

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE MEDICINĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Markeri de stres oxidativ cu valoare diagnostică și prognostică în expunerea la izocianați

Conducător de doctorat: **Prof.Dr.Remus Orăsan**

Doctorand: **Ovidiu Persecă**

**CLUJ-NAPOCA
2012**

CUPRINS

Introducere	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. EXPUNEREA OCUPAȚIONALĂ LA IZOCIANAȚI	19
1.1. Izocianații	19
1.2. Manifestări clinice în expunerea la izocianați	19
1.3. Manifestările morfologice după expunere respiratorie la izocianați	20
1.4. Patogenia astmului indus de izocianați	21
1.5. Influența factorilor genetici în dezvoltarea astmului indus de izocianați	23
1.6. Diagnosticul de astm ocupațional indus de izocianați	24
1.7. Perspective viitoare	25

2. Stresul oxidativ	26
2.1. Sinteza speciilor reactive ale oxigenului	26
2.2. Apărarea antioxidantă	27
2.3. Efectele excesului de SRO	28
2.4. Diagnosticul stresului oxidativ	28
3. Oxidul nitric	29
3.1. Sinteza oxidului nitric	29
3.2. Reactivitatea oxidului nitric	31
Oxidul nitric în stresul oxidativ	31
Oxidul nitric în stresul de nitrozare	33
Oxidul nitric în stresul nitrativ	34
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
4. Markerii de stres oxidativ cu valoare diagnostică și prognostică în expunerea la izocianati	39
4.1. Ipoteza de lucru	39
4.2. Metodologie generală	43
Reactivi teste biochimice	43
4.2.1. Evaluarea stresului oxidativ	43
Determinarea malondialdehidei	43
Determinarea proteinelor carbonilate serice	43
Determinarea tiolilor serici totali	44
Determinarea glutationului seric	44
Determinarea statutului oxidativ total seric	44
Determinarea capacității antioxidante totale	45
Calcularea indicelui de stres oxidativ	46
4.2.3. Evaluarea sintezei de oxid nitric	46
Determinarea nitriților și nitraților serici totali	46
Determinarea 3-nitrotirozinei plasmatice	47
4.2.3. Determinarea metaloproteinazei-9 serice	47
4.2.4. Examinarea histopatologică	47
Analiza statistică	48
4.3. Markerii de stres oxidativ cu valoare diagnostică și prognostică în expunerea experimentală la izocianati	49
4.3.1. Ipoteza de lucru	49
4.3.2. Material și metodă	50
Expunerea experimentală la toluen-2,4-diizocianat	50
Grupurile de animale	50
Protocolul studiului	51
4.3.3. Rezultate	52
Determinarea statusului oxidativ total	52
Determinarea capacității antioxidante totale	53
Determinarea indicelui de stres oxidativ	54
Determinarea lipoperoxizilor	54
Determinarea proteinelor carbonilate	54
Determinarea tiolilor serici totali	56
Determinarea glutationului	56
Determinarea nitriților și nitraților serici totali	56
Examenul histopatologic pulmonar	58

Cuantificarea infiltratului inflamator in parenchimul pulmonar	69
4.3.4. Discuții	71
4.3.5. Concluzii	73
4.4. Markerii de stres oxidativ cu valoare diagnostică și prognostică în expunerea profesională la izocianați	75
4.4.1. Ipoteza de lucru	75
4.4.2. Material și metode	76
Selecția subiecților incluși în studiu și protocolul studiului	76
Determinarea proteinazelor matriceale 9 (MMP9)	78
Evaluarea stresului oxidativ	78
Evaluarea sintezei de oxid nitric	78
Evaluarea funcției hepatice	78
4.4.3. Rezultate	80
Date demografice	80
Evaluarea funcției hepatice	81
Determinarea proteinazelor matriceale 9 (MMP9)	82
Evaluarea stresului oxidativ	83
Evaluarea sintezei de oxid nitric	88
4.4.4. Discuții	91
4.4.5. Concluzii	95
4.5. Concluzii generale	97
4.6. Originalitatea studiului	98
5. Referințe bibliografice	99
Anexe	110

Cuvinte cheie: izocianați, astm ocupațional, stres oxidativ, oxid nitric.

Introducere

Expunerea la substanțe toxice sau iritante la locul de muncă este o problemă de sănătate publică în creștere. Pe de o parte pentru că este un risc pentru sănătate și pe de altă parte pentru că este o problemă care depinde de resursele economice financiare. În cazuri de boli ocupaționale, lucrătorii afectați sunt nevoiți să-și abandoneze locurile lor de muncă temporar sau în cel mai rău caz definitiv, pentru a se recupera. Conform mecanismului patogenetic, astmul ocupațional poate fi împărțit în astm nonimun, astm indus de iritanți și astm imun indus de alergie. În plus, astmul alergic poate fi cauzat de două grupuri diferite de agenți: proteine cu greutate moleculară mare (> 5.000 Da) sau agenți cu greutate moleculară mică (<5000 Da), cum ar fi izocianații. Prin urmare, pentru evitarea inducerii bolii ocupaționale este de interes major recunoașterea semnelor cât mai curând posibil. În plus, în unele situații, ca și în cazul astmului indus de izocianați, simptomele persistă chiar și după încetarea expunerii. Din aceste motive pentru substanțele periculoase au fost stabilite limite maxime admise, dar o mulțime de substanțe chimice sunt nu numai toxice sau iritante, dar ar putea determina și reacții de hipersensibilitate. Cele mai mari probleme se datorează faptului că acești agenți induc reacții de hipersensibilizare la concentrații foarte mici, care din punct de vedere tehnic sunt dificil de monitorizat și nu toți lucrătorii expuși sunt sensibili și dezvoltă în timp boala. Toate acestea fac dificilă realizarea unei profilaxii eficiente.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru

În medicina ocupațională actuală după ce se evaluează efectele expunerii ocupaționale asupra subiecților umani, trebuie găsite metode specifice de diagnostic patogenetic, diagnosticul etiologic nefiind suficient. Diagnosticul patogenetic are menirea să identifice și să cuantifice mecanismele intime activate de expunerea la izocianați, dar și stadiul, severitatea și consecințele acesteia. De aceea, cercetarea actuală caută noi markeri patogenetici în expunerea ocupațională la izocianați, markeri care să permită un diagnostic și un pronostic cât mai specific și sensibil. Studii experimentale și umane au demonstrat că expunerea cutanată la izocianați este un factor de risc semnificativ pentru sensibilizarea la izocianați. Pornind de la aceste constatări, în ultimii ani au fost efectuate studii de medicină ocupațională, care au demonstrat legătura dintre sensibilizarea la izocianați prin expunere cutanată și astm. Studiul de față a avut trei obiective. Primul obiectiv a fost să evalueze sistemic nivelul stresului oxidativ și nitrozativ în expunerea experimentală și ocupațională la izocianați, pentru a permite stabilirea utilității parametrilor sistemici de stres oxidativ și nitrozativ ca parametri de diagnostic și prognostic în astmul indus de izocianați. Al doilea obiectiv a fost să se stabilească dacă în cazul expunerii experimentale la izocianați există o corelație între markerii de stres oxidativ și nitrozativ și modificările morfologice pulmonare. Al treilea obiectiv al studiului a fost să stabilească dacă la subiecții umani cu expunere ocupațională la izocianați și fără manifestări clinice și funcționale de astm ocupațional, markerii de stres oxidativ și nitrozativ se corelează cu nivelul MMP-9, în calitate de marker de leziune tisulară.

Metodologie generală

Evaluarea stresului oxidativ

Stresul oxidativ a fost evaluat utilizând teste globale și teste specifice. Testele globale măsoară prin Statusul oxidativ total (SOT) totalitatea compușilor oxidați, prin Capacitatea antioxidantă totală (CAT) totalitatea antioxidantilor și prin Indicele de stres oxidativ (ISO) raportul dintre oxidanți și antioxidanți. Testele specifice dozează compuși oxidați și antioxidanți specifici: dozarea peroxizilor lipidici prin determinarea Malonildialdehidei (MDA), dozarea proteinelor carbonilate prin determinarea grupărilor carbonil, dozarea tiolilor serici prin determinarea grupărilor sulfhidril (SH) totale, determinarea glutatationului seric.

Evaluarea sintezei de oxid nitric

Sinteza de oxid nitric (NO) a fost evaluată indirect prin măsurarea nitriților și nitraților serici totali (NO_x) și măsurarea 3-nitrotirozinei serice.

Determinarea metaloproteinazei-9 serice

MMP-9 este un bun indicator al leziunii tisulare, deoarece creșterea sa indică amplificarea lizei proteinelor matriceale.

Examinarea histopatologică

Principalele caracteristici histologice care au fost analizate au fost infiltratul inflamator peribronșic, perivascular și interstițial. Pentru evaluare a fost utilizat pentru fiecare animal un sistem de clasificare histopatologică exprimat pe o scară de 0-4.

Analiza statistică

Toate rezultatele au fost exprimate ca medie \pm deviație standard (SD) ori de câte ori datele au fost distribuite normal. Comparațiile statistice între valorile înainte și după tratament au fost efectuate cu ajutorul testului Student *t* ori de câte ori datele au fost distribuite normale. Comparații statistice între diferitele grupuri de tratament au fost realizate folosind testul ANOVA. Analiza corelațiilor dintre parametri a fost făcută cu testele lui Pearson și Spearman.

1. Expunerea experimentală la toluen-2,4-diizocianat

Sensibilizarea cutanată cu toluen-2,4-diizocianat (TDI) a fost realizată prin aplicarea cutanată pe fiecare ureche a câte 20 μ l TDI 3% trei zile consecutive (zilele 1, 2 și 3). În ziua a 7-a, au fost aplicate cutanată doze similare de 20 μ l TDI 3% pe ambele urechi. În ziua a 10-a, după anestezie ușoară cu eter etilic, animalele au primit instilații nazale de 10 μ l TDI 0,1% în fiecare narină. Pentru a dizolva TDI, a fost utilizat un solvent (AUM) preparat din 2 volume de acetonă (A) și 3 volume de ulei de măsline extra-virgin (UM).

Tratamentele au fost administrate începând din ziua 1 și terminând în ziua 10. În ziua a 11-a, la 24ore de la administrarea intranasală și după o supradoză de pentobarbital (90 mg/kg i.p.), a fost recoltat sânge prin puncție cardiacă și a fost prelevată o biopsie pulmonară.

Grupurile de animale incluse în studiu

Abreviere	Grup	Metoda
CONTROL	Grup control negativ	sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-a făcut cu ser fiziologic
AUM	Grup control solvent acetonă-ulei de măsline	sensibilizarea cutanată s-a făcut cu AUM 2:3 v/v și provocarea intranasală cu AUM 1:4 v/v;
TDI	Grup control pozitiv	sensibilizarea cutanată s-a făcut cu TDI 0.3%, iar provocarea intranasală cu TDI 0.1%;
TROLOX	Grup antioxidant	sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut ca la grupul TDI și în plus au primit tratament antioxidant cu trolox (20 mg/kg/zi i.p)
AG	Grup aminoguanidină	sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut ca la grupul TDI și în plus au primit tratament cu aminoguanidine (AG) (50 mg/kg/zi i.p.), inhibitor selectiv al NOS induse (iNOS/NOS2)
NAME	Grup N-argininmetilester	sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut ca la grupul TDI și în plus au primit tratament cu NG-nitro-L-arginine methyl ester (NAME), inhibitor neselectiv al sintezei oxidului nitric (NOS)
ARG	Grup arginină	sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut ca la grupul TDI și în plus au primit tratament cu arginină (100 mg/kg/zi i.p.) substratul sintezei oxidului nitric.

Concluzii

1. Expunerea cutanată experimentală a șoarecilor la TDI urmată de provocare cu TDI, determină stres oxidativ și nitrativ sistemic prin creșterea SRO și NO, asociate cu reducerea apărării

antioxidante. La nivel pulmonar TDI induce predominant un puternic infiltrat leucocitar, bogat în PMN, monocite și eozinofile.

2. Administrarea de antioxidanți tip Trolox, a scăzut mult nivelul stresului oxidativ sistemic. În același timp a redus și infiltratul leucocitar pulmonar, care a devenit predominant cu PMN și monocite.
3. Scăderea sintezei de NO prin administrarea de AG, inhibitor neselectiv de NOS și NAME, inhibitor selectiv de iNOS, a redus semnificativ la nivel sistemic stresul oxidativ și nitrativ. Asociat a scăzut mult infiltratul leucocitar pulmonar, devenind predominant cu PMN.
4. ARG, în calitate de substrat al sintezei de NO, a menținut la un nivel sistemic ridicat stresul oxidativ și nitrativ. La nivel pulmonar ARG a determinat menținerea infiltratului leucocitar bogat, dar acesta a devenit predominant cu PMN.
5. Aceste observații recomandă pe de o parte parametrii de stres oxidativ pentru evaluarea prognosticului în expunerile la izocianați, iar pe de altă parte confirmă utilitatea terapiei antioxidante.

2. Markerii de stres oxidativ cu valoare diagnostică și prognostică în expunerea profesională la izocianați

Primul obiectiv a fost să evalueze sistemic nivelul stresului oxidativ și nitrozativ în expunerea ocupațională la izocianați, pentru a permite stabilirea utilității parametrilor sistemici de stres oxidativ și nitrozativ ca parametrii de diagnostic și prognostic în hipersensibilizarea indusă de izocianați.

Al doilea obiectiv a fost să se stabilească dacă la subiecții umani cu expunere ocupațională la izocianați și fără manifestări clinice și funcționale de astm ocupațional, markerii de stres oxidativ și nitrozativ se corelează cu nivelul MMP-9, în calitate de marker de leziune tisulară.

Studiul a fost unul de tip explorator. Subiecții incluși în studiu au fost muncitori expuși la izocianați conform criteriilor de includere și excludere (n=70), precum și un lot martor de 50 de indivizi voluntari sănătoși neexpuși la izocianați sau alte toxice. Criteriile de includere au fost: expunere ocupațională la izocianați, lipsa astmului bronșic ocupațional, lipsa altor afecțiuni cronice sau acute, vârsta cuprinsă între 20-50 ani, nefumător, nu consumă droguri, alcool sau alte toxice, nu urmează tratamente medicamentoase, nu consumă preparate antioxidante sau inhibitori ai sintezei de NO. Criteriile de excludere: vârsta sub 20 sau peste 50 ani, sarcină, alăptare, astm ocupațional, alte boli cronice sau acute, fumător, tratamente medicamentoase ce pot influența sinteza de NO și stresul oxidativ. Diagnosticul pozitiv de astm ocupațional a fost pus în urma examenului clinic, a explorărilor funcționale respiratorii și imagistice. Expunerea ocupațională a fost zilnică, timp de două săptămâni.

Concluzii

1. În expunerea ocupațională umană la izocianați a existat stres oxidativ sistemic semnificativ.
2. La acești subiecți nivelul stresului oxidativ sistemic a fost mai mare în expunerile recente și la persoane cu vârstă mai mare.
3. Capacitatea antioxidantă totală a persoanelor expuse ocupațional la izocianați a fost semnificativ scăzută.
4. Reducerea CAT nu a depins de sex, vechimea expunerii ocupaționale sau vârstă.
5. La persoanele expuse ocupațional la izocianați s-a identificat un nivel sistemic crescut de NOx și 3NT, indicatori ai sintezei excesive de NO de către iNOS.
6. Sinteza de NO nu a depins de sex, vechimea expunerii ocupaționale sau vârsta subiectului.
7. În expunerea ocupațională umană la izocianați s-a identificat și o creștere sistemică importantă a MMP-9, ca indicator al răspunsului inflamator.

8. Având în vedere potențialul lezional a SRO, SRN și a MMP-9, creșterea acestor compuși la nivel sistemic reprezintă un indicator prongostic, deoarece reprezintă un risc suplimentar de complicații la distanță de aparatul respirator.
9. Pozitivarea testelor de stres oxidativ și nitrativ la nivel sistemic, la subiecți care încă nu au acuze respiratorii, recomandă aceste teste pentru un diagnostic precoce în hipersensibilizarea la izocianați.

Concluzii generale

1. În expunerea ocupațională umană la izocianați se asociază stres oxidativ sistemic semnificativ înainte de apariția semnelor clinice de astm ocupațional.
2. Stresul oxidativ sistemic este cu atât mai mare cu cât expunerea este mai recentă sau vârsta subiectului este mai mare.
3. La creșterea stresului oxidativ după expunere ocupațională la izocianați contribuie și reducerea capacității antioxidante totale.
4. Capacitatea antioxidantă totală a subiecților expuși ocupațional la izocianați nu depinde de sexul, vechimea expunerii sau vârsta indivizilor.
5. La persoanele expuse ocupațional la izocianați există o sinteză excesivă de NO, identificabilă prin creșterea sistemică a NOx și 3NT înainte de apariția modificărilor clinice de astm ocupațional.
6. La subiecții umani prezența răspunsului inflamator este confirmată de creșterea semnificativă a MMP-9 serice.
7. Modelul de expunere cutanată a șoarecilor la TDI urmată de provocare cu TDI, este un model bun experimental de studiu al stresului oxidativ și nitrativ, deoarece animalele au prezentat modificări similare celor înregistrate la subiecții umani expuși ocupațional la izocianați.
8. În modelul experimental procesul inflamator poate fi confirmat prin examenul histopatologic al biopsiilor pulmonare, care evidențiază un puternic infiltrat leucocitar, bogat în PMN, monocite și eozinofile.
9. La animalele expuse la TDI, faptul că administrarea de Trolox a scăzut mult nivelul stresului oxidativ sistemic și în același timp a redus și infiltratul leucocitar pulmonar, indică posibila utilitate a tratamentelor cu antioxidanți și la subiecții umani expuși la izocianați.
10. În ansamblu aceste observații umane și experimentale recomandă parametrii de stres oxidativ și nitrativ pentru diagnosticul precoce al astmului ocupațional indus de izocianați în stadiul preclinic.
11. Având în vedere potențialul lezional a SRO, SRN și a MMP-9, creșterea acestor compuși la nivel sistemic ar putea servi drept un indicator prognostic pentru complicațiile la distanță de aparatul respirator.

Originalitatea studiului

În astmul ocupațional indus de izocianați majoritatea studiilor existente au analizat modificările locale de la nivelul aparatului respirator. Astfel la nivel pulmonar a fost confirmată prezența stresului oxidativ și nitrativ ca mecanisme patogenetice asociate leziunilor locale și răspunsului inflamator asociat.

Originalitatea studiului de față este conferită în primul rând de identificarea existenței simultane a stresului oxidativ și a celui nitrativ la nivel sistemic după expunerea ocupațională la izocianați, începând cu stadiul preclinic.

În al doilea rând, studiul este original pentru că a relevat că riscul de stres oxidativ asociat expunerii ocupaționale la izocianați scade cu vechimea expunerii și crește cu vârsta subiectului.

Un alt element de originalitate este faptul că în expunerea la izocianați sinteza crescută de NO nu depinde de factori ca sexul, vechimea expunerii ocupaționale sau vârsta subiectului.

Toate aceste constatări sunt importante din mai multe puncte de vedere:

- testele de stres oxidativ și nitrativ se pozitivează încă din etapa preclinică a astmului ocupațional indus de izocianati, ceea ce permite un diagnostic și o profilaxie precoce
- pozitivarea testelor sistemice de stres oxidativ și nitrativ se datorează existenței unui răspuns inflamator confirmat de mărirea MMP-9
- stresul oxidativ, stresul nitrativ și MMP-9 pot fi indicatori prognostici, deoarece pot determina leziuni sistemice secundare, asociate celor respiratorii primare.

Bibliografie selectiva

1. Ayres JG, Boyd R, Cowie H, Hurley JF. Costs of occupational asthma in the UK. *Thorax* 2011; 66(2):128-133.
2. Tarlo SM, Broder I. Irritant-induced occupational asthma. *Chest* 1989; 96(2): 297-300
3. Piirilä PL, Meuronen A, Majuri M-L, Luukkonen R, Mäntylä T, Wolff HJ, et. al. Inflammation and functional outcome in diisocyanate induced asthma after cessation of exposure. *Allergy* 2008; 63: 583-591.
4. Baur X. Isocyanates: Occupational exposures and disorders. *Pneumologie* 2003; 57: 526-531.
5. Pisati G, Baruffini A, Bernabeo F, Cerri S, Mangili A. Rechallenging subjects with occupational asthma due to toluene diisocyanate (TDI), after long-term removal from exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2007; 80: 298-305.
6. Baur X, Budnik LT. New data on occupational exposure to isocyanates. *Pneumologie* 2009; 63:656-661.
7. Matheson JM, Johnson VJ, Vallyathan V, Luster MI. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma. *Toxicol. Sci.* 2005;84: 88-98.
8. Pauluhn J. Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate (MDI): Impact of vehicle for topical induction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2008; 50: 144-154.
9. Hur G-Y, Koh D-H, Choi G-S, Park H-J, Choi S-J, Ye Y-M et.al. Clinical and immunologic findings of methylene diphenyl diisocyanate-induced occupational asthma in a car upholstery factory. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 586-593.
10. Wisniewski AV, Liu Q, Liu J, Redlich CA. Human innate immune responses to hexamethylene diisocyanate (HDI) and HDI-albumin conjugates. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 957-967.
11. Redlich CA. Skin exposure and asthma: Is there a connection? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010;7:134-137.
12. Riedl MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8: 49-56.
13. Orăsan R. *Human physiology*, Ed. Intercredo, Cluj-Napoca, 2001 vol.2.
14. Mureșan A, Orăsan R, Tache T. *Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice*, Edit. Todesco, Cluj-Napoca, 2006.
15. Van Faassen EE, Vanin AF. (eds); *'Radicals for life: The various forms of Nitric Oxide.'* Elsevier, Amsterdam; 2007.
16. Van Faassen EE, Vanin AF. (eds); *'Radicals for life: The various forms of Nitric Oxide.'* Elsevier, Amsterdam; 2007.
17. Wang W, Huang KW, Wu BM, Wang YJ, Wang C. Correlation of eosinophil counts in induced sputum and fractional concentration of exhaled nitric oxide and lung functions in patients with mild to moderate asthma. *Chin Med J (Engl).* 2012 Sep;125(17):3157-60.
18. Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA Jr, Schleimer RP, Minnicozzi M. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Mar;129(3 Suppl):S9-23.
19. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: *Methods in Enzymology*, vol.233, Academic Press, Inc. 1994.p.380-384.

20. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* 2005;38(12):1103-1111
21. Matheson JM, Johnson VJ, Vallyathan V, Luster MI. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma. *Toxicol. Sci.* 2005;84(1):88-98.
22. Wisnewski AV. Developments in laboratory diagnostics for isocyanate asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(2):138-145.
23. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:12-24.
24. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.
25. Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol.* 2002; 168:3595-600.

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY "Iuliu Hațieganu"
Cluj-Napoca
FACULTY OF MEDICINE

DOCTORAL THESIS ABSTRACT

Oxidative stress markers with diagnostic and prognostic value in exposure to isocyanates

Mentor: Prof.Dr.Remus Orasan

PhD student: Ovidiu Perseca

Cluj-Napoca
2012

CONTENTS

Introduction	15
STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Occupational exposure to isocyanates	19
1.1. Isocyanates	19
1.2. Clinical manifestations exposure to isocyanates	19
1.3. Morphological manifestations of respiratory exposure to isocyanates	20
1.4. Pathogenesis of asthma induced by isocyanates	21
1.5. The influence of genetic factors in the development of asthma induced by isocyanates	23
1.6. Diagnosis of occupational asthma induced by isocyanates	24
1.7. Future prospects	25
2. Oxidative stress	26
2.1. Synthesis of reactive oxygen species	26

2.2. Antioxidant defense	27
2.3. The effects of excess ROS	28
2.4. Oxidative stress diagnose	28
3. Nitric oxide	29
3.1. Nitric oxide synthesis	29
3.2. Reactivity of nitric oxide	31
Nitric oxide in oxidative stress	31
Nitrosating nitric oxide in stress	33
Nitric oxide in nitrative stress	34
PERSONAL CONTRIBUTION	
4. Oxidative stress markers with diagnostic and prognostic value in exposure to isocyanates	39
4.1. Working hypothesis	39
4.2. General methodology	43
Chemicals	43
4.2.1. Evaluation of oxidative stress	43
Determination of malondialdehyde	43
Determination of serum proteins carbonylated	43
Determination of serum total thiols	44
Determination of serum glutathione	44
Determination of total serum oxidative status	44
Determination of total antioxidant capacity	45
Calculation of oxidative stress index	46
4.2.3. Evaluation of nitric oxide synthesis	46
Determination of total serum nitrites and nitrates	46
Determination of plasma 3-nitrotyrosine	47
4.2.3. Determination of serum metalloproteinase-9	47
4.2.4. Histopathological examination	47
Statistical analysis	48
4.3. Oxidative stress markers with diagnostic and prognostic value in experimental exposure to isocyanates	49
4.3.1. Working hypothesis	49
4.3.2. Materials and methods	50
Experimental exposure to toluene-2 ,4-diisocyanate	50
Group of animals	50
The study protocol	51
4.3.3. results	52
Determination of total oxidative status	52
Determination of total antioxidant capacity	53
Determination of oxidative stress	54
determination lipoperoxides	54
Determination of carbonylated proteins	54
Determination of serum total thiols	56
Determination of glutathione	56
Determination of total serum nitrites and nitrates	56
Lung histopathology	58
Quantification of inflammatory in lung parenchyma	69
4.3.4. Discussion	71

4.3.5. Conclusions	73
4.4. Oxidative stress markers with diagnostic and prognostic value in occupational exposure to isocyanates	75
4.4.1. Working hypothesis	75
4.4.2. Material and methods	76
The selection of sample size and study protocol	76
Determination of matrix proteinase 9 (MMP9)	78
Evaluation of oxidative stress	78
Evaluation of nitric oxide synthesis	78
Assessment of liver function	78
4.4.3. results	80
Demographics	80
Assessment of liver function	81
Determination of matrix proteinase 9 (MMP9)	82
Evaluation of oxidative stress	83
Evaluation of nitric oxide synthesis	88
4.4.4. Discussion	91
4.4.5. Conclusions	95
4.5. General conclusions	97
4.6. The originality of the study	98
5. References	99
Attachments	110

Keywords: isocyanates, occupational asthma, oxidative stress, nitric oxide.

Introduction

Exposure to toxic or irritating substances in the workplace is a growing public health problem. On one hand because it is a health risk and secondly because it is an issue that depends on the financial and economic resources. In cases of occupational diseases, the affected workers are forced to leave their jobs temporarily or permanently in the worst case, to recover. According to the pathogenetic mechanism, occupational asthma can be divided into nonimmune asthma, asthma induced by irritants and allergic asthma induced immune. In addition, allergic asthma can be caused by two different groups of agents: high molecular weight proteins (> 5,000 Da) or low molecular weight agents (<5000 Da), such as isocyanates. Therefore, to avoid inducing occupational disease is of major interest to recognize signs as soon as possible. In addition, in some cases, as with isocyanate-induced asthma, symptoms persist even after cessation of exposure. For these reasons hazardous maximum limits have been set, but a lot of chemicals are not only toxic or irritating, but could also cause hypersensitivity reactions. The biggest problem is because these agents induce hypersensitivity reactions at very low concentrations, which in technical terms are difficult to monitor and not all workers are sensitive and exposed while developing the disease. All these makes it difficult to achieve effective prophylaxis.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis

In current occupational medicine after assessing the occupational exposure of human subjects, specific pathogenetic diagnostic methods must be found, etiological diagnosis is not enough. Pathogenetic diagnosis aims to identify and quantify the intimate mechanisms activated by exposure to isocyanates, and progress, severity and consequences. Therefore, the current research seeks new markers in occupational exposure to isocyanates pathogenetic markers allowing a diagnosis and a prognosis as specific and sensitive. Experimental and human studies have demonstrated that dermal exposure to isocyanates is a significant risk factor for sensitisation to isocyanates. Based on these findings, in recent occupational medicine studies have been conducted, which demonstrated the link between skin sensitization and exposure to isocyanates and asthma. The study has three objectives. The first objective was to evaluate systemic oxidative and nitrosative stress

levels in experimental and occupational exposure to isocyanates in order to establish the usefulness of the systemic parameters of oxidative and nitrosative stress as diagnostic and prognostic parameters in asthma induced by isocyanates. The second objective was to determine whether in experimental exposure to isocyanates if there is a correlation between oxidative and nitrosative stress markers and morphological changes in the lungs. The third objective of the study was to determine whether human subjects with occupational exposure to isocyanates and without clinical and functional manifestations of occupational asthma, oxidative and nitrosative stress markers correlated with MMP-9 levels as a marker of tissue damage.

General methodology

Evaluation of oxidative stress

Oxidative stress was evaluated using global tests and specific tests. Global tests measured by total oxidative status (SOT) all oxidized compounds by total antioxidant capacity (TAC) all antioxidants and oxidative stress index (ISO) ratio of oxidants and antioxidants. Specific tests oxidized compounds and antioxidants specific dosing: dosing by determining malondialdehyde lipid peroxides (MDA), carbonylated protein determination by determining carbonyl groups, thiol determination by determining serum sulfhydryl groups (SH) and total serum glutathione determination.

Evaluation of nitric oxide synthesis

Synthesis of nitric oxide (NO) was assessed indirectly by measuring serum total nitrite and nitrate (NO_x) and measuring serum 3-nitrotyrosine.

Determination of serum metalloproteinase-9

MMP-9 is a good indicator of tissue injury because amplification indicates increased lysis of matrix proteins.

Histopathological examination

The main histological features analyzed were peribronchial inflammatory, perivascular and interstitial infiltrate. For evaluation of each animal was used a histopathological classification system expressed on a scale of 0-4.

Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) whenever data were normally distributed. Statistical comparisons between values before and after treatment were performed using Student t test when data were normally distributed. Statistical comparisons between treatment groups were performed using ANOVA test. Correlations analysis between parameters was made by Pearson and Spearman tests.

1. Experimental exposure to toluene-2,4-diisocyanate

Skin sensitization with toluene-2,4-diisocyanate (TDI) was performed by applying each ear skin with TDI 20 μ l 3% for three consecutive days (days 1, 2 and 3). On day 7, were applied to the skin similar doses of 20 ml TDI 3% on both ears. On day 10th after light anesthesia with diethyl ether, the animals received nasal instillation of 10 μ l TDI 0.1% in each nostril. To dissolve TDI was used a solvent (AUM) prepared in 2 volumes of acetone (A) and 3 volumes of extra-virgin olive oil (UM).

Treatments were administered from day 1 and ending on day 10. On day 11th at 24h after intranasal administration of an overdose of pentobarbital (90 mg / kg ip), blood was collected by cardiac puncture and lung biopsy was taken.

Group of animals included in the study

Abbreviation	Group	Method
CONTROL	Negative control group	skin sensitization and intranasal challenge with saline
AUM	Control group solvent acetone-olive oil	skin sensitization was done with AUM 2:3 v/v and intranasal challenge with AUM 1:4 v/v;
TDI	Positive control group	skin sensitization was done with TDI 0.3%, and intranasal challenge with TDI 0.1%;
TROLOX	Antioxidant group	skin sensitization and intranasal challenge were done as in TDI group and additionally received antioxidant treatment with trolox (20 mg/kg/zi i.p)
AG	Aminoguanidine group	skin sensitization and intranasal challenge were done as in

		TDI group and additionally received antioxidant treatment with aminoguanidine (AG) (50 mg/kg/zi i.p.), selective inhibitor of induced NOS (iNOS/NOS2)
NAME	N-argininmetilester group	skin sensitization and intranasal challenge were done as in TDI group and additionally received antioxidant treatment with NG-nitro-L-arginine methyl ester (NAME), nonselective inhibitor of nitric oxyde sintaze (NOS)
ARG	Arginine group	skin sensitization and intranasal challenge were done as in TDI group and additionally received treatment with arginine(100 mg/kg/zi i.p.) substrate of nitric oxide synthesis.

Conclusions

1. Experimental dermal exposure to TDI of mice followed by challenge with TDI, causes systemic oxidative and nitrate stress by increasing ROS and NO, associated with reduced antioxidant defense. In the lung TDI induces a powerful leukocyte infiltration predominantly, rich in neutrophils, monocytes and eosinophils.
2. Administration of Trolox type antioxidant significantly reduces systemic oxidative stress level. At the same time reduced lung leukocyte infiltration, which became predominantly with neutrophils and monocytes.
3. Decreased NO synthesis by administration of AG, selective inhibitor of NOS and NAME selective iNOS inhibitor, significantly reduced systemic oxidative and nitrate stress. Associated lung leukocyte infiltration decreased becoming predominantly with neutrophils.
4. ARG, as a substrate for NO synthesis, maintained high systemic oxidative and nitrate stress. At lung level ARG maintained rich leukocyte infiltrate, but it has become predominantly with neutrophils.
5. These observations recommend on one hand oxidative stress parameters for evaluating prognosis in exposures to isocyanates, and on the other hand confirm the utility of antioxidant therapy.

2. Oxidative stress markers with diagnostic and prognostic value in occupational exposure to isocyanates

The first objective was to evaluate systemic oxidative and nitrosative stress level in occupational exposure to isocyanates in order to establish the usefulness of the systemic parameters of oxidative and nitrosative stress as diagnostic and prognostic parameters in isocyanate-induced hypersensitivity.

The second objective was to determine whether in human subjects with occupational exposure to isocyanates and without clinical and functional manifestations of occupational asthma, oxidative and nitrosative stress markers correlated with MMP-9 levels as a marker of tissue damage.

The study was an exploratory one. Subjects included in the study were workers exposed to isocyanates that met the criteria for inclusion and exclusion (n = 70) and a control group of 50 healthy individuals not exposed to toxic isocyanates and other toxic agents. Inclusion criteria were: occupational exposure to isocyanates, lack of occupational asthma, no other chronic or acute disease, aged 20-50 years, non-smoker, no drugs, no alcohol or other toxic drug or treatments with antioxidants or NO synthesis inhibitors. Exclusion criteria: age under 20 or over 50 years, pregnancy, nursing, occupational asthma, other chronic or acute diseases, smoking, drug treatments that can influence the synthesis of NO and oxidative stress. Positive diagnosis of occupational asthma was made after clinical examination, pulmonary function test and imaging exploration. Occupational exposure was daily for two weeks.

Conclusions

1. In human occupational exposure to isocyanates systemic oxidative stress has been significant
2. In these subjects the systemic oxidative stress was higher in recent exposures in older people.
3. Total antioxidant capacity of persons exposed to occupational isocyanate was significantly lower.
4. CAT reduction was independent of sex, age, occupational exposure or age.
5. In people occupationally exposed to isocyanates there were identified increased systemic levels of NOx and 3NT, indicators of excessive synthesis of NO by iNOS.
6. NO synthesis was independent of sex, age, occupational exposure or subject age.

7. In human occupational exposure to isocyanates has been identified a significant systemic increase of MMP-9, as an indicator of inflammatory response.
8. Given the damage potential of the SRO, SRN and MMP-9, the growth of these compounds at the systemic level is an indicator prognostic because it is an additional risk of respiratory complications away.
9. Positive tests for nitrate oxidative stress and systemic level in subjects who have not yet respiratory complaints, recommend these tests for early diagnosis in hypersensitivity to isocyanates.

General conclusions

1. Human occupational exposure to isocyanates is associated with significantly systemic oxidative stress before onset of clinical signs of occupational asthma.
2. Systemic oxidative stress is greater in recent exposure or old subjects.
3. Reduced total antioxidant capacity contributes to increased oxidative stress after occupational exposure to isocyanates.
4. Total antioxidant capacity of subjects exposed to isocyanates does not depend on sex, age, exposure or individuals age.
5. In people occupational exposed to isocyanates there is excessive synthesis of NO, NO_x identifiable by increased systemic 3NT before the onset of clinical changes in occupational asthma.
6. The presence of the inflammatory response in human is confirmed by the significant increase in MMP-9 levels.
7. Dermal TDI exposure model in mice followed by challenge with TDI is a good experimental model for the study of oxidative and nitrative stress because animals had changes similar to those seen in human occupational exposure to isocyanates.
8. In the experimental model the inflammatory process can be confirmed by histopathological examination of lung biopsies, which show a strong leukocyte infiltrate rich in neutrophils, monocytes and eosinophils.
9. In animals exposed to TDI, Trolox administration significantly decreased the level of systemic oxidative stress and simultaneously reduced lung leukocyte infiltration, indicating the possible utility of the treatment with antioxidants and human subjects exposed to isocyanates.
10. Overall these human and experimental observations recommend the parameters of oxidative and nitrative stress for early diagnosis of occupational asthma induced by isocyanates in preclinical stage.
11. Given the damaging potential of the SRO, SRN and MMP-9, increased systemic level of these compounds could serve as a prognostic indicator for remote respiratory complications.

The originality of the study

In occupational asthma induced by isocyanates most existing studies have analyzed local changes in the respiratory system. Thus in the lung was confirmed that oxidative and nitrative stress are pathogenetic mechanisms associated with local lesions and associated inflammatory response.

The originality of this study is conferred primarily by identifying simultaneous the existence of oxidative stress and systemic nitrate after occupational exposure to isocyanates, from preclinical stage.

Secondly, the study is original because it showed that the risk of oxidative stress associated with occupational exposure, decreases with the duration of isocyanates exposure and increases with the subject age.

Another element of originality is that the exposure to isocyanates increased NO synthesis is not dependent on factors such as gender, age, occupational exposure or age.

All these findings are important from several points of view:

- oxidative and nitrative stress tests are positive in early preclinical stages of occupational asthma induced by isocyanates, enabling early diagnosis and prevention
- positive systemic oxidative and nitrative stress tests are due to an inflammatory response confirmed by increased MMP-9
- oxidative stress, nitrative stress and MMP-9 are prognostic indicators for secondary systemic damage, associated with the primary pulmonary ones

Selective References

26. Ayres JG, Boyd R, Cowie H, Hurley JF. Costs of occupational asthma in the UK. *Thorax* 2011; 66(2):128-133.

27. Tarlo SM, Broder I. Irritant-induced occupational asthma. *Chest* 1989; 96(2): 297-300
28. Piirilä PL, Meuronen A, Majuri M-L, Luukkonen R, Mäntylä T, Wolff HJ, et. al. Inflammation and functional outcome in diisocyanate induced asthma after cessation of exposure. *Allergy* 2008; 63: 583-591.
29. Baur X. Isocyanates: Occupational exposures and disorders. *Pneumologie* 2003; 57: 526-531.
30. Pisati G, Baruffini A, Bernabeo F, Cerri S, Mangili A. Rechallenging subjects with occupational asthma due to toluene diisocyanate (TDI), after long-term removal from exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2007; 80: 298-305.
31. Baur X, Budnik LT. New data on occupational exposure to isocyanates. *Pneumologie* 2009; 63:656-661.
32. Matheson JM, Johnson VJ, Vallyathan V, Luster MI. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma. *Toxicol. Sci.* 2005;84: 88-98.
33. Pauluhn J. Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate (MDI): Impact of vehicle for topical induction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2008; 50: 144-154.
34. Hur G-Y, Koh D-H, Choi G-S, Park H-J, Choi S-J, Ye Y-M et.al. Clinical and immunologic findings of methylene diphenyl diisocyanate-induced occupational asthma in a car upholstery factory. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 586-593.
35. Wisniewski AV, Liu Q, Liu J, Redlich CA. Human innate immune responses to hexamethylene diisocyanate (HDI) and HDI-albumin conjugates. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 957-967.
36. Redlich CA. Skin exposure and asthma: Is there a connection? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010;7:134-137.
37. Riedl MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8: 49-56.
38. Orăsan R. *Human physiology*, Ed. Intercredo, Cluj-Napoca, 2001 vol.2.
39. Mureșan A, Orăsan R, Tache T. *Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice*, Edit. Todesco, Cluj-Napoca, 2006.
40. Van Faassen EE, Vanin AF. (eds); '*Radicals for life: The various forms of Nitric Oxide.*' Elsevier, Amsterdam; 2007.
41. Van Faassen EE, Vanin AF. (eds); '*Radicals for life: The various forms of Nitric Oxide.*' Elsevier, Amsterdam; 2007.
42. Wang W, Huang KW, Wu BM, Wang YJ, Wang C. Correlation of eosinophil counts in induced sputum and fractional concentration of exhaled nitric oxide and lung functions in patients with mild to moderate asthma. *Chin Med J (Engl).* 2012 Sep;125(17):3157-60.
43. Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA Jr, Schleimer RP, Minnicozzi M. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Mar;129(3 Suppl):S9-23.
44. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: *Methods in Enzymology*, vol.233, Academic Press, Inc. 1994.p.380-384.
45. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* 2005;38(12):1103-1111
46. Matheson JM, Johnson VJ, Vallyathan V, Luster MI. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma. *Toxicol. Sci.* 2005;84(1):88-98.
47. Wisniewski AV. Developments in laboratory diagnostics for isocyanate asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(2):138-145.
48. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:12-24.
49. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.

50. Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol.* 2002; 168:3595–600.

UNIVERSITÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE "Iuliu Hatieganu"
Cluj-Napoca
FACULTÉ DE MÉDECINE

Résumé de thèse de PhD

Marqueurs de stress oxydatif ayant une valeur diagnostique et pronostique de l'exposition aux isocyanates

Mentor: **Prof.Dr.Remus Orăsan**

Etudiant: **Ovidiu Persecă**

CLUJ-NAPOCA

2012

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	15
ÉTAT COURANT DES CONNAISSANCES	17
1. L'exposition professionnelle aux isocyanates	19
1.1. Isocyanates	19
1.2. Manifestations cliniques de l'exposition aux isocyanates	19
1.3. Manifestations morphologiques de l'exposition respiratoire aux isocyanates	20
1.4. Pathogenèse de l'asthme induit par les isocyanates	21
1.5. L'influence des facteurs génétiques dans le développement de l'asthme induit par les isocyanates	23
1.6. Le diagnostic de l'asthme professionnel induit par les isocyanates	24

1.7. Les perspectives d'avenir	25
2. Le stress oxydatif	26
2.1. Synthèse des espèces réactives de l'oxygène	26
2.2. Défense antioxydante	27
2.3. Les effets de l'excès de ERO	28
2.4. Le diagnostic de stress oxydatif	28
3. L'oxyde nitrique	29
3.1. Synthèse d'oxyde nitrique	29
3.2. Reactivite d'oxyde nitrique	31
L'oxyde nitrique dans le stress oxydatif	31
L'oxyde nitrique dans le stress de nitrosation	33
L'oxyde nitrique dans le stress nitrative	34
CONTRIBUTION PERSONNELLE	
4. Marqueurs de stress oxydatif ayant une valeur diagnostique et pronostique de l'exposition aux isocyanates	39
4.1. Hypothèse de travail	39
4.2. Methodologie generale	43
Reactives	43
4.2.1. Evaluation du stress oxydatif	43
Détermination de malondialdéhyde	43
Détermination des protéines sériques carbonyler	43
Le dosage des thiols sériques total	44
Le dosage sérique de glutathion	44
Détermination du statut oxydatif totale sérique	44
Détermination de la capacité antioxydante totale	45
Calcul de l'indice de stress oxydatif	46
4.2.3. Évaluation de la synthèse de l'oxyde nitrique	46
Détermination du total des nitrites et nitrates sériques	46
Détermination de 3-nitrotirozine plasmatique	47
4.2.3. Détermination de sérum de métalloprotéinase-9	47
4.2.4. L'examen histopathologique	47
L'analyse statistique	48
4.3. Marqueurs de stress oxydatif ayant une valeur diagnostique et pronostique de l'exposition expérimentale aux isocyanates	49
4.3.1. Hypothèse de travail	49
4.3.2. Matériels et méthodes	50
L' exposition expérimentale au toluène-2 ,4-diisocyanate	50
Groupes d'animaux	50
Le protocole de l'étude	51
4.3.3. Résultats	52
Détermination du status oxydatif totale	52
Détermination de la capacité antioxydante totale	53
Détermination du index de stress oxydatif	54
Détermination des lipoperoxydes	54
Détermination des protéines sériques carbonyler	54
Le dosage des thiols sériques total	56
Détermination de glutathion	56

Détermination du total des nitrites et nitrates sériques	56
L'examen histopathologique pulmonaire	58
Quantification de l'infiltrat inflammatoire dans le parenchyme pulmonaire	69
4.3.4. Discussion	71
4.3.5. Conclusions	73
4.4. Marqueurs de stress oxydatif ayant une valeur diagnostique et pronostique de l'exposition professionnelle aux isocyanates	75
4.4.1. Hypothèse de travail	75
4.4.2. Matériels et méthodes	76
La sélection de l'échantillon et protocole de l'étude	76
Détermination de la protéinase matriciale-9(MMP9)	78
L'évaluation du stress oxydatif	78
Évaluation de la synthèse de l'oxyde nitrique	78
L'évaluation de la fonction hépatique	78
4.4.3. Résultats	80
Démographie	80
L'évaluation de la fonction hépatique	81
Détermination de la protéinase matriciale-9(MMP9)	82
L'évaluation du stress oxydatif	83
Évaluation de la synthèse de l'oxyde nitrique	88
4.4.4. Discussion	91
4.4.5. Conclusions	95
4.5. Conclusions générales	97
4.6. L'originalité de l'étude	98
5. Bibliographie	99
Annexes	110

Mots-clés: isocyanates, asthme professionnel, stress oxydatif, oxyde nitrique.

Introduction

L'exposition à des substances toxiques ou irritants en milieu de travail est un problème croissant de santé publique. D'une part parce que c'est un risque pour la santé et d'autre part parce que c'est une question qui dépend des ressources financières et économiques. Dans les cas de maladies professionnelles, les travailleurs concernés sont contraints de quitter leur emploi temporairement ou de façon permanente dans le pire des cas, de récupérer. Selon mécanisme pathogénique, l'asthme professionnel peut être divisé en asthme non immun, asthme induit par les irritants et asthme allergique induite immunitaire. L'asthme allergique peuvent être provoqués par deux groupes différents d'agents: les protéines de haut poids moléculaire (> 5.000 Da) ou à faible poids moléculaire (agents <5000 Da), tels que les isocyanates. Par conséquent, pour éviter de provoquer la maladie professionnelle est d'un intérêt majeur reconnaître les signes les plus brefs délais. Dans certains cas, comme avec l'isocyanate induite par l'asthme, les symptômes persistent, même après cessation de l'exposition. Pour ces raisons, les limites maximales dangereux ont été définis, mais un grand nombre de produits chimiques sont non seulement toxiques ou irritants, mais pourrait également provoquer des réactions d'hypersensibilité. Le plus gros problème est que ces agents induisent vous des réactions d'hypersensibilité à des concentrations très faibles, ce qui en termes techniques sont difficiles à surveiller et à tous les travailleurs ne sont sensibles et exposés tout en développant la maladie. Tout cela fait qu'il est difficile de réaliser une prophylaxie efficace.

CONTRIBUTION PERSONNELLE

Hypothèse de travail

Actuellement la médecine du travail, après avoir évalué l'exposition professionnelle à des sujets humains, doivent être trouvées des méthodes de diagnostic spécifiques pathogénique, le diagnostic étiologique n'est pas suffisant. Le diagnostic pathogénique vise à identifier et quantifier les mécanismes intimes activés par l'exposition aux isocyanates, et le progrès, la gravité et les conséquences. Par conséquent, la recherche actuelle cherche de nouveaux marqueurs de l'exposition professionnelle aux isocyanates marqueurs pathogéniques qui permettant un diagnostic et un pronostic plus précis et sensible. Des études expérimentales et humaines ont démontré que l'exposition cutanée aux isocyanates est un facteur de risque important pour sensibilisation aux isocyanates. Sur la base de ces résultats, ces dernières années, des études ont été menées médecine du travail, qui a démontré le lien entre l'exposition aux isocyanates sensibilisation de la peau et l'asthme. Cette étude avait trois objectifs. Le premier objectif était d'évaluer le niveau de stress oxydatif systémique et nitrosatif dans l'exposition expérimentale et professionnelle aux isocyanates afin d'établir l'utilité des paramètres du système du stress oxydatif et nitrosatif en tant que paramètres diagnostiques et pronostiques dans l'asthme induit par les isocyanates. Le deuxième objectif était de déterminer si l'exposition aux isocyanates expérimentale s'il existe une corrélation entre les marqueurs du stress oxydatif et nitrosatif et les changements morphologiques dans les poumons. Le troisième objectif de l'étude était de déterminer si les sujets humains avec l'exposition professionnelle aux isocyanates et sans manifestations cliniques et fonctionnelles de l'asthme professionnel, marqueurs du stress oxydatif et nitrosatif corrélés avec les niveaux de MMP-9 en tant que marqueur des lésions tissulaires.

Méthodologie générale

L'évaluation du stress oxydatif

Le stress oxydatif a été évalué au moyen de tests globaux et les tests spécifiques. Tests globaux mesurés selon le statut oxydatif total (SOT) tous les composés oxydés par la capacité antioxydante totale (CTA) tout rapport antioxydants et l'indice de stress oxydatif (ISO) des oxydants et des antioxydants. Des tests spécifiques détermine les oxydants et les antioxydants composés spécifiques: dosage par détermination de peroxydes lipidiques malonildialdehyde (MDA), la détermination des protéines par des groupes carbonyle carbonyle déterminants, la détermination thiol par la détermination de sérum groupes sulfhydryles totales (SH) , détermination glutathion sérum.

Évaluation de la synthèse de l'oxyde nitrique

Synthèse de l'oxyde nitrique (NO) a été évaluée indirectement par la mesure sérique de nitrites totaux et le nitrate (NOx) et de sérum 3-nitrotirosne.

Détermination de sérum de métalloprotéinase-9

MMP-9 est un bon indicateur d'une lésion tissulaire, car l'accrue indique d'amplification de lyse pour protéines de la matrice.

L'examen histopathologique

Les principales caractéristiques histologiques que ont été analysées ont été l'infiltrat inflammatoire pérbronchique périvasculaire et interstitielle. Pour l'évaluation de chaque animal a été utilisé pour le système de classification histopathologique exprimé sur une échelle de 0-4.

L'analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard (SD) chaque fois que les données ont été distribuées normalement. Les comparaisons statistiques entre les valeurs avant et après traitement ont été effectuées en utilisant le test t de Student lorsque les données ont été normalement distribuées. Les comparaisons statistiques entre les groupes de traitement ont été effectuées en utilisant le test ANOVA. Analyser les corrélations entre les paramètres a été faite par Pearson et Spearman essais.

1. Exposition expérimentale au toluène-2,4-diisocyanate

Sensibilisation de la peau avec du toluène-2,4-diisocyanate (TDI) est réalisée par l'application de chaque peau de l'oreille par TDI 20 μ l 3% pendant trois jours consécutifs (jours 1, 2 et 3). Au jour 7, ont été appliqués à des doses similaires peau de 20 ml TDI 3% sur les deux oreilles. Le 10e jour après anesthésie légère à l'éther diéthylique, les animaux ont reçu instillation nasale de 10 μ l TDI 0,1% dans chaque narine. Pour dissoudre TDI a utilisé un solvant (AUM) préparé en 2 volumes d'acétone (A) et 3 volumes d'huile extra-vierge d'olive (UM).

Les traitements ont été administrés dès le jour 1 et le jour 10. Le 11e jour à 24h après l'administration intranasale d'une overdose de pentobarbital (90 mg / kg ip), le sang a été recueilli par ponction cardiaque et une biopsie pulmonaire a été prise.

Groupes d'animaux inclus dans l'étude

Abréviation	Groupe	Metodé
CONTROL	Groupe témoin négatif	sensibilisation de la peau et de provocation intranasale avec une solution saline
AUM	Groupe témoin solvant acétone huile d'olive	sensibilisation de la peau avec AUM 2:3 v/v et de provocation intranasale avec AUM 1:4 v/v;
TDI	Groupe témoin positif	sensibilisation de la peau avec TDI 0.3%, et de provocation intranasale avec TDI 0.1%;
TROLOX	Groupe antioxydant	sensibilisation de la peau et provocation intranasale ont été faites que le groupe TDI, en plus de TDI groupe a reçu un traitement par anti-oxydant Trolox (20 mg/kg/jour i.p)
AG	Groupe aminoguanidine	sensibilisation de la peau et provocation intranasale ont été faites que le groupe TDI, en plus de TDI groupe a reçu un traitement par aminoguanidine (AG) (50 mg/kg/jour i.p.), inhibiteur sélectif de la NOS induite (iNOS/NOS2)
NAME	Groupe N-argininmetilester	sensibilisation de la peau et provocation intranasale ont été faites que le groupe TDI, en plus de TDI groupe a reçu un traitement par NG-nitro-L-arginine methyl ester (NAME), inhibiteur non-sélectif de l'oxyde nitrique synthase (NOS)
ARG	Groupe arginine	sensibilisation de la peau et provocation intranasale ont été faites que le groupe TDI, en plus de TDI groupe a reçu un traitement par arginine (100 mg/kg/jour i.p.) substrat de la synthèse d'oxyde nitrique.

Conclusions

1. L'exposition cutanée à des souris expérimentales TDI suivis par défi avec le TDI, provoque un stress oxydatif systémique et le nitrate en augmentant SROet le NO, associée à la défense antioxydante réduite. Dans le poumon TDI induit une infiltration leucocytaire avant tout un puissant, riche en polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les éosinophiles.
 2. Administration de antioxydant de type Trolox réduire considérablement le niveau de stress oxydatif systémique. Dans le même temps réduit l'infiltration leucocytaire du poumon, qui est devenue prédominante avec des neutrophiles et des monocytes.
 3. Diminution de la synthèse de NO par l'administration d'AG, inhibiteur sélectif de la NOS et NOM inhibiteur sélectif d'iNOS, a considérablement réduit le stress oxydatif systémique et nitrative. Associée à une infiltration leucocytaire du poumon diminué que de devenir principalement avec des neutrophiles.
 4. ARG, comme substrat pour la synthèse de NO, a maintenue élevée stress oxydatif systémique et nitrative. Le poumon causé ARG maintenir leucocytes infiltrant riche, mais il est devenu principalement avec des neutrophiles.
 5. Ces observations recommande première, paramètres du stress oxydatif pour évaluer le pronostic des expositions aux isocyanates, et d'autre part confirme l'utilité de la thérapie anti-oxydante.
- 2. Marqueurs de stress oxydatif ayant une valeur diagnostique et pronostique de l'exposition professionnelle aux isocyanates**

Le premier objectif était d'évaluer le stress systémique oxydatif et nitrosatif dans l'exposition professionnelle aux isocyanates afin d'établir l'utilité des paramètres du système du stress oxydatif et nitrosatif en tant que paramètres diagnostiques et pronostiques dans l'isocyanate hypersensibilité induite.

Le deuxième objectif était de déterminer si les sujets humains avec l'exposition professionnelle aux isocyanates et sans manifestations cliniques et fonctionnelles de l'asthme professionnel, les marqueurs du stress oxydatif et nitrosatif sont corrélés avec les niveaux de MMP-9 en tant que marqueur des lésions tissulaires.

L'étude a été exploratoire. Sujets inclus dans l'étude étaient des travailleurs exposés aux isocyanates (n=70) répondant aux critères pour l'inclusion et d'exclusion et un groupe témoin de 50 personnes en bonne santé que ne sont pas exposés aux isocyanates, toxiques et d'autres. Les critères d'inclusion étaient les suivants: l'exposition professionnelle aux isocyanates, le manque d'asthme professionnel, pas d'autres chroniques ou aiguës, âge 20-50 ans, non-fumeur, pas de drogues, d'alcool ou d'autres traitements médicamenteux ne sont pas toxiques pas manger cuit antioxydant ou inhibiteurs de la synthèse du NO. Critères d'exclusion: âge de moins de 20 ou plus de 50 ans, grossesse, allaitement, asthme professionnel, d'autres maladies chroniques ou aiguës, le tabagisme, les traitements médicamenteux qui peuvent influencer la synthèse du stress oxydatif et de NO. Le diagnostic positif d'asthme professionnel a été prise après l'examen clinique, la fonction pulmonaire et l'exploration d'imagerie. L'exposition professionnelle était par jour pendant deux semaines.

Conclusions

1. Dans l'exposition humaine professionnelle aux isocyanates a été stress oxydatif systémique significative.
2. Chez ces sujets au stress oxydatif systémique était plus élevée dans les expositions récentes chez les personnes âgées de plus.
3. La capacité antioxydante totale des personnes exposées à l'isocyanate professionnelle était significativement plus faible.
4. Réduction de CAT était indépendante du sexe, de l'âge, l'exposition professionnelle ou l'âge.
5. Chez les personnes exposées professionnelle aux isocyanates était identifié une augmentation des concentrations systémiques de NOx et de 3SA, les indicateurs de synthèse excessive de NO par iNOS.
6. La synthèse de NO était indépendante du sexe, de l'exposition professionnelle ou l'âge du sujet.
7. Dans l'exposition humaine professionnelle aux isocyanates a identifié une augmentation significative systémique de la MMP-9, comme indicateur de la réponse inflammatoire.
8. Compte tenu de la lésion potentielle de l'OAR, SRN et MMP-9, la croissance de ces composés au niveau systémique est un indicateur pronostic car il existe un risque supplémentaire de complications respiratoires loin.
9. Tests positifs du stress oxydatif et nitrative a niveau systémique, chez des sujets qui n'ont pas encore troubles respiratoires, recommandent ces tests pour un diagnostic précoce d'hypersensibilité aux isocyanates.

Conclusions générales

1. Dans l'exposition humaine professionnelle aux isocyanates est associée avec stress oxydatif systémique significative avant les signes cliniques de l'asthme professionnel.
2. Le stress oxydatif systémique est encore plus grande que l'exposition est récente ou l'âge du sujet est plus grande.
3. Au stress oxydatif augmenté après exposition professionnelle aux isocyanates contribue la réduction de la capacité antioxydante totale.
4. La capacité antioxydante totale des sujets exposés à l'emploi à isocyanates ne dépend pas des individus de sexe, du temps d'exposition ou de l'âge.
5. Chez les personnes exposées aux isocyanates au travail il ya excès de synthèse de NO, NOx identifiables par l'augmentation systémique et 3NT avant le début de l'évolution clinique de l'asthme professionnel.
6. Réponse inflammatoire dans la présence humaine est confirmé par l'augmentation significative des niveaux de MMP-9.
7. Modèle d'exposition par voie cutanée chez la souris suivies par défi avec TDI est un bon modèle expérimental pour l'étude du stress oxydatif et nitrative parce que les animaux ont subi des changements similaires à ceux observés chez les humains l'exposition professionnelle aux isocyanates.
8. Dans le modèle expérimental le processus inflammatoire peut être confirmé par l'examen histopathologique des biopsies pulmonaires, qui montrent une forte infiltration leucocytaire riche en polynucléaires neutrophiles, monocytes et éosinophiles.
9. Chez les animaux exposés au TDI qui Trolox administration diminué de manière significative le niveau de stress

oxydatif systémique et en même temps réduit l'infiltration leucocytaire et du poumon, ce qui indique l'utilité éventuelle d'un traitement avec des antioxydants et des sujets humains exposés aux isocyanates.

10. Globalement, ces observations humaines et d'expérimentation recommandée paramètres du stress oxydatif et nitrative pour le diagnostic précoce de l'asthme professionnel induit par les isocyanates en phase préclinique.

11. Compte tenu de la lésion potentielle de l'OAR, SRN et MMP-9, l'augmentation du niveau systémique de ces composés pourraient servir d'indicateur pronostique des complications respiratoires à distance.

L'originalité de l'étude

Dans l'asthme professionnel induit par les isocyanates plupart des études existantes ont analysé les changements locaux dans le système respiratoire. Ainsi, le poumon a été confirmé que le stress oxydatif et les mécanismes pathogéniques nitrative associée à des lésions locales et la réponse inflammatoire associée.

L'originalité de cette étude est accordée principalement par l'identification existence simultanée du stress oxydatif et du nitrate systémique après exposition professionnelle aux isocyanates, du stade préclinique.

Deuxièmement, l'étude est originale car elle montre que le risque de stress oxydatif associé à l'exposition professionnelle aux isocyanates diminue avec l'âge et augmente avec l'âge sujet.

Un autre élément d'originalité est que l'exposition aux isocyanates augmenté la synthèse de NO ne dépend pas de facteurs tels que le sexe, temps d'exposition professionnelle ou l'âge du sujet.

Tous ces résultats sont importants à plusieurs points de vue:

- paramètres du stress oxydatif et nitrative devenir positif dès le début préclinique de l'asthme professionnel induit par les isocyanates, permettant le diagnostic précoce et la prévention une positivité
- la positivité des tests de stress oxydatif systémique et nitrative est due à la réponse inflammatoire confirmée par l'augmentation de la MMP-9
- stress oxydatif, stress nitrative et MMP-9 sont des indicateurs pronostiques, car ils peuvent causer des dommages côté systémique lié à la poumon

Bibliographie sélective

51. Ayres JG, Boyd R, Cowie H, Hurley JF. Costs of occupational asthma in the UK. *Thorax* 2011; 66(2):128-133.
52. Tarlo SM, Broder I. Irritant-induced occupational asthma. *Chest* 1989; 96(2): 297-300
53. Piirilä PL, Meuronen A, Majuri M-L, Luukkonen R, Mäntylä T, Wolff HJ, et. al. Inflammation and functional outcome in diisocyanate induced asthma after cessation of exposure. *Allergy* 2008; 63: 583-591.
54. Baur X. Isocyanates: Occupational exposures and disorders. *Pneumologie* 2003; 57: 526-531.
55. Pisati G, Baruffini A, Bernabeo F, Cerri S, Mangili A. Rechallenging subjects with occupational asthma due to toluene diisocyanate (TDI), after long-term removal from exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2007; 80: 298-305.
56. Baur X, Budnik LT. New data on occupational exposure to isocyanates. *Pneumologie* 2009; 63:656-661.
57. Matheson JM, Johnson VJ, Vallyathan V, Luster MI. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma. *Toxicol. Sci.* 2005;84: 88-98.
58. Pauluhn J. Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate (MDI): Impact of vehicle for topical induction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2008; 50: 144-154.
59. Hur G-Y, Koh D-H, Choi G-S, Park H-J, Choi S-J, Ye Y-M et.al. Clinical and immunologic findings of methylene diphenyl diisocyanate-induced occupational asthma in a car upholstery factory. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 586-593.
60. Wisnewski AV, Liu Q, Liu J, Redlich CA. Human innate immune responses to hexamethylene diisocyanate (HDI) and HDI-albumin conjugates. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 957-967.
61. Redlich CA. Skin exposure and asthma: Is there a connection? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010;7:134-137.
62. Riedl MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8: 49-56.
63. Orăsan R. *Human physiology*, Ed. Intercredo, Cluj-Napoca, 2001 vol.2.
64. Mureșan A, Orăsan R, Tache T. *Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice*, Edit. Todescu, Cluj-Napoca, 2006.

65. Van Faassen EE, Vanin AF. (eds); *'Radicals for life: The various forms of Nitric Oxide.'* Elsevier, Amsterdam; 2007.
66. Van Faassen EE, Vanin AF. (eds); *'Radicals for life: The various forms of Nitric Oxide.'* Elsevier, Amsterdam; 2007.
67. Wang W, Huang KW, Wu BM, Wang YJ, Wang C. Correlation of eosinophil counts in induced sputum and fractional concentration of exhaled nitric oxide and lung functions in patients with mild to moderate asthma. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Sep;125(17):3157-60.
68. Szefer SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA Jr, Schleimer RP, Minnicozzi M. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Mar;129(3 Suppl):S9-23.
69. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: *Methods in Enzymology*, vol.233, Academic Press, Inc. 1994.p.380-384.
70. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem*. 2005;38(12):1103-1111
71. Matheson JM, Johnson VJ, Vallyathan V, Luster MI. Exposure and immunological determinants in a murine model for toluene diisocyanate (TDI) asthma. *Toxicol. Sci*. 2005;84(1):88-98.
72. Wisnewski AV. Developments in laboratory diagnostics for isocyanate asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(2):138-145.
73. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28:12-24.
74. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.
75. Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol*. 2002; 168:3595-600.