

Slutredovisning av projektet:

Effekten av svindammsexponering, med speciellt fokus på bakterieprodukter, hos friska svinskötare och försökspersoner

Projektledare Lena Palmberg, Enheten för Lung- och Allergiforskning, Institutet för Miljömedicin, Karolinska Institutet

Dnr SLF: 198/03

Projektnr: 0335015

Följande personer vid Enheten för Lung- och allergiforskning, vid IMM, Karolinska Institutet har deltagit vid genomförandet och bearbetningen av denna studie: Fernando Acevedo, Alexandra Ek, Kjell Larsson, Marianne Olsson, Lena Palmberg, Karin Sahlander, Ida von Scheele, Karin Strandberg, Britt-Marie Sundblad.

Vi tackar även Uppig gård för att vi fått tillgång till deras svinstallar.

Bakgrund

Det är sedan länge känt att svinbönder har en ökad förekomst av luftvägsbesvär, främst kronisk bronkit, men även astma förekommer i ökad omfattning. Vi har i tidigare studier visat att friska, tidigare oexponerade försökspersoner, som deltagit i arbetet med att väga grisar under tre timmar, utvecklar en akut inflammation i luftvägarna (1-3). Denna inflammatoriska reaktion manifesteras genom en kraftig invandring av inflammatoriska celler till de övre och nedre luftvägarna och till blodet. Frisättningen av olika inflammatoriska mediatorer (cytokiner) ökar också i luftvägarna och i blodet. Influensaliknande symtom såsom feber, huvud- och muskelvärk förekommer också hos försökspersonerna. En ökad känslighet i luftvägarna (bronkiell hyperreaktivitet) uppmätt med metakolinprovokation påvisas hos samtliga försökspersoner.

I en tidigare studie jämfördes effekten av en 3 timmars exponering vid vägning av grisar hos en grupp med friska försökspersoner med en grupp friska svinbönder (4). Denna studie visade att de tidigare oexponerade försökspersonerna reagerade med ett kraftigare inflammatoriskt svar än de kroniskt exponerade svinskötarna. Svinskötarna uppvisade ingen ökning av IL-6 halten i blod och inte heller ökad bronkiell reaktivitet efter exponeringen, vilket de friska försökspersonerna gjorde. Däremot antalet monocyter i blod ökade mer hos svinskötare än hos de friska försökspersonerna. Detta sammantaget skulle kunna bero på en toleransutveckling hos svinskötarna. I det långa loppet leder dock yrkesexponeringen till en ökad sjuklighet i luftvägarna. Specificiteten i denna tolerans är okänd och det är oklart om det föreligger korsreaktivitet för denna toleransutveckling. Man kan tänka sig att kontinuerlig exponering för organiskt material av olika ursprung ger en generell tolerans mot organiskt damm (yrkesmiljöer, tobksrök, etc)

I kroppens försvar mot mikroorganismer spelar ”Toll-like” receptorer (TLR) en stor roll (5-6). Man har identifierat 10 olika typer med gemensamma signalvägar. Den bäst karakteriserade är TLR4 som binder till LPS. LPS ingår i endotoxin som utgör en del av cellväggen hos gramnegativa bakterier. LPS kan genom att binda till LBP (LPS-binding protein) bilda ett komplex och binda till CD14 på exempelvis monocyter. Man har funnit att TLR4 är nödvändig för LPS-svaret. TLR2 binder lipoproteiner, grampositiva bakterier och mykobakterier. På senare år har mycket fokus lagts på effekten av stimulering av den icke-förvärvade immuniteten (innate immunity), som i stor utsträckning regleras av dessa Toll-

receptorer och dess roll vid allergiutveckling (7). Hygienhypotesen innebär att tidig exponering i livet för endotoxin ger en skyddande effekt mot utveckling av allergi. Exponering för höga endotoxinnivåer tidigt i livet kan motverka allergensensibilisering hos barn och förhöjda halter endotoxin korrelerar med ökad andel IFN- γ -producerande T-celler, som i sin tur hämmar produktionen av TH2 cytokiner (ökad utsöndring vid allergi) hos barnen (8-9). Däremot ger samexponering för allergen och endotoxin en förstärkning av symtom hos redan allergiska och/eller astmatiska individer (10). LPS-stimulering inducerar IL-12 syntes, som i sin tur kraftigt stimulerar immunsvaret av TH1-typ. Reaktionen på svinhusexponeringen i vår modell uppvisar kraftig ökning av IL-8, IFN γ , och IL-12. Studier på isolerade blodmonocyter har påvisat att IL-6 ger en uppreglering av TLR4 receptorer (8). Vi har i tidigare visat att friska svinskötare uppvisar tecken på tolerans vad gäller stor del av det inflammatoriska svaret bland annat gällande IL-6 svaret i blod, trots signifikant fler monocyter (en viktig celltyp vid det icke-förvärvade immuniteten) i blod jämfört med friska försökspersoner. Vi önskar därför ytterligare studera denna toleransutveckling och belysa betydelsen av Toll-receptorer i detta sammanhang. I många studier har man relaterat uppkomna fynd till endotoxinexponering, som inducerar luftvägsinflammation. Senare studier har dock visat att endotoxin uppvisar god korrelation med andra mikrobiella komponenter, varför endotoxin kanske snarare ska betraktas som en markör för exponering av dessa olika mikrobiella komponenter. Vi avser därför att studera TLR2, TLR4 och CD14, vilka alla är receptorer för de olika mikroorganismer och mikrobiella komponenter som förekommer i svindamm.

Undersökningens syfte

Projektet syftar till att ytterligare beskriva den inflammatoriska reaktionen vid exponering i svinstallar. Nytt i denna studie är analys sputum, som speglar den bronkiella delen av luftvägarna. Vidare jämförs reaktionen efter exponering i svinhus med reaktionen efter inhalation av rent LPS. Vi avser att kartlägga adaptationsmekanismer hos kroniskt exponerade svinskötare och beskriva en eventuell korsreaktivitet för toleransutveckling mot annat organiskt material (endotoxinexponering hos rökare). Särskilt fokus läggs på uttryck av Toll-receptorerna som är viktiga i kroppens försvar mot mikroorganismer, som är vanligt förekommande i svinhusmiljöer.

Material och metoder

Denna studie utgör ett delprojekt i ett större projekt som delvis finansierats av Hjärt-Lungfonden. I denna rapport ingår resultat från hela studien för att ge en helhetsbild. Studien består av 2 delar, dels en *in vivo*-del och dels en *ex vivo*-del. I *in vivo*-delen ingår 3 försöksgrupper bestående av 12 friska icke-rökande försökspersoner (10 män, 2 kvinnor) medelålder 33 år (spridning 25-54 år), 11 friska icke-rökande svinskötare (10 män, 1 kvinna) medelålder 41 (spridning 22-61 år) och 12 friska rökare (11 män, 2 kvinnor) medelålder 41 (spridning 25-54 år). Samtliga var utan allergiska besvär (negativa i pricktestundersökning). Försökspersonerna exponerades för LPS (komponent i gramnegativa bakterier) genom inhalation av en stamlösning framställd av *Escherichia coli* serotype 0111:B4 (Sigma) löst i steril fysiologisk koksaltlösning till en koncentration av 1.25 mg/ml, vilken tillverkades inför varje exponeringstillfälle. Lösningen administrerades via en inhalationsdosimeter (SPIRA®Elektro 2, Hameenlinna, Finland) där försökspersonerna andades in 6 andetag, vilket motsvarar en exponeringsdos på 53.4 μ g LPS. Vidare exponerades försökspersonerna i svinhus varvid försökspersonerna fick vistas 3 timmar i ett svinstall dimensionerat för ca 300 grisar under det att en svinskötare vägde grisar. Ingen av rökarna eller kontrollförsökspersonerna var/hade varit verksamma inom lantbruksnäringen. Två till sex

personer exponerades per tillfälle antingen för LPS eller svindamm i en randomiserad turordning. Cirka två veckor före den första exponeringsdagen och 7 timmar efter exponeringsstarten vid de båda exponeringarna genomgick försökspersonerna undersökning av lungfunktion, mätning av bronkiell reaktivitet (metakolinprovokation), nässköljning (nasalt lavage, NAL; enbart före och efter svinexponering), samt blodprovstagning. Blodet togs i EDTA-rör, varvid blodet inkuberades med fluorescerande antikroppar, röda blodkropparna lyserades varefter analyser gjordes i en flödescytometer. En sk femparts-differentialräkning företogs för att se på fördelningen och absoluttalen av de olika vita blodkropparna. Vidare studerades TLR2, TLR4 och CD14 uttryck på monocytterna. Likaså studerades den procentuella andelen av IL-2, IL-4, IL-13 och IFN γ producerande T-hjälparceller av den totala populationen T-hjälparceller. Som ett ytterligare mått på inflammation, gjordes analys av kväveoxidhalten (NO) i utandningsluft. Vidare utfördes inducerat sputum, varvid försökspersonerna provocerades med stigande koncentration (0.9, 3, 4, 5 %) av koksaltlösning för att kunna producera upphostningar härrörande från de nedre luftvägarna. Sköjljväska från näsan, sputum och blod analyserades med avseende på innehåll av inflammatoriska celler samt olika inflammatoriska cytokiner, såsom interlekin-6 (IL-6) och IL-8 (ej i blod). Omedelbart före och efter exponeringen mättes PEF (Peak Expiratory Flow) och kroppstemperatur. PEF mättes vid upprepade tillfällen upp till 5 timmar efter exponeringen. Symtom registrerades vid 3 tillfällen med hjälp av ett frågeformulär, före, efter 4 timmar och efter 7 timmar. Symtom som efterfrågades var frysningar, huvudvärk, matthet/trötthet, muskelvärk samt illamående liksom 7 luftvägsspecifika frågor. Symtomen skattades enligt en visuell analog skala (VAS) graderad från 0 till 100 mm. Exponeringsnivåer mättes med personburen utrustning. Provtagare för både inandningsbart damm samt respirabelt damm användes. Efter vägning av filter extraherades dammet och endotoxinkoncentrationen analyserades. I *ex vivo*-delen inkuberades helblod, framrenade neutrofiler och framrenade monocyter i 2 timmar med medium, LPS eller svindamm i stigande koncentrationer (10, 100 och 200 $\mu\text{g/ml}$). I flödescytometern studerades TLR2, TLR4 och CD14 uttryck på monocyter och neutrofiler.

Statistik

Resultaten presenteras som medianvärde (25:e – 75:e percentilen), förutom lungfunktion och kroppstemperatur som presenteras som medelvärde \pm SD. Jämförelser gjordes med variansanalys (ANOVA) och Student's t-test för parade observationer (lungfunktion och bloddata). Jämförelser mellan de olika exponeringstillfällena testades med Friedman test, följt av Wilcoxon's signed rank test. För att utröna om statistisk skillnad mellan grupperna analyserades med Kruskal Wallis följt av Mann-Whitney U test. Korrelationer analyserades med Spearman rank korrelations test. Ett p-värde $< 0,05$ ansågs vara signifikant.

Resultat

Skillnader i basala värden

Bönder hade signifikant högre halter NO i utandningsluft ($p=0.001$) och rökare signifikant lägre halter ($p=0.04$) jämfört med kontroller.

Basala lungfunktionsvärden var normala hos samtliga försökspersoner före exponeringen. Vitalkapaciteten var 96% av förväntat värde hos kontrollerna, 92% hos rökarna och 88% hos svinskötarna. Motsvarande siffror för FEV1 var 102%, 94% och 92% (tabell 1)

Bönder ($p=0.047$) och rökare ($p=0.0014$) hade signifikant fler neutrofiler i sputum jämfört med kontroller. Även IL-8 halten var signifikant högre hos bönder ($p=0.0068$) och både IL-6

halten ($p=0.0056$) och IL-8 halten ($p=0.015$) var signifikant högre hos rökare basalt i sputum jämfört med de friska kontrollpersonerna.

Även i blod förelåg det signifikanta skillnader basalt där både bönder ($p=0.019$) och rökare ($p=0.0021$) uppvisade fler neutrofiler (fig 1A) och rökare även signifikant fler monocyter (fig 1B) ($p=0.0007$) jämfört med kontrollförsökspersoner. Bönder uttryckte lägre halter TLR2 på blodmonocyter (fig 1D) jämfört med både kontroller ($p=0.0026$) och rökare ($p=0.038$). Såväl bönder ($p=0.033$) som rökare ($p=0.041$) hade större andel T-hjälparceller som uttryckte intracellulär halt av IL-13 (fig 1C).

Före exponering förelåg en signifikant korrelation mellan antalet neutrofiler i sputum och blod ($p=0.0038$), samt antalet neutrofiler och halten IL-8 signifikant ($p=0.0019$) i sputum. TLR2-uttryck korrelerade negativt ($p=0.05$) med ett kumulativt exponeringsmått för bönderna (antalet timmars exponering per dag multiplicerat med antalet grisar på gården).

Efter exponeringarna

Symtom

Efter LPS-provokation ökade symtom som huvudvärk ($p=0.007$) och matthet ($p=0.006$) hos alla försökspersoner, men det förelåg ingen skillnad mellan grupperna. Frysningar, nässektion, hosta och trånghetskänsla över bröstet ökade signifikant i kontrollgruppen efter svindammsexponeringen. Hosta ökade signifikant hos rökare och trånghetskänsla över bröstet hos svinbönder. Vid jämförelse mellan grupperna uppvisade kontrollgruppen signifikant mer illamående jämfört med bönderna ($p=0.04$) och hosta ökade signifikant mer hos både kontrollgruppen och rökare jämfört med svinbönderna ($p=0.04$ och $p=0.002$).

Lungfunktion och bronkiell reaktivitet

Sju timmar efter LPS-provokation sjönk lungfunktionsparametrarna (VC och FEV₁) signifikant ($p=0.008$ och $p=0.02$) hos kontrollpersonerna, men inte i de andra grupperna (tabell 1). Efter svinexponeringen sjönk VC i alla 3 grupperna (kontroller $p=0.004$, rökare $p=0.02$ och svinskötare $p=0.01$) och FEV₁ hos kontrollerna ($p<0.0001$) och svinskötare ($p=0.02$). Det var ingen signifikant skillnad mellan grupperna vad gäller lungfunktionsparametrarna, varken efter LPS-exponering eller svindammsexponering.

Den bronkiella reaktiviteten mot metakolin efter LPS-inhalation ökade med 0.9 dubblingssteg hos kontrollerna, 0.7 steg hos rökarna och 0.9 steg hos svinskötarna (fig 2). Det var ingen signifikant skillnad mellan grupperna. Efter svindammsexponeringen ökade kontrollpersonerna med 3.5 dubblingssteg, vilket var signifikant mer än rökarna som ökade 1.5 steg ($p=0.001$) och svinskötarna som ökade 1.3 steg ($p<0.001$).

Kväveoxid (NO) i utandningsluften

LPS-exponeringen påverkade inte NO-värdena i utandningsluft i någon av grupperna. Efter svindammsexponering ökade NO i utandningsluft signifikant hos både kontroller (från 11.0 (8.0-16.2) ppb till 18.8 (16.0-21.6) ppb) och rökare (från 7.2 (5.3-10.4) ppb till 15.3 (10.7-21.1) ppb), till skillnad från svinskötare som inte ökade (från 17.9 (11.1-22.2) ppb till 16.0 (11.2-24.2) ppb). Både kontroller ($p=0.003$) och rökare ($p=0.02$) ökade signifikant mer än svinskötare. Det förelåg en signifikant negativ korrelation mellan förändringen i NO i utandningsluft före och efter svindammsexponering och rökhistorik (paketår), ($r=-0.54$, $p=0.05$).

Nässköljning

Alla 3 grupperna ökade signifikant i IL-6 och IL-8 i NAL efter svindammsexponering med undantag för bönder som inte ökade i IL-8 halten (fig 3A). Kontroller ($p=0.0138$) och rökare ($p=0.0097$) ökade signifikant mer i IL-8 jämfört med bönderna. Enbart kontroller och rökare ökade i cellantal efter svindammsexponeringen. Kontroller ökade signifikant mer än bönder ($p=0.0016$) och rökare ($p=0.0433$) i cellantal i NAL efter svindammsexponeringen.

Inducerat sputum

Rökare ökade signifikant mer i cellantal i sputum efter LPS-provokation jämfört med bönderna ($p=0.019$) (fig 3B). Det var ingen skillnad mellan grupperna i cellökningen efter svindammsexponeringen och inte heller i förändringen av antalet neutrofiler varken efter LPS-provokation eller efter svindammsexponering. IL-6 i sputum ökar signifikant mer hos rökare än hos både kontrollpersoner ($p=0.049$) och bönder ($p=0.0024$) och mer i IL-8 i sputum än bönderna efter LPS-inhalation. Bönder ökar signifikant mindre än kontrollpersoner ($p=0.01$) i IL-6 i sputum efter LPS-provokation. Efter svindammsexponeringen ökar friska och rökare signifikant mer i IL-6 och rökare signifikant mer i IL-8 i sputum jämfört med bönder.

Förändringar i perifert blod

Den procentuella andelen T-hjälparceller som uttrycker de intracellulära cytokinerna IFN γ , IL-4 och IL-13 ökade signifikant hos kontrollerna efter båda exponeringarna, med undantag för IFN γ som bara ökade efter LPS-exponering (fig 4A). TLR2-uttrycket på monocyter ökade signifikant mer hos bönder jämfört med kontrollerna.

En signifikant ökning av den totala koncentrationen av neutrofila granulocyter i blod påvisades i alla 3 grupper efter båda typerna av exponering (fig 4B). Det förelåg inga signifikanta skillnader mellan grupperna med undantag för neutrofilökningen efter LPS-inhalation där rökare ökade signifikant mer än både kontroller ($p=0.0026$) och bönder ($p=0.0015$). Även monocytorna ökade signifikant i alla 3 grupperna efter båda exponeringstyperna och signifikant mer hos rökare efter LPS-provokation jämfört med både kontrollpersoner ($p=0.0058$) och bönder ($p=0.0096$).

Exponering – personburen mätutrustning

Halterna inandningsbart damm var i nivå med vad vi uppmätt i tidigare studier (Larsson, 2001) i samma typ av stallmiljö (tabell 2). Däremot uppvisade den respirabla fraktionen något högre halter endotoxin jämfört med tidigare. Vi har dock övergått till att mäta med en kinetisk metod, mot tidigare end-point metod. Denna kinetiska metod är den metod man rekommenderar enligt svensk standard (SS-EN 14031).

Ex vivo-studien

Dos-responskurvorna för LPS och svindamm vid helblodsinkuberingarna uppvisade inga signifikanta skillnader mellan bönder och kontrollpersonerna vad gäller TLR2-, TLR4- och CD14-uttryck på monocyter. Däremot är det bara kontrollpersonerna som ökar sitt TLR2 efter LPS-stimulering och enbart bönderna som minskar sitt TLR2-uttryck efter svindammstimulering. Bönder ligger signifikant högre i CD14-uttrycket i mediumkontrollen jämfört med kontrollernas negativa kontroll. CD14-uttrycket på monocyter ökar signifikant hos både bönder och kontroller efter LPS-stimulering.

Dos-responskurvorna för LPS och svindamm vid helblodsinkuberingarna uppvisade inga signifikanta skillnader mellan bönder och kontrollpersonerna vad gäller TLR2-, TLR4- och CD14-uttryck på neutrofiler. TLR2- och CD14-uttryck efter svindammsstimulering ökar hos både bönder och kontrollpersoner liksom TLR4-uttryck efter både LPS- och svindammsstimulering.

Dos-responskurvorna för LPS och svindamm uppvisade inga signifikanta skillnader mellan bönder och kontrollpersonerna vad gäller TLR2-, TLR4- och CD14-uttryck på framrenade neutrofiler. TLR2-, TLR4- och CD14-uttryck efter svindammsstimulering ökar hos både bönder och kontrollpersoner, men LPS-stimulering hade ingen effekt på TLR4-uttrycket på dessa framrenade neutrofiler.

Dos-responskurvorna för LPS och svindamm vid helblodsinkuberingarna uppvisade inga signifikanta skillnader mellan bönder och kontrollpersonerna vad gäller frisättning av IL-6 och IL-8. IL-6 ökade signifikant i båda grupperna efter svindammsstimulering och IL-8 efter både LPS- och svindammsstimulering.

Diskussion

In vivo studien visar att både rökare och bönder har tecken på en pågående inflammation basalt även om profilerna skiljer sig åt i vissa avseenden. Kväveoxid i utandningsluft ligger lägre hos rökare och högre hos svinskötare basalt jämfört med kontrollpersonerna. Enligt litteraturen är det känt att rökare har lägre halter NO i utandningsluft pga en nedreglering av NO-syntas (12). I denna studie såg vi också att ökningen i NO efter svindammsexponeringen uppvisade en signifikant negativ korrelation med rökarnas ”packyear” (antalet cigarettpaket x antalet rökår), ett vanligt exponeringsmått för rökare. Detta talar för att ju längre och kraftigare exponering för tobaksrök, desto större påverkan på NO-syntesen. En ökad halt NO i utandningsluft ses däremot bland annat hos astmatiker, vilket anses tyda på en pågående inflammation (13). NO är också bakteriostatiskt (14), varför böndernas förhöjda halter kan bero på inhalation av dammet i svinhusen, som uppvisar en riklig förekomst av bakterier. Rökare och bönder uppvisade också ett förhöjt antal neutrofila granulocyter i såväl blod som sputum. Rökare uppvisade också en förhöjning i antalet monocyter i blod. Även inflammatoriska mediatorer som IL-6 och IL-8 hos rökare och IL-8 hos bönder var signifikant förhöjda i sputum. Rökare och bönder har också en högre andel T-hjälparceller som uttrycker intracellulära halter IL-13.

Efter LPS-inhalation reagerade rökarna kraftigast. Cigarettrök innehåller endotoxin (15-16), varför en toleransutveckling hos rökarna mot endotoxinexponering var en av våra arbetshypoteser. Emellertid ökade antalet celler i blod och sputum mer hos rökarna och även i inflammatoriska cytokiner som IL-6 och IL-8 i sputum efter LPS-inhalation jämfört med både kontroller och svinskötare. Rökare uttryckte inte fler antal TLR4 per monocyterna, men det faktum att de hade signifikant fler monocyter före exponeringen gör ju att rökarna kan uppvisa ett kraftigare svar vid LPS-provokation jämfört med kontroller och bönder. Monocyterna är de celler med flest TLR4 och som också har förmåga att bilda IL-6. Bönderna däremot ökade inte lika mycket i IL-6-halt i sputum som de friska kontrollerna, tydande på någon form av adaptation. Det är också enbart kontrollerna som ökar i IFN γ , IL-4 och IL-13 intracellulärt, även om det inte förelåg någon signifikant skillnad mellan grupperna.

Efter exponeringen i svinhus uppvisade svinskötarna en tydlig tolerans med en mindre uttalad inflammatorisk reaktion i luftvägarna. Detta gällde flertalet parametrar, så väl symptom, bronkiell reaktivitet, som celler och inflammatoriska mediatorer i näsan och lungorna. Även

rökarna uppvisade en viss grad av tolerans, men inte i lika många parametrar. Rökarna ökade inte i den bronkiella reaktiviteten och i cellantal i nässköljvätska i samma omfattning som kontrollpersonerna. En bidragande orsak till det minskade cytokinsvaret skulle kunna vara den ökade andelen T-hjälparceller som uttrycker IL-13 basalt. IL-13 är en sk Th2 cytokin som framförallt ökar vid allergiska reaktioner, men det finns också studier som visat en ökad frisättning vid endotoxinprovokation (17). IL-13 hämmar produktionen av proinflammatoriska cytokiner, till exempel IL-6 och de högre halter basalt i blod, skulle kunna förklara den minskade reaktionen när det gäller cytokinfrisättning som bönderna uppvisar. Likaså kan det nedreglerade uttrycket av TLR2 på monocyter förklara det minskade svaret vid svindammsexponering, eftersom TLR2 är en receptor för grampositiva bakterier. Den rikliga förekomsten av grampositiva bakterier i svindammet skulle kunna förklara denna nedreglering. Färre receptorer kan tänkas leda till ett mindre svar, vilket ju är fallet för svinskötarna. Det minskade uttrycket av TLR2 på monocytorna uppvisade en positiv korrelation med exponeringsmättet antalet timmars exponering per dag multiplicerat med antalet grisar. Wang et al har i en *in vitro*-studie redovisat att induktionen av tolerans mot bakteriellt lipoprotein är kopplat till ett nedreglerat uttryck av TLR2 (18). Vidare har Droemann et al påvisat att patienter med kroniskt obstruktiv lungsjukdom (KOL) och rökare uttrycker lägre nivåer av TLR2 på sina alveolära makrofager (19). I denna studie ökade icke-rökarna sitt TLR2-uttryck på de alveolära makrofagerna efter LPS-stimulering vilket inte var fallet hos rökare med och utan KOL. Detta ligger helt i linje med fynden i denna studie, där svinskötarna uttrycker lägre nivåer TLR2 basalt på blodmonocytorna parallellt med en påtaglig tolerans i ett flertal av de registrerade inflammationsparametrarna. Likaså fyndet att enbart blodmonocyter från de friska kontrollerna ökade sitt TLR2-uttryck efter LPS-stimulering.

Svinskötare drabbas av kronisk bronkit, vilket bland annat innebär en ökad risk för bakteriekolonisation och luftvägsinfektioner. TLR deltar i kroppens naturliga försvar mot bakterier och ett minskat uttryck av dessa, skulle kunna vara en förklaring till de ökade luftvägsbesvären hos bönder. Även det kraftiga inflammatoriska svaret hos kontrollpersonerna är ett naturligt svar på den kraftiga exponeringen. Det nedreglerade svar hos bönderna kan vara av ondo och i det långa loppet leda till ökad sjuklighet i luftvägssjukdomar, ett förhållande som visats i ett flertal epidemiologiska studier.

Ett minskat inflammatoriskt svar hos bönderna skulle kunna tala för ”healthy worker effect”, det vill säga att de bönder som tolererar sin arbetsmiljö fortsätter att arbeta och känsliga personer slutar och byter yrke. De tämligen stora skillnaderna mellan bönder och kontrollpersonerna talar dock emot detta. Skillnaden i det inflammatoriska svaret beror sannolikt på den kroniska exponeringen och en adaptation gentemot denna.

Referenslista

1. Larsson K.A., Eklund A.G., Hansson L.-O., Isaksson B.-M., Malmberg P.O. -Swine dust causes intense airways inflammation in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;**150**:973-977.
2. Wang Z., Malmberg P., Larsson P., Larsson B.-M., Larsson K. Time course of interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- increase in serum following inhalation of swine dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;**153**:147-52.
3. Larsson B.-M., Palmberg L., Malmberg P., Larsson K. -Effect of exposure to swine dust on levels of IL-8 in airway lavage fluid. *Thorax* 1997;**52**:638-642.
4. Palmberg L., Larsson B.-M., Malmberg P., Larsson K. -Airway responses of healthy farmers and nonfarmers to exposure in a swine confinement building. *Scand J Work Environ Health* 2002;**28**:256-263.
5. Sabroe I, Parker LC, Wilson AG, Whyte MKB, Dower SK. Toll-like receptors:their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy* 2002;**32**:984-989.
6. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* 2001;**2**:675-680.
7. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *New Eng J Med* 2000;**343**:338-344.

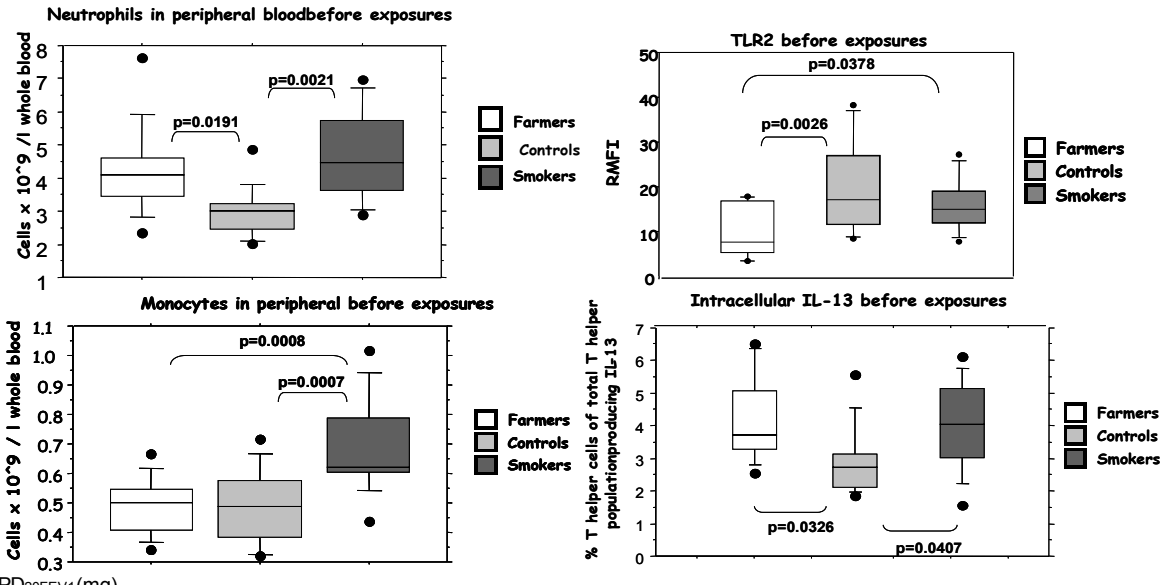
8. Gereda J, Leung D, Thatayatikom A, et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355:1680-3.
9. Liu A, Leung D. Modulating the early allergic response with endotoxin. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1535-9.
10. Eldridge M, Peden D. Airway response to concomitant exposure with endotoxin and allergen in atopic individuals. *J Tox Env Health* 2000; 61:27-37.
11. Tamandl D, Bahrami M, Wessner B, Weigel G, Ploder M, Furst W, Roth E, Boltz-Nitulescu G, Spittler A. Modulation of Toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock* 2003;20:224-229.
12. Kharitonov S, Robbins R, Yates D, Keatings V, Barnes P. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:609-612.
13. Alving K, Weitzberg E, Lundberg J. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993;6:1368-1370.
14. Diamond G, Legarda D, Ryan L. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunological Reviews* 2000;173:27-38
15. Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 1999;115:829-835.
16. Larsson L, Szponar B, Pehrson C. Tobacco smoking increases dramatically air concentrations of endotoxin. *Indoor Air* 2004;14:421-424.
17. Alexis NE, Lay JC, Almond M, Peden DB. Inhalation of low-dose endotoxin favors local TH2 responses and primes airway phagocytes in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1325-1331.
18. Wang JH, Doyle M, Manning BJ, Wu QD, Blankson S, Redmond HP. Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of Toll-like receptor 2 expression. *J Biol Chem* 2002;277:36068-36075
19. Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Research* 2005;6:68

	VC (L)			FEV ₁ (L/s)			FEV ₁ /VC (%)		
	Before	After LPS	After Pig dust	Before	After LPS	After Pig dust	Before	After LPS	After Pig dust
Non-smokers	5.56 4.91-6.22	5.44** 4.82-6.05	5.34** 4.73-5.94	4.64 4.06-5.21	4.53* 3.98-5.08	4.37*** 3.82-4.93	83 80-87	83 80-87	82* 78-86
Smokers	4.96 4.45-5.47	4.87 4.36-5.37	4.74* 4.17-5.31	3.82 3.35-4.29	3.84 3.36-4.32	3.70 3.19-4.21	77 72-82	79* 74-83	78 74-82
Farmers	4.73 4.04-5.43	4.75 3.96-5.54	4.64* 3.95-5.32	3.76 3.13-4.39	3.77 3.10-4.44	3.61* 3.02-4.22	79 75-83	79 75-83	78 74-81

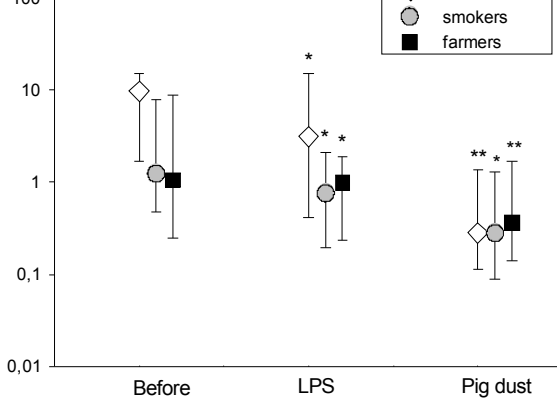
Tabell 1. Lungfunktionsdata, medelvärde (95%CI). Basala värden jämfördes med värden efter LPS och svindammsexponering: *** p < 0.001, ** p < 0.01 and * p < 0.05.

<i>Inandningsbart damm</i>	<i>Inhalerbart damm</i>	<i>Respirabelt damm</i>
Dammhalt (mg/m³)	8.28 (6.2 - 9.72)	0.32 (0.30 - 0.33)
Endotoxin (ng/m³)	62.8 (48.0 - 85.3)	12.9 (2.99 - 26.9)

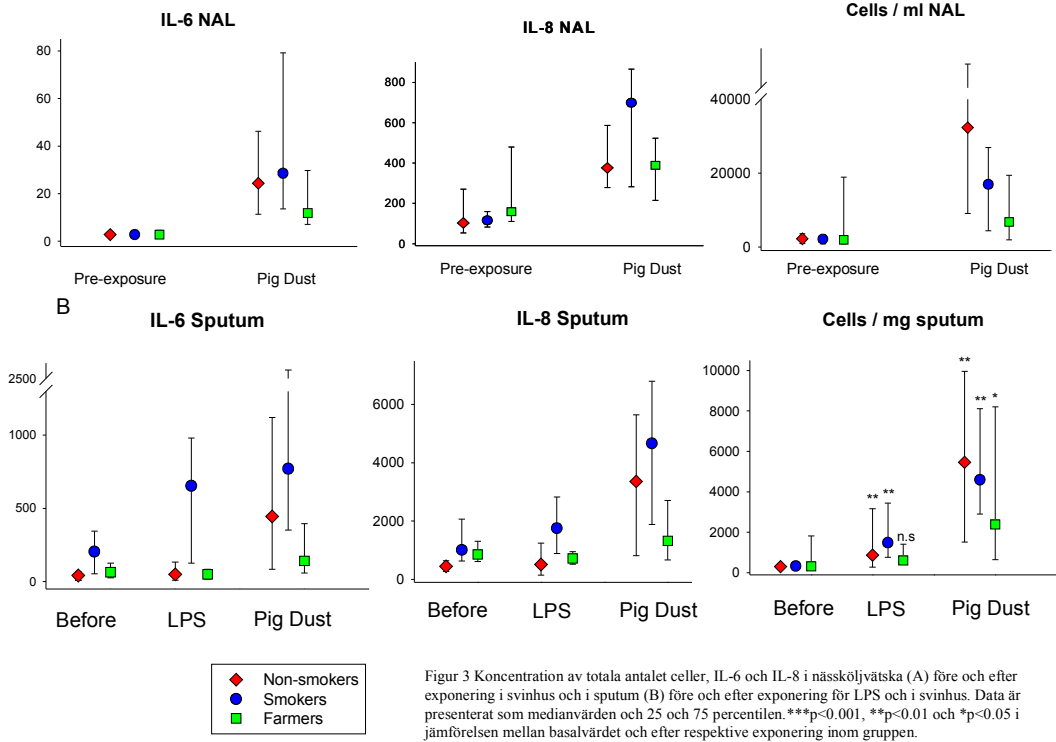
Tabell 2. Exponeringsnivåer uppmätta med IOM-provtagare och cykloner (median, 25:e - 75:e percentilen)



Figur 1 Basala skillnader i antalet neutrofiler (A), monocyter (B), procentuell andel T-hjälparceller positiva för IL-13 intracellulärt (C) och TLR2 uttryck på monocyter (D). Data är presenterat som medianvärde och 25 och 75 percentil.



Figur 2 Bronkiell reaktivitet till metakolin före och efter exponering för LPS och i svinhus.



Figur 3 Koncentration av totala antalet celler, IL-6 och IL-8 i nässköljvätska (A) före och efter exponering i svinhus och i sputum (B) före och efter exponering för LPS och i svinhus. Data är presenterat som medianvärden och 25 och 75 percentil. ***p<0.001, **p<0.01 och *p<0.05 i jämförelsen mellan basalvärdet och efter respektive exponering inom gruppen.

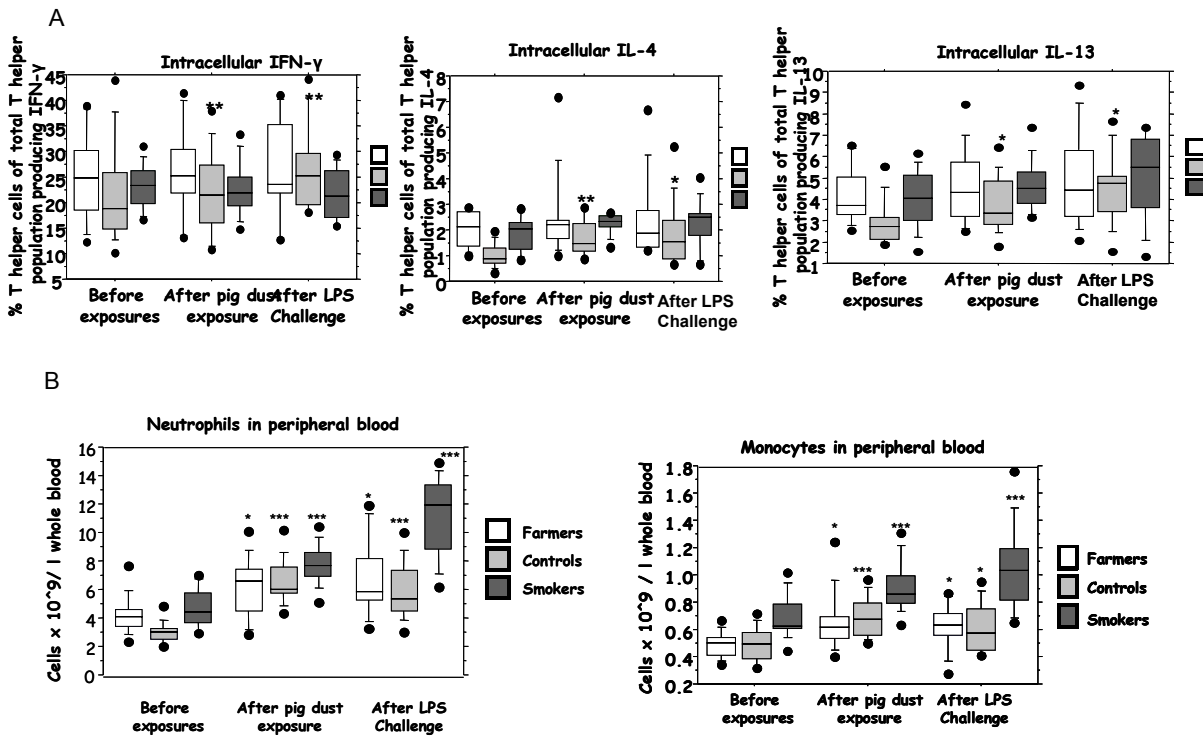


Figure 4 Procentuell andel T-hjälparceller positiva för IFN γ , IL-4 och IL-13 (A) och absoluta antalet neutrofiler och monocyter i perifert blod före och 7 timmar efter starten av exponeringen för svindamm och LPS. Data är presenterat som medianvärde och 25 och 75 percentilen. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ i jämförelsen mellan basala värdet och efter respektive exponering inom gruppen.

Resultatförmedling

Studien presenterades i form av 3 poster på årets European Respiratory Society årliga konferens som ägde rum i Köpenhamn 17-21 september.

Som framgår av den vetenskapliga rapporten är undersökningarna mycket omfattande och resultatsammanställningen har skett parallellt med rapportskivandet och är ännu inte riktigt slutfört. Studien kommer att resultera i 3 separata publikationer i relevanta medicinska vetenskapliga tidskrifter med särskild inriktning på arbetsmiljöfrågor.

Besök för rapportering av studieresultatet på försöksgården Upppig (Hjälsta) är inplanerat enligt ägarnas önskemål till mitten av december vid deras ordinarie ägarmöte.

Efter önskemål kan även resultaten publiceras i någon mer branschnära tidskrift.