

СЕРУМНИ НИВА НА НЕОПТЕРИН И IL-12 p40 ПРИ ЕКСПОНИРАНИ НА НЕОРГАНИЧЕН ПРАХ

Г. Пракова¹, П. Гидикова², Г. Сандева², Е. Славов³

¹УМБАЛ Ст. Загора ЕАД, ²Катедра Хигиена, епидемиология и инфекциозни болести,

³Катедра Молекулярна Биология, Имунология и Медицинска Генетика- МФ при ТУ

SERUM LEVELS OF NEOPTERIN AND INTERLEUKIN-12p40 AMONG EXPOSED TO INORGANIC DUST

G. Prakova¹, P. Gidikova², G. Sandeva², E. Slavov³

University Hospital Stara Zagora, Department of Hygiene, Epidemiology and Infection diseases, Department of Biology and Clinical immunology Medical Faculty, Thracian University Stara Zagora

ABSTRACT

Alveolar macrophages play a major role in the pathogenesis of pneumoconioses, which trigger pulmonary inflammation through release of free radicals, enzymes and a large number of cytokines. Statistically significant higher levels of neopterin and IL-12p40 were found in the exposed workers compared to the control group. No significant differences in neopterin and IL-12p40 levels were found in the groups according to workplace. Higher serum levels of neopterin and IL-12p40 were present in the non-smoking workers compared to the smoker. Our results showed that in workers exposed to inorganic dust activation of microphages and some proinflammatory cytokines was present. The higher serum levels of neopterin and IL-12p40 in non-smoking workers compared to smoking ones were probably due to the suppressive effect of cigarette smoke on the immune system of the exposed workers.

Keywords: neoterin, IL-12p40, inorganic dust

УВОД

Алвеоларните макрофаги имат важна роля в патогенезата на пневмокониозите, причинявайки белодробно възпаление чрез освободените от тях свободни радикали, ензими и голям брой цитокини. Белодробна фиброза могат да предизвикат редица фактори, като неорганичен прах, радиация, както и някои лекарства. Прогнозата на интерстициалните белодробни заболявания е неблагоприятна, а настоящата терапевтична схема е с недобър ефект [27]. Последни данни, получени както от хора, така и от експериментални животни, са довели до значителен напредък в разбирането на механизмите, водещи до белодробна фиброза. Установено е, че някои цитокини участват не само в белодробното възпаление, характеризиращо се със струпване на възпалителни клетки в алвеоларното пространство, но и в стимулирането на фибробластите и синтеза на колаген. В участъците с белодробна фиброза са намерени редица възпалителни клетки, като мастоцити, неутрофили, еозинофили и лимфоцити [4,17,23,28]. Rom, W. N., R. G. Crystal, 1992 посочват алвеоларните макрофаги (AM) като "големите манипулатори на болестта" [18]. Неоптеринът и IL-12 се произвеждат предимно от макрофагите [3].

Неоптеринът е вещество с ниска молекулна маса от класа на птеридините и се продуцира от активираните макрофаги след стимулиране с γ -интерферон [19,24,25]. G. Gulumian et al., 2001 посочват серумния неоптерин като възможен маркер за ефект при експозиция на силициев диоксид [7].

Интерлевкин (IL)-12 е цитокин, произведен основно от активираните макрофаги, който участва в имунния отговор посредством контрола на Th1/Th2 [2,13,21]. В поредица от свои проучвания Hnaux, F. et al., 1999, 2002 установяват, че производството на IL-12p40 и Th2 има

важна роля във възпалителния и фиброзогенен отговор на белодробния паренхим при вдишване на неорганични прахови частици [8,9].

Цел на настоящата работа е да се изследват серумните нива на неоптерин и IL-12 p40 при лица, експонирани на неорганичен прах без клинични данни за белодробно и автоимунно заболяване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са серумните нива на неоптерин и IL-12p40 при 60 болни от силикоза, при 71 работници експонирани на неорганичен прах и при 30-контролна група. На всички изследвани лица са взети кръвни проби, получени чрез венепункция, след попълване на информирано съгласие за участие в проучването. Определянето на неоптерин (ng/mL) и IL-12p40 (pg/ml) в серум е извършено посредством ELISA кит (DRG Diagnostics, Germany и BioSource, Austria), в съответствие с протокола на производителя.

Получените данни са обработени с помощта на програмен продукт Statistica 7 и Table for Windows.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На таблица 1 са представени резултатите за неоптерин и IL-12p40 при изследваните групи. Установява се достоверно по-високо серумно ниво на изследваните цитокини при болните от силикоза и при работниците експонирани на неорганичен прах в сравнение с това на контролната група. Незначимо по-високо ниво на цитокините е намерено при експонирани на неорганичен прах работници в сравнение с болните от силикоза. Тези резултати най-вероятно са свързани с повишената активност на макрофагите по време на активната експозиция на неорганичен прах. При болните от силикоза има по-ниска активност на макрофагите и по-ниско ниво на цитокини, което се предполага е резултат на преустановена трудовата дейност и съответно експозиция на неорганичен прах на лицата с доказано професионално белодробно заболяване.

Таблица 1. Серумни нива на неоптерин и IL-12 p40 при изследваните групи

Групи	Показатели	n	Неоптерин (ng/ml)	IL-12p40 (pg/ml)
Болни от силикоза		60	2,74±0,72*	94,5±51,60*
Експонирани на неорганичен прах		71	3,32±1,15*	122,4±70,9*
Контролна група		30	1,62±0,52	87,4±49,39

* $p < 0.05$ в сравнение с контролната група

Интерес представляват резултатите при експонирани работници в зависимост от работното място. Установяват се достоверно по-високи нива при двете групи работници в сравнение с тези на контролната група. Няма значима разлика в серумните нива на изследваните цитокини при изследваните лица на две различни работни места. Измерените концентрации на неорганичния прах (инхалабилна и респирабилна фракция) и на СКСД показват два пъти по-високи нива за работниците от група 2 (добив на въглища) в сравнение с тези от група 1 (разкривка на въглищни пластове). Процентното съдържание на СКСД в респирабилната фракция за двете работни места се движи в еднакви граници от 3,7 до 7,9%. Отсъствието на значима разлика с серумните нива на цитокините при двете групи работници според нас е свързано с еднаквото съдържание на СКСД в респирабилната фракция на неорганичния прах.

Таблица 2. Серумни нива на неоптерин и IL-12 p40 при експонираните на неорганичен прах работници в зависимост от работното място

Работно място	Показатели	n	Неоптерин (ng/ml)	IL-12p40(pg/ml)
Група 1 (разкривка на въглищни пластове)		29	3,21±0,96*	127,95±66,46*
Група 2 (добив на въглища)		42	3,40±1,27*	118,59±74,45*
Контролна група		30	1,62±0,52	87,4±49,39

* $p < 0.05$ в сравнение с контролната група

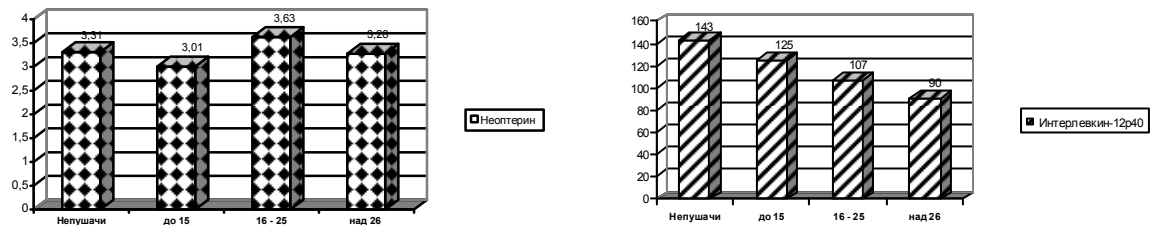
Не се установяват значими различия при анализиране на получените резултати за цитокините по възраст на експонираните работници. Тези данни не съответстват на докладваните от други автори, които намират значително нарастване на концентрациите на неоптерин с възрастта, и според които причините за това са въпрос на бъдещи дискусии. [6,11,12,16,20,22]. Резултатите от нашето проучване са при лица, експонирани на неорганичен прах, което предполага участието на два неблагоприятни фактора и тяхното синергично действие върху клетъчно-медираните имунни реакции.

Анализът на резултатите в зависимост от фактора тютюнопушене (Таблица 3 и Фигура 1) показва по-високи серумни нива на цитокините в групата на непушачите в сравнение с пушачите, като значима разлика има само по отношение на IL-12p40 (143,45±78,96 при непушачи и 107,02±61,50 при пушачи).

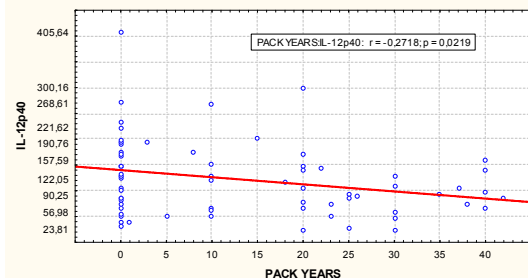
Таблица 3. Серумни нива на неоптерин и IL-12 p40 при експонираните на неорганичен прах работници в зависимост от наличието на тютюнопушене

Тютюнопушене	Показатели	n	Неоптерин (ng/ml)	IL-12p40 (pg/ml)
Непушачи		30	3,31±0,78	143,45±78,96*
Пушачи		41	3,17±1,37	107,02±61,50

* $p < 0.05$



Фиг. 1. Серумни нива на неоптерин и IL-12p40 при експонираните на неорганичен прах и продължителността на тютюнопушене в пакетогодини



Фиг. 2. Статистически значима корелационна зависимост между IL-12p40 и пакетогодините при експонирани на неорганичен прах ($r=-0,27$ $p=0,0219$)

Налице е значима корелационна зависимост с обратен знак между серумното ниво на IL-12p40 и пакетогодините при експонираните работници-пушачи (фигура 2).

IL-12 е ключов регулаторен цитокин в развитието на Th1 клетките и има особено значение в защитата на организма от паразити, вируси, бактерии и отхвърляне на туморни клетки. IL-12 се смята за мощен индуктор на клетъчно-медиерания имунитет, води до производство на интерферон (IFN-) (αТН1 цитокини) и подобрява клетъчно-медиераната цитолитична дейност (13).

Резултатите от нашето проучване съответстват на тези от Huaux F et al. 1999, 2002, които установяват, че фиброзни процеси в белите дробове на мишки са придружени от продължителна свръхпродукция на IL-12p40, но не и на IL-12p70. Авторите доказват, че алвеолит, предизвикан от инхалиране на частици от MnO₂, е свързан с регулация на IgG2a и IFN-, докато преминаването към фиброза, предизвикана от силициев диоксид, е резултат от повишени нива на IgG1. Повишените нива на неоптерин и IL-12 p40 при изследваните групи съвпадат с резултатите на цитираните автори, които правят извода, че производството на IL-12p40 и поляризацията на Th2 играят важна роля във възпалителните и фиброзни отговори на белодробния паренхим при вдишване на неорганични прахови частици.

Установеното от нас повишено серумно ниво на неоптерин и IL-12p40 както в групата на болните от силикоза, така и при групата на експонираните работници в сравнение с контролната потвърждава данните за важната роля на макрофагите в силициево индуцираната белодробна фиброза [8].

Значимо по-ниските серумни нива на цитокините при експонирани на неорганичен прах работници-пушачи е свързано с потисната клетъчно-медиерана цитолитична активност [1,14,26]. С помощта на миши модели хронично изложени на цигарен дим, Kroening PR et al., 2008 установяват по-ниска продукция на IL-12p70 и p40 и повишена на TNF-алфа при „пушачи“. Тези данни предполагат, че оксидативния стрес, генериран от експозицията на цигарен дим потиска производството на цитокини, което може да бъде компенсирано от прилагането на антиоксиданти[10].

Повишени нива на проинфламаторни цитокини IL-12 и TNF-α са били наблюдавани в BALF на мишки изложени на цигарен дим. След прекратяване на експозицията, нивата на TNF-α се връщат до изходните, а тези на IL-12 не се нормализират [3]. Подобни резултати съобщават de Heens G.L. et al., 2009, които намират по-ниско отношение на IL-12p40/IL-10 при пушачи с пародонтит в сравнение с непушачи (P <0.05) [5]. По-ниски концентрации на неоптерин при пушачите в сравнение с непушачите установяват Diamondstone,LS et al., 1994 [6]. Подтискащият ефект на тютюневия дим върху имунната система на човека е докладвано и от Moszczynski P. et al., 2001, което е в съответствие с получените в нашето проучване стойности на неоптерин и IL12p40 при експонираните на неорганичен прах работници-пушачи в сравнение с непушачите.

ИЗВОДИ

1. При болни от силикоза и при експонирани на неорганичен прах се установява активиране на макрофагите и клетъчно-медиерания имунен отговор потвърдено от значимо по-високите нива на неоптерин и IL-12p40 в сравнение с контролната група. По-високо ниво на активност се установява при експонираните на неорганичен прах работници в сравнение с болните от силикоза.

2. Активността на клетъчно-медиерания имунен отговор при експозиция на неорганичен прах зависи предимно от съдържанието на СКСД в респираторната фракция на инхалирания прах.

3. Значимо по-ниските серумни нива на неоптерин и IL-12p40 при експонирани на неорганичен прах работници-пушачи е свързано вероятно с потисната клетъчно-медиерана цитолитична активност. Това определя необходимостта от оценка и прецизиране на професионалния риск за развитие на белодробна фиброза при експонирани на неорганичен прах работници в зависимост от фактора тютюнопушене.

ЛІТЕРАТУРА

1. Arcavi, L., N. Benowitz. 2004. Cigarette Smoking and Infection, *Arch.Int.Med*,164, 20, 2206-2216.
2. Buttner, C., A. Skupin, T. Reimann, E. P. Rieber, G. Unteregger, P. Geyer, and K. H. Frank. 1997. Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17: 315-325.
3. Chung, KF: Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2001, 34:50s-59s
4. Corsini, E., M. I. Luster, J. Mahler, W. A. Craig, M. E. Blazka, and G. J. Rosenthal. 1994. A protective role for T lymphocytes in asbestos-induced pulmonary inflammation and collagen deposition. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11: 531-539
5. de Heens, GL, R.Kikkert, LA.Aarden, U.van der Velden, BG.Loos. 2009.Effects of smoking on the ex vivo cytokine production in periodontitis. *J Periodontal Res.*44(1):28-34.
6. Diamondstone,LS, DJ.Tollerud, D.Fuchs, H.Wachter, LM.Brown, E.Maloney. 1994. Factors influencing serum neopterin and β 2-microglobulin levels in healthy diverse population. *J Clin Immunol*,14:368-374.
7. Gulumian,G.,J.Murray,G.Nelson,L.Darvin,V.Valliathan,V.Castranova,P.Born,K.Donaldson, 2001. Biomarkers of silicosis, International EUROGIN-EAST conference, Vilnius.
8. Huaux, F., M. Arras, D.Tomasi, V.Barbarin, M.Delos, JP Coutelier, A.Vink, SH.Phan,JC. Renauld , D.Lison. 2002. A profibrotic function of IL-12p40 in experimental pulmonary fibrosis. *J Immunol.* Sep 1;169(5):2653-61.
9. Huaux, F., C. Lardot, M. Arras, M. Delos, M.C. Many, J.P. Coutelier, J.P. Buchet, J.C. Renauld, D.Lison.1999.Lung Fibrosis Induced by Silica Particles in NMRI Mice Is Associated with an Upregulation of the p40 Subunit of Interleukin-12 and Th-2 Manifestations. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Volume 20, Number 4, 561-572.
10. Kroening PR, Barnes TW, Pease L, Limper A, Kita H, Vassallo R. 2008. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J Immunol.*15;181(2):1536-47.
11. Ledochowski M, Murr C, Jäger M, Fuchs D. 2001. Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation. *Exp Gerontol*;36:1739-1747.
12. Ledochowski M, Murr C, Widner B, Fuchs D. Association between insulin resistance, body mass and neopterin concentrations. *Clin Chim Acta* 1999;282:115-123.
13. Ma X, Riemann H, Gri G, Trinchieri G. 1998. Positive and negative regulation of interleukin-12 gene expression. *Eur Cytokine Netw.*,9 (3 Suppl):54-64.
14. Mohan L.S., W. Kozak. 1998. Immunomodulatory effects of smoking. *Journal of Neuroimmunology*
15. Moszczynski P, Zabinski Z, Moszczynski P, Jr, Rutowski J, Slowinski S, Tabarowski Z. 2001. Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicol Lett*;118:121-127.
16. Reibnegger G, Huber LA, Jürgens G, Schönitzer D, Werner ER, Wachter H, et al. Approach to define "normal aging" in man. Immune function, serum lipids, lipoproteins and neopterin levels. *Mech Ageing Dev* 1988;46:67-82.
17. Rom, W. N., P. B. Bitterman, S. I. Rennard, A. Cantin, and R. G. Crystal. 1987. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 1429-1434.
18. Rom, W. N., and R. G. Crystal. 1992. Consequences of chronic inorganic dust exposure. In *Lung Injury*, 1st ed. R. G. Crystal and J. B. West, editors. Raven Press, New York. 125-137.

19. Saito M , Chichara J., Mouri T., Kurachi D., Yamamoto T., Nakajima S. 1996. Elevated local production of neopterin from alveolar macrophages from patients with interstitial lung diseases. *Gen Pharmacol.*, 27, (3), 483-6.
20. Schennach H., C. Murr, E. Gächter, P. Mayersbach, D. Schönitzer, D. Fuchs. 2002. Factors Influencing Serum Neopterin Concentrations in a Population of Blood Donors. *Clinical Chemistry* , 48: 643-645, *Clinical Chemistry*. 2002;48:643-645.
21. Sharma, S. K., J. A. MacLean, C. Pinto, and R. L. Kradin. 1996. The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 193-200.
22. Solichova D, Melichar B, Svobodova I, Blaha V, Zadak Z. 1999. Fluorescence analysis of antioxidant vitamins and neopterin in nonagenarians. *Biomed Chromatogr*;13:117-118.
23. Suzuki, N., T. Horiuchi, K. Ohta, M. Yamaguchi, T. Ueda, H. Takizawa, K. Hirai, J. Shiga, K. Ito, and T. Miyamoto. 1993. Mast cells are essential for the full development of silica-induced pulmonary inflammation: a study with mast cell-deficient mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9: 475-483.
24. Tzouvelekis A, G. Kouliatsis, S. Anevlavis, D. Bouros. 2005. Serum biomarkers in interstitial lung diseases. *Respiratory Research*, 6, 78. 9.
25. Vanhée, D., Gosset, P., Boitelle, A., Wallaert, B., Tonnel, A.B. 1995. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis *Eur Respir J*, 8, 834–842.
26. Vassallo, R., K. Tamada, J. S. Lau, P. R. Kroening, L. Chen. Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function to preferential induction of Th-2 priming. *The Journal of Immunology*, 2005.
27. Wolff, G., and R. G. Crystal. 1997. Biology of pulmonary fibrosis. In *The Lung*, 2nd ed. R. G. Crystal, J. B. West, E. R. Weibel, and P. J. Barnes, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. 192:2509-2524.
28. Zhang, K., M. Gharaee, Kermani, B. McGarry, D. Remick, and S. H. Phan. 1997. TNF-alpha-mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 158: 954-959., 483-6.