

Słowa kluczowe: cytokiny, płuca, zarodniki grzybów, WWA

Anna CZARNY*, Ewa ZACZYŃSKA*, Anna JANICKA**, Urszula NAWROT***,
Katarzyna Włodarska***, Włodzimierz SZCZEPANIAK**,
Wojciech WALKOWIAK****

PRODUKCJA CYTOKIN PRZEZ LUDZKIE KOMÓRKI PŁUC TRAKTOWANE ZANIECZYSZCZENIAMI POWIETRZA I ZARODNIKAMI GRZYBÓW, *in vitro*

Szkodliwe działanie zanieczyszczeń powietrza może ułatwiać infekcje płuc, wirusowe, bakteryjne oraz grzybicze, szczególnie trudne do wyleczenia. Zakażeniom towarzyszy powstawanie licznych czynników reakcji zapalnej, odgrywających istotną rolę w zwalczaniu infekcji. Nabłonkopodobne ludzkie komórki płuc linii A549 preinkubowano 24 godz. z 10 ul/ml WWA (z gazów spalinowych silnika obciążonego), a następnie traktowano zarodnikami *Aspergillus fumigatus* lub *Alternaria sp.* Po 24 godzinnej inkubacji, w nadsączach z nad komórek określano poziom IL-6, IL-8 oraz IL-12 stosując test immunoenzymatyczny-ELISA. Synteza IL-6 (8 pg/ml, $p < 0,13$); IL-8 (772 pg/ml $p < 0,8$) w komórkach traktowanych WWA była wyższa w porównaniu do kontroli, statystycznie znamiennej wyższy poziom stwierdzono tylko w przypadku IL-12 (9,2 pg/ml, $p < 0,01$). Komórki stymulowane tylko zarodnikami grzybów produkowały większe ilości tych cytokin: IL-6 (13,8 pg/ml, $p < 0,006$); IL-8 (899 pg/ml, $p < 0,001$), IL-12 (18,3 pg/ml, $p < 0,0008$). Komórki preinkubowane z WWA i traktowane zarodnikami grzybów produkowały znacznie mniej IL-6 i IL-12, poziom ten był zbliżony do poziomu obserwowanego w przypadku komórek kontrolnych. W przypadku IL-8 obserwowano nieznaczny wpływ WWA na produkcję tej cytokiny.

1. WSTĘP

Układ oddechowy narażony jest na działanie nie tylko substancji chemicznych, ale także na wpływ różnych mikroorganizmów znajdujących się w powietrzu, Komórki nabłonkowe odgrywają zasadniczą rolę w zabezpieczeniu różnych tkanek gospodarza przed wpływem szkodliwych substancji oraz mikroorganizmów.

* Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław

** Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska, Wrocław

*** Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej, Wrocław

**** Zakład Pojazdów Samochodowych i Silników Spalinowych, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Długotrwała ekspozycja układu oddechowego na działanie związków chemicznych znajdujących się w powietrzu lub składników mikroorganizmów wyzwała reakcję zapalną, która może wpływać na rozwój chorób płuc(nowotwory, astmę i różnego rodzaju alergię) czy układu krążenia i powodować zniszczenie tkanek [8,10]. Szkodliwe działanie zanieczyszczeń powietrza na układ oddechowy może ułatwiać infekcje, wirusowe, bakteryjne, oraz grzybicze, szczególnie trudne do wyleczenia. Nabłonek układu oddechowego stanowi dużą powierzchnię będącą w stałym kontakcie ze środowiskiem zewnętrznym.

Dysfunkcja układu oddechowego wywołana zanieczyszczeniami powietrza stanowi ryzyko poważnych infekcji płuc. Infekcjom towarzyszy powstawanie licznych mediatorów reakcji zapalnej, które pomagają w szybkiej likwidacji infekcji. Wiedza na temat równoczesnego działania WWA i zarodników grzybów na komórki nabłonkowe płuc jest ograniczona. Wyniki badań prowadzonych na materiale ludzkim i zwierzęcym dostarczają danych, wskazujących na znaczenie TNF- α w ochronie organizmu gospodarza przed infekcjami grzybami [3]. Płuca są narażone na zakażenia takimi grzybami, jak *Aspergillus* i *Alternaria*. Infekcje te najczęściej występują u ludzi z obniżoną odpornością, do zakażeń dochodzi przez wdychanie zarodników grzybów, które dostają się do głębszych warstw tkanki płucnej. Równowaga poziomu cytokin pro i przeciwzapalnych zabezpiecza organizm przed zakażeniami, natomiast konsekwencją rozregulowania systemu immunologicznego mogą być infekcje. Cytokiny prozapalne w odpowiednich ilościach zabezpieczają komórki przed drobnoustrojami [9,11]. Badania epidemiologiczne dostarczają głównie danych wskazujących na znaczenie WWA w indukcji cytokin związanych głównie z alergią [2]. Mniej natomiast jest informacji dotyczących wpływu węglowodorów aromatycznych, pochodzących ze spalin samochodowych, na reakcje komórek płuc wywołane czynnikami infekcyjnymi.

Celem naszych badań było określenie, w jakim stopniu WWA oraz zarodniki grzybów *Aspergillus fumigatus* i *Alternaria sp.* wpływają na syntezę mediatorów procesu zapalnego, takich jak : IL-6, IL-8 oraz IL-12 w ludzkich komórkach płuc A549, *in vitro*.

2. MATERIAŁY I METODY

Pobór próbek spalin. Do badań wykorzystano silnik doświadczalny VW1,9. Silnik pracował z obciążeniem 30Nm..Zestaw do poboru prób gazów spalinowych składał się z sorbentu (rurki z węglem aktywnym typu SKC-lot 120) oraz filtra z włókna szklanego (Staplex TF AGF 810) Pobór odbywał się dwustopniowo.

Ekstrakcja WWA. Ekstrakcja WWA zaadsorbowanych na węglu aktywnym odbywała się za pomocą chlorku metylenu w łaźni ultradźwiękowej. W celu oczyszczenia ekstraktu z substancji przeszkadzających zastosowano metodę SPE – technikę ekstrakcji do fazy stałej (Solid Phase Extraction).

Skład WWA. Analizę chromatograficzną prowadzono na chromatografie gazowym Hewlett-Packard 5890, z detektorem płomieniowo jonizacyjnym, umożliwiającym ilościowe i jakościowe oznaczanie zaadsorbowanych WWA. Chromatograf zawierał kolumnę kapilarną HP-5 (30 m, 0,53 mm).

Uzyskiwanie zarodników grzybów. Grzyby *Aspergillus fumigatus* lub *Alternaria sp.* hodowano na podłożu stałym Sabouraud. w temperaturze 28 C. Do stymulacji komórek A₅₄₉ przygotowywano zawiesinę zarodników o gęstości 10³/ml.

Indukcja cytokin. Na jednowarstwową hodowlę komórek A₅₄₉ o gęstości 1x10⁶ komórek/ml, наносzono 10 µl nietoksycznego roztworu WWA i inkubowano 24 godziny, następnie dodawano zawiesinę zarodników grzybów. Mieszaninę inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, w wilgotnej atmosferze z dodatkiem 5% CO₂. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w płynie hodowlanym, komórki traktowane tylko mieszaniną WWA lub tylko zarodnikami.

Oznaczanie aktywności cytokin. Poziom cytokin w nadsączu znad komórek określano metodą ELISA zgodnie z procedurą dołączoną do poszczególnych zestawów Firmy Pharmigen, USA.

Analiza statystyczna. Wyniki analizowano przy użyciu testu t-studenta, wartości p<0,05 przyjęto jako statystycznie istotne.

3. WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono skład oraz ilości poszczególnych WWA znajdujących się w ekstraktach spalin silnika doświadczalnego. Analiza chemiczna wykazała, że ekstrakty spalin zawierały najwięcej fenantrenu-51% i fluorantenu-30%.

Tab. 1. Zawartość poszczególnych WWA w próbkach spalin

Obciążenie	C _{sr} [µg/dm ³] 30 [Nm]
Naftalen	n.w.*
Acenaftylen	0,00518
Acenaften	0,00534
Fluoren	0,00975
Fenantren	0,05432
Antracen	n.w.*
Fluoranten	0,03222
Piren	n.w.*
SUMA	0,10680

* n.w. – nie wykryto

Taką mieszaniną działano na komórki, a następnie zarodnikami grzybów. Mieszanina WWA stymulowała komórki do nieco większej produkcji IL-6 (8 pg/ml), jednak ta ilość była statystycznie nieistotna, p<0,13. Zarodniki grzybów stymulowały produkcję IL-6 w sposób znamieny statystycznie w porównaniu do komórek

kontrolnych (6,7 pg/ml). Zarodniki *Alternaria sp* indukowały najwyższy poziom IL-6 17,11pg/ml ($p<0,0005$), a zarodniki *Aspergillus fumigatus* 13,8 pg/ml ($p<0,0006$). Synteza IL-6 przez komórki traktowane WWA i zarodnikami była wyraźnie niższa, niewiele różniła się od poziomu tej cytokiny produkowanej przez komórki inkubowane tylko z WWA, i w porównaniu do komórek kontrolnych różnica nie była znamienna. I tak komórki traktowane WWA i zarodnikami *Alternaria sp*. wytwarzały 8,4 pg/ml ($p<0,06$) IL-6, a komórki inkubowane z WWA i zarodnikami *Aspergillus fumigatus* produkowały 7,7 pg/ml ($p<0,15$). Kolejnym etapem było zbadanie na ile WWA mogą zmieniać poziom IL-8, bardzo ważnej chemokiny w reakcjach zapalnych i procesach obronnych gospodarza przed infekcjami. Mieszanina WWA nie miała wpływu na produkcję IL-8 (772pg/ml) w porównaniu do komórek kontrolnych (771,5 pg/ml). Zarodniki grzybów podobnie jak w przypadku IL-6 stymulowały komórki A549 do syntezy większych ilości IL-8. Najwyższy poziom IL-8 (899pg/ml, $p<0,001$) obserwowano w przypadku komórek inkubowanych 24 godziny w obecności zarodników *Alternaria sp*. Komórki traktowane zarodnikami *Aspergillus fumigatus* produkowały nieco mniejsze ilości tej cytokiny (869 pg/ml, $p<0,048$). Poziom IL-8 w nadsączach znad komórek traktowanych WWA oraz zarodnikami grzybów niewiele różnił się od poziomu tej cytokiny produkowanej przez komórki traktowane tylko zarodnikami (WWA +*Alternaria sp*. 873pg/ml, WWA + *Aspergillus fumigatus* 867 pg/ml). Inną cytokiną ważną w ochronie organizmu przed infekcjami, jest IL-12, dlatego zbadano jaki wpływ wywiera mieszanina WWA i zarodników grzybów, na syntezę tego białka w komórkach A₅₄₉. Poziom IL-12 osiągał najwyższe wartości po stymulacji komórek zarodnikami grzybów *Alternaria sp*. i wynosił 37,3 pg/ml, w porównaniu do kontroli (5,9 pg/ml ($p<0,0006$). Zarodniki *Aspergillus fumigatus* również stymulowały komórki do produkcji znacząco większych ilości tej cytokiny (32,45 pg/ml, $p<0,003$). Komórki traktowane WWA produkowały również wyższy poziom IL-12 (9,23 pg/ml). Komórki poddane działaniu WWA, a następnie zarodników produkowały znacznie mniej IL-12, podobnie jak komórki stymulowane tylko WWA (WWA i zarodniki *Alternaria sp*. 11 pg/ml, $p<0,024$ w porównaniu do kontroli); WWA z zarodnikami *Aspergillus fumigatus* 9,8 pg/ml, $p<0,015$). Ilości te były jednak znacząco większe niż w próbkach kontrolnych.

4. Dyskusja

Nabłonek układu oddechowego stanowi barierę między środowiskiem zewnętrznym a tkanką płucną. Duża powierzchnia nabłonka ma stały kontakt ze środowiskiem zewnętrznym, w którym znajduje się wiele mikroorganizmów i substancji toksycznych [5]. Fragmenty lub zarodniki grzybów znajdujące się w powietrzu są przyczyną licznych schorzeń płuc głównie u alergików, u osób z obniżoną odpornością, lub dołączają do istniejących już chorób płuc [14]. Komórki nabłonkowe wykształciły szereg mechanizmów chroniących je przed szkodliwym wpływem zanieczyszczeń znajdujących się w powietrzu [4,12]. Jednym z nich jest

produkcja cytokin. Cytokiny prozapalne w odpowiednich ilościach biorą udział w procesie zwalczania infekcji. Interleukina-6 jest cytokiną plejotropową, wykazującą różnorodne działania biologiczne. Odgrywa ona istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, procesie zapalnym i hematopoezie. Zmiany w regulacji syntezy IL-6 są przyczyną wielu chorób [6,7]. Wykazana przez nas znacznie mniejsza produkcja IL-6 przez komórki traktowane WWA może być jednym z elementów rozwoju i utrzymywania się infekcji oraz nieskutecznego zwalczania grzybiczych zakażeń układu oddechowego. Inną cytokiną odgrywającą ważną rolę w procesach zapalnych jest IL-8. Jest czynnikiem chemotaktycznym odpowiedzialnym za aktywację i migrację leukocytów, szczególnie neutrofilów do miejsca zakażenia w celu szybkiej likwidacji patogenów. Obniżony poziom tej chemokiny może prowadzić do przedłużających się infekcji. Z uzyskanych przez nas danych wynika, że zarodniki grzybów stymulowały komórki do produkcji zwiększonej ilości tej cytokiny, ale WWA nie miały większego wpływu na syntezę IL-8 zarówno w komórkach kontrolnych jak i traktowanych zarodnikami, gdzie bardzo nieznacznie obniżały poziom tego białka. Inni autorzy wykazali wzrost poziomu IL-8 w bazofilach traktowanych węglowodorami aromatycznymi izolowanymi ze spalin samochodowych [4,3]. Należy przypuszczać, że różnica w indukcji IL-8 zależy od składu mieszaniny WWA. Mieszanina uzyskana przez nas zawierała najwięcej fenantrenu (51%). Z reakcją obronną gospodarza przed infekcjami związana jest interleukina-12, która pełni szereg funkcji i jest ważnym czynnikiem biorącym udział w ochronie przed zakażeniami grzybiczymi. IL-12 ma rolę regulacyjną i łączy niespecyficzną, naturalną odpornością z odpornością swoistą [15]. W naszych badaniach wyraźnie widać, że zarodniki *Aspergillus* i *Alternaria* wywierały stymulujący wpływ na syntezę IL-12 przez komórki A549, *in vitro*. Jednak w komórkach preinkubowanych z WWA i zarodnikami ta synteza ulegała obniżeniu, nie różniła się znacząco od ilości cytokiny w komórkach inkubowanych tylko z WWA. Yang i współ. wykazali, że substancje zawarte w spalinach obniżały syntezę cytokin prozapalnych w makrofagach płucnych szczurów [16]. Również dane uzyskane przez Amakawa i wsp, przemawiają za hamującym wpływem związków znajdujących się w spalinach, na produkcję IL-6 IL-8 czy TNF przez makrofagi płucne myszy stymulowane LPS [1]. Z naszych badań wynika, że WWA wpływają na zmianę syntezy cytokin w komórkach nabłonkowych. Zmiany ekspresji cytokin mogą wynikać z zaburzenia szlaków sygnałowych. Działanie tych węglowodorów na komórki również może prowadzić do stymulacji wielu receptorów, co w konsekwencji zwiększa niebezpieczeństwo infekcji. Pełne zrozumienie reakcji obronnych i procesów zapalnych zachodzących w komórkach nabłonkowych układu oddechowego, pozwoli na opracowanie nowych leków i wprowadzenie efektywnej strategii terapeutycznej w schorzeniach płuc.

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grant
nr N 40405832/1669

LITERATURA

- [1] Amakawa K., Terashima T., Matsuzaki T., Matsumaru A., Sagai M., Yamaguchi K. 2003. Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res.*, 29:149-164.
- [2] Bommel H., Li-Weber M, Serfling E., Duschl A. 2000. The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105:796–802. Filler S.G., Yeaman M.R, Sheppard D.C. 2005. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis.*, 41(suppl 3): 208–S212.
- [3] Hippenstiel S., Opitz B., Schmeck B., Suttorp N. 2006. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia-molecular mechanisms of pathogen recognition. *Respir Res.*, 8: 97-11.
- [4] Knight D. A., Holgate S. T. 2003. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 8: 432-44
- [5] Kishimoto T. 2005 Interleukin-6: from basic science to medicine - 40 years in immunology. *Annu. Rev. Immunol.*, 23:1–21.
- [6] Kishimoto T. 2006. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.*, 8 (suppl): 2:2-3.
- [7] Mouton C.P. 2008. Environmental influences on cardiovascular health. 100: 98-102.
- [8] Phadke A.P, Mehrad B. 2005. Cytokines in host defense against *Aspergillus*: Recent advances. *Med. Mycol.*, 43 (suppl 1): 173–176.
- [9] Riedl M. 2008. The effect of air pollution on asthma and allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.*, 8: 139-146.
- [10] Romani L., Puccetti P. 2007. Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Exprt Rev. Anti. Infect. Ther.*, 5: 1007-1017.
- [11] Schleimer R., Kato A., Kern R., Kuperman D., Avila P.C. 2007. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol.*, 120: 1279-1284.
- [12] Schober W., Lubitz S., Belloni B., Gebauer G., Lintelmann J., Matuschek G., Weichenmeier I., Eberlein-König B., Buters J., Behrendt H. 2007. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance allergic inflammation by acting on human basophils. *Inhal Toxicol.*, 19 (suppl) 1:151-156.
- [13] Shah A. 2008. *Aspergillus*-associated hypersensitivity respiratory disorders. *Indian J Chest Dis Allied Sci.*, 50: 117-128.
- [14] Trinchieri G. 1998. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol.*, 16: 365-396.
- [15] Yang H.M., Barger MW., Castranova V., Ma J.K., Yang J.J., Ma J.Y. 1999. Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J Toxicol Environ Health A.*, 58: 261-268.

PRODUCTION OF CYTOKINES BY HUMAN LUNG CELLS TREATED WITH AIR POLLUTION AND FUNGAL SPORES, *in vitro*

Air pollution influence on difficult to cure of viral, bacterial or fungal pulmonary infections. After infection the cells produced of different agents, that are responsible for inflammatory responses and eradication of microorganisms. In our experiments we preincubated human epithelial cells A549 for 24 hrs with 10 ul/ml of PAHs, subsequently the cells were treated with *Aspergillus fumigatus* or *Alternaria sp.* spores. The levels of IL6, IL-8 and IL12 in supernatants were quantified using ELISA tests. The IL-6 (8 pg/ml, $p < 0,13$) or IL-8 (772 pg/ml $p < 0,8$) production in cells incubated with PAHs was higher than in control cells, but not statistic significant. The level of IL-12 was significant higher (9,2 pg/ml, $p < 0,01$). The highest levels of cytokines were observed when cells were treated with fungal spores, IL-6 (13,8 pg/ml, $p < 0,006$); IL-8 (899 pg/ml, $p < 0,001$), IL-12 (18,3 pg/ml, $p < 0,0008$). Production of IL-6 and IL-12 was significantly diminished, when cells were preincubated with PAHs and treated with spores. The PAHs were insignificant effect on IL-8 production.