50:213–28.

Vandenplas O, Cartier A, Lesage J, et al. Prepolymers of hexamethylene diisocyanate as a cause of occupational asthma. *J. of Allergy and Clin. Immunol*. 1993;91:850–861.

Verstraelen S, Wens B, Hooyberghs J, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, et al. Gene expression profiling of in vitro cultured macrophages after exposure to the respiratory sensitizer hexamethylene diisocyanate. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22:1107–14.

Wisnewski AV, Redlich CA. 2001. Recent developments in diisocyanate asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1: 169-175.

Wisnewski AV, Srivastava R, Herick C, Xu L, Lemus R, Cain H, Magoski NM, Karol MH, Bottomly K, Redlich CA. Identification of human lung and skin proteins conjugated with hexamethylene diisocyanate in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Dec;162(6):2330-6.

Wisnewski AV, Stowe MH, Nerlinger A, Opare-Addo P, Decamp D, Kleinsmith CR, Redlich CA. Biomonitoring Hexamethylene diisocyanate (HDI) exposure based on serum levels of HDI-specific IgG. *Ann Occup Hyg.* 2012 Oct;56(8):901-10. doi: 10.1093/annhyg/mes024.

## 7 Ondertekening

TNO te Utrecht, 10 maart 2020



Drs. M.A.J. Rennen  
Research Manager



Dr. E.R. Verheij  
Auteur