

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

IMPLICAȚIILE STRESULUI  
OXIDATIV ÎN REACȚIILE  
INFLAMATORII ȘI ALERGICE

---

Doctorand: **Andrea Daniela Muti (n. Stanciu)**

---

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Adriana Mureșan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCERE</b>  | <b>1</b>  |
| <b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1. Tipurile majore de radicali liberi și derivați ai acestora în organismele vii</b> | <b>5</b>  |
| 1.1. Speciile reactive ale oxigenului   | 5         |
| 1.2. Speciile reactive ale azotului   | 8         |
| <b>2. Stresul oxidativ ca model de semnalizare redox</b>                                | <b>9</b>  |
| <b>3. Speciile reactive ale oxigenului, antioxidanții și transducția semnalului</b>     | <b>10</b> |
| 3.1. Semnalizarea prin citokine și factori de creștere                                  | 11        |
| 3.2. Fosfatazele tirozin-proteice   | 11        |
| 3.3. Protein-kinazele non-receptor  | 11        |
| 3.4. Serin/treonin kinaze   | 12        |
| 3.5. Factorii nucleari de transcripție  | 13        |
| <b>4. Astmul profesional la izocianați</b>  | <b>15</b> |
| 4.1. Astmul profesional   | 15        |
| 4.2. Izocianații  | 16        |
| 4.3. Patogenia astmului indus de izocianați   | 17        |
| <b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>  | <b>19</b> |
| <b>1. Implicațiile stresului oxidativ în reacțiile inflamatorii și alergice</b>         | <b>21</b> |
| 1.1. Ipoteza generală de lucru  | 21        |
| 1.2. Material și metode generale  | 22        |
| 1.2.1. Loturile experimentale   | 22        |
| 1.2.2. Evaluarea stresului oxidativ   | 23        |
| 1.2.3. Examinarea histopatologică   | 24        |
| 1.2.4. Analiza statistică   | 25        |
| <b>2. Studiu 1. Inducerea astmului experimental cu TDI la șobolan</b>                   | <b>27</b> |
| 2.1. Ipoteza studiului  | 27        |
| 2.2. Material și metode   | 27        |
| 2.2.1. Protocolul experimental  | 27        |

|

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.2.    | Testul de anafilaxie cutanată pasivă  | 28        |
| 2.3.      | Rezultate   | 28        |
| 2.3.1.    | Astmul experimental indus cu TDI  | 28        |
| 2.3.2.    | Testul de anafilaxie cutanată pasivă  | 28        |
| 2.3.3.    | Examenul histologic   | 28        |
| 2.4.      | Discuții  | 33        |
| 2.5.      | Concluzii   | 34        |
| <b>3.</b> | <b>Studiu 2. Evaluarea stresului oxidativ sistemic în astmul experimental indus cu TDI la șobolan</b> | <b>35</b> |
| 3.1.      | Ipoteza studiului   | 35        |
| 3.2.      | Material și metode  | 36        |
| 3.2.1.    | Protocolul experimental   | 36        |
| 3.3.      | Rezultate   | 37        |
| 3.3.1.    | Concentrația MDA în ser   | 37        |
| 3.3.2.    | Grupările sulfhidril din ser  | 41        |
| 3.3.3.    | Donorii de hidrogen din ser   | 43        |
| 3.3.4.    | Glutathionul în ser   | 45        |
| 3.4.      | Discuții  | 50        |
| 3.5.      | Concluzii   | 53        |
| <b>4.</b> | <b>Studiul 3. Evaluarea stresului oxidativ în lavajul bronho-alveolar</b>                             | <b>55</b> |
| 4.1.      | Ipoteza studiului   | 55        |
| 4.2.      | Material și metode  | 55        |
| 4.2.1.    | Protocolul experimental   | 55        |
| 4.2.2.    | Analiza lichidului de lavaj bronhoalveolar  | 56        |
| 4.3.      | Rezultate   | 56        |
| 4.3.1.    | Malondialdehida (MDA) din lavaj bronho-alveolar (LBA)   | 56        |
| 4.3.2.    | Donorii de hidrogen (DH) din lavajul bronho-alveolar (LBA)  | 58        |
| 4.3.3.    | Glutathionul (GSH) în lavajul bronho-alveolar (LBA)   | 60        |
| 4.4.      | Discuții  | 64        |
| 4.5.      | Concluzii   | 65        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>5.</b> | <b>Studiul 4. Evaluarea histopatologică și a stresului oxidativ din țesutul pulmonar</b> | <b>67</b> |
| 5.1.      | Ipoteza studiului  | 67        |
| 5.2.      | Protocolul experimental  | 67        |
| 5.3.      | Rezultate  | 68        |
| 5.3.1.    | Analiza histopatologică  | 68        |
| 5.3.2.    | Malondialdehida (MDA) din țesutul pulmonar   | 71        |
| 5.3.3.    | Donorii de hidrogen (DH) pulmonari   | 73        |
| 5.3.4.    | Glutathionul (GSH) în țesut pulmonar   | 75        |
| 5.3.5.    | Proteinele carbonilate (PC) pulmonare  | 77        |
| 5.3.6.    | Grupările sulfhidril (SH) pulmonare  | 79        |
| 5.4.      | Discuții   | 85        |
| 5.5.      | Concluzii  | 87        |
| <b>6.</b> | <b>Concluzii generale</b>  | <b>89</b> |
| <b>7.</b> | <b>Originalitatea studiului</b>  | <b>91</b> |
|           | <b>REFERINȚE</b>   | <b>93</b> |

# STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Speciile reactive ale oxigenului sau radicalii liberi ai oxigenului (SRO/RLO) sunt specii chimice ce posedă un electron liber:  $O_2^-$  - radical superoxid;  $HO_2^-$  - radical perhidroxil;  $\cdot OH$  - radical hidroxil;  $RO_2^-$  - radical peroxil;  $RO\cdot$  - radical alcoxil.

Radicalii hidroxili sunt cei mai agresivi din cauza unei reactivități extreme, având astfel o viață scurtă, ceea ce face ca ei să acționeze la locul producerii lor, având o capacitate de difuziune foarte mică. În contrast, radicalii superoxid au o inerție chimică relativă, ceea ce le conferă o capacitate de difuziune mai mare.

Radicalul  $NO\cdot$  este unul dintre cei mai mici mediatori moleculari și este produs de organisme evaluate prin transformarea L-argininei în L-citrulină. Acest proces este catalizat de către enzima NO-sintetază (NOS).

Celule și țesuturile sunt în stare stabilă dacă există un echilibru între producerea și neutralizarea de SRO. Semnalizarea redox necesită dezechilibrarea acestei balanțe, care poate fi indusă de activarea sistemelor care produc SRO sau SRN. În anumite condiții producția de SRO poate fi puternică și persistentă astfel încât să nu se poată reveni la starea inițială de echilibru, dar sistemele vor atinge o nouă stare de echilibru stabilă, caracterizată de nivele mai crescute ale SRO, și de nivele mai crescute de aminoacizi liberi și expresie diferită a genelor datorate căilor de semnalizare redox-sensibile.

Stările patologice se dezvoltă în cazuri extreme de persistență a unor nivele înalte de SRO, fără ca acestea să necesite un dezechilibru al homeostaziei, ci mai degrabă de modificarea cronică a nivelului homeostaziei. Astfel simptomele patologice pot rezulta atât din efectele negative ale SRO cât și din modificările în expresia genelor mediate de SRO.

Fosfatazele tirozin-proteice (PTP) sunt probabil cele mai bine caracterizate ținte directe ale SRO. Inactivarea reversibilă a PTP de către SRO joacă un rol important în controlul redox și semnalizarea celulară.

În afară de protein-kinazele cu funcție de receptor, anumite protein-kinaze non-receptori (PTK), care aparțin familiei Src (kinaze Src) și Janus kinaze (JAK), sunt activate de SRO. NO produs de macrofagele activate și de celulele mieloidesupresoare inhibă activitatea Jak 1, Jak 2 și Jak 3 având ca efect inhibarea proliferării limfocitelor T.

Toți receptorii de tip serin/treonin kinază descriși în celulele mamiferelor sunt membrii ai superfamiliei TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$ 1 stimulează producția de SRO într-o varietate de celule și inhibă creșterea majorității celulelor-țintă, iar în unele celule inhibă expresia enzimelor antioxidante - MnSOD, Cu,Zn-SOD, catalaza.

Probabil cel mai important efect de semnalizare al SRO este în calea MAPK, care implică activarea factorilor nucleari de transcripție, ce controlează expresia genelor protectoare care repară ADN-ul modificat, stimulează sistemul imun, întrerupe proliferarea celulelor modificate și induce apoptoza.

Astmul ocupațional este o afecțiune definită prin limitarea variabilă a fluxului de aer, asociată cu inflamație și care poate fi atribuită condițiilor dintr-un anumit mediu profesional.

Din punct de vedere patogenetic sunt trei mecanisme de astm ocupațional: astm mediat de IgE, care apare după o perioadă de latență, astm indus de substanțe iritante, cu sau fără o perioadă de latență

și cu sindrom de disfuncție reactivă a căilor respiratorii, astmul din cauza agenților profesionali cu patogenie necunoscută și care poate prezenta, de asemenea, o perioadă de latență.

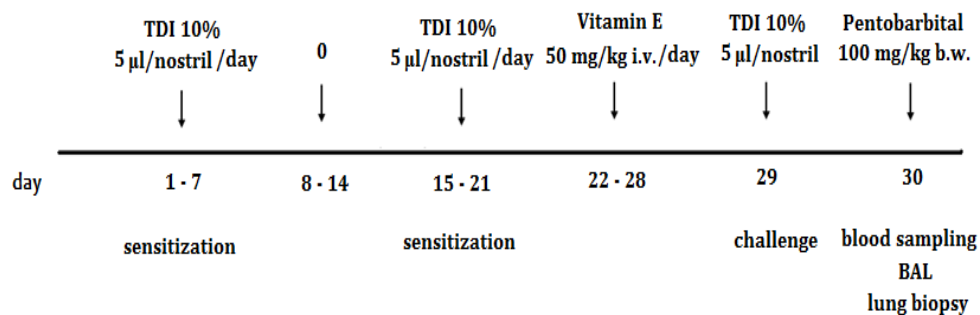
Izocianații și poliizocianații, sunt o familie de substanțe chimice foarte reactive și una dintre cele mai frecvente cauze raportate în astmul ocupațional. Izocianații sunt utilizați într-o vastă gamă de produse industriale, comerciale: spume flexibile și rigide, produse de etanșare, elastomeri, adezivi, vopsele și lacuri.

Astmul la izocianați apare printr-un proces de sensibilizare. În procesul de sensibilizare la izocianați participă factori imunologici și neimunologici.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **Studiu 1. Inducerea astmului experimental cu TDI la șobolan**

Pentru inducerea astmului experimental am pornit de la modele existente în literatură. Protocolul experimental este ilustrat mai jos:



Stresul oxidativ a fost evaluat prin dozarea malondialdehidim proteinelor carbonilate, a grupărilor sulhidril, a donozilor de hidrogen și a glutatationului.

După provocare cu TDI 5%, șobolanii au prezentat clinic semne de sensibilizare prin strănut și hipersecreție nazală. Cei din lotul control negativ nu au prezentat probleme respiratorii.

Testul de anafilaxie cutanată pasivă a fost pozitiv pentru serul nediluat și prin urmare, a demonstrat prezența anticorpilor IgE anti-TDI din ser de șobolani cu sensibilizate TDI.

În grupul TDI principalele leziuni histologice găsite au fost un infiltrat inflamator masiv și metaplazia severă a celulelor calciforme în epiteliul respirator. Procese exudative au fost localizate în straturile peribronșolare și chiar intraluminal. Aceste modificări au fost prezente în majoritatea componentelor pulmonare, intensitatea lor a fost diferită atât de la o zonă la alta, cât și de la o componentă la alta. S-a observat hiperplazia severă a musculaturii peribronșolare, însoțită de prezența de infiltrat inflamator cronic sever peribronșolar. Nu au existat schimbări pulmonare histoarchitectural majore în grupul de control.

Analiza semicantitativă a inflamației bronhice a evidențiat că media indicelui inflamator a fost semnificativ mai mare în grupul TDI, comparativ cu grupul control M.

Evaluarea PAS celulelor calciforme pozitive a evidențiat hiperplazia și hipertrofia celulelor calciforme și că procentul celulelor calciforme PAS pozitive a fost semnificativ a crescut la șobolani la TDI în comparație cu grupul control.

În astmul indus la șobolan Wistar prin administrarea de TDI a fost identificat infiltrat limfoplasmocitar perivascular, dovada existenței unei inflamații cronice la nivelul căilor respiratorii.

Identificarea de focare peribronhiolare de emfizem este exemplul de hiperinflatie pulmonară și factor de severitate în astm. Câteva secțiuni pulmonare de la animale care aparțin la grupul TDI, am găsit modificări vasculare cu congestie pasivă și hemosideroză și edem pulmonar. Deoarece acestea au fost cazuri izolate, acesta este un argument în favoarea heterogenității răspunsului la TDI, care se găsește deja în practica medicală pentru pacienții care au fost expuși și sensibilizate la izocianați.

## **Studiu 2. Evaluarea stresului oxidativ sistemic în astmul experimental indus cu TDI la șobolan**

La șobolanii Wistar, TDI a determinat creșterea stresului oxidativ sistemic după sensibilizare și stimulare, caracterizat prin creșterea MDA și PC.

Mecanismele antioxidante evaluate prin SH și DH au fost reduse de TDI.

GSH a crescut semnificativ după TDI, ceea ce sugerează că doza de TDI nu a fost suficient de mare pentru a inhiba toate mecanismele antioxidante.

Tratamentul cu vitamina E la animalele cu TDI a redus stresul oxidativ. Scăderea stresului oxidativ la grupul TDI tratat cu vitamină E s-a datorat scăderii MDA și PC.

Grupul TDI tratat cu vitamină E nu a prezentat modificări importante ale mecanismelor de apărare antioxidantă.

Deși mecanismul patogen al astmul ocupational indus de izocianați nu a fost investigat complet, studiile existente au sugerat că mai multe mecanisme imunologice și non imunologice sunt implicate în patogeneza astmului ocupational. Recent unele studii consideră că ROS acționează ca adjuvanți în inflamația din alergii, deoarece ele pot induce mediatori proinflamatorii, care sunt importanți pentru inițierea inflamației alergice.

Supraproducția de ROS este importantă pentru activarea celulară proinflamatorie, viabilitate și proliferare. ROS au dovedit a crește și expresia proteinelor țintă inflamatorii și mediatorii proinflamatorii, cum ar fi MMP-9, molecula de adeziune intercelulară -1 (ICAM-1), molecula de adeziune celula vasculară-1 (VCAM-1), TNF-alfa și IL-1b într-un interval. În plus, ROS pot iniția răspunsuri inflamatorii în căile respiratorii prin activarea de factori de transcriere sensibili la stres oxidativ, inclusiv AP-1, factor de hipoxie inductibile (HIF) -1 și NF-kB. Prin urmare, ROS par să joace un rol cheie de reglare a căilor moleculare care conduc la inițierea bolilor inflamatorii ale căilor respiratorii și pulmonare, precum astmul ocupational indus de diizocianat.

## **Studiul 3. Evaluarea stresului oxidativ în lavajul bronho-alveolar**

Astmul experimental indus cu TDI la șobolani Wistar a determinat stres oxidativ la nivelul căilor respiratorii, diagnosticat prin creșterea MDA și scăderea DH în lichidul de lavaj bronhoalveolar.

În astmul experimental indus cu TDI la șobolani Wistar s-a asociat o creștere a GSH în lichidul de lavaj bronhoalveolar.

Tratamentul cu vitamina E a redus stresul oxidativ din LBA de la șobolani Wistar cu astm experimental indus cu TDI prin scăderea MDA și creșterea DH.

Timp de mulți ani, inflamația eozinofilică a fost recunoscută ca fiind cea mai importantă caracteristică a pacienților cu astm cronic, stabil. PMN au un rol important în astmul indus de TDI, deoarece acestea pot elibera ROS având efecte patologice asupra celulelor epiteliale din căile respiratorii ale indivizilor astmatici prin stresul oxidativ. Astfel, efectele directe neimune ale stresului oxidativ pot juca un rol important în patogeneza astmului indus de TDI.

Administrarea de vitamină E la animalele TDI a scăzut stresul oxidativ prin reducerea MDA. Pe lângă efectul antioxidant, interacțiunea cu peptididele eliberate în LBA ar putea fi o altă cale de intervenție a

vitaminei E in patogeneza astmii experimentale induse de TDI. Acest posibil mecanism necesită însă explorări ulterioare.

## **Studiul 4. Evaluarea histopatologică și a stresului oxidativ din țesutul pulmonar**

Analiza histopatologică a evidențiat prezența unui bogat infiltrat cu predominarea eozinofilelor, limfocitelor și a monocitelor. S-a constatat o hiperplazie a celulelor caliciforme, a țesutului limfatic și a stratului muscular peribronșic.

În astmul indus de TDI la șobolan asocierea vitaminei E a redus ne semnificativ infiltratul leucocitar cu eozinofile, limfocite și fagocite.

Vitamina E a redus hipertrofia celulelor caliciforme din căile respiratorii ale șobolanilor cu astm indus de TDI.

Tratamentul cu vitamină E a scăzut stresul oxidativ indus de TDI la șobolani prin reducerea MDA și PC, dar nu a avut un efect asupra DH, SH și GSH pulmonar.

Vitamina E are potențial favorabil în astmul indus de TDI prin diminuarea leziunilor induse de stresul oxidativ și reducerea remodelării căilor respiratorii.

Pe lângă leziunile tisulare pulmonare și modificările structurale de remodelare a căilor respiratorii, celulele infiltratului leucocitar, în special fagocitele, când sunt activate cresc stresul oxidativ. Acest mecanism a fost demonstrat la animalele cu TDI la care nivelul MDA și PC pulmonar au crescut, iar SH, DH și GSH a scăzut.

În studiile umane, efectul vitaminei E nu este identificat în mod clar. Rezultate pozitive au fost raportate într-o meta-analiză care a inclus trei studii de coortă.

Rezultatele acestui studiu au demonstrat că vitamina E poate reduce semnificativ stresul oxidativ din astmul experimental indus de TDI la șobolan prin scăderea MDA și a PC, fără a influența semnificativ și capacitatea de apărare antioxidantă.

## **Concluzii generale**

Administrarea de TDI 10% pentru sensibilizarea și 5% pentru stimulare la șobolan Wistar a determinat astm experimental, confirmat clinic prin bronhospasm.

Testul cutanat de anafilaxie indusă pasiv pozitiv la animalele cu astm indus prin administrarea de TDI a demonstrat existența stării de hipersensibilitate tip 1.

Analiza histopatologică a plămânilor a arătat că șobolanii cu astm indus de TDI au prezentat un infiltrat leucocitar cu eozinofile, limfocite, neutrofile și macrofage, precum și remodelarea căilor respiratorii.

La șobolanii cu astm indus de TDI după stimulare s-a identificat creșterea stresului oxidativ sistemic prin creșterea MDA și PC și reducerea mecanismelor antioxidante evaluate prin SH și DH.

GSH a crescut semnificativ după TDI, ceea ce sugerează că doza de TDI nu a fost suficient de mare pentru a inhiba toate mecanismele antioxidante.

Tratamentul cu vitamina E la animalele cu TDI a redus stresul oxidativ sistemic, scăderea MDA și PC, fără modificări importante ale mecanismelor de apărare antioxidantă.



Stresul oxidativ de la nivelul căilor respiratorii evaluat prin analiza LBA a evidențiat că astmul experimental indus cu TDI la șobolani Wistar a determinat stres oxidativ prin creșterea MDA și scăderea DH. S-a asociat o creștere a GSH în lichidul de lavaj bronhoalveolar.

Tratamentul cu vitamină E a redus stresul oxidativ din LBA de la șobolani Wistar cu astm experimental indus cu TDI prin scăderea MDA și creșterea DH.

În astmul indus de TDI la șobolan asocierea vitaminei E a redus nesemnificativ infiltratul leucocitar intrapulmonar, dar a redus hipertrofia celulelor caliciforme din căile respiratorii

Tratamentul cu vitamină E a scăzut stresul oxidativ indus de TDI la șobolani prin reducerea MDA și PC, fără a avea efect asupra capacității de apărare antioxidantă.

Vitamina E are potențial favorabil în astmul indus de TDI prin diminuarea stresului oxidativ sistemic și intrapulmonar, ceea ce reduce remodelarea căilor respiratorii și posibilele complicații sistemice.

Originalitatea studiului de față este conferită în primul rând de realizarea unui nou model experimental de astm indus cu TDI la șobolan. În al doilea rând, studiul a demonstrat utilitatea tratamentului cu vitamina E în astmul indus de izocianați prin reducerea stresului oxidativ. Aceasta constatare are o deosebită utilitate practică. Stresul oxidativ poate determina complicații sistemice, iar pe de altă parte contribuie semnificativ la remodelarea căilor respiratorii la pacienții cu astm.

Studii pe grupuri semnificative de subiecți sunt necesare pentru a putea stabili doza, ritmul și durata optimă de administrare a vitaminei E în astmul indus de izocianați.

---

SUMMARY OF THE PhD THESIS

# IMPLICATIONS OF OXIDATIVE STRESS IN ALLERGIC AND INFLAMMATORY DISEASES

---

PhD student: **Andrea Daniela Muti (n. Stanciu)**

---

PhD coordinator: **Prof. Dr. Adriana Mureșan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## TABLE OF CONTENTS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>1</b>  |
| <b>CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1. Major types of free radicals and their derivates in living beings</b>       | <b>5</b>  |
| 1.1. Oxygen reactive species  | 5         |
| 1.2. Nitrogen reactive species  | 8         |
| <b>2. Oxidative stress as model of redox signaling</b>                            | <b>9</b>  |
| <b>3. Oxidative reactive species, antioxidants and signal transduction</b>        | <b>10</b> |
| 3.1. Signaling by cytokines and growth factors                                    | 11        |
| 3.2. Tyrosin-protein phosphatases   | 11        |
| 3.3. Non-receptor protein-kinases   | 11        |
| 3.4. Serin/treonin kinases  | 12        |
| 3.5. Nuclear transcription factors  | 13        |
| <b>4. Isocyanates-induced professional asthma</b>                                 | <b>15</b> |
| 4.1. Professional asthma  | 15        |
| 4.2. Isocyanates  | 16        |
| 4.3. Pathogenesis of isocyanates-induced asthma                                   | 17        |
| <b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>  | <b>19</b> |
| <b>1. Implications of oxidative stress in inflammatory and allergic reactions</b> | <b>21</b> |
| 1.1. General work hypothesis  | 21        |
| 1.2. General materials and methods  | 22        |
| 1.2.1. Experimental groups  | 22        |
| 1.2.2. Evaluation of oxidative stress   | 23        |
| 1.2.3. Histopathological examination  | 24        |
| 1.2.4. Statistical analysis   | 25        |
| <b>2. 1st Study. Induction of experimental TDI-induced asthma in rat</b>          | <b>27</b> |
| 2.1. Study hypothesis   | 27        |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 2.2.  | Materials and methods   | 27        |
| 2.2.1.  | Experimental protocol   | 27        |
| 2.2.2.  | Passive cutaneous anaphylaxis test                            | 28        |
| 2.3.  | Results   | 28        |
| 2.3.1.  | Experimental TDI-induced asthma                               | 28        |
| 2.3.2.  | Passive cutaneous anaphylaxis test                            | 28        |
| 2.3.3.  | Histological examination                                      | 28        |
| 2.4.  | Discutions  | 33        |
| 2.5.  | Conclusions   | 34        |
| <b>3. 2nd Study. Evaluation of systemic oxidative stress in experimental TDI-induced asthma in rats</b> |   | <b>35</b> |
| 3.1.  | Study hypothesis  | 35        |
| 3.2.  | Materials and methods   | 36        |
| 3.2.1.  | Experimental protocol   | 36        |
| 3.3.  | Results   | 37        |
| 3.3.1.  | Serum MDA concentration                                       | 37        |
| 3.3.2.  | Serum sulphhidril groups                                      | 41        |
| 3.3.3.  | Serum hidrogen donors   | 43        |
| 3.3.4.  | Serum glutathion  | 45        |
| 3.4.  | Discutions  | 50        |
| 3.5.  | Conclusions   | 53        |
| <b>4. 3rd study. Evaluation of oxidative stress in broncho-alveolar lavage liquid</b>                   |   | <b>55</b> |
| 4.1.  | Study hypothesis  | 55        |
| 4.2.  | Materials and methods   | 55        |
| 4.2.1.  | Experimental protocol   | 55        |
| 4.2.2.  | Analysis of bronchiolo-alveolar lavage liquid                 | 56        |
| 4.3.  | Results   | 56        |
| 4.3.1.  | Malondialdehyde (MDA) in broncho-alveolar lavage liquid (BAL) | 56        |
| 4.3.2.  | Hidrogen donors (HD) in broncho-alveolar lavage liquid (BAL)  | 58        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.3.3.    | Glutathion (GSH) in broncho-alveolar lavage liquid (BAL)                           | 60        |
| 4.4.      | Discutions   | 64        |
| 4.5.      | Conclusions  | 65        |
| <b>5.</b> | <b>4th Study. Histopathological evaluation and oxidative stress in lung tissue</b> | <b>67</b> |
| 5.1.      | Study hypothesis   | 67        |
| 5.2.      | Experimental protocol  | 67        |
| 5.3.      | Results  | 68        |
| 5.3.1.    | Histopathological analysis   | 68        |
| 5.3.2.    | Malondialdehyde (MDA) in lung tissue   | 71        |
| 5.3.3.    | Hidrogen donors (HD) in lung tissue  | 73        |
| 5.3.4.    | Glutathionul (GSH) in lung tissue  | 75        |
| 5.3.5.    | Carbonyl proteins (CP) in lung tissue  | 77        |
| 5.3.6.    | Sulfhidril groups (SH) in lung tissue  | 79        |
| 5.4.      | Discutions   | 85        |
| 5.5.      | Conclusions  | 87        |
| <b>6.</b> | <b>General conclusions</b>   | <b>89</b> |
| <b>7.</b> | <b>Study originality</b>   | <b>91</b> |
|           | <b>REFERENCES</b>  | <b>93</b> |

# CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

Oxygen reactive species or oxygen free radicals (ORS/OFR) are chemical species of oxygen that have a free electron:  $O_2^-$  - superoxide radical;  $HO_2^-$  - perhydroxile radical;  $\cdot OH$  - hydroxile radical;  $RO_2^-$  -peroxile radical;  $RO\cdot$  -alcoxile radical.

Hydroxile radicals are the most aggressive because they are extremely reactive, having a short life; for this reason they will act on their production site, having a limited diffusion capacity. In contrast, superoxide radicals have a relative chemical inertia that gives them a higher diffusion capacity.

$NO\cdot$  radical is one of the smaller molecular mediators and is produced in euvoluted organisms by transforming L-arginine into L-citruline. This process is mediated by the NO-synthetase enzyme (NOS).

Cells and tissues are in stable state if there is an equilibrium between production and neutralisation of ORS. An imbalance is necessary for redox signaling and it can be induced by the activation of the systems producing ORS or NRS. Sometimes ORS production can be important and persistent so it is impossible to return to the initial equilibrium state, characterized by higher levels of ORS, higher levels of free aminoacids and different expression of genes due to redox-sensitive signaling pathways.

Pathological states develop in extreme cases of persistence of high levels of ORS without an imbalance of homeostasis but a chronic modification of homeostasis level. Pathological symptoms can result both from negative effects of ORS and from changes in ORS-mediated gene expression.

Tyrosin-protein phosphatases (TPP) are probably the best characterized direct targets of ORS. Reversible inactivation of TPP by ORS play an important role in redox control and cellular signalling.

In addition to protein-kinase with receptor function, some non-receptor protein-kinases (PTK) which belong to Src family (Src kynases) and Janus kynases (JAK) are activated by ORS. NO produced by activated macrophages and supressor myeloid cells inhibits Jak 1, Jak 2 and Jak 3 activity resulting in inhibition of lymphocytes T proliferation.

All types of serine/treonine kynase receptors described in mammalian cells are members of TGF- $\beta$  superfamily. TGF- $\beta$ 1 stimulates ORS production in a variety of cells and inhibits growth of the most target-cells, but in some cells it inhibits antioxidant enzymes expression - MnSOD, Cu,Zn-SOD, catalase.

Probably the most important signaling effect of ORS is the MAPK pathway implying activation of nuclear transcription factors which controls expression of protector genes responsible of repairing the modified DNA, of stimulating the immune system, stopping proliferation of modified cells and inducing apoptosis.

Occupational asthma is a disease defined by variable airflow limitation associated with inflammation and causal relationship can be established with conditions of a certain professional environment.

There are three mechanisms implicated in pathogenesis of professional asthma: IgE-mediated asthma, which appears with a latency period, irritant-induced asthma with or without a latency period and a syndrome of airway reactive dysfunction, professional asthma with unknown pathogenesis which can also have a latency period.

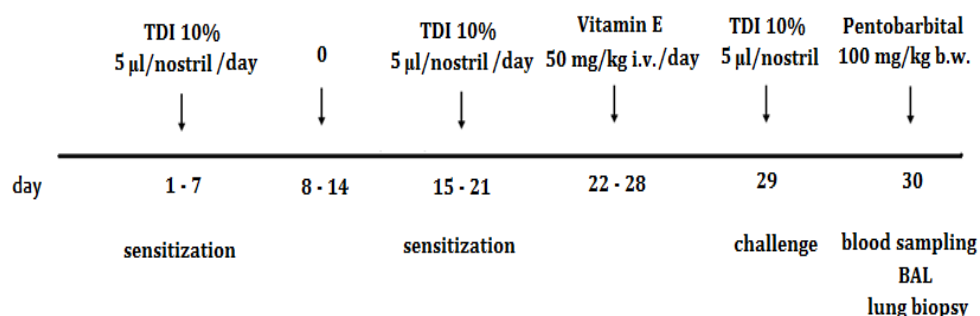
Isocyanates and polyisocyanates are a family of extremely reactive chemical substances and one of the most frequent reported causes of occupational asthma. Isocyanates are used in a large variety of industrial, commercial products: flexible and rigid foams, sealing products, elastomeres adhesives, paints and varnishings.

Isocyanates-induced asthma develops by sensitization. Immunological and non-immunological factors contribute to the sensitization process.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### 1ST Study. Induction of experimental TDI-asthma in rat

To obtain an animal model of experimental asthma, I started from models already described in the literature. The experimental protocol is illustrated in the figure.



Oxidative stress was evaluated by the dosage of malondialdehyde, carbonyl-proteins, sulfhidril groups, hydrogen donors and glutathion.

After the provocation with 5%TDI, rats presented clinical signs of sneezing and nasal hypersecretion. The animals of the control group didn't have any respiratory problem.

Cutaneous passive anaphylaxis test was positive for undiluted serum and therefore presence of anti-TDI IgE was demonstrated in the serum of the sensitized rats.

A massive inflammatory infiltrative and severe metaplasia of goblet cells in the epithelial tissue were the principal lesions identified in the TDI group. Exsudative processes were identified in the peribronchiolar tissue and even inside the bronchioli. These modifications were present in most of the lung components and their intensity was different between regions, with patchy distribution. We observed a severe hyperplasia of peribronchial muscle associated with severe peribronchiolar chronic inflammatory infiltrate. There were no changes in histological lung architecture in the control group.

Semiquantitative analysis of bronchial inflammation showed that medium inflammatory index was significantly higher in the TDI group in comparison to control group.

Evaluation of PAS positive goblet cells showed a hyperplasia and hypertrophy of goblet cells and the percentage of goblet cells was significantly higher in TDI-treated rats in comparison to control group.

Perivascular lympho-plasmocytic infiltrate was identified in Wistar rats with TDI-induced asthma proving the existence of chronic inflammation into the airways.

Identification of peribronchiolar area of emphysema is an example of pulmonary hyperinflation and it is a severity factor in asthma. In a few lung sections from TDI group we found vascular modifications with passive congestion and hemosiderosis and lung edema. These cases were isolated and they witness of the heterogenous response to TDI which has already been described in medical practice in patients exposed and sensitized to isocyanates.

## **2nd study. Evaluation of systemic oxidative stress in experimental TDI-induced asthma in rats**

In Wistar rats, TDI induced an increase in systemic oxidative stress after sensitization and provocation, characterized by an increase in MDA and CP.

The antioxidant mechanisms evaluated by SG and HD were reduced by TDI.

GSH was significantly increased after TDI exposure, suggesting that TDI administered dose was not sufficient to inhibit antioxidant mechanisms.

Treatment with vitamin E decreased oxidative stress in TDI group. Decrease in oxidative stress in TDI plus vitamin E group was due to a decrease in MDA and CP.

TDI plus vitamin E group didn't have important modifications in antioxidant defense mechanisms.

Although pathogenic mechanisms in occupational isocyanate-induced asthma are not completely investigated, the existent studies suggested that many immunologic and non-immunologic mechanisms are implicated. Recently, a few studies consider that ORS act as adjuvants in allergic inflammation because they can induce pro-inflammatory mediators which are important for initiating the allergic inflammation.

Overproduction of ORS is important for pro-inflammatory cellular activation, viability and proliferation. ORS increase the expression of target inflammatory proteins and pro-inflammatory mediators such as MMP-9, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

Even more, ORS can initiate inflammatory response in the airways through activation of transcription factors that are sensitive to oxidative stress, including AP-1, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and NF- $\kappa$ B. Therefore, ORS seem to play a key role in the regulation of molecular pathways that lead to initiation of inflammatory airway and lung diseases, such as isocyanate-induced asthma.

## **3rd study. Evaluation of oxidative stress in bronchiolo-alveolar lavage liquid**

Experimental TDI-induced asthma in Wistar rats induced oxidative stress into the airways, identified by an increase in MDA and a decrease in HD in the bronchiolo-alveolar lavage liquid (BAL).



Experimental TDI-induced asthma in Wistar rats associated with an increase in GSH in BAL.

The treatment with vitamin E reduced the oxidative stress in BAL of the Wistar rats with experimental TDI-induced asthma by decreasing MDA and increasing HD.

For a long period, eosinophilic inflammation was recognized as the most important characteristic in patients with chronic stable asthma. PMN have an important role in TDI-induced asthma because they can release ORS and have pathological effects on airways' epithelial cells of the asthmatic individuals mediated by the oxidative stress. Therefore the direct non-immune effects of the oxidative stress can play an important role in the pathogenesis of TDI-induced asthma.

Vitamin E administration in animals exposed to TDI decreased the oxidative stress by reducing MDA. In addition to the antioxidant effect, interaction with peptides released in BAL could be another pathway of vitamin's E intervention in the pathogenesis of TDI-induced asthma. This possible mechanism needs further explore.

#### **4th study. Histopathological and oxidative stress evaluation in lung tissue**

Histopathological analysis highlighted the presence of a rich inflammatory infiltrate with eosinophil, lymphocyte and monocyte predominance. We found a hyperplasia of goblet cells, lymphatic tissue and peribronchial muscle.

Vitamin E insignificantly decreased the leucocyte infiltrate with eosinophils, lymphocytes and phagocytes in TDI-induced asthma in rats.

Vitamin E decreased goblet cells hypertrophy in the airways of rats with TDI-induced asthma.

Treatment with vitamin E decreased TDI-induced oxidative stress in rats by the reduction of MDA and CP, but didn't influence the lung HD, SG and GSH.

Vitamin E has a potential favorable effect in TDI-induced asthma by decreasing the oxidative stress-induced lesions and decreasing airways' remodelling.

Activated cells of leucocytic infiltrate increase oxidative stress in addition to lung tissue lesions and structural remodelling in airways. This mechanism was demonstrated in TDI group in which MDA and CP increased in lung tissue and SG, HD and GSH decreased.

In human studies, the effect of vitamin E is not clearly identified. Positive results were reported in a meta-analysis that included three cohort studies.

The results of our study showed that vitamin E can significantly reduce oxidative stress in TDI-induced asthma in rats by decreasing MDA and CP without a significant influence on antioxidant defense capacity.

#### **General conclusions**

Sensitization with TDI 10% and provocation with TDI 5% in Wistar rats induced experimental asthma confirmed by bronchospasm.

Positive passive cutaneous anaphylaxis test in animals with TDI-induced asthma demonstrated a type I hypersensitivity reaction.

Histopathological analysis of lungs showed that rats with TDI-induced asthma have an inflammatory infiltrate with eosinophils, lymphocytes, neutrophils and macrophages as well as airways remodelling.

In rats with TDI-induced asthma we identified an increase in systemic oxidative stress by an increase in MDA and CP and a decrease in antioxidant mechanisms evaluated by SG and HD.

GSH was significantly increased by TDI, suggesting that the dose of TDI was not high enough to inhibit all antioxidant mechanisms.

Treatment with vitamin E in TDI group reduced systemic oxidative stress by decreasing MDA and CP without significant changes in antioxidant defense mechanisms.

Oxidative stress in the airways evaluated by BAL analysis showed that experimental TDI-induced asthma in Wistar rats induced oxidative stress by increasing MDA and decreasing HD associated to an increase in GSH.

Treatment with vitamin E reduced oxidative stress in BAL of Wistar rats with experimental TDI-induced asthma by decreasing MDA and increasing HD.

Vitamin E in TDI-induced asthma in rats unsignificantly decreased intrapulmonary leucocytic infiltrate, but significantly reduced goblet cells hypertrophy in the airways.

Treatment with vitamin E decreased TDI-induced oxidative stress in rats by decreasing MDA and CP without having an effect on antioxidant defense capacity.

Vitamin E has a favorable potential in TDI-induced asthma by decreasing systemic and intra-pulmonary oxidative stress, reducing airways remodelling and possible systemic complications.

The present study is original because it describes a new model of experimental TDI-induced asthma in rats. Secondly, the study demonstrated the usefulness of a treatment with vitamin E in reducing oxidative stress. These findings are useful in practice. Oxidative stress can determine systemic complications and on the other hand has a significant contribution in airways remodelling in asthma patients.

Studies with a significant number of patients need to be established in order to establish the right dose, rhythm and duration of vitamin E administration in isocyanates-induced asthma.