

Samenvatting proefschrift

Respiratory effects of endotoxin exposure: individual susceptibility and gene-environment interactions

(Blootstelling aan endotoxine en respiratoire gezondheidseffecten: individuele gevoeligheid en gen-omgeving interacties)

Lidwien Smit¹

Endotoxines zijn bestanddelen van de celwand van Gram-negatieve bacteriën die algemeen voorkomen op planten en plantaardige producten en als commensale darmbacteriën.

Op verschillende plaatsen in de werkomgeving, met name in de landbouw, is sprake van een verhoogde luchtwegblootstelling aan endotoxine, met een zeer grote variatie in het niveau van blootstelling. Het inademen van stofdeeltjes of aërosolen die endotoxine bevatten kan leiden tot ontstekingsreacties en luchtwegaandoeningen, die gekenmerkt worden door infiltratie van neutrofiële granulocyten en de productie van pro-inflammatoire cytokines.

Epidemiologisch onderzoek heeft blootstelling-respons relaties aangetoond tussen werkgerelateerde endotoxineblootstelling en een versnelde afname van de longfunctie, luchtwegklachten en bronchiale hyper-reactiviteit.

Werknemers die langdurig blootstaan aan hoge endotoxineniveaus hebben een verhoogd risico op astma en chronische obstructieve longaandoeningen. Anderzijds heeft een aantal onderzoeken juist omgekeerde verbanden aangetoond tussen endotoxineconcentraties in huisstof en atopie en allergische astma bij kinderen uit boerengezinnen, maar ook bij kinderen uit een stedelijke omgeving. Volgens weer andere onderzoeksresultaten zijn ook volwassenen die op een boerderij zijn opgegroeid nog steeds aantoonbaar minder vaak atopisch dan leeftijdsgenoten die niet uit een boerengezin afkomstig zijn. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de endotoxineconcentraties in huisstof vaak hoger zijn bij boerengezinnen. Recent onderzoek heeft gesuggereerd dat endotoxineblootstelling op latere leeftijd nog steeds bescherming biedt tegen atopie en allergische astma. Niet alle aan endotoxine blootgestelde werknemers ontwikkelen luchtwegklachten of meetbare ontstekingsreacties, zelfs bij zeer hoge blootstellingsniveaus. Aangeboren en verworven kenmerken kunnen de gevoeligheid voor endotoxineblootstelling beïnvloeden wat een aanzienlijke heterogeniteit in gezondheidseffecten kan veroorzaken binnen een groep werknemers met vergelijkbare endotoxineblootstelling.

Het belangrijkste doel van dit proefschrift was het onderzoeken van relaties tussen endotoxineblootstelling en effecten op de luchtwegen en allergie bij volwassenen met een soms zeer hoge werkgerelateerde blootstelling aan endotoxine. Daarnaast werd onderzocht of 1) de capaciteit van *ex vivo* gestimuleerde witte bloedcellen om cytokines te produceren en 2) variatie in genen die een rol spelen in de

aangeboren immuniteit van invloed waren op verbanden tussen blootstelling en effecten op de luchtwegen.

In plaats van gemeten endotoxineblootstellingsniveaus hebben veel studies het houden van vee gebruikt als maat voor verhoogde endotoxineblootstelling. Deze aanpak is ook gekozen in een vragenlijstonderzoek onder 1.205 conventionele en 593 biologische boeren. Het doel van deze survey was het vergelijken van de prevalentie van hooikoorts en astmasymptomen bij conventionele en biologische boeren en het onderzoeken van verbanden tussen het opgroeien op een boerderij, agrarisch werk als volwassene en luchtwegsymptomen.

Biologische boeren bleken minder vaak last te hebben van een piepende ademhaling ('piepen') met kortademigheid en hadden iets vaker hooikoorts dan conventionele boeren.

Een biologische bedrijfsvoering bleek echter geen onafhankelijke determinant voor hooikoorts te zijn wanneer dit verband gecorrigeerd werd voor andere variabelen.

Veehouders die op een boerderij waren opgegroeid hadden een drie keer lagere hooikoortsprevalentie dan akker- en tuinbouwers die als kind niet op een boerderij woonden met een odds ratio (OR) en 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) van 0,3 (0,1-0,5). Akker- en tuinbouwers die als kind op een boerderij woonden en veehouders die als kind niet op een boerderij woonden hadden een verlaagde hooikoortsprevalentie ten opzichte van akker- en tuinbouwers die als kind niet op een boerderij woonden, maar deze verschillen waren niet statistisch significant. Het gebruik van desinfecterende middelen die quaternaire ammoniumverbindingen bevatten was positief geassocieerd met hooikoorts (OR 2,1 (1,0-4,4)). Opgroeien op een boerderij en werkgerelateerde variabelen waren niet geassocieerd met astma. Boeren hadden een lager risico op astma en astmasymptomen zoals piepen vergeleken met een steekproef uit de algemene Nederlandse bevolking van het Europese Luchtwegonderzoek (ECRHS). Deze studie laat zien dat de combinatie van opgroeien op een boerderij en werk als veehouder op volwassen leeftijd zowel bij biologische als conventionele boeren bescherming lijkt te bieden tegen allergie.

Verder beschrijft dit proefschrift een onderzoek onder Nederlandse boeren en werknemers in de agrarische industrie (bloembollen-, diervoeder-, uien-, en zaai-zaadver-

¹ Promotie instituut: IRAS, Universiteit Utrecht; promotiedatum: 25 november 2008; email: L.A.Smit@uu.nl

werkende industrie). Onder deze populatie zijn in totaal 249 persoonlijke inhaleerbaar-stofmonsters verzameld gedurende de werkdag. In de stofmonsters werd het endotoxinegehalte bepaald, waarbij sterk uiteenlopende endotoxineblootstellingsniveaus werden gemeten (~10 tot 10.000 EU/m³). De niveaus bij de minst blootgestelde werknemers waren maar zeer licht verhoogd in vergelijking met achtergrondwaarden, terwijl andere werknemers zeer hoog blootgesteld waren met niveaus die buiten de werkomgeving normaalgesproken nooit worden gevonden. De meetgegevens zijn bewerkt tot een "job-exposure matrix". Met deze matrix werden endotoxineblootstellingsniveaus voor alle deelnemers aan het onderzoek vastgesteld.

Blootstelling-respons relaties werden bepaald tussen werkgerelateerde endotoxineblootstelling en allergie- en luchtwegklachten, waarbij er rekening mee werd gehouden of deelnemers al dan niet op een boerderij opgegroeid waren. Verbanden tussen endotoxineblootstelling en vragenlijstgegevens over symptomen van 877 deelnemers werden geanalyseerd met behulp van meervoudige logistische regressie. Gecorrigeerde Odds Ratio's (ORs) voor een interkwartiel range toename in de hoogte van endotoxineblootstelling waren significant verhoogd voor luchtwegsymptomen zoals piepen (OR (95%BI) 1,41 (1,16-1,72)), piepen met kortademigheid (OR 1,50 (1,18-1,90)) en dagelijks hoesten (OR 1,29 (1,03-1,62)). Aan de andere kant was endotoxineblootstelling juist geassocieerd met een lagere hooikoortsprevalentie (OR 0,62 (0,49-0,78)). Mensen die op een boerderij waren opgegroeid hadden een lagere hooikoortsprevalentie, maar de eerder genoemde verbanden tussen endotoxineblootstelling, luchtwegklachten en hooikoorts weken niet af bij mensen die op een boerderij waren opgegroeid.

Daarnaast werden verbanden geanalyseerd tussen endotoxineblootstelling en objectief gemeten gezondheidseffecten, namelijk atopie en bronchiale hyper-reactiviteit voor methacholine (BHR). Daarnaast werd onderzocht of atopie een rol speelt bij het verkrijgen van endotoxine-gerelateerde effecten op de luchtwegen. Atopie werd bij 427 boeren en werknemers in de agrarische industrie bepaald op basis van specifiek serum IgE tegen veel voorkomende inhalatie-allergenen. BHR werd bij 113 deelnemers bepaald. Mensen die op een boerderij waren opgegroeid waren minder vaak atopisch en hadden minder vaak specifiek IgE tegen graspollen dan mensen die niet op een boerderij waren opgegroeid. Er was een omgekeerd verband tussen endotoxineblootstelling en atopie (OR voor een interkwartiel range toename in de hoogte van endotoxineblootstelling 0,56 (0,42-0,74)) en IgE tegen graspollen (OR 0,52 (0,37-0,73)), maar dit verband werd alleen gevonden bij mensen die *niet* op een boerderij waren opgegroeid. Het is onwaarschijnlijk dat deze omgekeerde associatie vooral een resultaat is van "healthy worker" selectie, aangezien een significant verband tussen endotoxineblootstelling en atopie en IgE tegen graspollen ook werd gevonden bij werknemers die geen allergische klachten hadden. Net als in de gehele (vragenlijst)populatie was endotoxineblootstelling positief geassocieerd met piepen op de borst (OR 1,30 (1,01-

1,67)), en daarnaast ook met de BHR (1,55 (1,03-2,35)), ongeacht of deelnemers op een boerderij opgegroeid waren. Hoewel piepen en BHR significant geassocieerd waren met atopie, was slechts 14,7% en 26,4% respectievelijk van de prevalentie toe te schrijven aan atopie. Verbanden tussen endotoxineblootstelling en luchtwegeffecten werden bij zowel atopische als niet-atopische deelnemers gevonden. Stikstofoxide (NO) wordt door de luchtwegen geproduceerd, en de fractie uitgedemde NO (FE_{NO}) kan worden gemeten als marker van luchtweginflammatie. FE_{NO} werd online bepaald bij 425 boeren en werknemers in de agrarische industrie. Een significante, positieve blootstelling-respons relatie tussen endotoxineblootstelling en FE_{NO} werd gevonden, echter alleen bij niet-atopische niet-rokers ($P=0,001$). FE_{NO} was significant geassocieerd met piepen en andere astmasymptomen, ongeacht atopie en rookgewoonten. Relaties tussen endotoxineblootstelling en symptomen veranderden nauwelijks wanneer gecorrigeerd werd voor FE_{NO}, wat erop wijst dat de rol van FE_{NO} als intermediaire factor tussen endotoxineblootstelling en luchtwegsymptomen beperkt lijkt te zijn.

Een hoge blootstelling aan endotoxines kan leiden tot luchtwegklachten en luchtwegobstructie, maar niet iedereen is hier even gevoelig voor. Er werd onderzocht of de aanwezigheid van luchtwegproblemen voor een deel toe te schrijven is aan het vermogen van ontstekingscellen om cytokines te produceren wanneer ze gestimuleerd worden met lipopolysaccharide (LPS, gezuiverd endotoxine). Bij 412 boeren en werknemers in de agrarische industrie werd de longfunctie bepaald en TNF α , IL1 β , en IL10 productie door perifere bloedcellen werd gemeten in *ex vivo* LPS-gestimuleerde bloedmonsters. Voor elke cytokine werd de mediane concentratie gebruikt als afkappunt om deelnemers onder te verdelen in een groep "lage responders" en een groep "hoge responders". Hoge IL10 responders hadden een hogere prevalentie luchtwegklachten dan lage IL10 responders (ORs tussen 2,03 and 5,10; $P<0,05$). De *ex vivo* TNF α respons was ook positief geassocieerd met de aanwezigheid van symptomen, maar dit verband was niet statistisch significant. Er was geen verband tussen IL1 β respons en symptomen. Voor elk van de drie cytokines bleek dat onder hoge responders positieve en significante verbanden aanwezig waren tussen endotoxineblootstelling en astmasymptomen, en tussen endotoxineblootstelling en luchtwegobstructie (een lagere FEV1; $P<0,05$), terwijl bij lage responders slechts zwakke, statistisch niet-significante verbanden werden gevonden. Het verband tussen endotoxineblootstelling en piepen was statistisch significant verschillend bij lage en hoge TNF α responders (interactie $P<0,05$). Met deze resultaten heeft dit onderzoek sterke aanwijzingen gegeven voor het bestaan van verschillen in individuele gevoeligheid voor de effecten van endotoxineblootstelling op de luchtwegen. Deze bleek geassocieerd te zijn met de *ex vivo* cytokine respons van LPS-gestimuleerde ontstekingscellen.

Dit proefschrift beschrijft ten slotte twee onderzoeken naar genetische factoren en gen-omgeving-interacties die een rol kunnen spelen bij astma en allergie. In allebei de studies

werd onderzocht of "single nucleotide polymorphisms (SNPs)" in genen van het aangeboren immuunsysteem zoals *CD14* en Toll-like receptor 2 en 4 (*TLR2* en *TLR4*) zouden kunnen leiden tot een afwijkende respons op microbiële blootstellingen, wat tot uiting zou kunnen komen in de gevoeligheid voor astma en atopie.

Een patiënt-controle-onderzoek werd uitgevoerd binnen een cohort van 1.901 jonge Deense boeren. Bij 100 boeren met recent ontstane astma en 88 boeren zonder astma werd het genotype bepaald voor drie *CD14* SNPs, drie *TLR2* SNPs en twee *TLR4* SNPs. Aan het begin van de studie waren huidpriktesten uitgevoerd, en atopie werd gedefinieerd als een positieve huidpriktest tegen ten minste een van de veel voorkomende inhalatie-allergenen. Zowel bij de boeren met astma als bij de controles waren 17 deelnemers atopisch (respectievelijk 17,0% en 19,3%). Het *CD14*-260T allel was significant geassocieerd met een lagere atopieprevalentie met een OR van 0,39 (0,21-0,72; additief genetisch model), terwijl het *CD14*-651T allel juist positief geassocieerd was met atopie (OR 2,53 (1,33-4,80; additief genetisch model)). Deze resultaten werden bevestigd door haplotype-analyse. Gestratificeerde analyse voor opgroeien op een boerderij liet zien dat de effecten van beide *CD14* SNPs op atopie sterker waren bij boeren die op een boerderij geboren en opgegroeid waren, hoewel er geen statistisch significante interactie was. Er werden geen verbanden gevonden tussen *CD14*, *TLR2* of *TLR4* genotypes en nieuw-ontstane astma.

Het is eerder aangetoond dat volwassenen een lagere astma prevalentie hebben wanneer ze als kind in een landelijk gebied woonden. Een mogelijke verklaring voor deze observatie zou kunnen zijn dat deze mensen als kind een hogere blootstelling hadden aan microbiële agentia. De relatie tussen SNPs in *CD14*, *TLR2*, *TLR4* en *TLR9* genen en astma bij volwassenen werd onderzocht, waarbij rekening werd gehouden of ze als kind in een landelijk gebied woonden. Bij volwassen deelnemers aan de Franse epidemiologische studie naar de genetica en omgevingsfactoren van astma, bronchiale hyper-reactiviteit en atopie (EGEA) werd het genotype bepaald van 25 SNPs in *CD14*, *TLR2*, *TLR4* en *TLR9*. Een patiënt-controle-onderzoek werd uitgevoerd onder niet-verwante deelnemers (239 astmapatiënten en 596 personen zonder astma), en een associatietest onder familieleden (FBAT) werd uitgevoerd bij 192 families die via een astmapatiënt waren geselecteerd. Het *TLR2*+596C allel was geassocieerd met een verhoogd risico op astma, zowel in het patiënt-controle onderzoek als in de analyses onder familieleden (onder een dominant genetisch model OR 1,91 (1,34-2,72), $P=0,0003$; Z-waarde FBAT=2,48, $P=0,01$). In atopische deelnemers (atopie was vastgesteld via een positieve huidpriktest) bleek het *CD14*-260C allel negatief geassocieerd te zijn met astma (additief genetisch model, OR 0,66 (0,48-0,91)). Significante gen-omgeving interacties tussen variatie in *CD14* en *TLR* genen en het opgroeien in een landelijk gebied werden aangetoond voor tien SNPs. In atopische deelnemers met het *CD14*-260CC genotype bleek het opgroeien in een landelijk gebied te beschermen tegen astma (OR 0,32 (0,12-0,85)),

terwijl er geen verband was tussen het opgroeien in een landelijk gebied en astma bij atopische dragers van het *CD14*-260T allel (OR 1,11 (0,65-1,90); gen-omgeving interactie $P<0,05$).

Samengevat laten de resultaten beschreven in dit proefschrift zien dat de endotoxineblootstelling bij boeren en werknemers in de agrarische industrie een significant dosis-afhankelijk verband vertoont met een verhoogd risico op astma-gerelateerde luchtwegproblemen, die voornamelijk worden gekarakteriseerd door een niet-atopisch fenotype. Aan de andere kant werden juist omgekeerde verbanden gevonden tussen de mate van werkgerelateerde endotoxineblootstelling en het voorkomen van hooikoorts en atopische sensibilisatie. Individuele gevoeligheid voor de negatieve gevolgen van blootstelling aan endotoxines bleek een belangrijke rol te spelen: in de groep deelnemers van wie de LPS-gestimuleerde bloed monocyten een hogere cytokine respons vertoonden waren de verbanden tussen endotoxineblootstelling en effecten op de luchtwegen veel sterker dan bij mensen met een lage cytokine respons. Een patiënt-controle onderzoek onder jonge boeren, en een patiënt-controle-onderzoek en een familieonderzoek onder volwassenen naar astma en atopie suggereerden gen-omgeving interacties tussen genen die een rol spelen in de aangeboren immuniteit en blootstelling aan endotoxine of andere microbiële agentia in de werk- of leefomgeving. Hoewel endotoxine – ook op latere leeftijd – bescherming zou kunnen bieden tegen allergieën, benadrukt dit proefschrift het belang van de reductie van endotoxineblootstellingsniveaus in de landbouw en agrarische industrie om werknemers beter te beschermen tegen chronische luchtwegaandoeningen. Maatregelen en grenswaarden zouden daarbij niet alleen op de gemiddelde werknemer gericht moeten zijn, maar ook - indien enigszins mogelijk - onder alle omstandigheden voldoende bescherming moeten bieden aan de meest gevoelige individuen.

Voor het hele proefschrift zie:

<http://igitur-archive.library.uu.nl>