

De betekenis van dierexperimenteel onderzoek bij de risicoschatting van allergeenblootstelling

C. Frieke Kuper

TNO | Kennis voor zaken



CGC Arbeidstoxicologie

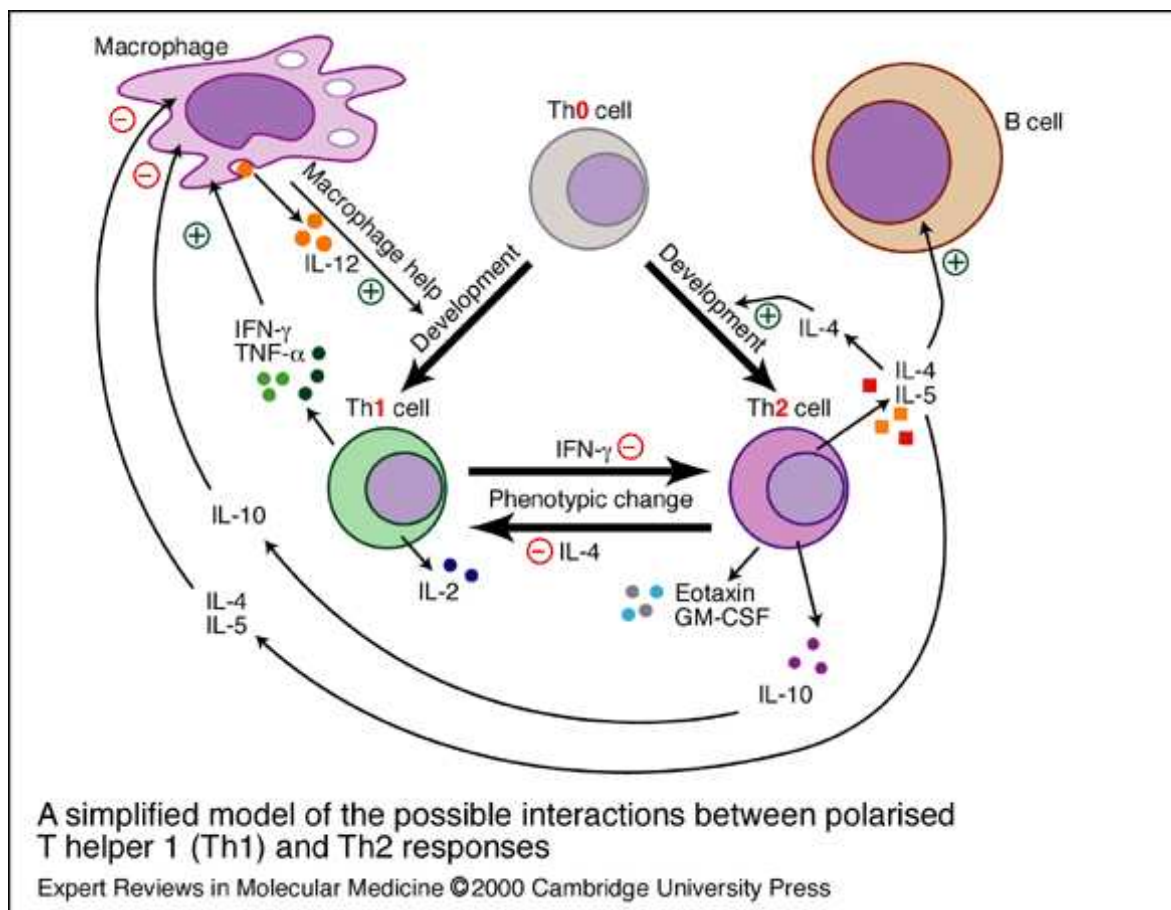
Dieren zijn geen mensen.....



Focus

- **Moeten huidcontact en inademing wel gescheiden worden?**
Bij proefdieren blijkt huid zeer efficiënte route om luchtwegen te sensibiliseren: geldt dat ook voor de mens?
- **Welke parameters voor vaststellen van drempelwaarden?**
- Is co-blootstelling aan irriterende stoffen een risicofactor?
- **Bij onderzoek naar drempelwaarden rekening houden met genetische predispositie van proefdier? Is dat relevant voor de mens (bv. atopie)?**

In proefdierwereld:
 Allergie = Polarisatie van immuunrespons: Thelper1 of Thelper2



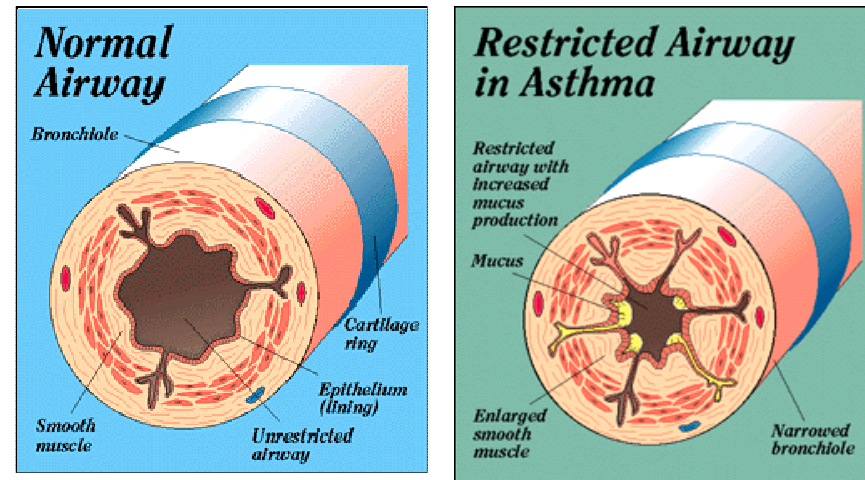
IgE, mast cells

Simplificatie gebaseerd op waarnemingen bij de mens: Allergische ziekten met hoogste incidentie

HUID: Allergische contact dermatitis
– vnl. Th1



LUCHTWEGEN: Astma – vnl. Th2,
IgE)



Moeten huidcontact en inademing wel gescheiden worden?

- Allergie is een twee-stappen proces:
niet-klinische sensibilisatie stap en klinische provocatie stap (allergie)
- In principe is sensibilisatie een systemisch proces, te bereiken via verschillende routes van blootstelling (huid, inademing, oraal)



Proefdiergegevens over sensibilisatie: Th2

In proefdieren niet alle routes even effectief om lichaam (incl. luchtwegen) te sensibiliseren voor Th2 type allergie

Huid blijkt zeer geschikte route

Afhankelijk van huiddoorlaatbaarheid: Meeste stoffen gaan niet makkelijk door de huid, tenzij huid extra doorlaatbaar is (irritatie door vehikel, vocht, enzym dat huid aantast)

Intraperitoneale route wordt ook gebruikt (niet fysiologisch, werkt wel)



Proefdiergegevens over sensibilisatie: Th2

Waarom luchtwegen niet zo effectief?

Bovenste luchtwegen en maag-darmtractus hebben goed ontwikkeld, immunologisch systeem om tolerantie te induceren (deze routes hebben geen sterke mechanische barriere, zoals huid; luchtwegen en darmen moeten niet voortdurend ontstoken zijn)

Onderzoek naar sensibilisatie via huid: benodigde dosis chemisch allergeen voor Th2 reactie tussen 3 en 30x hoger dan voor Th1 reactie: vooral morsen lijkt risico voor (luchtweg)sensibilisatie voor Th2



Zulke hoge concentraties voor luchtwegen moeilijk te bereiken of te toxisch/irriterend?

Proefdiergegevens over sensibilisatie: Th1

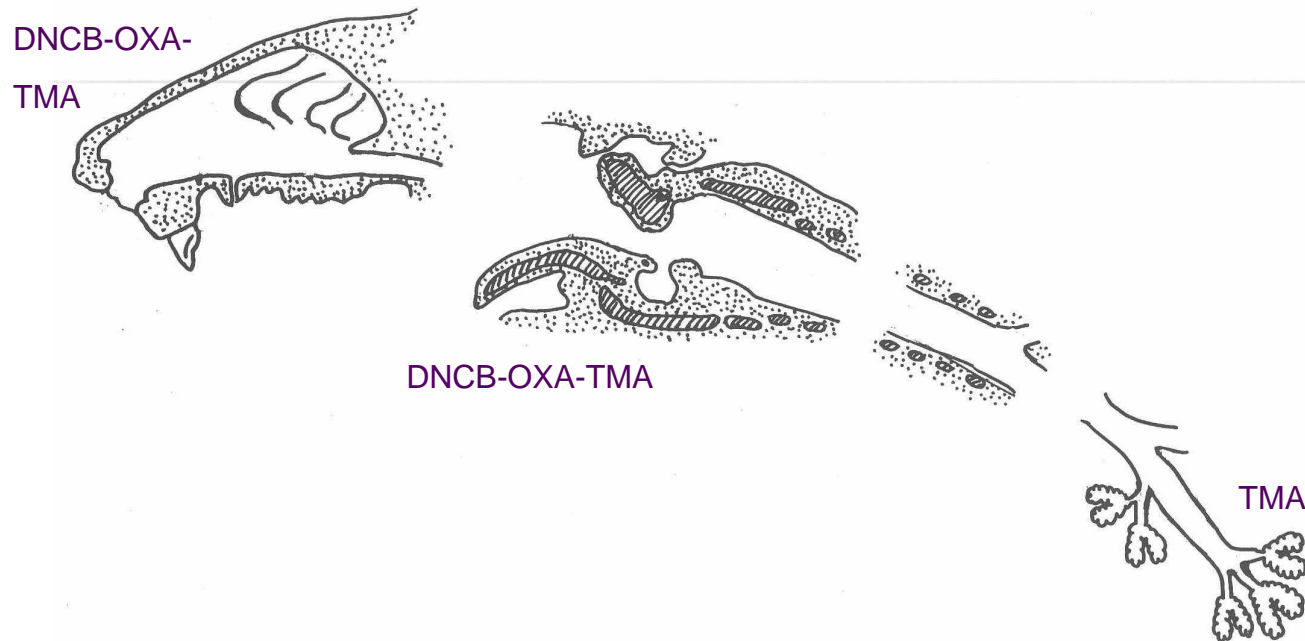
Recent onderzoek:

Huid, maar ook luchtwegen lijken geschikte route om lichaam te sensibiliseren voor Th1 allergie/klein-moleculaire contactallergenen (dinitrochlorbenzeen, isoeugenol, cinnamal)



Proefdiergegevens over provocatie

- Provocatie is (altijd?) een lokaal proces, afhankelijk van contact lichaam met allergeen (afhankelijk van o.a. inspanning)



Relevantie voor de mens?

- Sensibilisatie (inclusief luchtwegen) kan getest worden in bloed (serologische test op aanwezigheid van specifieke antilichamen, IgE).
- Luchtwegallergie (Th2) kan getest worden met provocatie in huid (huidpriktest).
Afwezigheid huidreacties op werkvloer door te lage concentraties allergeen?

Conclusie: huidcontact en inademing ook bij mens niet scheiden als het om allergie gaat. Doorlaatbaarheid huid voor vluchtige allergenen groot en arbeidsomstandigheden kunnen huid extra doorlaatbaar maken:



Huid ook beschermen!

Drempelwaarden voor sensibilisatie?

Bescherming tegen sensibilisatie lijkt biologisch gezien het meest zinvol

We weten niet of sensibilisatie met de tijd uitdooft.

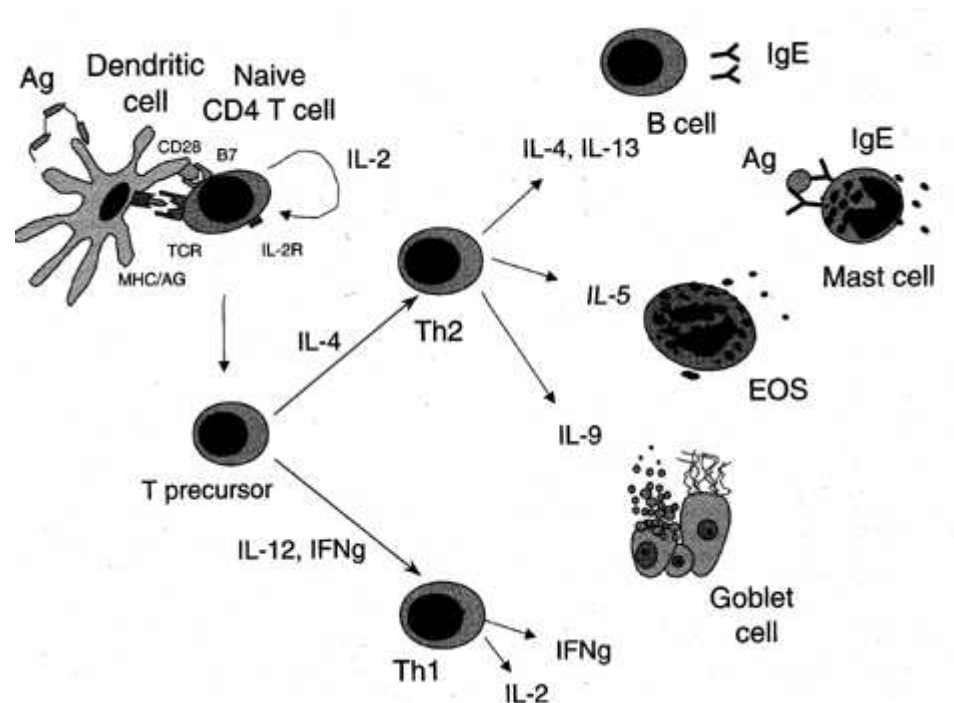
Sensibilisatie = immunisatie?

Vaccinatie kan lange tijd blijven bestaan, maar heeft mogelijk zo nu en dan booster nodig.



Theoretisch is er drempelwaarde voor sensibilisatie: antigeen-presenterende cel moet minimum aantal moleculen binden om actief te worden: groot oppervlak huid met lage dosis minder erg dan klein oppervlak met hoge dosis (hoe is dat in luchtwegen?)

Kiekhäfer CM, Kelly EA, Jarjour NN. 2001.



Test voor sensibilisatie: LLNA

(niet gevalideerd voor HMW stoffen)

Protocol

Dag 1, 2, 3 ————— Dag 5 of 6

Applicatie teststof
dorsale kant oren
muis of rat
óf inhalatie teststof

Ip injectie van radioactief thymidine
Verzamelen oor-drainerende lymfeklier
Bepalen proliferatie (scintillatieteller)

Bepalen SI (stimulatie index) en EC3 waarde = de dosis van de teststof die nodig is om de proliferatie met een factor 3 te stimuleren.

Sensibilisatie huid versus inademing: LMW allergenen dermale LLNA – respiratoire LLNA

Rangorde teststof via huid	Berekende totale dosis / EC3 waarde %	Rangorde teststof via inhalatie	Berekende totale dosis / Geschatte EC3 waarde conc. x tijd
OXA	0.02 / 0.013	TDI	0.05 / 7.5 x 45
DNCB	0.07 / 0.044	OXA	0.09 / 30 x 22
TDI	0.16 / 0.109	PA	0.09 / 15 x 45
TMA	0.33 / 0.218	TMA	0.27 / 30 x 67
PA	0.54 / 0.357	DNCB	0.27 / 30 x 67

Sensibilisatie via luchtwegen, gemeten a.h.v. verschillende eindpunten (review Arts et al., 2006)

<i>LMW allergen</i>	<i>Gebruikte concentraties/aantal blootstellingen</i>	<i>Drempelwaarde</i>	<i>Dose response</i>
HDI-biuret	5x	2.7 mg/m ³	ja
HDI-isocyanuraat	5x	3 mg/m ³	ja
MDI polymeric	5 – 835 mg/m ³ , 1x	-	ja
TDI	5x	0.12 ppm	ja
	70x	0.02 ppm	n.v.t.
TMA	5 mg/m ³ , 1x, 3x of 5x	n.v.t.	ja, dosis = aantal blootstellingen

Sensibilisatie via luchtwegen gemeten a.h.v. verschillende eindpunten (review Arts et al., 2006)

<i>HMW allergen</i>	<i>Gebruikte concentraties</i>	<i>Drempelwaarde</i>	<i>Dose response</i>
Alcalase	i.t. 10x	-	ja
	Inhalatie, 40x	-	ja
Subtilisin	5x	1.9 mg/m ³	ja
	5x	0.041 mg/m ³	ja
	<1 – 64 mg/m ³ , 6x	-	ja
OVA	0.025 – 0.250 mg/m ³	- (0.025 mg/m ³ geen allergy, maar wel IgE)	ja

Samenvatting drempelwaarden sensibilisatie

- Er worden met name NOEL's gevonden voor (sub)acute luchtwegblootstellingen; weinig onderzoek naar chronische blootstelling.
- Voor sommige allergenen ligt drempelwaarde zo laag, dat het in praktijk neerkomt op afwezigheid drempelwaarde.
- Dierexperimenteel werk vooral gericht op sterke allergenen



Indeling allergenen in categorieën op basis van potentie?

Vergelijking dermale EC3 waarden van huidallergenen in proefdier met sensibilisatie in mens (Basketter et al., 2000)

20 stoffen ingedeeld in 5 potentie-klassen:

Mens

Sterk allergeen

Matig allergeen

Zwak allergeen

Niet-sensibiliserend

Dier

lage EC3 waarde (klasse 1: 0.01 en 0.08%)

matige EC3 waarde (klasse 2: rond 1%)

hoge EC3 waarde (klasse 3: rond 10%)

geen EC3 waarde (klassen 4 en 5)

Drempelwaarden voor provocatie?

Mensen, die al gesensibiliseerd zijn, moeten worden beschermd:
drempelwaarden voor provocatie nodig.



Drempelwaarden voor provocatie?

- Drempelwaarden voor provocatie blijken (veel) lager te liggen dan voor sensibilisatie: extra reden om vooral sensibilisatie te voorkomen
- Veel respiratoir allergenen ook irriterend voor de luchtwegen, maar drempelwaarde voor irritatie hoger dan voor provocatie (en sensibilisatie)

Inhalatiestudie met trimellitic anhydride (TMA)

	BN rat (Th2-prone)	Wistar rat (Th1-prone)
NOEL voor luchtwegirritatie op basis van longfunctie (ademhalingsfrequentie en patroon)	14 mg/m ³	14 mg/m ³
NOEL voor acute provocatie/luchtwegallergie	0.2 mg/m ³	Geen functionele veranderingen > 250 mg/m ³

Risicofactoren: rol van irritatie

- Veel luchtwegallergenen zijn zelf irriterend:
Irritatie slecht gedefinieerd: effect op ademhalingsfrequentie, inductie van celschade, activatie van macrofagen (eiwitdeeltjes)
- Op werkplek vaak co-blootstelling aan irriterende stoffen
Verwachting: luchtwegontsteking en celschade door irriterende stoffen versterkt kans en mate van luchtwegallergie

Dierexperimenten met TMA en blootstelling aan SO₂ of silica wijzen op complexe interactie: bij meeste dieren bescherming tegen allergie, door inductie plaveicel epitheel in luchtwegen? Bij enkel dier versterking allergie

Risicofactoren: genetische make-up (Th1- of Th2 type)

	Stimulatie- index 1% DNCB	Stimulatie- index 50% TMA	IgE conc. In serum (µg/ml) 1% DNCB	IgE conc. In serum (µg/ml) 50% TMA
Th1-prone Wistar rat	6.8	6.9	0.14 (0.15 contr.)	0.19
Th2-prone BN rat	3.0	3.0	1.42 (1.34 contr.)	3.84**

Risicofactoren: genetische make-up (Th1- of Th2 type)

		Immunisatie/ Sensibilisatie (LLNA)	Astma-achtige ademhaling	Allergische luchtwegontsteking
BN rat Th2-prone	DNCB -Th1 Contact allergeen	Ja	Nee	Nee
Wistar rat Th1-prone	DNCB	Ja	Nee	Ja
BN rat	TMA-Th1/Th2 Respir. allergeen	Ja	Ja	Ja
Wistar rat	TMA	Ja	Nee	Ja

Dierexperimenteel (en ook klinisch en epidemiologisch) onderzoek suggereert dat drempelwaarden bestaan: mogelijke benadering

- Waarschijnlijk zullen de meest bruikbare drempelwaarden vastgesteld kunnen worden voor de zwak tot matig sensibiliserende stoffen
- testen:
 - Via huidcontact of inademing?
 - Alleen voor sensibilisatie of ook provocatie?
 - Voor enkele of herhaalde blootstelling?
 - Rekening houdend met genetische make-up van testdier/teststelsel?

Voor sterk-sensibiliserende stoffen bepalen van aanvaardbaar risico/risicogetallen

REACH

- REACH heeft veel aandacht voor sensibilisatie, maar er is voor luchtwegsensibilisatie geen gevalideerde test. De allergene activiteit van een nieuwe stof zal dus gemist worden.

Mogelijke benadering: vermijdt huidcontact en inademing van alle stoffen die kunnen sensibiliseren (positieve LLNA, Guinea pig test, nog te ontwerpen in-vitro test), op zijn minst de sterk sensibiliserende stoffen.