

STUDIUL MARKERILOR DE STRES OXIDATIV ÎN EXPUNEREA EXPERIMENTALĂ LA IZOCIANAȚI

OVIDIU PERSECĂ¹, REMUS ORĂSAN², ALINA ELENA PÂRVU³,
REMUS MOLDOVAN²

¹Sănătate Ocupațională, Centrul Regional de Sănătate Publică, Cluj-Napoca

²Disciplina de Fiziologie

³Disciplina de Fiziopatologie

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

Rezumat

Obiectiv. Toluen diizocianatul (TDI) este o cauză de astm ocupațional. Scopul studiului a fost să evalueze nivelul stresului oxidativ sistemic în expunerea experimentală la izocianați.

Material și metodă. A fost utilizat un model de expunere experimentală la TDI la șoareci, timp de 10 zile. Pentru studiu au fost utilizate patru grupuri (n=12): un grup control negativ, cu sensibilizare cutanată și provocare intranasală cu ser fiziologic; un grup AUM, cu sensibilizare și provocare cu solventul utilizat pentru TDI; un grup TDI, cu sensibilizare și provocare cu TDI; un grup TDI plus trolox (20 mg/kg/zi i.p.). În ziua a 11-a s-a recoltat sânge prin puncție cardiacă. Stresul oxidativ a fost evaluat prin determinarea malondialdehidei (MDA), proteinelor carbonilate (PC), tiolilor totali (tSH) și glutationului seric (GSH).

Rezultate. TDI a determinat o creștere a MDA, PC și tSH și o reducere a GSH. Solventul nu a influențat nici un parametru. Troloxul a redus PC și a crescut GSH.

Concluzii. Expunerea experimentală a șoarecilor la TDI a determinat stres oxidativ sistemic, iar Troloxul a scăzut nivelul stresului oxidativ sistemic.

Cuvinte cheie: izocianați, astm bronșic, stres oxidativ, trolox.

STUDY OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN EXPERIMENTAL EXPOSURE TO ISOCYANATE

Abstract

Aim. Toluene diisocyanate (TDI) is a frequent cause of occupational asthma. The aim of this study was to evaluate the systemic oxidative stress in experimental exposure to TDI.

Methods. An experimental model of mice exposure to TDI was used for 10 days. The study groups (n=12) were: a negative control group with skin sensitization and intranasal challenge, performed with saline; a group with sensitization and challenge with the solvent; a group with sensitization and challenge with TDI; a group with TDI and trolox (20 mg/kg /day ip). On the 11th day, blood was collected by cardiac puncture, and oxidative stress was assessed by malondialdehyde (MDA), carbonylated proteins (CP), total thiols (TSH) and serum glutathione (GSH).

Results. TDI increased MDA, PC and TSH and reduced GSH. The solvent did not influence any parameter. Trolox reduced PC and increased GSH.

Conclusions. Experimental exposure of mice to TDI caused systemic oxidative stress and Trolox lowered the systemic oxidative stress.

Keywords: isocyanates, asthma, oxidative stress, trolox.

Articol intrat la redacție în data de: 15.05.2012

Primit sub formă revizuită în data de: 29.05.2012

Acceptat în data de: 30.05.2012

Adresa pentru corespondență: parvualinaelena@yahoo.com

INTRODUCERE

Toluen diizocianatul (TDI) este cea mai frecventă cauză de astm ocupațional în țările în curs de dezvoltare. Expunerea la izocianati în mediul industrial a crescut semnificativ pe măsura creșterii utilizării acestor substanțe în tot mai multe domenii industriale [1-3]. Mult timp s-a considerat că principalii cale patogenetică de sensibilizare la izocianati este calea respiratorie, care duce la apariția astmului. Practica a demonstrat însă că metodele de reducere a expunerii aeriene la izocianati nu au redus corespunzător proporția de indivizi sensibilizați la izocianati. În plus, s-a constatat că astmul indus de izocianati a apărut și la persoane care lucrau într-un mediu cu nivele scăzute, greu detectabile de izocianati în atmosfera locurilor de muncă. Aceste observații au sugerat existența unei alte căi de sensibilizare la izocianati. Studii experimentale și umane au demonstrat că expunerea cutanată la izocianati este un factor de risc semnificativ pentru sensibilizarea la izocianati [4,5]. Pornind de la aceste constatări, în ultimii ani au fost efectuate studii de medicină ocupațională care au demonstrat legătura dintre sensibilizarea la izocianati prin expunere cutanată și astm [6,7].

Mecanismele patologice sunt incomplet cunoscute și nu există metode de testare serologică. Deoarece afectarea permanentă a funcției pulmonare a fost observată pe termen lung, chiar și după întreruperea expunerii, dezvoltarea unor biomarkeri pentru identificarea subiecților sensibili din rândul celor expuși este esențială [8,9].

În astmul indus de izocianati au fost identificate două tipuri de mecanisme. Aproximativ 10-30% din cazuri prezentau hipersensibilitate de tip I la izocianati. Majoritatea subiecților însă nu aveau imunglobuline E specifice la izocianati, mecanismul fiind hipersensibilitate non-imunglobulin E-dependentă. Legătura dintre sensibilizarea cutanată și astmul la izocianati o reprezintă un proces de sensibilizare sistemică, în care are loc o activare a macrofagelor în calitate de celule prezentatoare de antigene [6,10-13]. Anumite aspecte ale acestui mecanism au fost identificate, dar detaliile sunt încă insuficient cunoscute.

În procesele de sensibilizare sistemică, indiferent de substanța implicată, este stimulată sinteza de specii reactive ale oxigenului (SRO), în calitate de molecule efectoare. În astmul indus de izocianati s-a constatat că procesul inflamator pulmonar este dependent de stresul oxidativ. Pe de altă parte, studiile care au analizat reactivitatea diizocianatilor în organism au constatat că aceștia pot reacționa cu grupările -OH, -SH și -NH₂ din proteinele endogene, se pot lega de glutatión (GSH), unul dintre antioxidanții pulmonari importanți. Experimental s-a evidențiat că GSH are efect protector în astmul alergic [2,11].

Din aceste motive, scopul studiului a fost să evalueze sistemic nivelul stresului oxidativ în expunerea experimentală la izocianati, pentru a putea stabili dacă modificările intrapulmonare și efectele sistemice ale

izocianatilor influențează acest mecanism patogenetic în mod semnificativ. Rezultatele acestei analize vor permite stabilirea utilității parametrilor de stres oxidativ ca parametri de diagnostic și prognostic în astmul indus de izocianati.

MATERIAL ȘI METODĂ

Expunerea experimentală la tolue-2,4-diizocianat

Sensibilizarea cutanată cu tolue-2,4-diizocianat (TDI) (Aldrich, Taufkirchen, Germany) 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 cutanat 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 [2]. Solventul AUM, folosit pentru a dizolva TDI, a constat dintr-un amestec de 2 volume de acetona (A) și 3 volume de ulei de măsline extra-virgin (UM).

Grupurile de animale și protocolul studiului

Animalele utilizate au fost șoareci de sex masculin (greutate aprox. 20 g, vârsta 6-7 săptămâni) de la Biobaza UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca. Pe parcursul experimentului au fost menținuti în condiții standard de temperatură și umiditate, ciclul lumină/întuneric de câte 12 h, au primit hrană granulată și apă *ad libitum*. Toate procedurile experimentale au fost aprobate de către Comisia de etică a UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca.

Pentru studiu au fost utilizate patru grupuri de șoareci (n=12): un grup control negativ, la care sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut cu ser fiziologic; un grup AUM la care sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut cu solventul utilizat pentru TDI; un grup TDI, la care sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut cu TDI; un grup TROLOX, la care sensibilizarea cutanată și provocarea intranasală s-au făcut cu TDI, în plus a primit tratament antioxidant cu trolox (20 mg/kg/zi i.p.) [11,22]. În ziua a 11-a, la 24 ore de la administrarea intranasală, după o supradoză de pentobarbital (90 mg/kg i.p.) a fost recoltat sânge prin puncție cardiacă (Fig. 1).

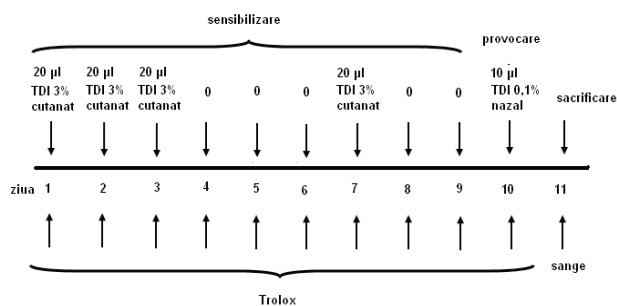


Fig. 1. Reprezentarea grafică a protocolului de expunere experimentală la TDI și tratament cu trolox. TDI = tolue-2,4-diizocianat.

Determinarea malondialdehidei

Malondialdehida (MDA) a fost determinată ca marker de peroxidare a lipidelor [14]. Pe scurt, 150 μ l de ser au reacționat cu 125 μ l TCA 10%, 125 μ l de acid 5 mM etilendiaminotetraacetic, 125 μ l sulfat de sodiu dodecil 8%, și 10 μ l 0.5 g/ml butilhidroxitoluen. După agitare timp de 30 s, amestecul a fost incubat timp de 10 min la temperatura camerei. Apoi s-au adăugat 500 μ l de acid tiobarbituric 0,6% și amestecul a fost încălzit la 95°C timp de 30 min. După răcire la temperatura camerei, amestecul a fost centrifugat la 10000 g timp de 10 min. Absorbanța supernatantului a fost măsurată la 532 nm. O curbă standard a fost generată cu 1,1,3,3-tetraethoxypropane standard (0.3 la 10 nmol/ml). Concentrația MDA serice a fost exprimată în nmol/ml de ser.

Determinarea proteinelor carbonilate serice

Oxidarea proteinelor a fost evaluată prin măsurarea proteinelor carbonilate (PC) serice [15]. Utilizând 0.25 ml TCA 10% au fost precipitate proteinele din 0.5 ml ser. La precipitatul separat prin centrifugare s-au adăugat 0.75 ml de DNPH 10 mM în HCl 2M. După incubare 30 min la temperatura camerei, s-a adăugat aceeași cantitate de TCA și s-a recentrifugat. Precipitatul astfel obținut a fost spălat de două ori cu 1 ml etanol/etil acetat (1:1 v/v). Apoi precipitatul a fost dizolvat în 0.75 ml solvent (2 g dodecilsulfat de sodiu și 50 mg EDTA în 100 ml tampon fosfat 80 mM, pH 8.0) și incubat 10 min la temperatura camerei. Absorbanța a fost citită la 370 nm față de HCl 2M. Concentrația serică de PC, calculată utilizând un coeficient molar de extincție 22,000 M⁻¹cm⁻¹, a fost exprimată în μ mol/ml [16].

Determinarea tiolilor serici totali

Tiolii totali (tSH) au fost determinați utilizând 4.0 ml reactiv Ellman, la care s-au adăugat 0.2 ml de ser, 0.6 ml de 20 mM tampon tris-HCl pH 8.2, 0.04 ml de DTNB 10 mM în metanol absolut și 3.16 ml de metanol absolut. După 15 min la temperatura camerei, tuburile au fost centrifugate și a fost citită absorbanta supernatantului la 412 nm. Concentrația serică de tSH a fost exprimată în nmol/ml [16].

Determinarea glutationului seric

Glutationul seric (GSH) a fost măsurat fluorimetric. Serul tratat cu TCA 10% a fost centrifugat la 1900 g timp de 6 min. La supernatant s-a adăugat o-phthalaldehide, ca agent fluorescent la pH 8.0 cu excitație la 350 nm și emisie la 420 nm. Concentrația GSH seric a fost exprimată în nmol/ml [17].

Analiza statistică

Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm deviație standard (SD). Compararea loturilor s-a făcut cu testul ANOVA. O valoare de $p < 0.05$ a fost considerată statistic semnificativă. Analiza statistică a fost efectuată cu un program standard (SPSS for Windows, version 11.0).

REZULTATE

Determinarea lipoperoxizilor

TDI a determinat o creștere ușoară a MDA față de control ($p > 0.05$). Solventul AUM nu a influențat nivelul MDA față de control ($p > 0.05$). Troloxul nu a influențat semnificativ nivelul de MDA, nici față de TDI, nici față de control ($p > 0.05$) (Fig. 2).

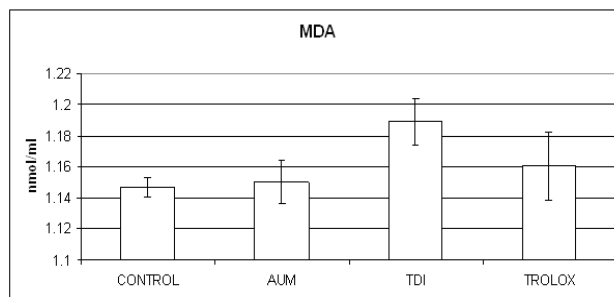


Fig. 2. Valorile malondialdehidei serice în ziua a 11-a de experiment. MDA = malondialdehida.

Determinarea proteinelor carbonilate

Proteinele carbonilate au crescut semnificativ la animalele tratate cu TDI ($p < 0.01$). Solventul AUM nu a avut un efect important ($p > 0.05$). Troloxul a redus mult PC față de TDI ($p < 0.01$) și nesemnificativ față de lotul control ($p > 0.05$) (Fig. 3).

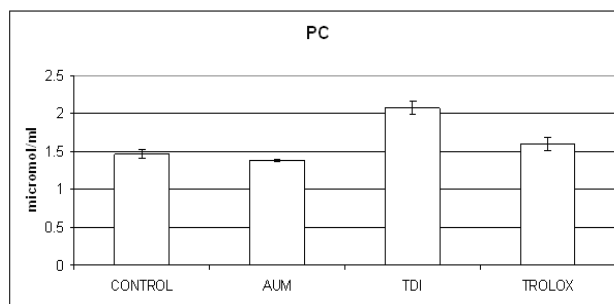


Fig. 3. Valorile proteinelor carbonilate serice în ziua a 11-a de experiment. PC = proteine carbonilate.

Determinarea tiolilor serici totali

Administrarea TDI a indus doar o ușoară creștere a tSH față de control ($p < 0.05$). Solventul AUM și Troloxul nu au influențat semnificativ tSH ($p > 0.05$) (Fig. 4).

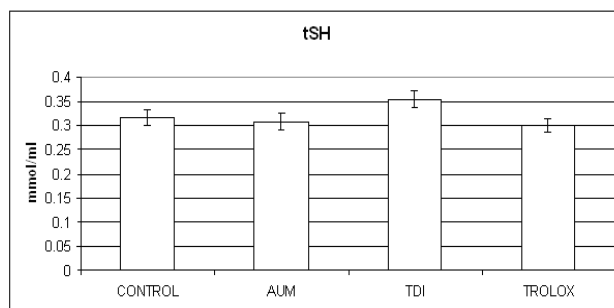


Fig. 4. Valorile tiolilor serici totali în ziua a 11-a de experiment. tSH = tioli serici totali.

Determinarea glutationului

În urma tratamentului cu TDI, GSH a scăzut față de lotul control ($p < 0,01$). Solventul AUM nu a avut efect semnificativ ($p > 0,05$). Troloxul a crescut semnificativ GSH, față de TDI și față de control ($p < 0,01$) (Fig. 5).

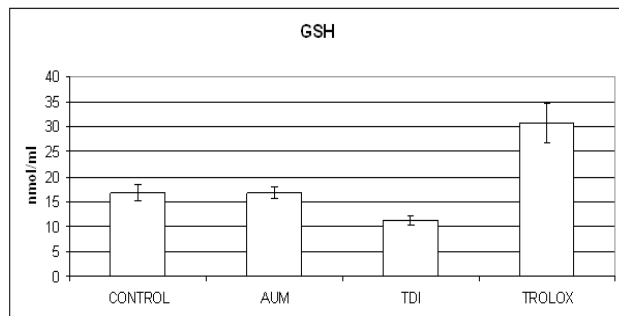


Fig. 5. Valorile glutationului seric în ziua a 11-a de experiment. GSH = glutationul seric.

DISCUȚII

În acest studiu a fost analizat nivelul sistemic al stresului oxidativ la un model experimental de expunere cutanată la TDI. Modelul experimental utilizat induce un răspuns inflamator și imun similar celui din astmul ocupațional provocat de izocianati [9]. Rezultatele obținute au indicat existența unui nivel crescut de stres oxidativ după sensibilizare cutanată urmată de provocare respiratorie cu TDI la șoareci.

Studiile din ultimii ani au adus tot mai multe dovezi epidemiologice și experimentale că expunerea cutanată la izocianati poate determina sensibilizare la izocianati și astm. Spre deosebire de alte tipuri de sensibilizări profesionale, în cazul izocianatilor în majoritatea cazurilor nu s-a putut identifica un răspuns imun specific. De aceea, se presupune că patogeniza celor mai multe cazuri de astm indus de izocianati nu implică mecanisme dependente de IgM [18,19]. Spre deosebire de alergeni clasici, izocianatii pot reacționa cu grupările amino, hidroxil și sulfhidril din diferite proteine și peptide, formând astfel complexe haptene-proteină sau antigene. Astfel se poate explica lipsa unor markeri imunologici clari și lipsa unei relații doză-răspuns față de izocianati. Din același motiv severitatea sensibilizării la izocianati ar putea fi evaluată prin markeri nespecfici, utilizați în procesele cu mecanism inflamator [18]. Astfel de exemplu, se utilizează dozarea IgE și IgG anti TDI-albumină umană și mediatori inflamatori (ex. citokine, MMP-9) [20].

Numeroase studii dermatologice au evidențiat implicarea imunității nespecifice în patogeniza dermatitei atopice, prin implicarea speciilor reactive ale oxigenului. Având în vedere faptul că dermatita atopică are un mecanism patogenetic asemănător cu cel al sensibilizării cutanate cu izocianati, se justifică evaluarea consecințelor expunerii experimentale a șoarecilor la TDI prin măsurarea

stresului oxidativ.

Localizarea și efectele stresului oxidativ pot fi analizate prin markeri locali tisulari și sistemici, deoarece sinteza excesivă de SRO poate determina leziuni tisulare locale și în același timp pot difuza sistemic. Nivelul sistemic al SRO reprezintă un indicator de risc pentru complicații la distanță, în cadrul răspunsului inflamator sistemic. Creșterea stresului oxidativ descrie situațiile în care mecanismele antioxidante sunt incapabile să inactiveze SRO. Acestea pot fi determinate de producția excesivă de SRO, de reducerea apărării antioxidante sau ambele [21].

Metodele de cuantificare a stresului oxidativ sunt frecvent numite metode de amprentare, prin care sunt măsurați produși finali specifici rezultați din interacțiunea SRO cu diverse biomolecule. Astfel sunt lipoperoxizii și proteinele carbonilate. Lipoperoxizii au efect lezional, deoarece pot induce un lanț de reacții care se autoperpetuează și care duc la lezarea membranelor [21]. În studiul de față, nivelul lipoperoxizilor a fost apreciat indirect prin dozarea MDA. În condiții normale, proteinele sunt mai puțin sensibile la atacul SRO. Când există însă un exces de SRO, crește semnificativ producerea PC prin oxidarea unor aminoacizi. De aceea nivelul seric al PC este un marker bun pentru evaluarea stresului oxidativ.

La animalele expuse la TDI s-a constatat o creștere ușoară a MDA și o creștere importantă a PC. Acestea indică existența unei sinteze excesive de SRO după expunere la TDI.

În condiții normale, efectul lezional al stresului oxidativ este în echilibru cu efectul antioxidantilor naturali. Nu există o metodă de referință pentru măsurarea capacității antioxidante. Sistemele antioxidante acționează împreună, nu izolat, pentru că există interacțiuni între antioxidanții hidrofilii și lipofili. În plus există și antioxidanți nedescoperiți sau ignorați [21]. La nivelul organismului proteinele constituie principalii antioxidanți din ser. Grupările SH libere din proteine sunt de fapt principalele responsabile de acest efect antioxidant. De aceea nivelul tSH servește ca biomarker antioxidant. La animalele expuse la TDI nivelul tSH nu a prezentat modificări semnificative, ceea ce indică că stresul oxidativ după expunere la TDI nu se datorează reducerii apărării antioxidante.

La nivel celular, balanța redox este menținută de GSH. Concentrația serică a GSH reflectă statusul glutationului tisular și este un indicator de stres oxidativ. Reducerea semnificativă a GSH funcțional după expunerea la TDI confirmă creșterea stresului oxidativ și riscul leziunilor oxidative [21,22]. Acest rezultat a fost confirmat și de constatarea că administrarea de Trolox, antioxidant neenzimatic, a redus semnificativ PC și a crescut mult GSH.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obținute, am concluzionat că expunerea cutanată experimentală a șoarecilor la TDI determină stres oxidativ sistemic prin creșterea SRO și

reducerea asociată a apărării antioxidante, deoarece au crescut MDA, PC, tSH și s-a redus GSH. Administrarea de antioxidanți, tip Trolox, scade nivelul stresului oxidativ sistemic. Aceste observații recomandă pe de o parte parametrul de stres oxidativ pentru evaluarea prognosticului în expunerile la izocianati, iar pe de altă parte confirmă utilitatea terapiei antioxidante.

Diagnosticul precoce al sensibilizării la izocianati prin intermediul mecanismelor patogenetice este important, deoarece izocianati pot induce modificări acute (sindromul de disfuncție reactivă a căilor respiratorii) sau cronice (astmul bronșic) ale funcției respiratorii, în timpul expunerii și după întreruperea expunerii la izocianati [22].

Bibliografie

1. Jones MG, Floyd A, Nouri-Aria KT, et al. Is occupational asthma to diisocyanates a non-IgE-mediated disease? *J Allergy Clin Immunol*, 2006;117:663-669.
2. Vanoirbeek JA, De Vooght V, Synhaeve N, Nemery B, Hoet PH. Is toluene diamine a sensitizer and is there cross-reactivity between toluene diamine and toluene diisocyanate? *Toxicol Sci*, 2009;109(2):256-264.
3. Tinnerberg H, Mattson C, Usage of airmonitoring and Biomarkers of Isocyanate exposure to assess the Effect of a Control intervention. *Ann Occup Hyg*, 2008;52 (3):187-194.
4. Bello D, Herrick Christina A, Smith TJ, et.al. Skin Exposure to Isocyanates: Reasons for Concern. *Environ Health Perspect*, 2007;115:328-335.
5. Redlich CA. Skin exposure and asthma: Is there a connection? *Proc. Am Thorac Soc*, 2010;7:134-137.
6. Lummus ZL, Wisniewski AV, Bernstein DI. Pathogenesis and disease mechanisms of occupational asthma, *Immunol Allergy Clin North Am*, 2011;31(4):699-716.
7. Vanoirbeek JA, Tarkowski M, Ceuppens JL, Verbeken EK, Nemery B, Hoet PH. Respiratory response to toluene diisocyanate depends on prior frequency and concentration of dermal sensitization in mice. *Toxicol Sci*, 2004; 80(2):310-321.
8. Pronk A, Preller L, Raulf-Heimsoth M, et al., Respiratory symptoms, sensitization, and exposure response relationships in spray painters exposed to isocyanates. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007; 176(11):1090-1097.

9. Wisniewski AV. Developments in laboratory diagnostics for isocyanate asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7(2):138-145.
10. Dykewicz, M.S. Occupational asthma: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and management. *J. Allergy Clin. Immunol*, 2009; 123:519-528.
11. Wisniewski AV, Liu Q, Liu J, Redlich CA. Glutathione protects human airway proteins and epithelial cells from isocyanates. *Clin Exp Allergy*, 2005; 35(3):352-357.
12. McClung JM, Kavazis AN, Whidden MA, et al. Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB-Akt) signaling, *J Physiol*, 2007; 585:203-215.
13. Baur X, Budnik LT. New data on occupational exposure to isocyanates. *Pneumologie*, 2009; 63:656-661.
14. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*, 1993; 15:353-363.
15. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, 1990; 186:464-478.
16. Tripathi P, Chandra M, Misra MK. Oral administration of L-arginine in patients with angina or following myocardial infarction may be protective by increasing plasma superoxide dismutase and total thiols with reduction in serum cholesterol and xanthine oxidase. *Oxid Med Cell Longev*, 2009; 2(4):231-237.
17. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: *Methods in Enzymology* vol.233, Academic Press, Inc. 1994:380-384.
18. Wisniewski AV, Jones M. Pro/Con debate: Is occupational asthma induced by isocyanates an immunoglobulin E-mediated disease? *Clin. Exp. Allergy*, 2010; 40:1155-1162.
19. Wisniewski AV, Stowe MH, Cartier A, et al. Isocyanate vapor-induced antigenicity of human albumin. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113(6):1178-1184.
20. Palikhe NS, Kim JH, Park HS. Biomarkers predicting isocyanate-induced asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2011; 3(1):21-26.
21. Lodovici M, Bigagli E. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol*. 2011;2011:487074. doi:10.1155/2011/487074.
22. Hannu T, Riihimäki V, Piirilä P. Reactive airway dysfunction syndrome (RADS) in a chemistry teacher induced by fumes of mixed iodine compounds. *Ind Health*, 2009; 47(6):681-684.