

Slutredovisning av projektet:

Förändrad medfödd immunitet hos grisbönder-orsak till ökad sjuklighet i luftvägarna? H0635083

Stiftelsen Lantbruksforskning; FoU-program för en god arbetsmiljö

Docent, läkare Lena Palmberg, Lung- och allergigruppen, IMM, Karolinska Institutet

Bakgrund

Den mänskliga lungan utsätts dagligen för stora mängder luftburna partiklar av vilka många aktiverar immunsystemet. Luftvägsepitetet utgör ”first line of defense” och spelar en nyckelroll vid försvaret mot dessa patogener. Kroniskt obstruktiv lungsjukdom och kronisk bronkit är båda sjukdomar med hög förekomst av kolonisering med bakterier i luftrören och en ökad risk för sekundärinfektioner. Dessa sjukdomar har också en ökad förekomst hos både lantbrukare och rökare.

Toll-receptorer (TLR) spelar en nyckelroll vid den medfödda immuniteten, genom sin förmåga att binda till mikrober och mikrobiella produkter. Tio humana Tollreceptorer har identifierats och bronkiella epitelceller uttrycker alla dessa tio. Även monocyter/makrofager och neutrofiler (två typer av vita blodkroppar) uttrycker Tollreceptorer och deltar därmed i kroppens försvar mot bakterier och virus och alla dessa celler finns närvarande i luftvägarna. Den bäst karakteriserade Toll-receptorn är TLR4 som binder till lipopolysackarid (LPS). LPS utgör en del av cellväggen hos gramnegativa bakterier. LPS bildar ett komplex med LBP (LPS-binding protein) och binder till CD14 på exempelvis monocyter. TLR2 binder lipoproteiner, grampositiva bakterier och mykobakterier.

Vi har vidare i 2 studier påvisat att bönder har en pågående inflammation i luftvägarna och en tolerans (de reagerar inte med en lika kraftig inflammation efter exponering i grishus respektive provokation med LPS) jämfört med tidigare oexponerade personer. I en av dessa studier såg vi också att bönder hade reglerat ner sitt uttryck av TLR2 på blodmonocyter.

Frågeställning

I föreliggande studie avsåg vi att studera om kronisk exponering för organiskt material (rökare och svinskötare) leder till likartad reaktion vad gäller påverkan av det medfödda immunförsvaret. Vår hypotes är att uttrycket av Tollreceptorer på celler från sputum är nedreglerat i luftvägarna hos grisbönder jämfört med friska rökare och kontroller. Uttrycket av Tollreceptorer hos viktiga celltyper som deltar i kroppens försvar mot patogener hos friska kontroller, rökare och grisbönder från både luftvägarna och blod är inte studerat tidigare.

Metodbeskrivning

Femton friska kontroller, 15 friska rökare och 15 icke-rökande grisbönder inkluderades i studien. Försökspersonerna läkarundersöktes, pricktest utfördes för att utesluta allergi och försökspersonerna fick fylla i en enkät rörande luftvägsbesvär, rökvanor och en noggrann analys av yrkesexponering för lantbrukaren utfördes. Lungfunktionsundersökningar inklusive reversibilitetstest genomfördes för att bedöma grad av en eventuell luftvägsobstruktion. Blodprovtagning och induktion av sputum (upphostningsprov som speglar de övre luftvägarna) genomfördes, samt NO i utandningsluft mättes. I blod och sputum analyserades cellfördelningen, halten inflammatoriska mediatorer i form av IL-2, IL-4 och IL-13 intracellulärt i lymfocyter (enbart blod), uttryck av TLR2 och TLR4 på såväl monocyter som neutrofiler, samt halten lösliga receptorer delaktiga i den medfödda immuniteten som sTLR2 och sCD14 i sputum. Vidare analyserades adhesionsmolekyler på neutrofiler i både blod och sputum som är viktiga vid utvandringen av neutrofiler från blodet till luftvägarna, samt halten av de inflammatoriska cytokinerna IL-6 och IL-8.

Resultat och diskussion

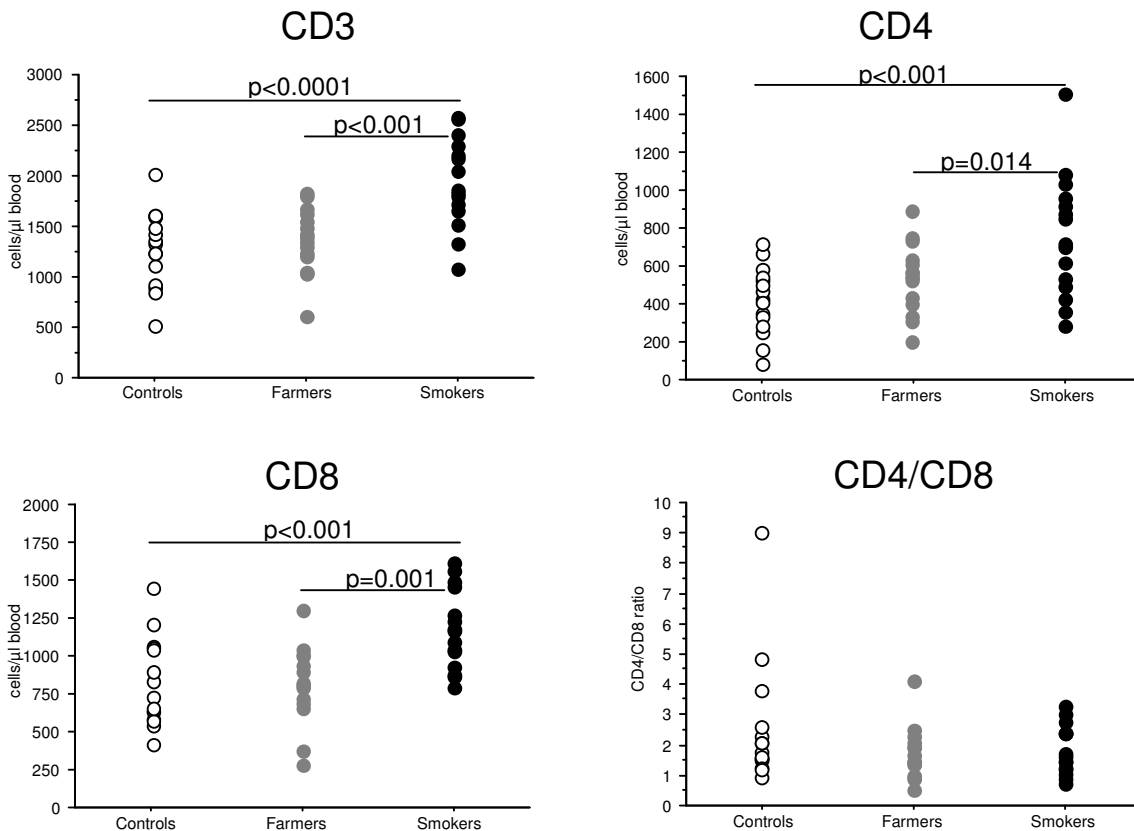
Alla 3 grupper uppvisade normal lungfunktion (lungfunktionsparametrar: VC=vitalkapacitet, FVC=forcerad vitalkapacitet; se tabell 1). Rökarna uppvisade ett visst mått på obstruktion/trånghets känsla i bröstet och signifikant mer än kontrollerna och i viss mån

lantbrukarna (parametrar som påvisar obstruktion: FEV₁=forcerad expiratorisk volym på 1 sekund, FEV₁/VC=hur mycket man kan blåsa ut den första sekunden av totala lungkapaciteten). NO i utandningsluft, som är ett mått på luftvägsinflammation skilde sig inte åt mellan grupperna.

Tabell 1

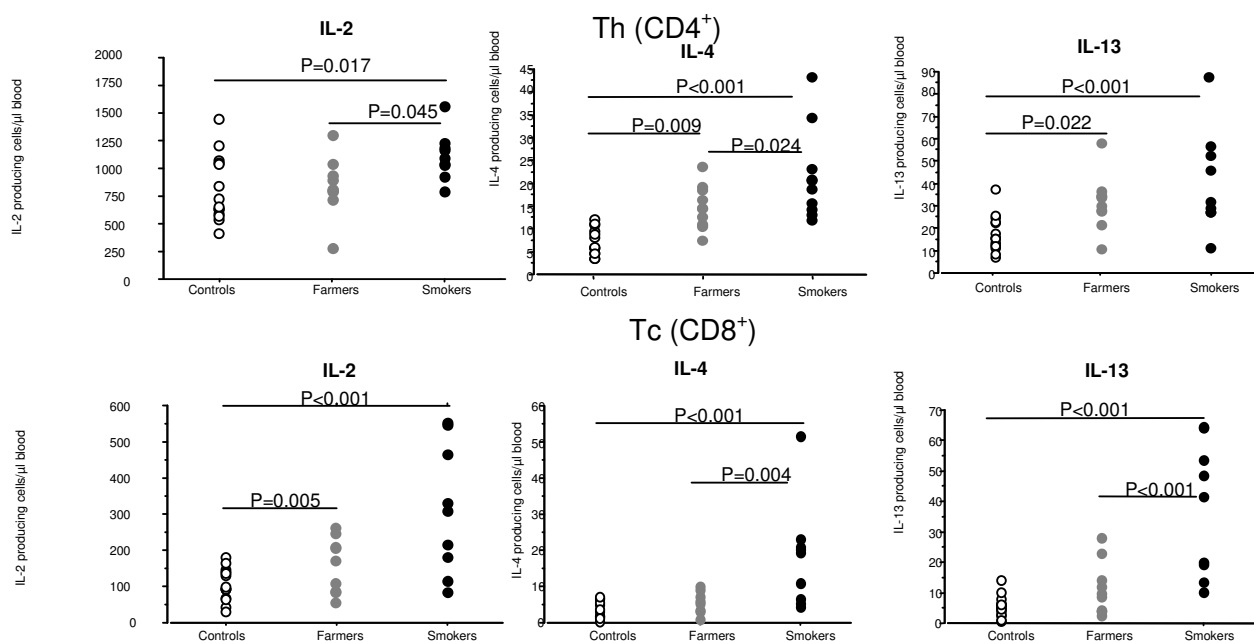
	Controls		Farmers		Smokers		Between groups
	Value	% predicted	Value	% predicted	Value	% predicted	p-value
VC (L)	5.08 (4.70-5.47)	95% (91-100)	4.87 (4.21-5.54)	89% (82-97)	4.69 (4.17-5.20)	91% (83-100)	ns
FVC (L)	5.02 (4.64-5.39)	96% (91-100)	4.88 (4.22-5.54)	91% (83-98)	4.54 (4.02-5.06)	90% (81-99)	ns
FEV₁ (L)	4.02 (3.69-4.36)	100% (96-105)	3.93 (3.38-4.47)	94% (85-103)	3.38 (2.95-3.80)	87% (80-95)	% pred C vs S p=0.0089
FEV₁/VC	79 (76-81)		80 (77-83)		72 (68-76)		C vs S p=0.0043 F vs S P=0.001
Reversibility (%)	2.30 0.88 – 3.71)		2.89 0.61 – 5.16)		5.46 (2.22 – 8.70)		ns
NO (ppb)	12.1 (9.2–15.0)		12.5 (9.1–16.0)		11.4 (8.1– 14.8)		ns

Figur 1



Rökare har signifikant mer T-lymfocyter (CD3⁺), samt fler T-hjälparceller (CD4⁺) och cytotoxiska lymfocyter (CD8⁺) jämfört med både kontrollpersonerna och svinskötarna (figur 1). Rökare har också signifikant fler IL-2-, IL-4- och IL-13-producerande CD4⁺- och CD8⁺-celler jämfört med kontroller (figur 2). Även svinskötare har ett ökat antal av IL-4- och IL-13-producerande CD4⁺-celler och IL-2-producerande CD8⁺-celler. IL-4 och IL-13 är inblandat vid astma, men är också kända som antiinflammatoriska cytokiner, som skyddar mot dödlig utgång vid kraftig endotoxemi (kraftig exponering för LPS) i djurmodeller. Dessa cytokiner kan bidra till att svinskötare uppvisar en form av tolerans mot sin arbetsmiljö och inte reagerar lika kraftigt vid vägning av grisar som tidigare oexponerade personer gör. Vi har tidigare påvisat en signifikant korrelation mellan andelen IL-13-producerande CD4⁺-celler och antalet arbetsår inom grisuppfödning. IL-4 och IL-13 är också inblandat i en rad inflammatoriska sjukdomar som karakteriseras av remodelling, dvs permanenta sjukliga förändringar i lungan. Nyligen har man sett att IL-13 leder till ökad produktion av transforming growth factor (TGF-) β_1 , en tillväxtfaktor som man vet är inblandad i lungfibros.

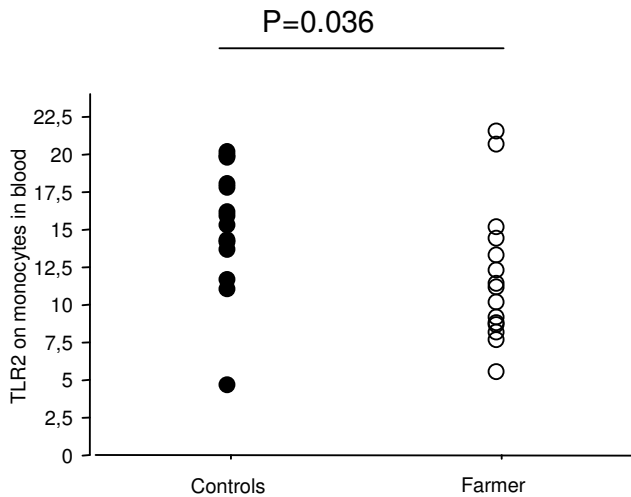
Figur 2



På grund av tekniska orsaker har vi fått för få sputumprover av god kvalitet från rökargruppen för att kunna dra säkra slutsatser. Därför har vi i de följande parametrarna analyserade i sputum enbart gjort jämförelser mellan friska och svinskötare. Det var inte heller möjligt att analysera cellyteuttryck på makrofager i sputum, då dessa celler autofluorescerar och gör det därmed svårt att skilja mellan autofluorescens och fluorescens orsakad av antikroppsbindning till cellytan vid analys i flödescytometern. Därför har vi fokuserat på neutrofiler i blod och sputum vad gäller Tollreceptoruttryck.

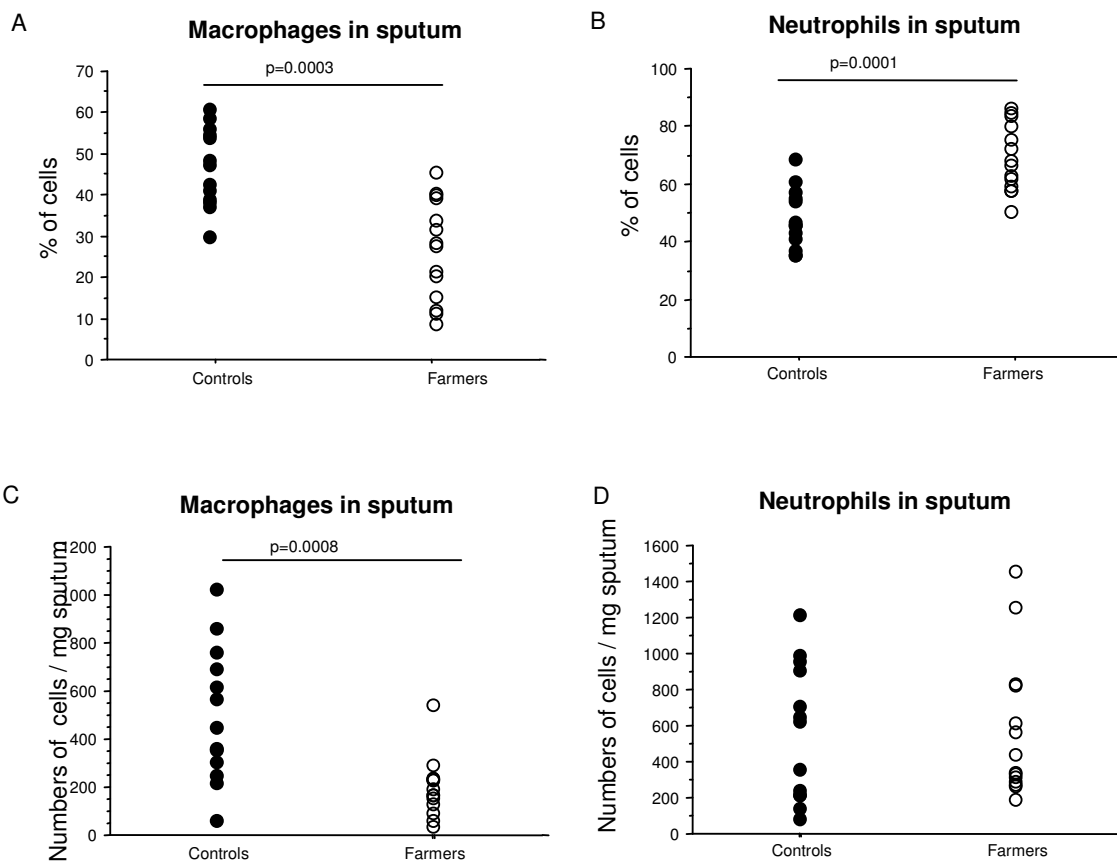
Vi kunde upprepa fyndet från föregående studie och påvisa en nedreglering av TLR2 på blodmonocyter (Figur 3). Detta minskade uttryck skulle kunna vara en förklaring till det försämrade försvaret mot luftvägsinfektioner och den ökade förekomsten av kronisk bronkit som bönder utvecklar.

Figur 3



Svinskötare uppvisar tecken på inflammation i luftvägarna med signifikant högre andel neutrofila granulocyter i inducerat sputum jämfört med kontrollpersonerna (figur 4). Svinskötarna hade också signifikant lägre andel och antal makrofager, vilka är celler viktiga i kroppens försvar i sputum jämfört med kontrollerna.

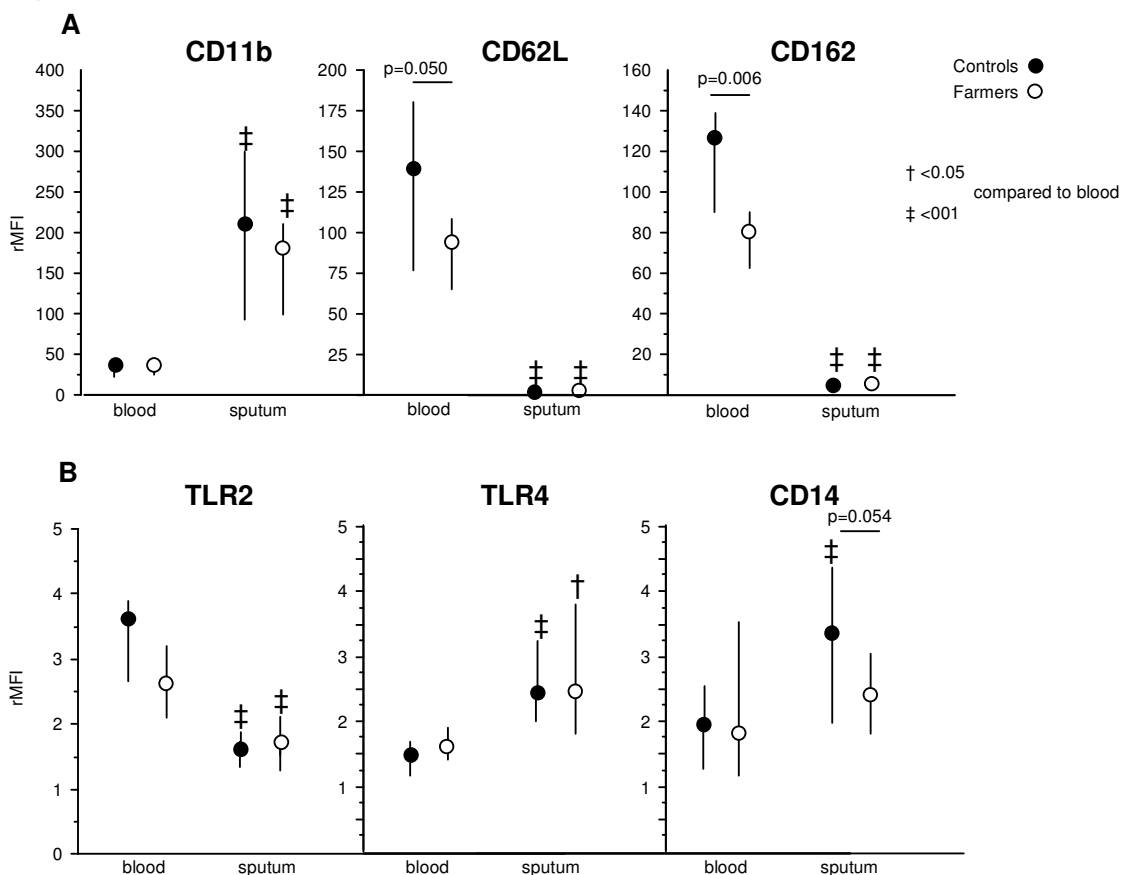
Figur 4



Studier av adhesionsmolekyler på de neutrofila granulocyterna i 2 olika compartments (blod och luftvägar mätt i inducerat sputum) har jämförts så väl inom gruppen som mellan grupperna.

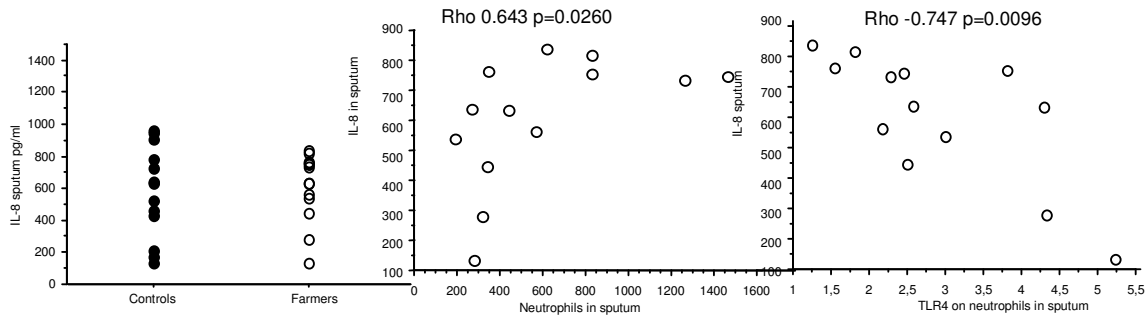
Adhensionsmolekyler är viktiga i samband med utvandringen av neutrofiler från blod ut i luftvägarna. Exponering i svinhus leder till en ökad utvandring av neutrofiler i luftvägarna. CD11b-uttryck ökar på neutrofilerna i samband med utvandring i luftvägarna och i samma omfattning i båda grupperna (Figur 5A). Svinskötare uppvisar ett minskat uttryck av både L-selectin (CD62L) och P-selectin (CD162) i blod jämfört med kontrollerna och uttrycket minskar efter utvandring i luftvägarna och signifikant mer hos kontrollpersonerna. Uttryck av adhensionsmolekyler på neutrofiler i både blod och sputum hos lantbrukare har inte tidigare studerats. En jämförelse av uttryck av TLR2, TLR4 och CD14 som är en viktig co-receptor för TLR4 har även här gjorts på de neutrofila granulocyterna i 2 olika compartments (blod och luftvägar mätt i inducerat sputum) och jämförelser har gjorts så väl inom gruppen som mellan grupperna. Uttrycket av TLR2 på neutrofiler minskar i och med utvandringen i luftvägarna (Figur 5B). De båda involverade receptorena för endotoxin, TLR4 och CD14 uppreglas på neutrofilerna vid utvandringen till luftvägarna främst hos kontroller. Uttrycket av CD14 på neutrofiler i sputum uppreglades inte och var lägre hos svinskötarna, om än inte signifikant.

Figur 5



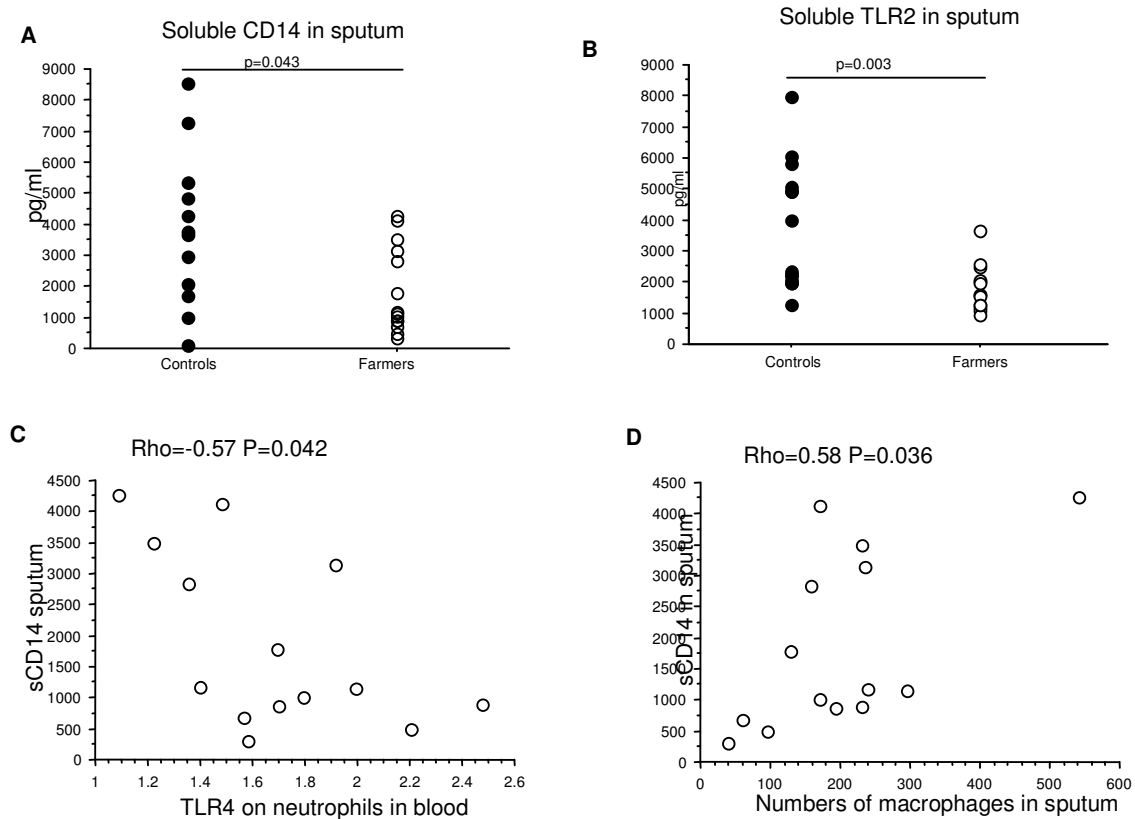
IL-8, en kemokin som lockar till sig neutrofila granulocyter, skilde sig inte åt mellan grupperna i luftvägarna i denna studie (Figur 6). Hos svinskötarna var det en signifikant korrelation mellan antalet neutrofiler i sputum och halten IL-8 i sputum, vilket är rimligt för IL-8 är en kemotaktisk faktor för IL-8. Det vill säga att IL-8 kan därmed öka utvandringen av neutrofiler i sputum. Dessutom påvisades en negativ korrelation mellan halten IL-8 i sputum och uttrycket av TLR4 på neutrofiler i sputum-det vill säga ju kraftigare inflammation desto lägre uttryck av den för försvaret mot bakterier viktiga receptorn TLR4. Vi har inte tidigare studerat TLR-uttryck i de övre luftvägarna och dessa studier ger intressanta aspekter gällande försvaret i luftvägarna i de båda grupperna.

Figur 6



Receptorena CD14 och TLR2 finns också i en löslig form (sCD14 och sTLR2) och man tror att kroppen i sitt försvar mot bakterier frisätter dessa receptorer. Dessa lösliga former tros binda till bakteriella produkter och därmed mildra den inflammatoriska reaktionen. Både sCD14 och sTLR2 var signifikant lägre hos svinskötarna i sputum (Figur 7A, B). Detta skulle kunna förklaras av att receptorn bundit bakteriella produkter och kan därmed inte binda till sig antikroppen som används för att detektera substansen. Det kan också förklara det lägre uttrycket av TLR2 på neutrofiler i sputum jämfört med blod på grund av att receptorn frisätts. Vidare såg vi en negativ korrelation mellan sCD14 och TLR4-uttryck på neutrofiler i blod, det vill säga ju lägre uttryck av TLR4 på neutrofilerna desto högre halt sCD14 i sputum (Figur 7C). En korrelation förelåg också mellan sCD14 och antalet makrofager i sputum, två faktorer som båda var signifikant lägre hos svinskötare (Figur 7D).

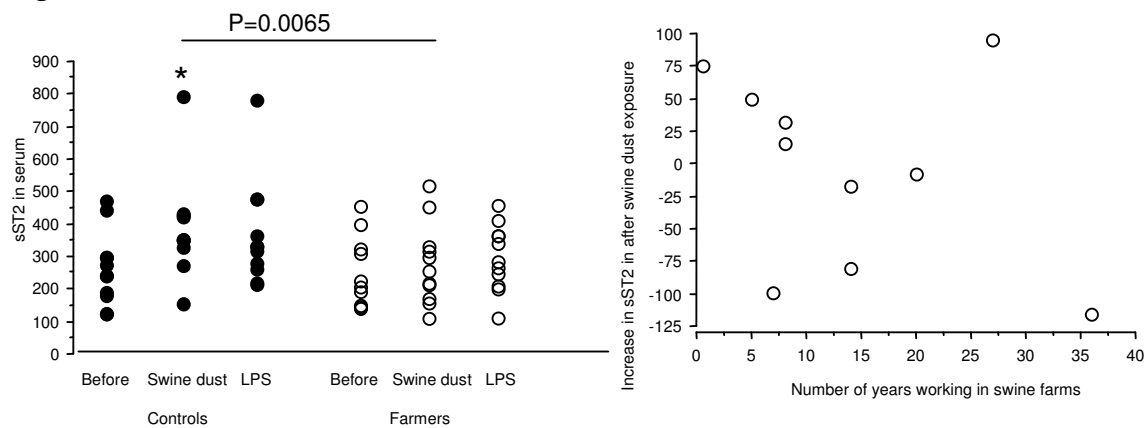
Figur 7



För att fördjupa kunskaperna om bakomliggande orsaker till den toleransutveckling som svinskötare uppvisar, där de inte utvecklar samma kraftiga inflammatoriska reaktion i samband

med exponering i svinhus har vi analyserat halten sST2 i serum före och efter exponering för LPS och i svinhus. sST2 har tidigare visats vara en negativ regulator av inflammation och skulle kunna vara en bidragande faktor till den toleransutveckling som lantbrukare uppvisar. Intressanta fynd var att enbart kontrollerna ökade i sST2 i serum efter exponering i svinhus och signifikant mer än lantbrukarna (Figur 8). Vi såg en negativ korrelation mellan ökningen av sST2 i serum efter vägning av grisar och antalet år som lantbrukaren arbetat och varit verksam inom lantbruk, det vill säga att ju färre år lantbrukaren arbetat desto mer ökade de i sST2 i serum och uppvisade därmed ett reaktionsmönster liknande det som kontrollerna har. Vi tror att den kraftiga inflammatoriska reaktion som friska försökspersoner uppvisar efter exponering i svinhus är ett naturligt svar på den toxiska miljön. Den tolerans som lantbrukaren uppvisar kan vara av ondo och bidra till den ökade förekomst av luftvägssjukdomar som epidemiologiska studier påvisar.

Figur 8



Sammanfattningsvis har dessa studier visat att svinskötare i en rad parametrar kopplat till det medfödda immunsvaret är signifikant skilt från kontrollerna. De har fler T-hjälparceller som uttrycker IL-4 och IL-13, cytokiner som man vet har antiinflammatoriska egenskaper och som där med skulle kunna bidra till toleransutvecklingen som svinskötare uppvisar. De ökar inte heller i samma omfattning som kontrollerna i ST2 efter exponering i svinhus och ökningen av ST2 är negativt korrelerat till antal arbetsår i svinstall. ST2 kan vara en bidragande orsak till den toleransutveckling som svinskötare uppvisar.

Kronisk exponering för organiskt material leder till en pågående inflammation i luftvägarna och en påverkan på det medfödda immunförsvaret. Dessa förändringar kan vara orsak till den ökade förekomsten av kronisk bronkit och kroniskt obstruktiv lungsjukdom som svinskötare drabbas av. Dessa sjukdomar är ofta förknippade med en ökad kolonisering av bakterier i luftvägarna. Man har i studier nyligen sett att såväl svinskötare som grisar är bärare av Meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) det vill säga multiresistenta bakterier som bland annat ger upphov till sjukhussjuka. Dessa multiresistenta bakterier är ett växande problem inom sjukvård och kräver isolering av personer som är bärare av dessa. *Staphylococcus* är grampositiva bakterier och det minskade uttrycket av de Tollreceptorer som binder grampositiva bakterier som vi i denna studie påvisat att svinskötare gör kan även bidra till denna utveckling.

Publikationer:

Resultaten från studien har presenterats på 2 kongresser inom Lungmedicin, där forskare från hela världen samlas och diskuterar aktuella resultat. I vårt fall har resultaten presenterats inom sektionen rörande arbetsmiljöfrågor.

1. Karin Sahlander, Kjell Larsson, Lena Palmberg. Altered inflammatory response in farmers chronically exposed to organic material. Poster 137 Toll 2008; Lisabon 2008
2. Karin Sahlander, Kjell Larsson, Lena Palmberg. Acute exposure in a pig barn increases soluble ST2 in peripheral blood in previously unexposed controls but not in chronically exposed pig farmers. Poster ERS; Berlin 2008.

Två manuskript är under sammanställning, där vi räknar med att skicka in det första före jul och det andra i början av nästa år.

Vi har kontaktat Svensk Gris med knorr om eventuell publicering i tidskriften.