

**Inflammasjonsresponser i bronkiale  
epitelceller induert av sink eller jern,  
alene eller i kombinasjon av partikler**

**Av Christina Olsen**

---

# Inflammasjonsresponser i bronkiale epitelceller induisert av sink og jern

*-alene eller i kombinasjon av partikler*

**Christina Olsen**



Masteroppgave i tokiskologi, Biologisk institutt, Det matematiske-  
naturvitenskapelige fakultet

Utført ved Nasjonalt folkehelseinstitutt

UNIVERSITETET I OSLO

September 2008

## Forord

Dette arbeid er utført på avdeling for luftforurensning og støy, divisjon for miljømedisin ved Nasjonalt folkehelseinstitutt i tiden august 2006 til september 2008 under fagelig hovedveiledning av Johan Øvrevik og Magne Refsnes. Internveileder har vært Steinar Øvrebø ved Biologisk institutt, Universitetet i Oslo. Jeg vil takke avdelingsdirektøren på luftforurensning og støy, Per Schwarze, for å ha gitt meg muligheten til å utføre oppgaven på avdelingen.

Jeg vil spesielt takke Johan Øvrevik for en fantastisk god fagelig veiledning og oppfølging under hele min periode ved avdelingen, og for et par spark bak når det har trengtes ☺ En bedre veileder skal man lete lenge etter! Håper jeg ikke har slitt deg ut!

Ellers vil jeg få takke hele den trivelige gjengen på MILS for to hyggelige år, både på lab og rundt det til tider trange lunsjbordet. Tonje Skuland, Edel Lilleås, "lille-Tonje" og Hans Jørgen Dahlmann fortjener en stor takk for all teknisk opplæring og assistanse på laboratoriet. Lille-Tonje aka Tonje W. Elvestad og Elisabeth Øya fortjener også en ekstra takk for hyggelige stunder og lærerike øyeblikk på avdelingen, og for artige samtaler av alt mellom himmel og jord.

En stor takk sendes også til alle toksikologene på lesesal 4131, for alle fagelige, og ikke minst ikke-fagelige, samtaler og diskusjoner. Mye moro har skjedd bak lukkede dører der.

Til slutt vil jeg takke Frode, som alltid stiller opp, og som har vært en stor hjelp gjennom denne tiden. Ikke minst takk for alle sene middager du har måttet diske opp med, og en armkrok å hvile i.

Oslo, september 2008

Christina Olsen

## Sammendrag

Epidemiologiske undersøkelser har funnet en sammenheng mellom eksponering for svevestøv i uteluft og utvikling eller forverring av kroniske lungesykdommer, astma, hjertekarsykdommer og kreft. Betennelsesreaksjoner i lungene antas å spille en sentral rolle i utviklingen av disse akutte og kroniske effektene man ser på lunge og hjerte. Det er imidlertid problematisk å avgjøre hva som forårsaker de observerte effektene. Svevestøvet har en svært kompleks sammensetning, og inneholder både forbrenningspartikler (fra biltrafikk, vedfyring og industri), slitasjepartikler (fra veidekke, bremseskiver etc.) og ”naturlige” partikler (fra jorderosjon, pollen etc.). Støvparklene kan dessuten ha bundet en rekke potensielt helseskadelige komponenter på overflaten, slik som metaller, PAH’er, allergener, og endotoksiner. Per i dag er det fremdeles uklart hvilke effekter som bidrar mest til helseeffektene, og i hvilken grad ulike forbindelser gir samvirkende effekter.

Denne studien har tatt for seg metallene sink og jern, alene eller i kombinasjon med ultrafine karbonpartikler, og deres evne til å inducere cytokin- og kjemokinfrigjøring fra bronkiale epitelceller. Det er i denne oppgaven brukt celler fra den humane cellelinjen BEAS-2B. Frigjøring av cytokinene IL-8 og IL-1 samt aktivering av MAP-kinasene ERK1/2, p38, JNK og transkripsjonsfaktoren NF- $\kappa$ B ble undersøkt.

Det ble observert at sink og jern induerte konsentrasjonsavhengig frigjøring av IL-8, men i ulik grad og ved ulike konsentrasjoner. Sink syntes å være mest potent med hensyn til induksjon av både cytokinfrigjøring og celledød. Også ovenfor IL-1 induksjon var sink mer potent enn jern, men i mye mindre grad enn ved IL-8 frigjøringen, og ga kun en signifikant oppregulering ved den høyeste dosen for IL-1 $\alpha$ . Sink og jern viste også ulike virkningsmekanismer involvert i MAP-kinasene, hvor både ERK1/2, p38 og muligens JNK så ut til å være involvert i den jerninduserte IL-frigjøringen. p38 var den eneste MAP-kinasen som viste signifikant involvering i IL-8 frigjøringen ved sin eksponering. Kombinasjonseksponering for metaller og ultrafine karbonpartikler så ut til å gi reduserende effekter av IL-8 frigjøring, enn nivåene observert for metalleksponering alene.

---

# Innhold

<b>FORORD</b> .....	<b>3</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>4</b>
<b>INNHold</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INNLEDNING</b> .....	<b>7</b>
1.1 LUFTFORURENSNING OG SVEVESTØV.....	7
1.1.1 Helseeffekter av svevestøv.....	8
1.2 PARTIKLER OG PARTIKKELKOMPONENTER.....	9
1.2.1 Partikler.....	9
1.2.2 Metaller.....	11
1.3 RESPIRASJONSSYSTEMET.....	14
1.3.1 Anatomi.....	14
1.3.2 Celletyper i lungene.....	15
1.3.3 Partikkeldeponering i lungene.....	16
1.3.4 Fjerning av partiklene fra lungene.....	17
1.4 INFLAMMASJON.....	18
1.4.1 Lungeinflammasjon.....	19
1.4.2 Cytokiner.....	21
1.4.3 Interleukin-8.....	22
1.4.4 Interleukin-1.....	24
1.5 MITOGENAKTIVERTE PROTEINKINASE SIGNALVEIER.....	26
1.6 TRANSKRIPSJONSAKTIVERTOR NF-KB.....	29
<b>2 MÅL MED OPPGAVEN</b> .....	<b>30</b>
<b>3 MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>31</b>
3.1 MATERIALER.....	31
3.2 METODER.....	33
3.2.1 Celler og dyrkingsbetingelser.....	33
3.2.2 Metaller og partikler.....	34
3.2.3 Eksponeringsbetingelser.....	34
3.2.4 Bestemmelse av viabilitet ved fluorescensmikroskopi.....	34
3.2.5 Måling av cytokiner ved Enzyme-linked immunosorbent assay.....	35
3.2.6 Elektroforese og Western immunblotting.....	37
3.2.7 Måling og kvantifisering av RNA, cDNA og mRNA.....	39

---

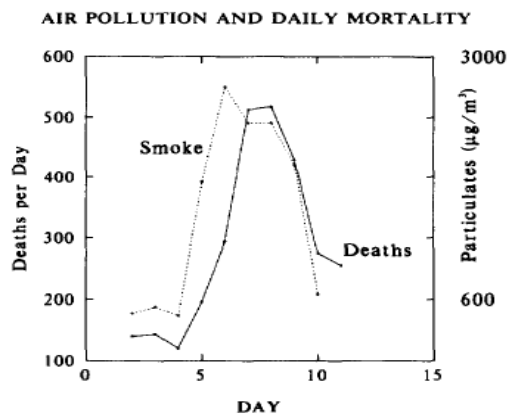
3.2.8	Statistikk.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>44</b>
4.1	VIABILITET .....	44
4.1.1	Viabilitet til BEAS-2B celler eksponert for sink og jern, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler.....	45
4.2	IL-8 RESPONSER .....	45
4.2.1	IL-8 utskillelse fra BEAS-2B celler eksponert for sink og jern, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler.....	45
4.2.2	IL-8 genekspressjon i BEAS-2B celler eksponert for sink og jern, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler.....	46
4.2.3	Ekspressjon av andre cytokin- og kjemokingener – mRNA screen.....	47
4.3	SIGNALVEIER INVOLVERT I SINK-OG JERNINDUSERT IL-8 RESPONSER.....	48
4.3.1	Betydningen av ERK1/2 aktiveringen .....	49
4.3.2	Betydningen av p38 aktiveringen .....	50
4.3.3	Betydningen av JNK aktiveringen.....	51
4.3.4	Betydningen av I $\kappa$ B aktivering .....	52
4.4	IL-1A OG IL-1B.....	52
4.4.1	IL-1 $\alpha$ og IL-1 $\beta$ frigjøring fra BEAS-2B celler eksponert for sink og jern.....	52
4.4.2	IL-1 $\alpha$ og IL-1 $\beta$ genekspressjon i BEAS-2B celler eksponert for sink og jern.....	54
4.4.3	Effekt av IL-1Ra på sink- og jernindusert IL-8 frigjøring.....	54
4.4.4	Effekt av kalpain- og caspase-1-hemming på sink- og jernindusert IL-8 frigjøring.....	55
<b>5</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>KONKLUSJON.....</b>	<b>65</b>
	<b>KILDELISTE.....</b>	<b>66</b>

# 1 Innledning

## 1.1 Luftforurensning og svevestøv

Verden er i stadig forandring og innen 2011 er det estimert omtrent 7 milliarder mennesker på jorden. Med samme økning får vi også en vekst i transport og i industriell virksomhet, og ser en økende trend i nivået av luftforurensninger, også i de rurale områdene. Dermed kan luftforurensninger bli et enda mer alvorlig helseproblem for en stor del av befolkningen. Mange opplever allerede i dag en stor reduksjon i helse- og livskvalitet. Verdens helseorganisasjon (WHO) definerer svevestøv blant verdens viktigste helseproblemer, og antar at mer enn 800.000 dødsfall årlig kommer som følge av eksponering for svevestøv over hele verden (WHO 1987). Luftforurensninger som svevestøv er ofte knyttet til storbyer som Beijing, Tokyo og New York, men også her i Norge kan vi finne relativt høye nivåer av svevestøv, og noen steder overskrider vi de nasjonale målene for døgnmiddelkonsentrasjoner, som ligger på  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  i mindre enn 7 dager per år (SFT 2007). Innholdet i luftforurensningen kommer i dag fra forbrenningspartikler som vedfyring og bensin- og diesel-partikler, slitasjepartikler fra veidekke og langtransporterte partikler fra utlandet. Sammensetningen av støvet varierer lokalt og regionalt, med årstidene og med været.

### 1.1.1 Helseeffekter av svevestøv



**Figur 1: Graf over sammenheng mellom dødsfall og smogen som la seg over London i 1952.** Noen dager etter at smogen la seg, så en stigning i antall dødsfall per dag i den engelske storbyen. Hentet fra artikkelen til Schwartz (Schwartz 1994).

I mange år har svevestøv fra omgivelsene blitt sett på som et alvorlig helseproblem. Enkelthendelser av luftforurensning, som den i 1952 hvor smogen la seg tjukt over London, satte fart i interessen for helseeffekter rundt eksponering for svevestøv. En kunne tydelig se en korrelasjon fra London mellom konsentrasjonen av smog, og påfølgende dødsfall noen dager senere (figur 1). Mennesker kommer stort sett i kontakt med ulike typer svevestøv via inhalasjon og til en viss grad inntak av føde, mens kontakt over huden er en mindre eksponeringsvei. Effekter i luftveiene er også derfor mest utbredt etter eksponering for svevestøv, og effektene kan variere fra irritasjon og plage, svimmelhet og vansker med å puste til akutte dødsfall ved hjertekarsykdom. Vedvarende eksponering for svevestøv er også satt i sammenheng med kreftutvikling (Kampa and Castanas 2008). Både korttids- og langtidseksponering forverrer allerede eksisterende sykdom, mens langvarig eksponering for høye nivåer også kan settes i sammenheng med utvikling av sykdom (SFT 2007). Særlig pasienter med eksisterende lungesykdom som astma og kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) synes å være spesielt utsatt (Lagorio et al. 2006). Resultatene fra internasjonale studier viser at en ikke kan utelukke negative helseeffekter selv ved relativt lave luftforurensningsnivåer, tilsvarende de som kan forekomme i Norge. Flere epidemiologiske studier viser at PM kan gi både negative lang- og korttids effekter på helsen ved de konsentrasjonene en finner i luften (Costa 2003). I en europeisk studie som dekket 43 millioner mennesker fordelt over 21 byer, viste en korttidsstudie en økning i total dødelighet



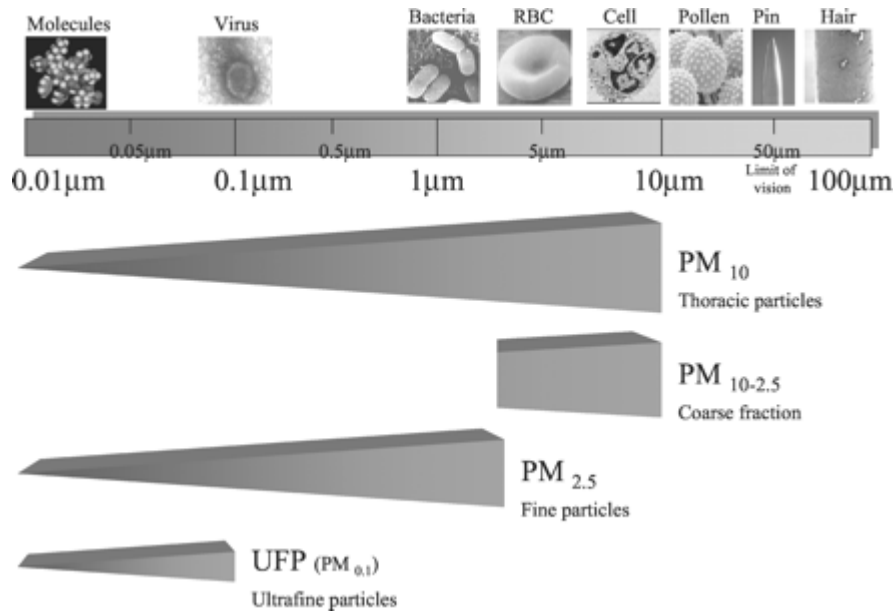
---

på 0,6% for hver 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  økning i svevestøv større enn 10  $\mu\text{m}$  (PM10). Innleggelser på sykehus blant de over 65 år med astma og KOLS, økte med 1% per 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  PM10. Lignende effekter ble også vist i studier fra USA (Brunekreef and Holgate 2002). Den samme trenden vises ved dødelighet av lunge og hjertesykdommer. Substanser fra lungene kan komme over i blodbanen og påvirke hjertet. Andre effekter kan være forandringer i hematologiske/koagulerings- prosesser, som kan føre til hjerteinfarkt og/eller død (Schwarze et al. 2006). Fra en studie i USA så en én økning på 0,21% for dødelighet fra kardiovaskulære sykdommer, ved en økning på 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  fra PM10 i luften. (Brook et al. 2004). En har også sett tegn til betennelsesreaksjoner og skader på hjernen hos hunder og mennesker i Mexico City, som indikerer en mulig sammenheng med utvikling av Alzheimer's og Parkinson's (Calderon-Garciduenas et al. 2002; Calderon-Garciduenas et al. 2004)

## 1.2 Partikler og partikkelkomponenter

### 1.2.1 Partikler

Svevestøv, også kalt partikulært materiale (Salnikow et al. 2004), finnes over alt i atmosfæren og kan være en blanding av organiske, uorganiske, og biologiske materialer som alle er svært ulikt sammensatt, alt etter utslippskilden. Den kjemiske sammensetningen av svevestøv kan variere med tid og sted, avhengig av kilder og prosesser som finner sted. Svevestøv er ofte komplekse partikler, og kan bestå av flere elementer. Noen av de viktigste komponentene, i hvert fall når det gjelder mengdemessige forhold, er sulfat, nitrat, ammonium, andre uorganiske ioner ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  og  $\text{Cl}^-$ ), organisk elementært karbon, mineraler, samt partikkelbundet vann og tungmetaller. Da svevestøv kan forekomme i mange varianter og størrelser, blir de ofte inndelt etter deres aerodynamiske diameter. Aerodynamisk diameter (AD) defineres som den teoretiske diameteren til en kuleformet partikkel med egenvekt 1, som vil falle like fort i luft som den virkelige partikkelen (SFT 2007). De viktigste størrelsesfraksjonene som benyttes er PM10 ( $\text{AD} \leq 10 \mu\text{m}$ ), PM2,5 ( $\text{AD} \leq 2,5 \mu\text{m}$ ), PM1 ( $\text{AD} \leq 1 \mu\text{m}$ ) og PM0,1 ( $\text{AD} \leq 0,1 \mu\text{m}$ ). I tillegg brukes også inndelingen grovfraksjon (10-2,5  $\mu\text{m}$ ), finfraksjon ( $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ) og ultrafin fraksjon ( $\leq 0,1 \mu\text{m}$ ), også kalt nanopartikler. Figur 2 gir en liten oversikt.



**Figur 2: Størrelsesforhold for de ulike partikkelfraksjonene.** Figuren er hentet fra Brook og medarbeidere (Brook et al. 2004).

Finfraksjonen består hovedsakelig av forbrenningspartikler, og disse partiklene har gjerne en karbonkjerne. Forbrenningspartiklene dannes ved ufullstendig forbrenning, og hovedkildene kommer fra bensin- og dieselmotorer, men også fra bruk av vedovner. Grovpartikler er stort sett slitasjepartikler, og inneholder gjerne kalsium, aluminium, silika, magnesium og jern, eller primært organiske materiale som for eksempel pollen og sporer (SFT 2007). Hvilke kjemiske komponenter som sitter på partikkelen er avgjørende for partikkelens toksiske egenskaper. Størrelsen er en viktig faktor når en ser på de toksikologiske egenskapene til svevestøv fordi det avgjør hvor dypt partiklene inhaleres, hvor de deponeres i luftveiene, og hvor effektivt de avsettes i lungene. Generelt vil de største partiklene avsettes i de øvre delene av luftveien mens de mindre vil kunne bli fraktet videre og avsettes lengre ned i lungene der de antas å gjøre større skade. Mindre partikler avsettes også mer effektivt, og har større relativ overflate i forhold til vekt. Dermed kan en som en tommelfingerregel si at jo mindre aerodynamisk diameter partiklene har, jo mer potente kan de være. I eksperimentelle studier blir det ofte brukt surrogatpartikler som skal representere partikler i svevestøvet. Slike surrogatpartikler er ofte karbonpartikler i ulike størrelsesordener, og kan være både karbonpartikler eller ultrafine karbonpartikler. Disse er nøye utvalgt for sin størrelse, overflateareal og kjemiske komposisjoner. Ultrafine karbonpartikler, som printex 90, har også vist å ha en effekt på lungeinflammasjon, uavhengig av løselige metallbundet partikler (Brown et al. 2000; Wilson et al. 2002).

---

## 1.2.2 Metaller

Metaller anses for å spille en viktig rolle i helseeffekter induisert av svevestøv. Dette så en blant annet i Utah Valley hvor en midlertidig la ned en stålfabrikk i 13 måneder. I dette tidsrommet registrerte man en nedgang av svevestøv i luften, og sykdomsutvikling og dødelighet gikk ned i de nærliggende områdene. Da stålfabrikken så ble åpnet igjen økte disse tallene, noe som kunne indikere at metallutslippene til atmosfæren hadde negative helseeffekter på mennesker i områdene rundt stålfabrikken. Både cytokin-nivåer (interleukin (IL) 6 og IL-8) og antallet neutrofiler i lungevevet var markant redusert i den 13 måneder lange perioden fabrikken var stengt (Ghio 2004; Schwarze et al. 2006). Også på steder utenfor industriområder kan det finnes betydelig mengde metall i svevestøv, og en anser disse som viktig for effektene ved eksponering for svevestøv. I en undersøkelse fra Kanadiske byer, fant Burnett et al.(2000) ut at metallene jern, nikkel og sink, i tillegg til sulfater, var assosiert med dødeligheten i populasjonen (Burnett et al. 2000; Schwarze et al. 2006). De viktigste antropogene kildene til metaller kommer fra forbrenning av fossilt brensel, smelteverk, gruvedrift, prosessering og avfallshåndtering. Slitasjepartikler fra dekk, katalysatorer, bremses og asfalt er også med på å frigi metaller til atmosfæren. Naturlig forekommende kilder er fra vulkanutbrudd, jorderosjon og sandstormer. Flere studier har sett korrelasjoner mellom metallinnhold og ulike biologiske effekter, som cytokinproduksjon, cellulært stress, oksidative skader etc. (Sehlstedt et al. 2007). Denne oppgaven fokuserer på sink og jern som begge antas å kunne være viktige for helseeffekter av svevestøv (Prieditis and Adamson 2002).

### Sink

Sink er et overgangsmetall med atomnummer 30, og forekommer i to oksidasjonsformer; Zn(0) og Zn(II). Det er et essensielt metall for alle levende organismer og er involvert i en rekke prosesser i kroppen, hvorpå over 2-300 metalloenzymer krever Zn som en kofaktor (Bury et al. 2003; Goyer and Clarkson 2003). Sink er like viktig for åndedrett som det jern er, og er en viktig komponent i proteinet karboanhydrase, som frakter CO<sub>2</sub> fra cellene til lungene hvor det avgis (Mostad 2008).

Inhalasjon av sinkpartikler er vist å kunne gi metallstøvfeber hos sveise-arbeidere, som er et inflammatorisk syndrom som involverer aktivering av betennelsesreaksjoner i lungene (Gordon et al. 1992; Gordon and Fine 1993; Kim et al. 2006). Sink er et relativt stabilt

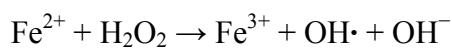
metall, og inngår derfor ikke i redoksreaksjoner, men har faktisk i motsetning antioksidantiske egenskaper ved lave konsentrasjoner (Bury et al. 2003). I oksidative miljøer derimot vil store mengder sink i cellen kunne føre til en frigjøring av sinkmolekylene fra sitt bindemolekyl metallothionin, og indirekte danne ROS ved svovel-frigjøring fra komplekset (Maret 2000). I forhold til cellulær toksisitet er mekanismene for sink mindre kjent.  $Zn^{2+}$  kan påvirke flere cellulære proteiner og fosforyleringsavhengige signaliseringsveier som epidermal vekstfaktorreseptorer (EGFR) og mitogenaktiviserte proteinkinaser (MAP-kinaser). Disse er kjent for å være involvert i regulering av betennelsesresponser og andre stressreaksjoner i cellene (Tal et al. 2006). Mekanismene for dette er trolig ved hemming av proteintyrosinfosfataser (PTP). PTP er negative regulatorer av intracellulære signaler, som hemmer fosforylering og dermed aktivering av kinaser, en viktig gruppe intracellulære signalproteiner.  $Zn^{2+}$  kan hemme PTP aktiviteten, og kan føre til ukontrollert kinaseaktivering inkludert aktivering av EGFR og MAP-kinaser, som kan resultere i aktivering av betennelsesreaksjoner (Samet et al. 1999; Wu et al. 1999; Tal et al. 2006).

Antropogene kilder for sinkutslipp er blant annet avrenning fra gruver, metallsmelteverk, slitasjepartikler fra veidekke og forbrenning av fossilt brensel. Videre er også sement- og gjødselprodusenter store kilder av metallutslipp til atmosfæren (Councell et al. 2004). Det er påvist høyere konsentrasjoner i områder med høy trafikk. Sinkoksid ( $ZnO$ ) blir tilsatt for å aktivisere vulkaniseringen av trådene i dekkene for å herde dem, og naturlig nok vil derfor dekkslitasje være en kilde til utslipp (Adachi and Tainosho 2004). En svensk studie anslår at den svenske bilparken årlig bidrar med 150 tonn sink til miljøet, og at 10% av sinkutslippet kom fra slitasje på bildekk (Councell et al. 2004). Sink nivåene i Oslo ble under RAIAP (Respiratory Allergy and Inflammation Due to Ambient Particles) undersøkelsen, målt til ca 60  $\mu\text{g}/\text{mg}$  PM om våren, for så å synke utover året og omtrent halvere seg ved vinterstid. Disse målingene var fra finfraksjoner.

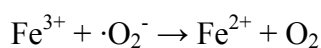
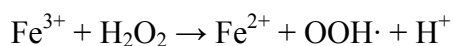
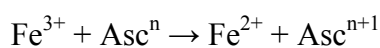
## **Jern**

Jern er et overgangsmetall med atomnummer 26, og forekommer i fem oksidasjonsformer;  $Fe(0)$ ,  $Fe(II)$ ,  $Fe(III)$ ,  $Fe(IV)$  og  $Fe(VI)$ . I likhet med sink er jern også et essensielt metall. En av dets viktigste mekanismer i kroppen er å frakte  $O_2$  rundt om til cellene, og 65-70% av jernet i kroppen finner vi bundet til hemoglobin. Jern er et stort, ladet ion, og krever dermed transportprotein til å fraktes over lipidlaget i cellemembranen, som transferrin (Andrews

2000b). Askorbinsyre (vitamin C) er med på å øke opptaket i kroppen via mat, mens kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hindrer opptak. Jernmangel kan føre til nedsatt intellektuell utvikling, nedsatt motstandsdyktighet mot infeksjoner eller blodmangel. En annen funksjon den har, er å delta i redoksreaksjoner på cytokromene som er involvert i respirasjonskjeden. Men med dette følger også de negative sidene ved redoksreaksjoner, nemlig dannelsen av frie radikaler (ROS), som kan være toksiske ovenfor celler (Bury et al. 2003). Av ulike reaktive oksygenforbindelser, er hydroxylradikaler ( $\cdot\text{OH}$ ) en av de mer DNA-skadelige. Jern kan bidra til  $\cdot\text{OH}$ -dannelse via Fenton-reaksjonen, som involverer reduksjonen av hydrogenperoksider ved hjelp av  $\text{Fe}^{2+}$  (Knaapen et al. 2002; Risom et al. 2005):



$\text{Fe}^{3+}$  kan videre igjen bli redusert til  $\text{Fe}^{2+}$  ved bruk av hydrogenperoksider. Ved tilstedeværelse av en reduktant som ascorbat, som er en biologisk reduktant (Brook et al.), vil  $\text{Fe}^{3+}$  kunne reduseres tilbake til  $\text{Fe}^{2+}$  (Vidrio et al. 2008). Dette kan føre til en syklus der stadig mer  $\cdot\text{OH}$  dannes og dermed øker skadene på biomolekyler.  $\text{Fe}^{3+}$  kan også reduseres til  $\text{Fe}^{2+}$  ved tilstedeværelse av hydrogenperoksid (som del av Haber-Weiss reaksjonen) ved tilstedeværelsen av superoksidanion:

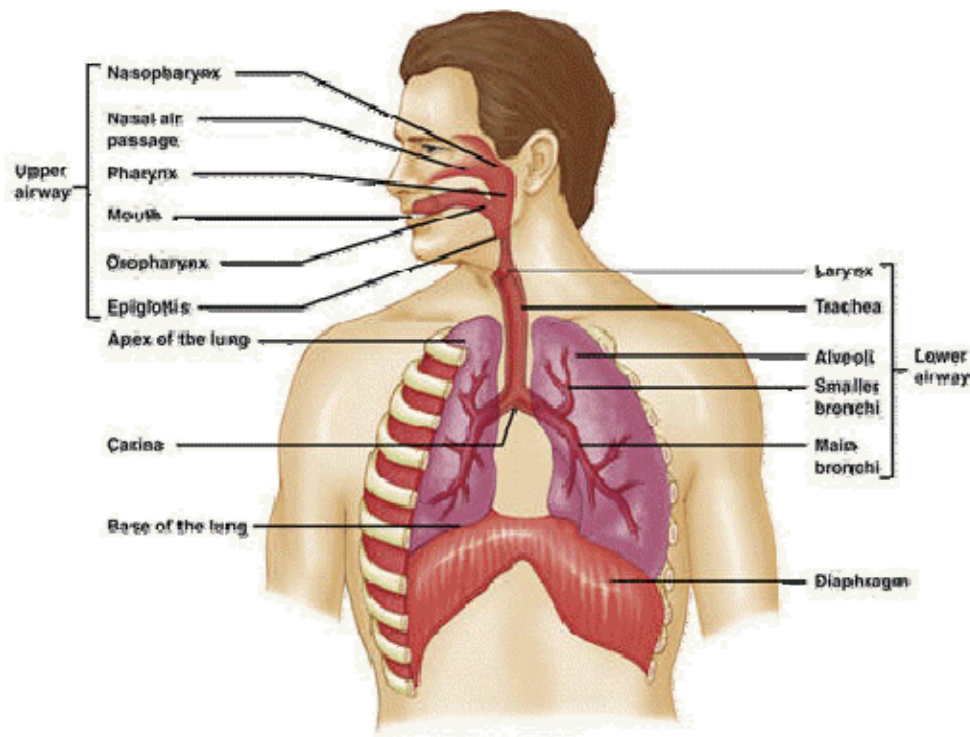


Desto mer jern som er tilgjengelig i kroppen, desto mer øker ROS-dannelsen, og flere frie radikaler blir frigjort i cellene. Frie radikaler kan igjen angripe DNA og andre målmolekyler og gi reaktive skader. Videre kan ROS indusere aktiveringen av MAPK, som igjen kan induserer produksjon av IL-8 (Lee and Esselman 2002). Forskere har sterke beviser for at jern kan stimulere proinflammatoriske responser både *in vivo* og *in vitro* (Pritchard et al. 1996; Carter et al. 1997; Dreher et al. 1997; Wilson et al. 2002).

I jordskorpen finner vi 5,8% jern, og derfor er det en naturlig utslippkilde når både erosjon og vind herjer overflaten. Mesteparten forekommer imidlertid i ferrisk ( $\text{Fe}^{3+}$ ) form, som stort sett er uløselig i vann ved nøytral pH (Andrews 2000a). Antropogene utslipp kan være

rust fra kjøretøyer, bremseslitasje, eksos, petroleums-basert fossilt brensel og fra stålfabrikker (Adachi and Tainosho 2004).

## 1.3 Respirasjonssystemet



**Figur 3: Oversiktsbilde over de øvre og nedre luftveiene.**

(<http://www.emergencymedical.com/images/respsys.gif> 2008)

### 1.3.1 Anatomi

Respirasjonssystemet består av munnhule, nesehule, svelget, strupehodet, luftrøret (trachea) og luftrørgrenene (bronkiene). Videre finner en de perifere luftveiene som omfatter de minste forgreiningene (bronkioler) og lungeblærene (alveolene) For oversikt, se figur 3.

Respirasjonssystemet er transportør av flere elementer som gass, partikler og damp inn og ut av kroppen, og dermed fungerer den også som inngangsporten til mange toksiske substanser. Nese og lunge er derfor ofte målorganer for disse komponentene, og fordi lungene er tett knyttet sammen med blodbanen og resten av kroppen, kan substansene også spres videre og gi en effekt på andre deler av organismen, som for eksempel hjertet (Brook et al. 2004;

---

Totlandsdal et al. 2008). Lungene består av fem lungelapper; tre på høyre side og to på venstre side, hvor også hjertet befinner seg. Ved vanlig aktivitetsnivå bruker vi bare de øverste delene av lungene, mens større deler av lungene tas i bruk ved med krevende fysisk aktivitet.

Med unntak av munnhulen og svelget er slimhinnen i luftveien kledd av respiratorisk epitel som er enlaget, sylindrisk og har flimmerhår, kalt cillier. Epitelet har rikelig med slimproduserende celler, og er på overflaten dekket av et seigt slimteppe, som fanger opp mikroorganismer og fremmedlegemer. Flimmerepitelet transporterer slimet, mucus, kontinuerlig mot svelget, hvor det svelges. Dette systemet er en viktig del av luftveienes infeksjonsforsvar. Slimhinnen i luftveiene, spesielt i nesene, har rikelig blodforsyning og det gjør at luften varmes opp til kroppstemperatur og mettes med vanndamp før den kommer ned i lungene. Flimmerepitelet fortsetter ned til bronkiene, men ikke videre ned i bronkiolene. Her er det spesialiserte forsvarsceller (makrofager), som tar opp og bryter ned fremmedlegemene, eller frakter dem med seg ut av alveolene og opp til bronkiolene (Sand et al. 2002b).

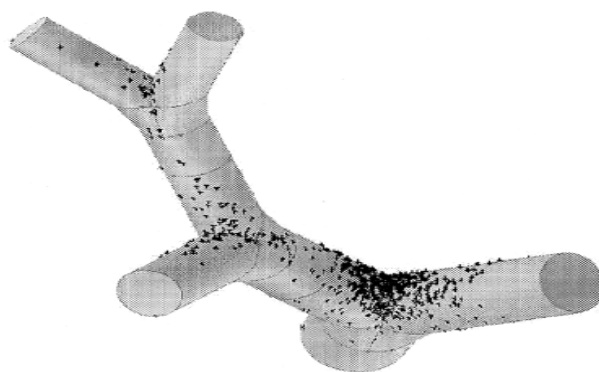
### 1.3.2 Celletyper i lungene

Overflaten av lungene består av epitelceller, og har som hovedfunksjon å gi fysisk beskyttelse for lungene og regulerer transporten av stoffer mellom omgivelsene og kroppens indre miljø. De ligger side ved side og er fast sammenkoblet til hverandre, også til det underliggende vevet. Fordi lungeepitelcellene utgjør den første barrieren som forhindrer inhalerte fremmedlegemer å komme inn i kroppen, blir epitelcellene også et første mål for skadelige komponenter i luften. Epitellaget fra svelget og ned til bronkiolene er dekket med slimproduserende celler og cilier, som er med på å hindre partikler fra å komme ned i lungene (Sand et al. 2002b). Det respiratoriske epitellaget ble tidligere tildelt en passiv rolle: å fungere som en barriere som forhindret inhalerte patogener, toksiske stoffer og allergener fra å få tilgang til det submucosale vevet. Nyere studier viser derimot at epitelcellene aktivt responderer på inhalerte stoffer. Når epitelcellene blir stimulert av enkelte fragmenter, kan dette gi oppregulering av gener for produksjon av cytokiner, kjemokiner og adhesjonsmolekyler som initierer den inflammatoriske responsen, metaplasia av mucuscellene, og til slutt remodellering av luftveiene. I bronkiolene finnes en type celler som kalles for Clara-celler. Disse er ikke cilierte, men synes å kunne være stamceller og

kunne gi opphav til cilierte celler lenger oppe i lungene (Bishop 2004). Videre ned i det alveolære epitelet finner vi to celletyper; type 1-celler og type 2-celler. Type 1-cellene er spesialiserte celler som står for gassutvekslingen og dekker hele 95% av overflatearealet i alveolene. Type 2-cellene proliferer og differensieres til type 1-celler, og erstatter aldrende og apoptotiske type 1-celler ved fagocytose. De syntetiserer, skiller ut og resirkulerer alle komponentene til surfaktanten i lungene. De har også varierende roller i den alveolære væskeballansen, og virker på immunresponsen (Fehrenbach 2001).

I lungene spiller også makrofagene en viktig rolle som del av det første forsvaret mot inhalerte fremmedlegemer. Makrofager er monocytter som har modnet og vandret ut i lungevevet, og er ofte stasjonære makrofager (Bjålie et al. 2001). Alveolære makrofager fjerner fremmedlegemer fra alveolene. De er selvfornyende og har et særlig langt livsforløp. Ved fjerning av fremmedlegemene vil partiklene tas opp i makrofagene via endocytose, og smelte sammen med lysosomer inne i cellen. Lysosomene inneholder blant annet proteaser som er et fordøyelsesenzym, og på denne måten kan fremmedlegemene bli brutt ned (Sand et al. 2002a). Makrofager kan være involvert i både det medfødte immunsystemet som fagocytter, og som antigenpresenterende celler for det adaptive immunforsvaret (Burns-Naas et al. 2001).

### 1.3.3 Partikkeldeponering i lungene



**Figur 4:** Matematisk modellering av deponeringsmønsteret for partikler med aerodynamisk diameter på 10 µM, i luftveisforgreining 3 til 5. (Balashazy et al. 2003a).



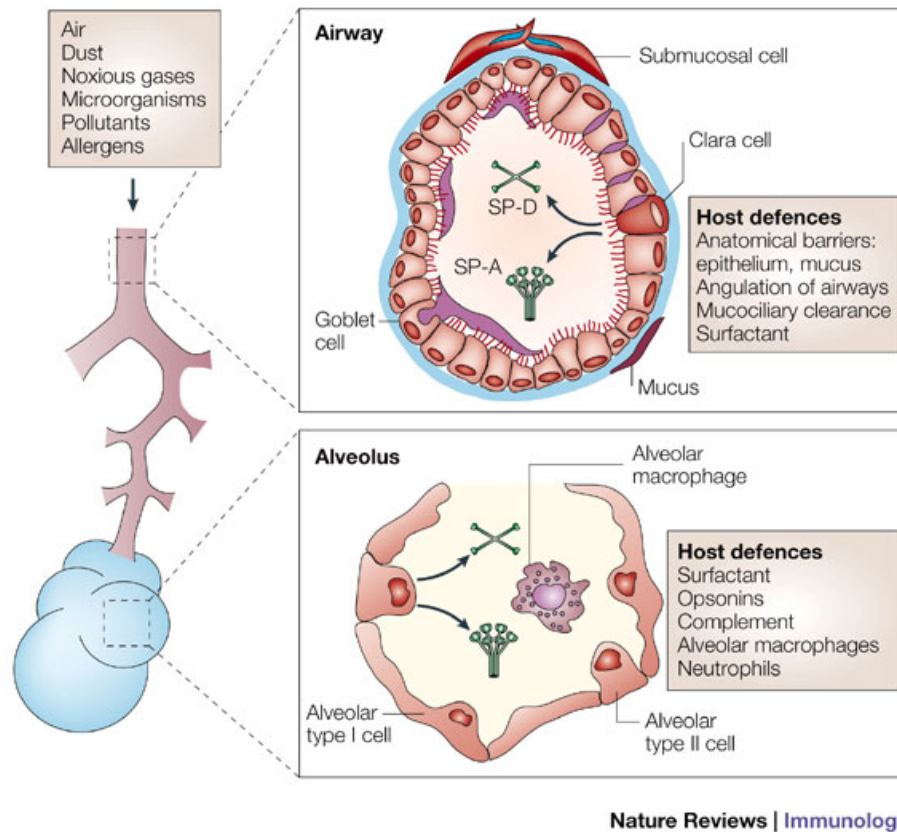
---

Som tidligere nevnt avsettes de største partiklene i nese og svelg ( $> 10 \mu\text{M}$ ), og kommer derfor som regel aldri i kontakt med lungene. Men partikler som er mindre enn dette vil kunne passere svelget og havne i luftveiene. Partikler i finfraksjonen ( $< 2,5 \mu\text{M} - > 0,1 \mu\text{M}$ ) vil kunne havne så langt ned i lungene som til bronkiolene og alveolene, og kan dermed være de mest potente partiklene. Derimot kan så små partikler ofte ha vansker med å bli avsatt i lungene, fordi de vil bli pustet ut av luftveiene på grunn av den lave vekten. Partiklene vil desuten ofte ikke avsettes jevnt fordelt utover i lungene, men synes å konsentreres i enkelte områder, slik at noen regioner kan få en massiv oppkonsentrasjon av partikler, flere hundre ganger over gjennomsnittet for hele lungen. Størst deponering forekommer i forgreiningspunktene i bronkier og bronkioler (figur 4). Dermed er bronkiale epitelceller et relevant modellsystem for å studere effekter av svevestøv, fordi disse cellene er mer utsatt i lungevevet.

Deponering av partikler i lungene påvirkes for øvrig av en rekke individuelle faktorer, inklusive alder, sykdomstilstand og aktivitetsnivå. Spedbarn og personer med lungesykdom som astma og KOLS, grupper som i utgangspunktet er mer sensitive for effekter av svevestøvseksponering, synes også å få avsatt en større del av det inhalerte støvet i lungene enn friske voksne personer (Asgharian et al. 2004).

### **1.3.4 Fjerning av partiklene fra lungene**

Mekanismene for fjerning av fremmedlegemer i lungene (engelsk: "clearance") varierer mellom de ulike områdene av luftveiene. I luftrøret, bronkiene og i bronkiolene vil de cilierte epitelcellene sammen med slim frakte legemene opp fra luftrøret og ned i svelget, hvor de blir uskadeliggjort i magesyren. I alveolene hvor det ikke finnes cilierte celler, fjernes fremmedlegemer i hovedsak ved hjelp av makrofager og fagocytose. Partikler som har havnet i alveolene vil kunne ha lengre "clearance-tid" enn i andre deler av luftveiene, og fremmedsubstansene her kan potensielt være mer skadelig for lungevevet da oppholdstiden blir lengre. En oversikt er vist i figur 5.

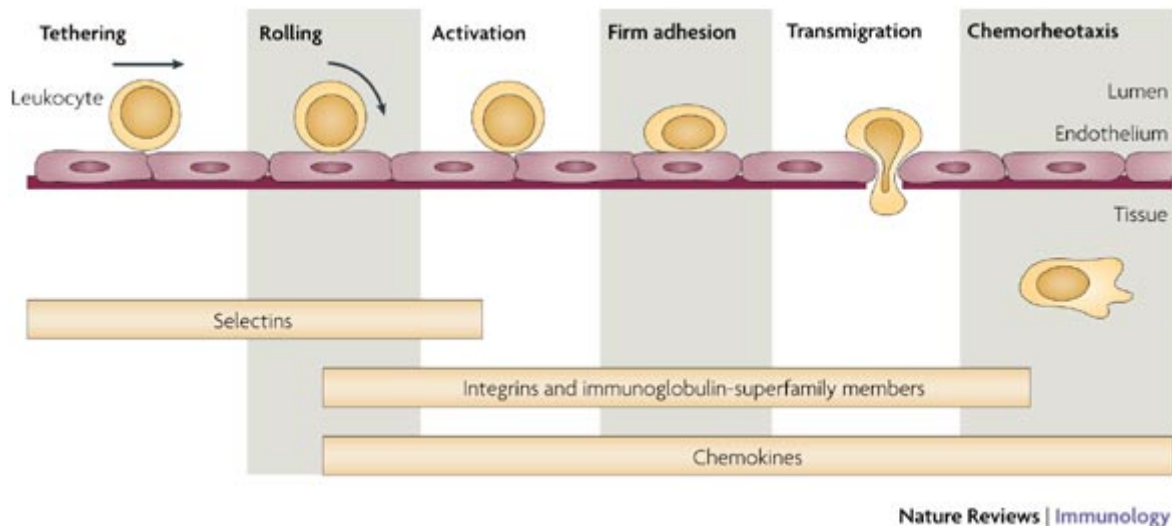


**Figur 5: Illustrasjon over fjerning av partikler i luftveien.** Hentet fra artikkelen til (Wright 2005).

## 1.4 Inflammasjon

Når et patogen invaderer et vev, utløser den nesten alltid en inflammatorisk respons (betennelse). Denne reaksjonen karakteriseres ved smerte, rødhet i huden, varme og hevelse på infeksjonsstedet som følge av forandringer i de lokale blodårene. Blodårene utvider seg og bli permeable ovenfor væsker og proteiner, som er med på å prøve å bekjempe infeksjonen. Epitelcellene som ligger over blodårene blir stimulert til å produsere adhesjonsproteiner, som gjør at hvite blodlegemer blir tiltrukket til stedet, og fester seg i området (figur 6). Inflammasjonsresponsen blir utført ved hjelp av ulike signalmolekyler, som kan være prostaglandiner eller proteiner som cytokiner, blant annet tumor nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  og interleukin (IL)-1, frigitt av aktiverte makrofager og andre celler (Alberts et al. 2002). Inflammasjon kan også bli utløst av reaktive oksygenskader (Pauluhn et al.) eller via direkte celledskade som følge av de inntrengende stoffene. Hvilke responser som fører til hva i cellen, er avhengig av hvilke type cytokiner som blir frigitt (Scapellato and Lotti 2007).

Hos predisponerte grupper som astmatikere og de med KOLS som allerede har en inflammasjon i lungevevet, vil svevestøv kunne føre til nye frigjøringer av betennelsesreaksjoner i bronkiene og indusere inflammasjoner, som igjen kan føre til hyperreaktivitet. De frigitte stoffene vil på nytt kunne føre til en vedvarende inflammasjon, hvor stadig flere monocytter kommer til skadestedet. Slike inflammasjoner kan føre til videre utvikling av astma, hjerte- og lungesykdommer, og i verste fall for tidlig død.

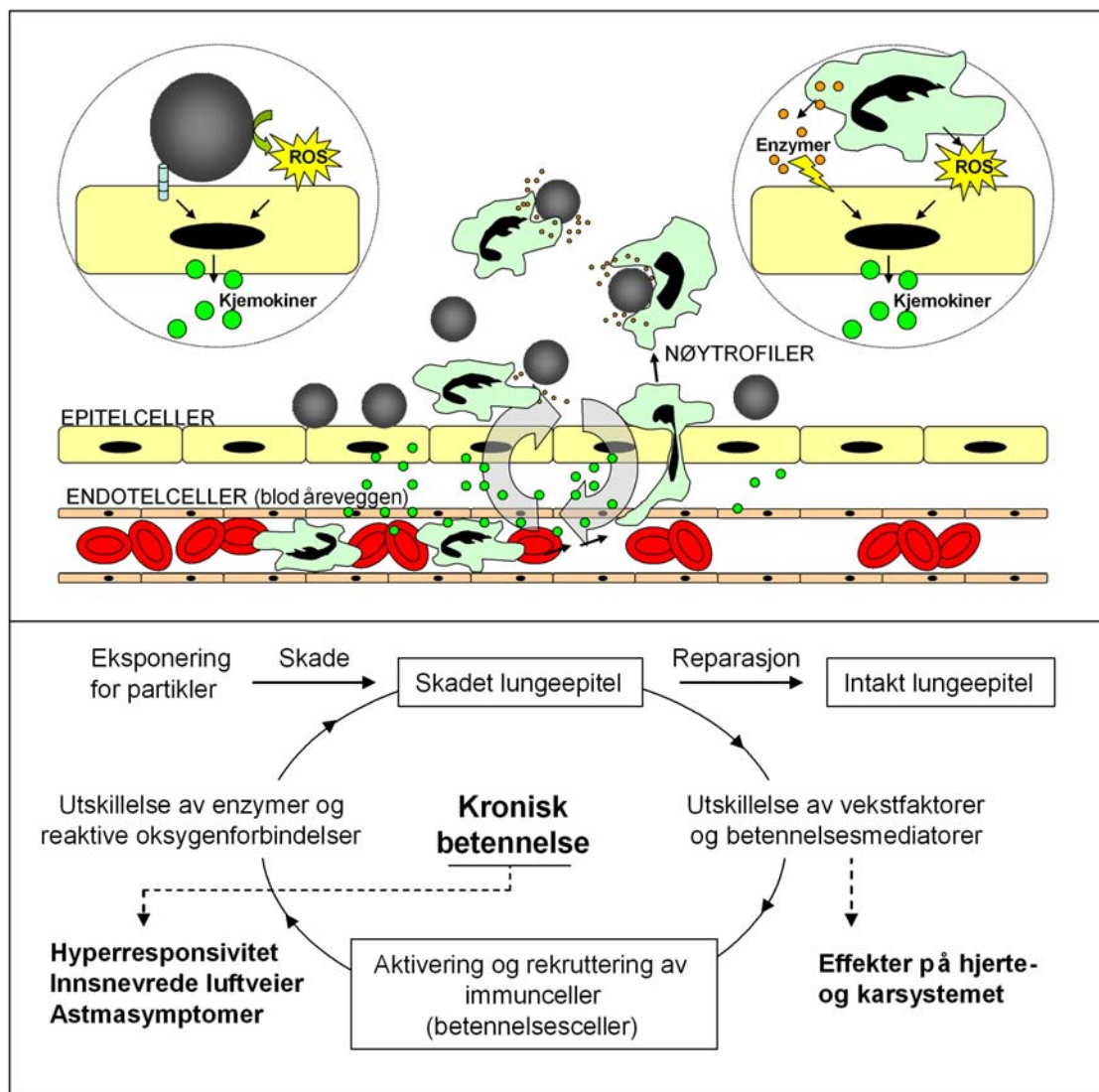


**Figur 6: Illustrasjon av hvordan hvite blodceller (leukocytter) fester seg til endotelet, aktiveres og tas opp i blodcellene under inflammasjon.** Hentet fra (Weber et al. 2007).

### 1.4.1 Lungeinflammasjon

Inhalasjon av svevestøv kan føre til inflammasjon i lungene. De første cellene i forsvarslinjen i lungene er det dekkende epitelcellelaget og makrofagene. Hvordan disse cellene reagerer på svevestøvparklene er viktig for den videre responsen. Aktivisering av betennelsesreaksjoner som frigjøring av cytokiner og kjemokiner, kan tiltrekke seg immunceller som blant annet nøytofiler og T-celler. Disse er spesialiserte celler som bekjemper ulike inntrengere og fremmede stoffer, og kan gi opphav til forskjellige responser som frigjøring av enzymer og dannelse av ROS. Når immunceller skiller ut effektormolekyler som frie radikaler og cytokiner, vil flere og flere immunceller tiltrekkes skadestedet. En langvarig betennelsesreaksjon vil kunne skade lungevevet ytterligere, og en kronisk inflammasjon kan oppstå. Ved nedbrytelse av dødt vev og døde celler, vil de nedbrutte komponentene kunne tas opp av vevet omkring skadestedet. Her skjer det også en hurtig deling av bindevevsceller (fibroblaster) som skiller ut proteiner, og da særlig

kollagen. Disse kan danne arrvev, og kronisk lungeinflammasjon kan dermed føre til at lungene mister noe av sin elastisitet, og da også noe av sin funksjon (Sand et al. 2002a). Dette er svært uheldig for de med nedsatt lungefunksjon, som ofte er mer predisponert for effekter fra fremmedlegemer i luft enn friske mennesker. En oversikt over mekanismer for betennelsesreaksjoner i er gitt i figur 7.



**Figur 7: Mekanismer for betennelsesreaksjoner i lungene.** Betennelsesmediatorer som cytokiner og kjemokiner vil ved inflammasjon trekke til seg immunceller som nøytrofiler og T-celler, til skadestedet. Dette kan føre til lettere skade som kan bli reparert av kroppens eget immunforsvar, eller føre til større ødeleggelser på lungeepitelet, som ved vedvarende stimuli kan føre til en kronisk betennelse i lungene. (Figuren er gjengitt med tillatelse av J. Øvrevik, Nasjonalt folkehelseinstitutt.).

---

## 1.4.2 Cytokiner

Cytokiner er for det meste lavmolekylære proteiner eller glykoproteiner som virker som kjemiske kommunikasjonsmidler mellom celler. De fleste cytokinene skilles ut fra produsentcellen og til omgivelsene, men det finnes også eksempler på at enkelte cytokiner kan forekomme i en membranbundet form. Cytokinene fungerer ikke som effektormolekyler i seg selv (antistoffer, cytotoxiner), men virker først etter binding til spesifikke overflatereseptorer i membranen på celler. De fleste virker autokrint eller parakrint og har dermed stort sett bare lokale effekter, men de kan også virke endokrint (Lea 2006).

Cytokiner har en viktig rolle i immunforsvaret, og er med på å tiltrekke seg lymfocytter, makrofager og andre effektorceller som er med i den immunologiske bekjempelsen. Dermed kan cytokiner være med på aktiveringen av inflammasjonsprosesser ved utskillelse fra skadede celler. Cytokinene har ofte delvis overlappende effekter og påvirker hverandres aktivitet, og er således med i et større funksjonelt nettverk hvor hvert cytokin kan påvirke produksjonen av andre cytokiner (Lea 2006). Selv om cytokiner er viktige for å opprettholde homeostasen, spiller disse proteinene også en kritisk rolle i utviklingen av kroniske luftveisinflammasjoner som er involvert i utviklingen av astma og kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) (Yamagata and Ichinose 2006)

Cytokinene kan deles inn etter både funksjon og struktur, men mest vanlig er det nok å dele dem inn i proteinfamilier etter den kjemiske strukturelle likheten, som videre kan deles inn i subfamilier:

- Hematopoetinfamilien
- Tumornekrose-familien (TNF-familien)
- Kjemokinfamilien

Hematopoetinfamilien er den største familien og omfatter de fleste interleukiner og interferoner, som interleukin (IL)-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -10 og -12. Familien er karakterisert ved fire  $\alpha$ -helixbunter. Tumornekrosefaktor (TNF)-familien inneholder overveiende  $\beta$ -platestruktur, og består av TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CD40 ligand og Fas ligand (Lea 2006). Kjemokinfamilien består av hele 40-50 ulike kjemokiner, og er satt sammen av både  $\alpha$ -helix og  $\beta$ -strukturer. De er små molekyler med størrelsesorden 8-12 kDa (Rollins 1997). Kjemokinene er videre delt inn i fire klasser, alt etter hvordan et par konserverte

---

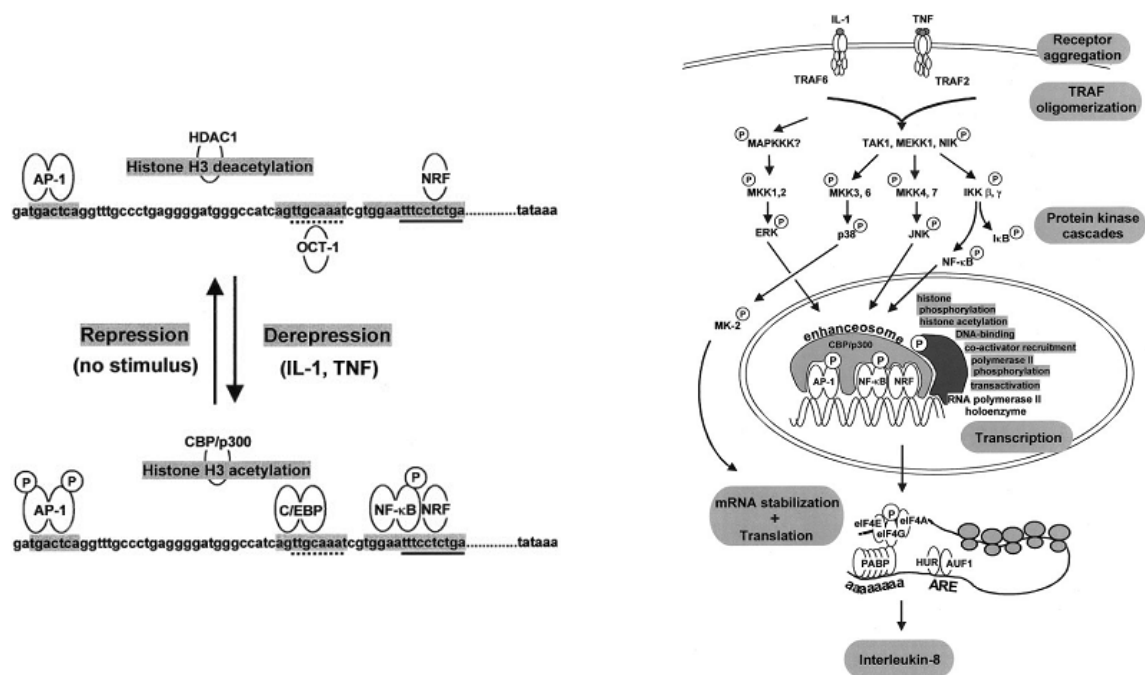
cysteinrester i den N-terminale enden er arrangert: 1) CXC-kjemokiner ( $\alpha$ -kjemokiner) hvor C står for cystein og X for en vilkårlig aminosyre, 2) CC-kjemokiner ( $\beta$ -kjemokiner), 3) C-kjemokiner ( $\gamma$ -kjemokiner) og 4) CX3C-kjemokiner. Kjemokinene virker hovedsakelig som kjemoattraktanter, og produseres ved ulike infeksjons- og betennelsestilstander av en rekke forskjellige celletyper (Lea 2006).

Kjemokiner kan initiere kjemotaksis hos andre celler, som betyr en direkte migrasjon av andre celler til infeksjonsstedet. Kjemokinene induserer denne cellemigrasjonen ved å binde til spesifikke G-protein-bundet overflatereseptorer på målcellene. Disse kjemokinreseptorene har syv transmembrane domener, noe som er unikt blant cytokinreseptorene. Den cellulære oppsamlingen skjer ved hjelp av en kjemotaktisk gradient slik at de inflammatoriske cellene flytter seg mot området med høye kjemokinkonsentrasjoner. Denne gradienten hjelper ikke bare til med å tiltrekke seg celler til skadestedet, men også til å holde dem der når de først har ankommet (Fernandez and Lolis 2002; Mukaida 2003; Remick 2005).

### 1.4.3 Interleukin-8

IL-8, eller CXCL8 som er den nye nomenklaturen, tilhører som navnet tilsier klasse CXC av kjemokinene. Den produseres av flere ulike celletyper, blant annet epitelceller, monocytter, T-celler, neutrofiler og NK- (natural killer) celler. IL-8 blir vanligvis ikke produsert under normale fysiologiske omstendigheter, og produseres derfor ikke av friske celler, men er induserbar via proinflammatoriske cytokiner som IL-1 og TNF- $\alpha$ . Den kan også bli stimulert av bakterier, bakterieprodukter, virus eller viruspartikler. Dermed vil en kunne få en forhøyning av IL-8 i plasma ved mikrobielle infeksjoner (Hoffmann et al. 2002; Mukaida 2003; Remick 2005; Lea 2006). IL-8 er best kjent for å tiltrekke neutrofiler, og påvirker flere prosesser hos dem, blant annet ved frigjøringen av lysosomale enzymer, induksjon av adhesjonsmolekyler og adhesjon på ustimulerte endotelceller (Mukaida 2003). IL-8 blir først syntetisert som en 77 aminosyreforløper, som så blir proteolytisk forkortet til en 72 aminosyre lang kjede. Den binder seg til både CXCR1 og CXCR2, og induserer nesten identisk biologisk aktivitet hos begge (Remick 2005). Etter ligandbindingen vil de humane IL-8 reseptorene bli internalisert og deretter resirkulert, for så å resirkulere til celleoverflaten innen 60 minutter (Mukaida 2003). IL-8 blir produsert tidlig i inflammasjonsresponsen, og vil vare i en lengre periode, opptil dager og uker. IL-8 finner vi ikke hos rotter og mus, noe som har gjort dyreforsøk med dette kjemokinet vanskeligere. På promotoren til IL-8 finner

vi et NF- $\kappa$ B element. Kjernepromotoren for IL-8 inneholder også aktiveringsproteinet (AP)-1 og CAAT/enhancer-bindende protein (C/EBP) elementer, som er vist i figur 8. De sistnevnte er unværlige for aktiveringen av transkripsjon i noen celler, men kreves i andre. Dermed er AP-1 og C/EBP ikke essensielle (som NF- $\kappa$ B) for å indukere induksjonen av IL-8, men kreves for maksimal genekspressjon. Reaktive oksygen forbindelser (ROS), kan aktivere NF- $\kappa$ B, og tilslutt indukere IL-8 transkripsjonen. IL-8 ser ut til å spille en viktig rolle i flere patologiske tilstander, som kronisk inflammasjon, astma, fibrose og kreft (Mukaida 2003; Remick 2005)



**Figur 8: Regulering og induksjon av IL-8.** Til venstre vises reguleringene av den basale og induerte IL-8 transkripsjonen, med noen av aktørene involvert. Til høyre vises stegene i den essensielle cytokinmedierte signaliseringskaskaden hvor IL-8 til slutt blir dannet. Hentet fra (Hoffmann et al. 2002).

Svevestøv er i mange studier vist å kunne indukere inflammasjon i epitelcellene i lungene, og utskillelsen av IL-8 er målt å øke betraktelig under inflammatoriske responser utløst av svevestøv. Også komponentene på svevestøvet, som metallene  $Zn^{2+}$  og  $Fe^{2+}$ , øker IL-8 ekspressjonen (Ghio 2004; Okeson et al. 2004; Kim et al. 2005; Kim et al. 2006).

### 1.4.4 Interleukin-1

IL-1 er et multifunksjonelt cytokin og påvirker nesten alle celletyper i kroppen, alene eller i samarbeid med andre. IL-1 er et potent inflammatorisk cytokin, hvor marginen mellom fordelsaktige og uakseptable nivåer i kroppen er relativt lav. IL-1 danner en viktig del av den inflammatoriske responsen mot infeksjoner i kroppen. Familien bestod tidligere av tre medlemmer: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  og IL-1 reseptorantagonist (IL-1Ra), men er nå utvidet til også å inkludere IL-18, IL-33 og fem andre medlemmer (Dinarello 1996; Church et al. 2008). IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  blir produsert av monocytter, makrofager og endotelceller, og induisert av proinflammatoriske mediatorer som C5a og TNF. TNF- $\alpha$  og IL-1 $\beta$  har synergistiske faktorer, og er med på induksjonen av blant annet lavt blodtrykk, dannelsen av adhesjonsmolekyler og sekundærproduksjonen av cytokiner som blant andre IL-6 og IL-8 (Hildebrand et al. 2005). I cellene er IL-1  $\alpha$  og  $\beta$  agonister, mens IL-1Ra er en spesifikk reseptor antagonist ovenfor IL-1 reseptorene. Dette betyr at alle formene kan binde seg til reseptoren, men det er bare IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  som ved binding endrer aktiviteten til IL-1 reseptoren. IL-1  $\alpha$  og  $\beta$  er syntetisert som proformer, hvor modningen av hvert cytokin krever spesifikke proteaser som kløyver de til den aktive varianten. IL-1Ra derimot er involvert med et signalpeptid og er enkelt transportert ut av cellen. Det finnes også to former for IL-1 reseptorer, hvor type en reseptor (IL-1RI) omformer et signal, mens type to (IL-1RII) binder IL-1, men omformer ikke signalet videre. En oversikt over noen av medlemmene i IL-1 familien er vist i figur 9.

#### **IL-1 $\alpha$ :**

Det finnes ingen TATA boks i promotorregionen. ProIL-1 $\alpha$  blir syntetisert i tilknytning til mikrotubuli, noe som er ganske uvanlig for protein som blir translatert i endoplasmatiske retikulum. ProIL-1 $\alpha$  er fullt aktiv som proform, og forblir intracellulært. Det motsatte er tilfelle for IL-1 $\beta$  proform som ikke er fullt aktiv, og store mengder blir skilt ut etter deling av en intracellulær protease. Når en celle dør blir proIL-1 $\alpha$  frigjort, og kan da bli delt av ekstracellulære proteosomer. ProIL-1 $\alpha$  kan også bli delt ved aktivering av kalsium-avhengige membranassosierte cysteinproteaser kalt kalpain, som hydrolyserer pro-IL-1 $\alpha$  til moden IL-1 $\alpha$ . Moden IL-1 $\alpha$  er 17 KD langt (Bobayashi et al. 1990; Miller et al. 1994; Dinarello 1997).

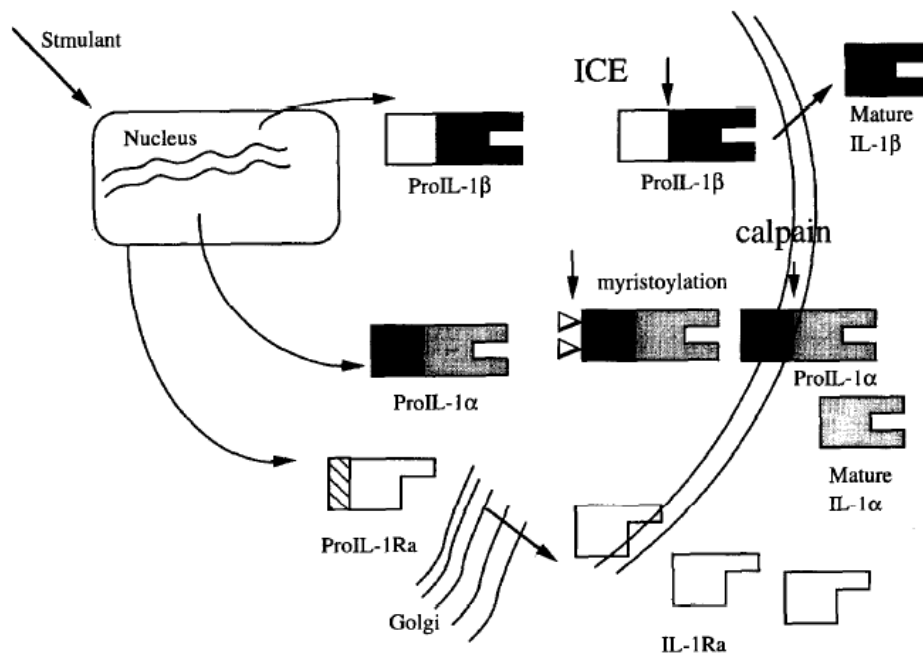


**IL-1 $\beta$ :**

I motsetning til promotoren hos IL-1 $\alpha$ , finnes det en TATA boks hos IL-1 $\beta$ . En finner også et NF- $\kappa$ B lignende sete, samt AP-1. Nesten alle mikrober og mikrobielle produkter induserer produksjonen av de tre IL-1 formene, men også ikkemikrobelle stoffer kan indusere syntesen av IL-1 familien. Ikke alle celler danner pro-IL-1 $\beta$  og skiller ut modent IL-1 $\beta$ , men i den monocytiske cellelinjen kan alle danne pro-formen, og skille ut IL-1 $\beta$  når de blir stimulert (Dinarello 1996). En av hovedfunksjonene til IL-1 $\beta$  er som et pyrogenisk cytokin, og er normalt produsert som en respons på infeksjoner, skader eller ved immunologiske utfordringer; ved minimale konsentrasjoner vil det forårsake feber, hypotensjon og produksjon av enda flere proinflammatoriske cytokiner som eks. IL-6. IL-1 $\beta$  er regulert av mange ulike proteiner, blant annet caspase 1 (også kalt ICE; interleukin-1 converting enzyme) (Church et al. 2008), som proteolytisk spalter pro-IL-1 $\beta$  formen til det aktive IL-1 $\beta$  (Dinarello 1997).

**IL-1 reseptorantagonist (IL-1Ra):**

IL-1 reseptor antagonist er en naturlig forekommende ligand i kroppen, og virker som en hemmer ovenfor IL-1. Den binder til de samme reseptorene som IL-1 gjør, og hindrer dermed IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  fra å sende sine signaler videre i cellen. IL-1Ra passer utmerket til bindingssetet på IL-1 reseptorene, men vil ikke kunne aktivere selve reseptoren til å sende signaler videre, slik som tilfellet for binding av IL-1 er (Dinarello 1997).

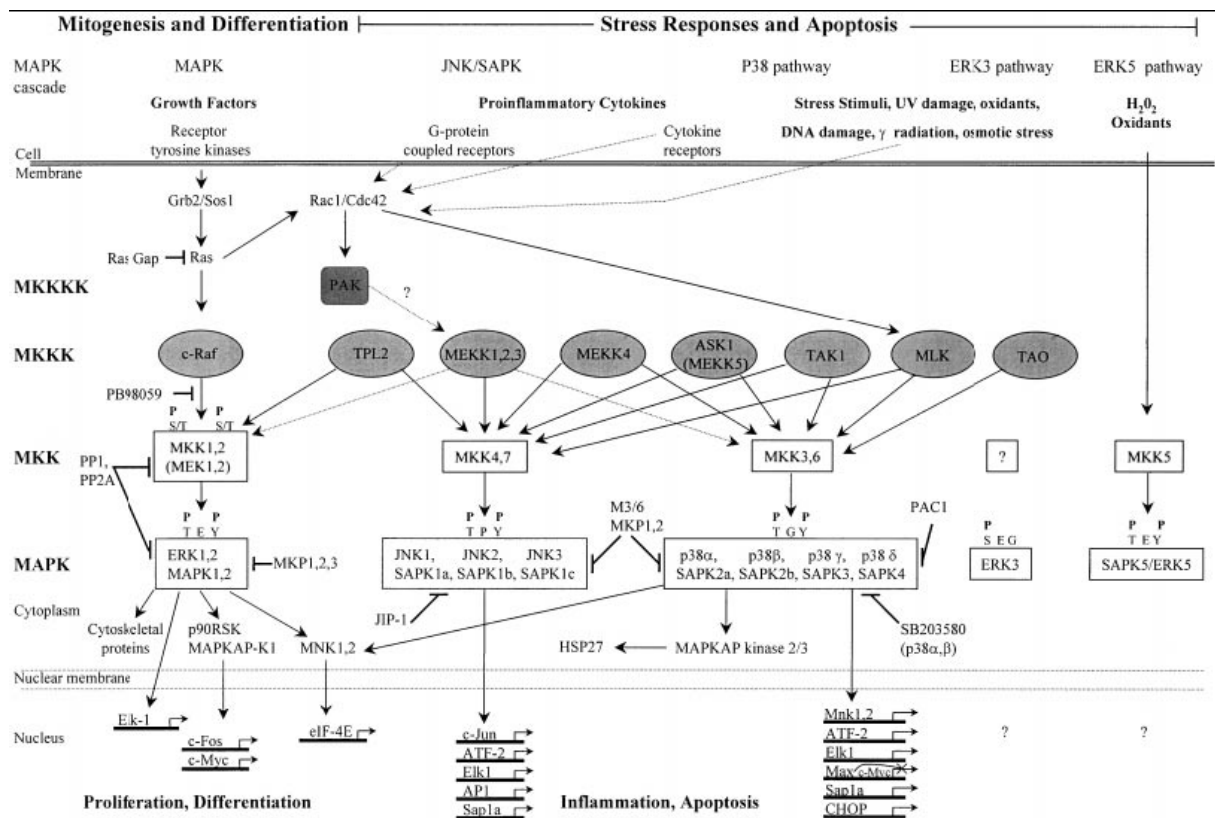


**Figur 9:** Skjematisk fremstilling av syntesen og utskillelsen av IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  og IL-1Ra. ProIL-1 $\beta$  forblir i cytosol til den blir proteolytisk spaltet av ICE (kalpain). Etter spaltingen blir den modne 17 kD formen av IL-1 $\beta$  skilt ut i det ekstracellulære rommet via membran-kanaler. Pro-biten kan bli funnet både utenfor og inni cellen. ProIL-1 $\alpha$  kan forbli i cytosol, eller bli forflyttet til cellemembranen, hvor det kan bli forankret opp. ProIL-1 $\alpha$  kan også bli hydrolysert ved hjelp av proteasen kalpain, som krever kalsium for aktivering. Etter kløyving blir det aktive IL-1 $\alpha$  frigjort ut i det ekstracellulære miljøet. ProIL-1 kan også ”lekke ut” av døende celler. ProIL-1 $\alpha$ , eller bare pro-biten kan intracellulært binde seg til DNA i kjernen. ProIL-1Ra blir translaterert i ER (endoplasmatiske retikulum) og transportert til Golgi. Etter kløyving kan IL-1Ra befinne seg i både cytosol og i det ekstracellulære rom, hvor de kan hemme bindingen til IL-1. (Dinarello 1997).

## 1.5 Mitogenaktiverte proteinkinase signalveier

Det bronkiale epitelet i lungene blir stadig utsatt for ytre stimuli som kan føre til at intracellulære signaliseringskaskader blir aktivert i kroppen. Mitogen-aktiverte protein (MAP) kinaser er serin/threonine spesifikke proteinkinaser som responderer på ekstracellulære stimuli (mitogener) og regulerer forskjellige cellulære aktiviteter, slik som mitose, differensiering og celleoverlevelse/apoptose (Pearson et al. 2001). Kinaser generelt er en type enzymer som overfører fosfatgrupper fra donor-molekyler med høy energi, til spesifikke substrater og målmolekyler, også kalt fosforylering. Aktivering av MAPK er også viktig for uttrykk av gener under inflammasjonsresponsen. Produkter som blir utskilt som følge av disse endringene i genuttrykket er cytokiner, kjemokiner og

adhesjonsmolekyler, som hjelper til med å tiltrekke seg immunceller til skadestedet (Hommes et al. 2003). Aktivering av disse kinasene skjer ved "dual" fosforylering på threonin- og tyrosin-enheter, og krever derfor oppstrøms kinaser med todelt spesifisitet, kalt MAP/ERK (MEK)-kinaser eller MAP-kinase kinaser (MAPKK). Aktiviteten til MEKene i sin tur er styrt av fosforylering, hvor fosforylerte MEKer er enzymatisk aktive. MEK'er er igjen kontrollert av MAP-kinase-kinase kinaser (MAPKKK/Raf) (Hommes et al. 2003). I figur 10 er det vist flere aktiveringsveier.



**Figur 10:** Skjematisk fremvisning av MAP- kinase kaskadene. Direkte (hele linjer) og indirekte (stiplede linjer) aktivering av de ulike MAP- kinasene via ekstracellulære stimuli som vekstfaktorer, cytokiner og oksidativt stress. (Puddicombe et al. 2000).

Av de fem MAP-kinase kaskadene som har blitt oppdaget, er tre av dem godt karakterisert.

- ERK1/2 - de ekstracellulært signalregulerte protein kinasene
- JNK – c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale kinasene
- p38 kinasefamilien

## **ERK**

De mest kjente ERKene er ERK1 og ERK2. De blir begge uttrykt i cellene, men hvor mye i hvert vev er forskjellig. De blir aktivisert av blant annet serum, vekstfaktorer, cytokiner, noe stress og ligander for G protein-bundet reseptorer (Pearson et al. 2001). Den ekstracellulære reseptor kinaseveien omformidler effekten av vekstfaktorer, noe som fører til at celler vokser, differensierer eller deler seg (Samet et al. 1998). Varigheten for ERK1/2 aktiveringen er avhengig av reguleringsmekanismene. Ved fjerning av en eller begge fosfatasene ved tyrosin, serin/threonin eller fosfataser, minker denne aktiviteten. Målorganer er ikke bare transkripsjonsfaktorer, men også membranproteiner som fosfolipase A, og cytoplasmiske proteiner som nedstrøms kinaser. ERK er involvert i flere inflammatoriske prosesser, og er viktig for T-celle aktiveringen via AP-1 familien (Hommes et al. 2003).

## **JNK**

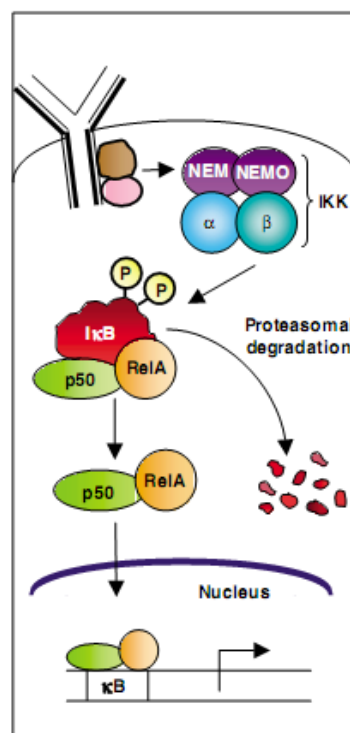
Signaliseringsveien til JNK er aktivert av stress i cellene fra blant annet varme og osmotisk sjokk, lipopolysakkarider (LPS), UV-stråling og proinflammatoriske cytokiner (IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$ ), og er involvert i reguleringen av celledeling og apoptose (Puddicombe and Davies 2000; Hommes et al. 2003). JNK finnes i tre isoformer; JNK-1, JNK-2 og JNK-3 (Puddicombe and Davies 2000; Hommes et al. 2003). For å bli aktivert må JNK fosforyleres to steder, på tyrosin og threonin (Pearson et al. 2001).

## **p-38**

p38 ligner strukturelt en del på JNK, og blir også aktivert av blant annet cytokiner (IL-1, IL-2, IL-7, IL-17, IL-18, TGF- $\beta$ , og TNF- $\alpha$ ), hormoner, G-protein bundne reseptorer, ROS, osmotisk sjokk og ovenfor varme. Men i noen sammenhenger virker faktisk medlemmer av p38 motsatt av hverandre (Pearson et al. 2001). p38 blir assosiert med inflammasjon, cellevekst, celledifferensiering og celledød. Fire isoformer er kjent blant p38 familien: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  og p38 $\delta$ . De ulike isoformene har ulike måsubstrater rundt i kroppen, og utfører ulike funksjoner. Aktiveringen av kinasen skjer via oppstrøms kinaser som MKK3, 4 og 6, mens nedregulering skjer ved fosfataser som kan defosforylere p38. p38 har også blitt påvist å kunne aktivere NF- $\kappa$ B (Hommes et al. 2003). NF- $\kappa$ B aktivering kan føre til blant annet induksjon av IL-8, hvor p38 er med på å stabilisere IL-8 mRNA i cellen (Hoffmann et al. 2002).

## 1.6 Transkripsjonsfaktor NF- $\kappa$ B

Nuclear factor- $\kappa$ B transkripsjonsfaktorer kan både indusere og undertrykke genekspresjon ved å binde til enkelte DNA sekvenser, også kjent som  $\kappa$ B elementer funnet på promotorer. Transkripsjonsfaktorer er proteiner som binder seg til spesifikke deler av DNA ved å bruke  $\kappa$ B seter, og er en del av et system som kontrollerer transkripsjon av genetisk informasjon fra DNA til RNA. I NF- $\kappa$ B familien er det fem medlemmer med to subfamilier; NF- $\kappa$ B proteinene og Rel proteinene.: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1) og p52/p100 (NF- $\kappa$ B2). I de fleste celletyper finnes NF- $\kappa$ B kompleksene tilbakeholdt i cytoplasma av en familie av hemmerproteiner, kalt I $\kappa$ B. Aktivering av NF- $\kappa$ B involverer stort sett fosforylering av I $\kappa$ B fra I $\kappa$ B kinasen (IKK), som resulterer i degradering av I $\kappa$ B. Den klassiske transduksjonsveien av NF- $\kappa$ B er vist i figur 11. NF- $\kappa$ B familien er involvert i flere normale cellulære prosesser, som i immun- og inflammatoriske responser, cellevekst, utviklingsprosesser og apoptose (Gilmore 2006; Perkins 2007).



**Figur 11: Den klassiske signaliseringsveien til NF- $\kappa$ B transduksjon.** NF- $\kappa$ B dimere som p50/p60 er tilbakeholdt i cytoplasma ved interaksjoner med et uavhengig I $\kappa$ B molekyl (ofte I $\kappa$ B $\alpha$ ). Binding av ligander til celleoverflate reseptorer kan få IKK domenenene til å fosforylere I $\kappa$ B, som fører til degradering av I $\kappa$ B-komplekset. Dermed kan NF- $\kappa$ B komme inn i kjernen av cellen og ”slå på” målgenene. Hentet fra (Gilmore 2006).

## 2 Mål med oppgaven

Epidemiologiske data viser at eksponering for svevestøv gir økt risiko for sykdomsutvikling og dødelighet. Inflammasjonsresponser i lungene antas å spille en sentral rolle i utviklingen av både akutte og kroniske helseeffekter ved svevestøvseksponering. Svevestøv inneholder imidlertid en rekke potensielt helseskadelige stoffer, og det er per i dag ikke klart hvilke komponenter som bidrar mest til utvikling av de observerte helseeffektene. Videre er samvirkende effekter mellom ulike forbindelser i svevestøvet lite studert.

Metaller er blant stoffgruppene som antas å være viktigst for utvikling av svevestøvrelatert helseskade. Denne oppgaven fokuserer på inflammasjonsreaksjoner i bronkiale epitelceller (BEAS-2B) etter eksponering for sink og jern, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler som modell på partikkelkjernen til forbrenningsstøv. Interleukin-8 (IL-8), som spiller en sentral rolle i inflammasjonsprosesser ved å aktivere og rekruttere neutrofile celler, er brukt som markør på stoffenes evne til å indusere inflammasjon.

### Hovedmålet:

Studere i hvilken grad sink og jern aktiverer IL-8 produksjon i BEAS-2B, og undersøke reguleringsmekanismene for sink- og jernindusert IL-8. Undersøke eventuelle samvirkende effekter mellom metallene og karbonpartikler.

### Delmål:

- Klarlegge sink og jerns evne til å indusere IL-8-responser og celledød i BEAS-2B celler
- Undersøke betydningen av utvalgte proteinkinaser for regulering av sink- og jernindusert IL-8-responser i BEAS-2B celler
- Undersøke sink og jerns evne til å indusere IL-1-responser i BEAS-2B celler, og studere i hvilken grad IL-1 eventuelt er involvert i sink- og jernindusert IL-8
- Studere samvirkende effekter av metaller og karbonpartikler på BEAS-2B celler, og hvorvidt karbonpartikler forsterker/endrer sink og jernindusert cytokinfrigjøring

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Materialer

<u>Produkt</u>	<u>Produsent</u>
3,3',5,5'-Tetrametylbenzidin (TMB)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Akylamid 30%	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Aprotein	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bio-Rad Dc Protein Assay, Reagent A	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Bio-Rad Dc Protein Assay, Reagent B	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Bio-Rad Dc Protein Assay, Reagent S	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Bovint Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bromfenolblått	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DEPC H <sub>2</sub> O	Nasjonalt Folkehelse institutt
Destillert vann	Octavia
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
dNTP	Applied Biosystems
FeSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Fosfatbufret saltløsning (PBS)	Nasjonalt Folkehelse Institutt
Føtalt kalveserum (FKS)	OneMed (Lagorio et al.)
Glyserin	Merck, Darmstadt, Tyskland
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hydrogenperoksid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Tyskland
IL-1 reseptor antagonist (IL-1RA)	CalBioChem, Cambrige, MA, CA, USA
Isopropanol	Arcus produkter, Norge
Kodak AL 4 X-ray fikseringsvæske	Kodak Norge (Kolbotn, Norge)
Kodak LX 24 X-ray fremkallingsvæske	Kodak Norge (Kolbotn, Norge)
Leupetin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
MOPS	Nasjonalt Folkehelse institutt
Metanol	VWR international
N,N,N,N-tetra-metyl-etylendiamin (TEMED)	BioRad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Natrium-dodecylsulfat (SDS)	Fluka Analytica
Pepstantin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PMFS	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ponceau S	Nasjonalt Folkehelse institutt
Printex 90 (karbonpartikler)	Degussa AG
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Random primers	Applied Biosystems
Restore Western Blot Stripping Buffer	Chemicon International
Revers buffer	Applied Biosystems
Revers transkriptase	Applied Biosystems
Saltvann sterilt	B.Braun
SuperSignaling Substrat	Thernio Scientific (Rockford,USA)

Trizma-Base (Tris-base)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tørrmelk	Fluka Analytica
Vircon	Antec International (Suffolk,UK)
ZnCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
β-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<u>Antistoffer</u>	<u>Produsent</u>
Biotinylert proteinstige	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
IκB	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
p-ERK ½	Santa Cruz, Biotechnology Inc, USA
ERK2	Santa Cruz, Biotechnology Inc, USA
p-JNK	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
B-actin	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
p-p38	Santa Cruz, Biotechnology Inc, USA
p-38	Santa Cruz, Biotechnology Inc, USA
p-p65	MedProbe A/S
p-65	MedProbe A/S
Polyklonalt anti-kanin	Dako Cytomation (Dako Denmark A/S)
Polyklonalt anti-mus	Dako Cytomation (Dako Denmark A/S)
<u>Hemmere</u>	<u>Produsent</u>
MDL 28170	CalBioChem, Cambridge, MA, CA, USA
PD 98059 (hemmer ERK ½)	CalBioChem, Cambridge, MA, CA, USA
SB 202190 (hemmer p38)	CalBioChem, Cambridge, MA, CA, USA
SP 600125 (hemmer JNK)	BioSource International Inc.
Z-YVAD-fmk	CalBioChem, Cambridge, MA, CA, USA
<u>Medium</u>	<u>Produsent</u>
LHC-9 medium	Gibco BRL, Paisley, Skottland, USA
<u>Kit</u>	<u>Produsent</u>
Cytokine ELISA assay for humant IL-8	BioSource International Inc.
Biorad DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Duoset ELISA Development System for humant IL-1 α	BioSource International Inc.
Cytoskine ELISA assay for IL-1β	R&D Systems Inc. (Minneapolis,USA)
Super Array real-time PCR array	SuperArray Custom RT <sup>2</sup> Profiler <sup>TM</sup>
<u>Diverse</u>	<u>Produsent</u>
6-brønners brett	Corning Incorporated
Celledyrkningsflasker	Corning Incorporated
Glassplater	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Støpetårn	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Kammer	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Filterpapir	Whatman (Tyskland)
Strømkilde m/lokk	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA,USA)
Celleskraper	Corning Incorporated (Lagorio et al.)
Eppendorfrør	Plastibrand, Brand GMBH (Tyskland)



---

Nitrocellulosepapir	Whatman (Tyskland)
Spincup	Stratagene
Hansker	Kimberly-Clark (Roswell,USA)
MicroAmp 96-brønners brett	Applied Biosystems

## 3.2 Metoder

### 3.2.1 Celler og dyrkingsbetingelser

Cellelinjen som ble benyttet var BEAS-2B celler fra American Tissue Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Dette er en human cellelinje som har utgangspunkt i normale bronkiale epitelceller transformert med et adenovirus (Ad12SV40). De er klassifisert som biosafety nivå 2, og må derfor behandles deretter med arbeid i biohazard benk. Cellene ble sådd ut i 6-brønners brett på 35 nm i diameter, eller i skåler med diameter på 90 mm. For å holde cellelinjen oppe ble de også sådd ut i flasker. Alle brett og flasker var coatet med kollagen på forhånd. Cellene ble dyrket i LHC-9 medium ved 37 °C i inkubator med fuktig atmosfære og 5% CO<sub>2</sub>.

Etter tre til fire dager, når celletettheten hadde nådd 70-80% av konfluens, ble cellekulturen i flaskene splittet. Flasken ble vasket en gang med 3-4 mL temperert PBS. Tilsatte 1 mL trypsin og tippet flasken frem og tilbake slik at alle cellene ble dekket. Overskudd av trypsin ble sugd av. Flasken ble så satt i inkubator i to-tre minutter, før den fikk et par lette slag i siden, slik at cellene løsnet fra flaskebunnen. 10 mL LHC-9 medium m/ fettfri albumin ble så tilsatt for å inaktivere trypsinet. Cellesuspensjonen ble overført til et sentrifugerør, og sentrifugert på 1200 rpm i 10 minutter ved 4°C. Supernatanten ble sugd av og cellepelletten ble resuspendert i 8 mL LHC-9 medium. Fra mediet med cellepelletten ble celletettheten bestemt ved telling i Burker kammer, med 92 µL medium + 8 µL trypsinblått. Følgende tetthet ble deretter sådd ut i brønner og flasker;

Mandag	1.200 000 celler/flaske	100.000 celler/brønn
Torsdag	1.000 000 celler/flaske	80.000 celler/brønn

Ved hver splitting ble nytt medium skiftet den påfølgende dagen, både i flasker og brønner, med hhv. 15 mL og 1.5 mL LHC-9 medium. Cellene ble så dyrket videre i tre til fire dager i LHC-9 medium, før videre forsøk startet.

### 3.2.2 Metaller og partikler

For metallene ble det laget en stamløsning med  $ZnCl_2$  og en stamløsning med  $FeSO_4$ , som begge ble løst i sterilt saltvann til en konsentrasjon på 6.25 mM. Disse ble oppbevart kaldt og tatt ut før hvert forsøk. Nye stamløsninger ble laget ved synlig utfelling av metallene. Partiklene som ble brukt var karbonpartikler (Printex 90) med en aerodynamisk diameter på 14 nm. Før hvert forsøk ble det laget en stamløsning med Printex 90 partikler løst i LHC-9 medium (1,25 mg/mL). Printex 90 partiklene danner aggregater i løsning. For å løse aggregatene ble stamløsningen sonikert i 3x5 sekunder med en stavsonikator, umiddelbart før eksponering.

### 3.2.3 Eksponeringsbetingelser

BEAS-2B celler ble sådd ut i 6-brønners brett (brønndiameter 35 mm) for cytokin og mRNA forsøk, og i 90 mm skåler for Western, og dyrket til ca. 70-80% konfluens før eksponering. Som generell prosedyre ble mediet tatt av cellene og nytt tilsatt rett før eksponering. Deretter ble løsningene av metaller og karbonpartikler tilsatt.

#### *Bruk av IL-1 reseptorantagonist og ulike enzymhemmere*

IL-1Ra og ulike enzymhemmere ble brukt for å undersøke effekter på metallindusert IL-8. Det ble tilsatt en halv time før eksponering for metallene  $ZnCl_2$  og  $FeSO_4$ . Hemmerene som ble prøvd ut var kalpainhemmeren MDL28170, caspase1 hemmeren Z-YVAD fmk, ERK1/2 hemmeren PD98059, p-38 hemmeren SB202190 og JNK-hemmeren SP600125.

### 3.2.4 Bestemmelse av viabilitet ved fluorescensmikroskopi

Cellenes viabilitet ble undersøkt med fluorescensmikroskop og farging med Hoechst og PI. Hoechst 33342 binder seg til DNA i levende og døde celler, og gir cellene en blålig farge i fluorescensmikroskop. PI derimot binder seg til DNA i cellene via ødelagte cellemembraner, og cellekjernen farges rød. Den er impermeabel ovenfor intakte cellemembraner, og blir vasket bort i vaskeprosessene. På denne måten kan en enkelt skille mellom de levende og døde cellene ved at de blir blå og røde i fluorescensmikroskopet.

---

### *Prosedyre*

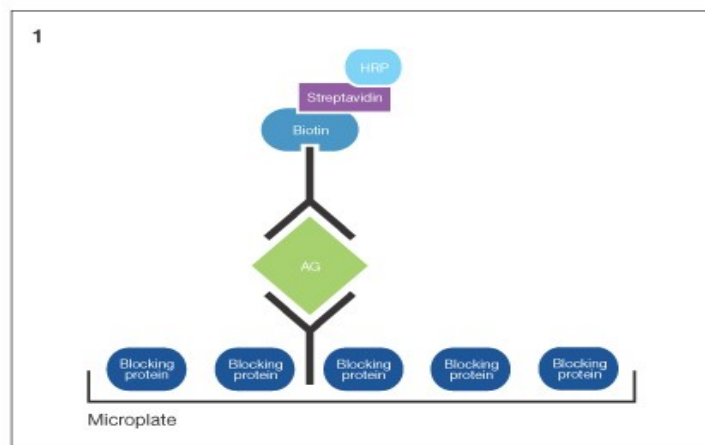
Etter at cellevekstmediet ble høstet til ELISA-formål, ble brettene skylt med PBS to ganger for å skylle bort proteinene. Deretter ble 150  $\mu\text{L}$  trypsin tilsatt hver brønn og brettene ble inkubert ved  $37^\circ\text{C}$  i 1-2 minutter. Brettene ble tatt ut og banket lett mot bordkanten, slik at cellene skulle løsne. For å inaktivere trypsinet ble 500  $\mu\text{L}$  fra en blanding av 20% FKS/PBS tilsatt hver brønn, og celleduspensjonen ble så overført til 1.5 mL eppendorfrør. Pelleten som ble igjen etter sentrifugen fra ELISA-høstingen ble tilsatt de nye eppendorfrøret, og sentrifugert på nytt i 10 minutter ved 1200 rpm ved  $4^\circ\text{C}$ . Supernatanten ble fjernet og pelleten løst i 500  $\mu\text{L}$  medium + 20% FKS. Hver prøve ble så tilsatt 10  $\mu\text{L}$  1:1 blanding av Hoechst 33342 (1 mg/mL) og PI (0.5 mg/mL), blandet godt, og inkubert mørkt i 30 minutter ved romtemperatur. Sentrifugerte så ned cellene i 10 minutter ved 1200 rpm i  $4^\circ\text{C}$ . Fjernet så all væsken fra pelleten, og løste den i ren FKS (5 til 10  $\mu\text{L}$  FKS). Cellene ble så strøket ut over et rent objektglass, og tilslutt tørket med hårføner. Da var de klare til telling i fluorescensmikroskopet. Det ble telt 300 celler for hvert preparat.

### **3.2.5 Måling av cytokiner ved Enzyme-linked immunosorbent assay**

Enzymed-Linked Immunosorbent Assay er et testsystem som blir brukt til å påvise og bestemme mengden eller konsentrasjonen av en substans i en biologisk væske. Antistoffene er gjerne merket, dvs. at de er konjugert med enten isotoper, enzymer, kolloidielt gull, fluorescerende forbindelser eller forbindelser som sender ut lys i form av luminiscens. ELISA kan deles inn i tre typer, direkte, indirekte eller ”sandwich” ELISA. Videre kan de deles inn i konkurrerende eller hemmende ELISA (Lea 2006). Her er det brukt et ”sandwich”-system, med to antistoffer, også kalt two-site analyse, noe som forutsetter at antigenet har to epitoper. Videre brukes det et overskudd av antistoff, og analysen er dermed en ikke-kompetitiv analyse. Det ene antistoffet er et såkalt ”capture”-antistoff, som bindes til bunnen av brønnen. Prøvene som tilsettes vil danne et kompleks med antistoffet i brønnen. Til dette komplekset vil det sekundære deteksjonsantistoffet kunne feste seg via spesifikk binding til antigenet. Streptavidin koblet til et enzym, vil kunne binde til dette komplekset. Enzymet koblet til deteksjonsantistoffet kan omdanne et kromogent eller fluorogent substrat som igjen vil gi et signal. Prinsippet for metoden er skissert i figur 12.

Analysetrinnene er som følgende:

- Antistoff spesifikk for antigenet adsorberes til fast fase, ofte brønn i en mikrotiterplate
- Blokkering
- Prøve settes på, sammen med deteksjonsantistoff, som er spesifikt for antigenet
- Enzym tilsettes
- Substratet tilsettes, dette omdannes ved hjelp av enzymet til et produkt som kan være farget, fluorescerende eller luminiserende
- Avlesning ved hjelp av et optisk instrument



**Figur 12: Prinsipper for ”sandwich”-ELISA** ([www.bendermedsystems.com/high-sensitivity-eli...](http://www.bendermedsystems.com/high-sensitivity-eli...))

### Prosedyre

Mediet fra cellekulturen ble overført til eppendorfrør og sentrifugert på 1200 rpm i 10 minutter ved 4 °C for å fjerne eventuelle celler. Supernatanten ble så overført til nye eppendorfrør og enten brukt umiddelbart eller fryst ned til -70 °C.

IL-1 $\alpha$  ble målt ved hjelp av DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) mens IL-1 $\beta$  og IL-8 ble målt ved hjelp av Cytoset ELISA kit (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Prøver og standarder ble fortynnet for å ligge innenfor dette området. Etter påsetning av enkelte prøver og standarder i duplikater på et 96-brønners Brett, som var coatet med spesifikt antistoff på forhånd, ble det sekundære antistoffet tilsatt og inkubert i to timer. Etter

---

vasking av platen i eget vaskeprogram ble horse raddish peroxidase (HRP) tilsatt, og så ny inkubering på 30 minutter. Deretter ble platen nok en gang vasket i vaskeprogrammet, for så å bli tilsatt tetrametylbenzidin (TMB). Fargen utviklet seg i mørket over tid, og etter maksimum 20 minutter ble det tilsatt stopp-løsning. Resultatet ble så avlest ved hjelp av UV-lys med  $\lambda=450$  nm.

### 3.2.6 Elektroforese og Western immunblotting

Western blot, eller immunoblot, er en metode for å detektere et spesifikt protein fra homogeniserte prøver. Det brukes gelelektroforese til å separere denaturerte proteiner ved hjelp av størrelsen på polypeptidene. Denatureringen skjer ved bruk av  $\beta$ -merkaptoetanol, og tilsatt SDS (natrium dodecylsulfat) i gelen gjør at proteinene danner komplekser med SDS, som vil vandre gjennom gelen pga. det elektriske feltet. Proteinene blir så overført og immobilisert på en nitrocellulosemembran ved bruk av elektroblotting. Fordi proteinene er negativt ladet vil de via strømføring bevege seg mot den positive elektroden, og legger man membranen her, vil den fange opp og immobilisere proteinene. Til slutt kan proteinene bli detektert ved bruk av antistoffer spesifikke for proteinet en studerer. Det sekundære antistoffet er konjugert med peroksidase, som vil luminisere når det blir eksponert for et passende substrat. Ved bruk av Chemiluminescent-deteksjon (ELC) vil man kunne detektere lyset på en fotografisk film.

#### *Prøvepreparering*

Eksponeringen ble stoppet ved at skålene med BEAS-2B celler ble satt direkte på is, mediet sugd av og skålen vasket to ganger med iskald PBS. Skålene med BEAS-2B celler ble deretter frosset ved  $-80^{\circ}\text{C}$ . For å kunne ekstrahere protein ble cellene tatt ut av fryseren og tilsatt lysisbuffer (PMFS (proteasehemmer), aprotinin (hemmer trypsin og proteasehemmere), leupeptin (proteasehemmer), pepstantin A (proteasehemmer), Triton-x (lager porer i cellemembranen) og destillert vann) direkte, og innkubert på is til cellene så vidt begynte å tine. Da ble skålen skrapet med en celleskraper, og overført til 1.5 mL eppendorfrør. Etter lysing av cellene ble løsningen sonikert. For å fjerne karbonpartiklene ble prøvene sentrifugert ved 12000 rpm. Deretter kunne supernatantene bli lagret på  $-80^{\circ}\text{C}$ , eller viderebehandles umiddelbart.

Proteinmengden i de eksponerte prøvene måtte først bli målt før en kunne sette i gang med selve Western Blottingen, for å få den samme proteinkonsentrasjonen i alle prøvene. Dette ble gjort med Bio-Rad DC Protein Assay, som baseres på en reaksjon mellom protein og en alkalisk kobberløsning. Reaksjonen er en reduksjon av folin med kobberkompleks. Komplekset får da en karakteristisk farge som gjør at man kan kvantifisere proteinene. En standardrekke med kjent proteinkonsentrasjon og prøver ble fortynnet 1:10 (5  $\mu$ L prøve + 45  $\mu$ L dest.vann), og ble så pipettert ut på en mikrotiterplate. Deretter ble hver brønn tilsatt reagens A' (2 mL løsning A + 40  $\mu$ L løsning S) 25  $\mu$ L og reagens B 200  $\mu$ L. Alle tre reagenser var fra Kittet. Platen ble inkubert i mørket i 15 minutter før absorbansen ble avlest ved 750 nm på en plateleser (Tecan Sunrise, Phoenix Research Products, Hayward, CA, USA). Etter proteinmåling ble proteinnivået i prøvene justert med lysisbuffer til alle prøvene hadde lik konsentrasjon. Tilslutt ble 5xSDS-PAGE buffer og glyserol tilsatt. Fordi denne bufferen inneholder  $\beta$ -mercaptoethanol som er giftig og kreftfremkallende, ble det jobbet i avtrekksbenken. Prøvene ble så kokt i 2 minutter, og var da klare til å kjøres på gel.

#### *SDS-polyakrylamid gelelektroforese*

Ved bruk av  $\beta$ -merkaptoethanol og SDS i bufferen, ble proteinene i prøvene denaturert. SDS i akrylamidgelen gjorde også at proteinene forble denaturert, og ikke kveilet seg sammen. Ved gelelektroforese ble da proteinene separert etter størrelse. SDS var negativt ladet, og ved binding til proteinene dannet det seg et kompleks som vandret mot den positive elektroden. Mindre proteiner vandret raskere enn de større molekylene gjennom gelen.

#### *Prosedyre*

Brukte 15% separasjonsgel med påfølgende 5% stacking gel, begge av typen SDS-PAGE, som sto i sine respektive kammer med elektroforesebuffer fylt til kanten i kammeret. Tilsatte deretter 5  $\mu$ L standard (både biotinyllert og vanlig) og 10  $\mu$ L av prøvene i hver sine brønner. Kjørte gelene først på 120 V til prøvene var komt på omtrent samme nivå i stackingelen, omtrent 10 minutter, og økte så til 200 V i ca. 40 minutter, til frontmarkøren hadde vandret ut av gelen. Etter elektroforesen ble gelene tatt ut av karet og lagt i skåler inneholdende transferbuffer.

#### *Proteinblotting og immunodeteksjon*

---

Proteinene blir så overført og immobilisert på en nitrocellulosemembran ved bruk av elektroblotting. Fordi proteinene er negativt ladet vil de via strømføring bevege seg mot den positive elektroden, og legger man membranen her, vil den fange opp og immobilisere proteinene. Til slutt kan proteinene bli detektert ved bruk av antistoffer spesifikke for proteinet en studerer. Det sekundære antistoffet er konjugert med peroksidase, som ved senere bruk av Enzym-Linked Chemiluminesce (ELC) vil danne et lys som biprodukt, som kan detekteres på film.

### *Prosedyre*

For å kunne overføre proteinene, ble gelen pakket i en sandwich bestående av tynn pad + filterpapir + nitrocellulosemembran + gel + filterpapir + tynn pad, som hele tiden var dynket i transferbuffer. Det hele ble satt i kassetten riktig vei, og ved hjelp av strøm ble proteinene overført til membranen. Etter ca. 40 minutter på 100 V ble membranen farget med Ponceau S løsning i 10 sekunder og så vasket i rennende vann. Blottene ble så blokkert med 3% tørrmelk i 30 minutter, og var da klare til å bli eksponert for det primære antistoffet.

Alt etter hva som ble oppgitt fra antistoff-leverandøren, ble enten stoffet blandet med 3% tørrmelk eller 5% BSA (bovint serumalbumin) i 2 timer på vippebrett. Etter vaskerunden ble det sekundære antistoffet tilsatt, som også fikk stå i to timer på vippebrett i romtemperatur, eller over natt på 4°C. For deteksjon ble blottene lagt i Chemiluminescence, og fraktet til mørkerommet i en lystett kassett for bildefremkalling. Alt etter hvor sterkt proteinet hadde bundet seg, jo kortere eller lengre tid måtte filmen ligge på blottet. For videre kjøring på blottene ble de strippet i strippeløsning i 15 minutter, så vasket og deretter blottet, før de var klare for nye antistoffer.

### **3.2.7 Måling og kvantifisering av RNA, cDNA og mRNA**

Ved å undersøke mRNA fra cellekulturene vil en kunne få et lite innblikk i hva som skjer i cellen ved for eksempel eksponering for metaller. Det kan også være med på å styrke datasettet en har fått fra andre målinger, eller gi motstridende resultater, som må undersøkes mer. Vi rensket RNA fra cellekulturene våre, som vi videre kunne lage cDNA av, og så undersøke det via RealTime-PCR analyser.

### *Prosedyre*

---

Prøvene ble tint og homogenisert ved filtrering gjennom en kanyle på 21 g fem ganger, for blant annet å fjerne proteiner. RNA ble isolert ved hjelp av Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), i henhold til produsentens prosedyre. Kort fortalt ble RNA bundet til et filter som vaskes og tilsettes DNase for å bryte ned DNA. DNA vaskes bort, og tilslutt elueres RNA ut med RNasefritt vann. RNA vil holdes i filteret så lenge det er salter tilstede som skaper binding. Men når vann tilsettes vil disse bindingene brytes, RNA vil slippe tak i filteret, og kan sentrifugeres ut. Dermed satt en igjen med 60 µL RNA løst i RNasefritt vann. RNA-innholdet i prøvene ble så målt ved å bruke Nanodrop spektrofotometer.

### *Northern Blotting*

For å sjekke kvaliteten på mRNAet og se at det ikke var degradert i fryseprosessen, ble prøvende testet ut ved bruk av Northern Blot. Dette er en teknikk som blir brukt for å studere genuttrykk fra RNA ved bruk av elektroforese. Avhengig av størrelsen på RNAet bruker en enten agarosegel eller polyakrylamidgel. For å denaturere RNAet blir formaldehyd brukt, og en må derfor arbeide i avtrekksbenk.

### *Prosedyre*

Gelutstyret ble først vasket i 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 10 minutter og så skylt i DEPC H<sub>2</sub>O. På grunn av størrelsen på RNAet ble en agarosegel benyttet, som bestod av agarose og MOPS. Gelblandingen kokte vi først i microbølgeovnen til agarosen ble løst i MOPSen. Fordi gelblandingen blir kokt vil en del fordampe bort fra løsning. Derfor ble den veid både før og etter oppvarming, og mer DEPC H<sub>2</sub>O ble tilsatt til riktig mengde var oppnådd. Gelen ble avkjølt litt før foraldehyd ble tilsatt, og gelen støpt mens den sto i avtrekkskap. Prøvene ble så applisert på gelen og vandret mellom en positiv og en negativ pol. Etter endt separasjon ble gelen farget med SYBR Green og båndene for ribosomalt RNA (18S og 28S), som forekommer i store mengder i celler, ble undersøkt. Markerte bånd indikerer intakt RNA, mens såkalt "smearing", dvs. utglidde, diffuse bånd, indikerer degradert RNA som er mindre egnet til videre bruk.

### *cDNA-syntese*



---

For å kunne lage cDNA (komplementært DNA) fra RNA, må en bruke revers transkriptase. Dette enzymet virker på en enkelt tråd av mRNA, som danner dets komplementære DNA ved å parre RNA baseparene (A,U, G og C) til deres DNA komplement (T, A, C og G). For å kunne produsere cDNA ble det brukt en PCR-maskin.

### *Prosedyre*

En mastermiks (revers buffer, dNTP's, random primers, revers transkriptase og vann) ble laget og 25 µL av denne blandingen ble mikset med RNA og vann, som fikk et totalvolum på 50 µL. Disse ble fordelt i PCR-rør, og satt i PCR maskinen. Programmet bestod av tre delprogrammer. De ulike delprogrammene er stort sett bare ulike tempepraturforskjeller, hvor det første steget er 10 minutter på 25°C, slik at trådene blir denaturert. Det andre steget er mer langvarig (2 timer på 37°C), og fører til at primerene kan feste seg på tråden og polymerasen kan begynne å feste dNTP på templatet i 5' til 3'-enden. Til slutt blir det hele varmet opp til 85°C i 30 sekunder, før det blir kjølt ned igjen til 4°C. Da kan prøvene med det nysyntetiserte cDNAet fryses ned, eller brukes direkte videre.

### *RealTime PCR*

For å kunne måle og kvantifisere genuttrykket fra små mengder RNA, må man kunne oppamplifisere gentranskripsjonen man undersøker. En måte å gjøre dette på er ved å først revers transkribere RNA til cDNA, slik som i avsnittet over. Videre kan en oppamplifisere mengdene fra de ønskede sekvensene med ulike primere i prøvene, slik at en til slutt kan analysere og kvantifisere mengdene mRNA og relativ genekspressjon ved hjelp av software-programmer som 7000FAST fra Applied BioSystems. Ved hver syklus kan en måle mengdene gensekvenser som blir oppamplifisert, og dermed navnet Real-time PCR. Først blir prøvene varmet opp til 50°C i 2 minutter, og så vider opp til 95°C i 10 minutter. Deretter ble prøvene kjørt gjennom 40 temperatursykluser bestående av oppvarming til 95°C i 15 sekunder, etterfulgt av en nedkjøling til 60°C i 1 minutt. For hver syklus som blir kjørt igjennom, vil mer og mer av gensekvensene bli oppregulert, til den når et platå. Oppreguleringen blir så kvantifisert opp mot referansegener, som 18S eller GAPDH, og kan således gi oss et bilde på om genene vi undersøker er oppregulert eller ikke.

### *Prosedyre*

---

cDNA fra tidligere ble fortynnet 1:9 med RNasefritt vann. En RealTime-mastermix ble så laget i en separert benk egnet for dette, slik at ikke noe DNA-forurensning kan forekomme. Denne blandingen består av en ferdiglaget mastermix tilsatt den ønskede primer/probe en ønsker å undersøke. De ulike mastermixene ble fordelt etter oppsett i 96-brønners RealTime plate, 11  $\mu\text{L}$  pr brønn. Brettet ble dekket, og arbeidsplass ble byttet. Deretter ble 9  $\mu\text{L}$  av cDNAprøvene tilsatt hver brønn, for så å bli sentrifugert i 1 minutt ved 1000 rpm, slik at alt ble samlet i bunnen av platen. Tilslutt ble platen plasert i Real-time PCR maskinen, der prøvene først ble varmet opp til  $95^{\circ}\text{C}$  i 10 minutter. Deretter ble prøvene kjørt gjennom 40 temperatursykluser, bestående av en 15 sekunders inkubering ved  $95^{\circ}\text{C}$  etterfulgt av 60 sekunder ved  $60^{\circ}\text{C}$ . Det ble undersøkt for tre gener, IL-8, IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$ , alle hver for seg. For hver prøve ble det beregnet en CT-verdi ("threshold cycle") ved hjelp av real-time maskinens software. CT-verdien angir hvor mange varmesykluser som må til for at RNA fra et gen utvikler en fargereaksjon som er sterk nok til å nå en gitt grenseverdi. Dess mer RNA som finnes i prøven, dess færre varmesykluser trengs for å nå denne grenseverdien. En lav CT-verdi indikerer dermed at genet er høyt uttrykt, mens en høy CT-verdi indikerer at genet er lavt uttrykt. Siden prøvene ble kjørt gjennom 40 sykluser vil CT-verdien være i størrelsesorden 0-40. Prøver med CT-verdier større eller lik 35 ble ansett som negative (ingen genekspressjon). Hver prøve ble så normalisert mot 18S, og uttrykt som gangers økning i forhold til de ubehandlede kontrollene, ved bruk av formelen  $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ , hvor  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct prøve} - \text{Ct 18S kontroll})$ .

For å "screene" effektene av metallene, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler, på et større antall cytokin-og kjemokingener, benyttet vi også et 17-geners real-time PCR array. Samme prosedyre ble fulgt som ovenfor, bortsett fra at prøvene her ble normalisert mot GAPDH og ikke 18S. Gangers økning i forhold til de ubehandlede kontrollene, ble igjen beregnet ved bruk av formelen  $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ , hvor  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct prøve} - \text{Ct GAPDH}) - (\text{Ct kontroll} - \text{Ct, GAPDH})$ .

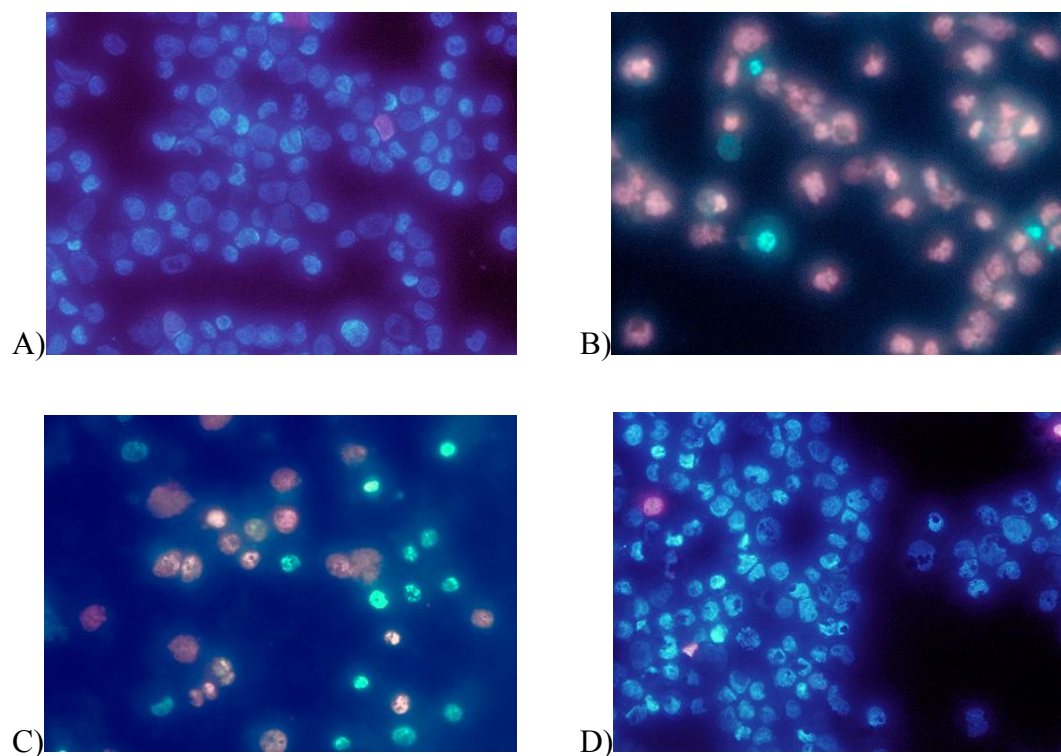
### **3.2.8 Statistikk**

Statistisk signifikans ble beregnet ved en-veis eller to-veis ANOVA med Bonferroni post-test. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM (standard error of mean). Alle analysene ble utført ved hjelp av GraphPad Prism 4 software.

## 4 Resultater

### 4.1 Viabilitet

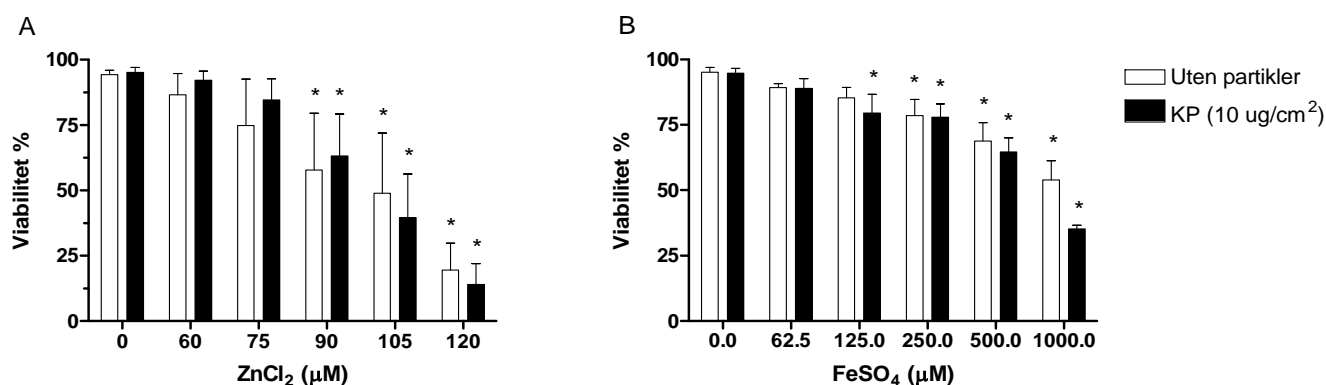
For å studere effekten av sink og jern på viabiliteten til BEAS-2B celler, ble de farget med PI og Hoechst 33342 og studert ved fluorescensmikroskopi, som beskrevet under materialer og metoder. PI-positive celler som ble farget røde, ble betegnet som døde, mens de PI-negative cellene, som hadde en blå farge, var viable. Figur 13 viser eksponerte og ueksponerte BEAS-2B celler etter farging med PI og Hoechst.



**Figur 13: Viabilitet av eksponerte BEAS-2B celler.** Bildene i figur 13 ble tatt med kamera festet til et fluorescensmikroskop, som enkelt kan skille mellom viable (blåe) og døde (røde) celler, da membranskadete celler tar opp PI og farger cellekjernen rød. Intakte celler derimot forblir blålige. På denne måten er det enkelt å telle cellene. A) viser ueksponerte celler, B) er celler som har blitt eksponert for 105  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , C) er celler som har blitt eksponert for 500  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , mens bilde D) viser ueksponerte celler med karbonpartikler. Alle eksponeringene er etter 24 timer. Bildet er tatt ved 40x forstørrelse i et fluorescensmikroskop.

### 4.1.1 Viabilitet til BEAS-2B celler eksponert for sink og jern, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler

Effekten av økende konsentrasjoner av  $\text{ZnCl}_2$  og  $\text{FeSO}_4$ , alene eller i kombinasjon med karbonpartikler, på viabiliteten til BEAS-2B celler er vist i figur 14. Både sink og jern induserte en signifikant, konsentrasjonsavhengig reduksjon i celleviabiliteten. Sink ser ut til å være mest potent, og ga økt celledød ved lavere konsentrasjoner enn  $\text{FeSO}_4$ . Viabiliteten for ueksponerte celler lå på 90%, og allerede ved 90  $\mu\text{M}$  sink ble det en signifikant reduksjon i viabiliteten. Jern induserte en signifikant reduksjon fra 250  $\mu\text{M}$ , mens karbonpartiklene her ga en signifikant reduksjon fra 125  $\mu\text{M}$ . Karbonpartikler ga likevel ikke noen signifikant endring i viabiliteten sammenlignet med metallene alene. Den høyeste konsentrasjonen sink ga en viabilitet på 20%, den høyeste konsentrasjonen jern ga 54%.



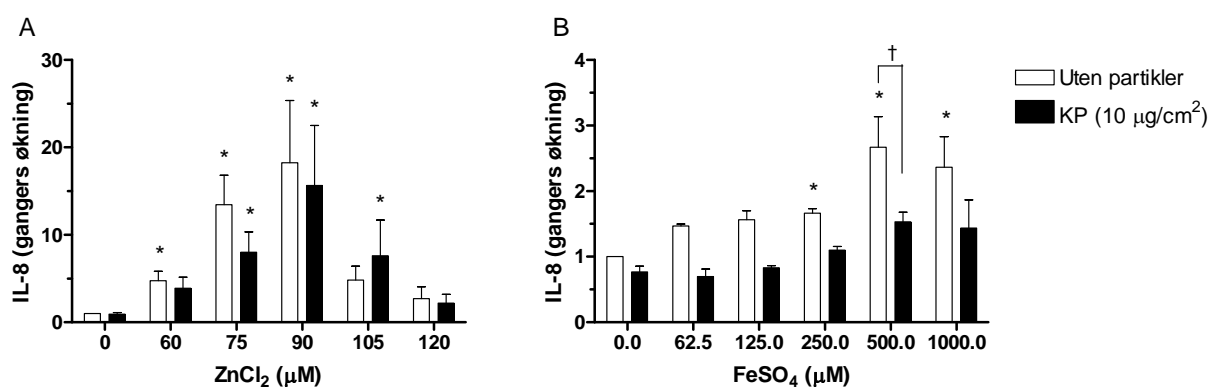
**Figur 14: Viabilitet av BEAS-2B celler eksponert for  $\text{ZnCl}_2$  (A) og  $\text{FeSO}_4$  (B).** Cellene ble eksponert for økende konsentrasjoner av  $\text{ZnCl}_2$  og  $\text{FeSO}_4$  samt en konstant konsentrasjon av karbonpartikler (KP), i 24 t ( $n = 4$ ). \* Signifikant forskjellig fra ubehandlede kontrollceller ( $P < 0,05$ ).

## 4.2 IL-8 responser

### 4.2.1 IL-8 utskillelse fra BEAS-2B celler eksponert for sink og jern, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler

For å undersøke effekter sink og jern hadde på IL-8 i BEAS-2B celler, og mulige samvirkende effekter mellom metaller og karbonpartikler, ble kulturene eksponert i 24 timer for økende konsentrasjoner  $\text{ZnCl}_2$  (0-120  $\mu\text{M}$ ) og  $\text{FeSO}_4$  (0-1000  $\mu\text{M}$ ) alene eller i kombinasjon med 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  karbonpartikler. Eksponering for sink ga en

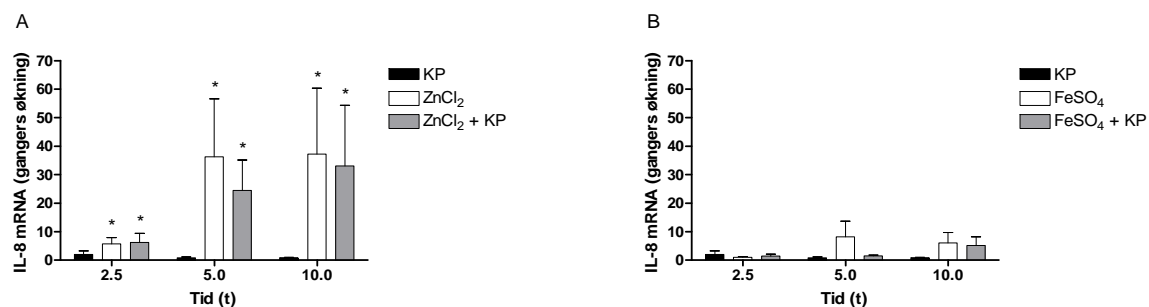
konsentrasjonsavhengig økning i IL-8 frigjøringen som var signifikant allerede fra 60  $\mu\text{M}$ , og med en maksimumsrespons ved 90  $\mu\text{M}$ . En samtidig eksponering med karbonpartikler ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ga en svak, men ikke signifikant, reduksjon i den sinkinduserte IL-8 utskillelsen (figur 15 A). Eksponering for jern ga også en konsentrasjonsavhengig økning i IL-8 utskillelsen fra BEAS-2B cellene. Imidlertid var effekten av jern først signifikant ved 250  $\mu\text{M}$ , og nådde en maksimumsrespons ved 500  $\mu\text{M}$  (figur 15 B). Økende konsentrasjoner av karbonpartikler ( $0\text{-}20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) alene eller i kombinasjon med 75  $\mu\text{M}$  sink eller 250  $\mu\text{M}$  jern ga ingen økning i IL-8 frigjøringen fra BEAS-2B celler. Derimot så økende partikkelkonsentrasjoner ut til å kunne gi en reduksjon i IL-8 nivåene sammenlignet med ubehandlede kontroller (resultater ikke vist).



**Figur 15: Frigjøring av IL-8 fra BEAS-2B celler eksponert for sink og jern.** Cellene ble eksponert for økende konsentrasjoner av  $\text{ZnCl}_2$  (A) og  $\text{FeSO}_4$  (B) med eller uten en konstant konsentrasjon av karbonpartikler (KP). Cellevekstmediet ble høstet etter 24 timer og analysert for IL-8 ved hjelp av ELISA ( $n \geq 3$ ) \* Signifikant forskjellig fra ubehandlede kontrollceller ( $P < 0,05$ ) † Signifikant forskjellig fra KP-behandlede celler.

#### 4.2.2 IL-8 genekspressjon i BEAS-2B celler eksponert for sink og jern, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler

Før cytokinmåling ved ELISA ble cellevekstmediet sentrifugert for å fjerne løse celler og partikler. Da karbonpartikler har vært vist å kunne binde IL-8 fra mediet (Kocbach et al. 2008b), kan det tenkes at den partikkelinduserte reduksjonen i IL-8 responsen skyldes at vi hadde mistet noe av IL-8 da partiklene ble sentrifugert vekk. For å unngå denne mulige feilkilden undersøkte vi også IL-8 responsen på mRNA nivå ved real time PCR.



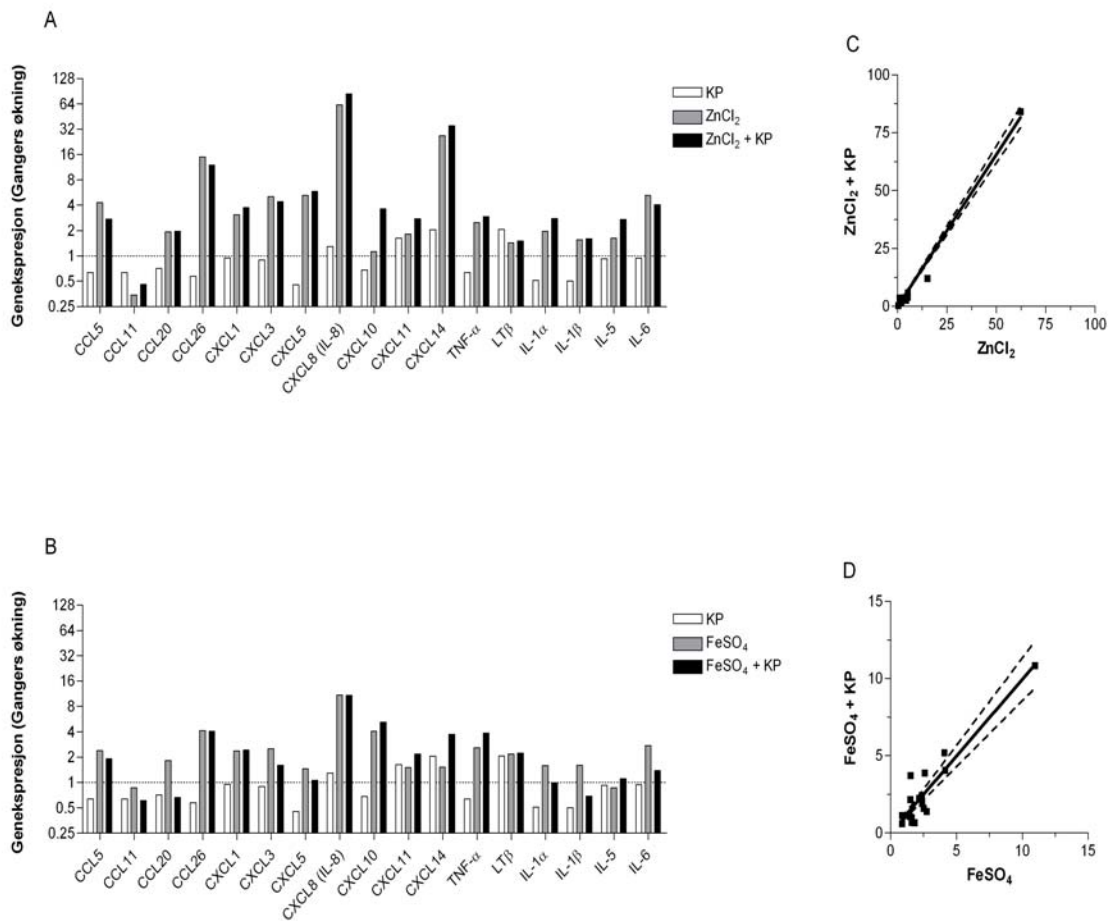
**Figur 16: IL-8 genekspressjon i BEAS-2B celler eksponert for karbonpartikler, sink og jern, alene eller i kombinasjon.** Cellene ble eksponert for 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  karbonpartikler (KP), 75  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , eller kombinasjon av karbonpartikler og metall, i 2.5 timer, 5 timer og 10 timer. IL-8 mRNA fra cellelysater ble målt ved hjelp av real-time PCR. Verdiene er gitt som gangers økning i forhold til ubehandlede kontrollceller ved hvert tidspunkt. (n = 4). \* Signifikant oppregulert genekspressjon ( $P < 0,05$ ).

For å undersøke tidsforløpet for IL-8 responsen, ble cellevekstmediet høstet ved tre tidspunkter; ved 2.5, 5 og ved 10 timer. Kulturene ble eksponert for 75  $\mu\text{M}$  sink eller 250  $\mu\text{M}$  jern, alene eller i kombinasjon med 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  karbonpartikler. Sink, alene eller i kombinasjon med karbonpartikler ga en signifikant oppregulering i IL-8 ekspressjonen ved alle tidspunktene (figur 16 A). Også jern, med og uten karbonpartikler, syntes å gi en oppregulering i IL-8 ekspressjonen, men denne responsen var imidlertid betydelig lavere enn den sink-induserte responsen, og ikke statistisk signifikant (figur 16 B). Karbonpartikler alene ga ingen signifikant oppregulering av IL-8 ekspressjonen. Partiklene syntes også å gi en svak reduksjon eller forsinkelse av de metallinduserte IL-8 mRNA nivåene, men denne mulige reduksjonen/hemmingen var ikke statistisk signifikant.

#### 4.2.3 Ekspressjon av andre cytokin- og kjemokingener – mRNA screen

For å undersøke om flere cytokin- eller kjemokingener ble oppregulert ved eksponering for metaller alene eller i kombinasjon med karbonpartikler foruten IL-8, ble det laget et real time PCR oppsett med 17 ulike gener. Prosedyren ble gjort som nevnt under metoddelen, og resultatene viste tydelig at IL-8 er sterkt oppregulert av metalleksponering. Også IL-14, IL-6 og CCL26 ble noe oppregulert. Oppregulering av de 17 genene er vist i figur 17. Figur 17 C og 17 D viser korrelasjon mellom metallene alene og metallene i kombinasjon med karbonpartikler. Som en kan se fra figurene er begge metallene sterkt korrelert med

kombinasjonseffekten av metaller og karbonpartikler sammen. Sink er noe mer korrelert med kombinasjonseffekten enn det jern er.



**Figur 17: Ekspresjon av 17 forskjellige cytokin- og kjemokingener i BEAS-2B celler eksponert for karbonpartikler, sink og jern, alene eller i kombinasjon.** Cellene ble eksponert for 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  karbonpartikler (KP), 75  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub>, 250  $\mu\text{M}$  FeSO<sub>4</sub>, eller i kombinasjon av karbonpartikler og metall, i 10 timer. mRNA fra cellelysater ble målt ved hjelp av et real-time PCR array (A og C). Figuren viser også forholdet mellom geneekspressjonsmønstrene induisert av ZnCl<sub>2</sub> alene og ZnCl<sub>2</sub> i kombinasjon med karbonpartikler (B), og geneekspressjonsmønstrene induisert av FeSO<sub>4</sub> alene og FeSO<sub>4</sub> i kombinasjon med karbonpartikler (D). Verdiene er gitt som gangers økning i forhold til ubehandlede kontrollceller (n = 1).

### 4.3 Signalveier involvert i sink-og jernindusert IL-8 responser

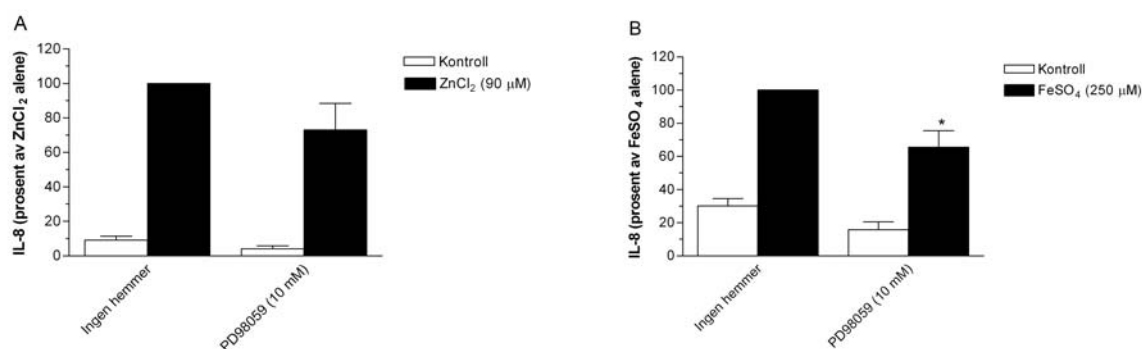
Aktiveringen av MAP-kinaser og transkripsjonsfaktoren NF- $\kappa$ B er ofte involvert i regulering av IL-8 responser. Vi undersøkte derfor i hvilken grad ulike MAP-kinasehemmere kunne



påvirke IL-8 frigjøringen fra BEAS-2B celler eksponert for partikler og metaller, og i hvilken grad partikler og metaller induerte fosforylering av MAP-kinasene ERK, p38 og JNK, samt endringer i I $\kappa$ B-nivåer i cellene.

### 4.3.1 Betydningen av ERK1/2 aktiveringen

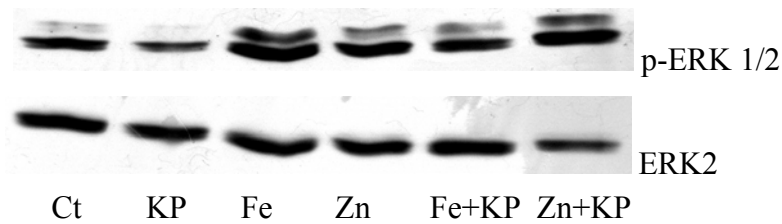
*Hemming av ERK1/2-aktiviteten:* BEAS-2B cellekulturen ble forbehandlet i en halv time med ERK hemmeren PD98059, før metall-eksponering. Tilstedeværelsen av PD98059 påvirket ikke signifikant utskillelsen av sink-indusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B cellene (figur 18 A). Den jern-indusert IL-8 frigjøringen ble signifikant hemmet (figur 18 B) i forhold til kontroll. Basalnivåer ble ikke påvirket.



**Figur 18: Betydningen av ERK1/2 for sink- og jernindusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B celler.**

Cellekulturen ble tilsatt 10 μM/mL PD98059 en halv time før eksponering for 90 μM ZnCl<sub>2</sub> (A) eller 250 μM FeSO<sub>4</sub> (B). Cellevekstmediet ble høstet etter 24 timer og analysert for IL-8 ved hjelp av ELISA (n = 3). \* Signifikant effekt av PD98059 (P < 0.05).

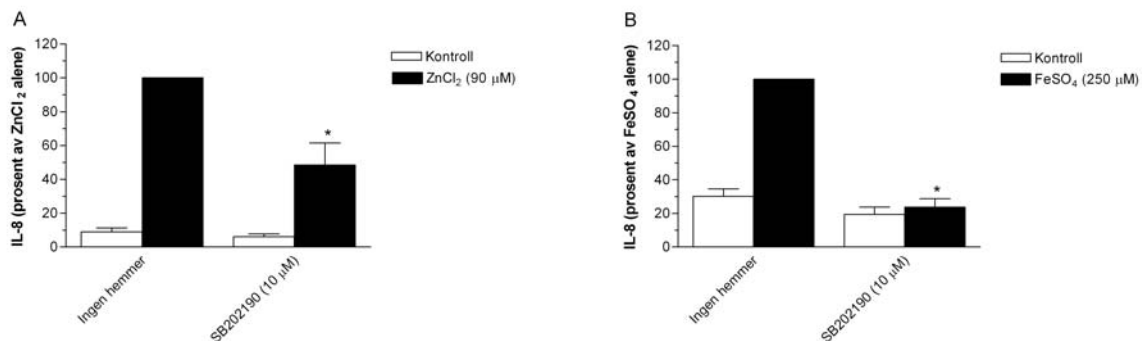
*ERK-aktivering:* Figur 19 viser Western Blot av total ERK2 og fosforylert ERK1/2. Cellene ble eksponert i 1 time. ERK ser ut til å kunne være litt oppregulert av både ZnCl<sub>2</sub> og FeSO<sub>4</sub>, mens KP alene ikke har noen synlig effekt. Derimot kan det se ut som om kombinasjonen FeSO<sub>4</sub> og KP ga en nedregulert effekt, mens den hos ZnCl<sub>2</sub> ga motsatt effekt, med en liten oppregulering.



**Figur 19: Fosforylering av ERK i BEAS-2B cellekulturer etter 1 times eksponering.** Eksponeringen er som følger; Kontroll, KP (10 µg/mL) FeSO<sub>4</sub> (250 µM), ZnCl<sub>2</sub> (75 µM), FeSO<sub>4</sub>+KP og ZnCl<sub>2</sub>+ KP. Figuren viser både den fosforylerte ERK1/2 og total ERK. Figuren viser et representativt blott (n=4).

### 4.3.2 Betydningen av p38 aktiveringen

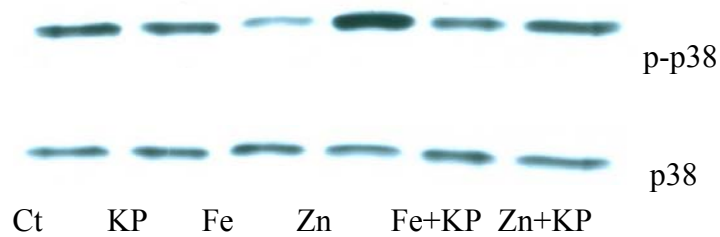
*Hemming av p38-aktivitet:* BEAS-2B cellekulturen ble forbehandlet i en halv time med p38 hemmeren SB202190, før metall-eksponering. Tilstedeværelsen av SB202190 ga en signifikant nedgang i utskillelsen av sink-indusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B cellene (figur 20 A). Den jern-indusert IL-8 frigjøringen ble også signifikant hemmet (figur 20 B) i forhold til kontroll. Basalnivåer ble ikke påvirket.



**Figur 20: Betydningen av SB202190 for sink- og jernindusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B celler.**

Cellekulturene ble tilsatt 10 µM/mL SB202190 en halv time før eksponering for 90 µM ZnCl<sub>2</sub> (A) eller 250 µM FeSO<sub>4</sub> (B). Cellevekstmediet ble høstet etter 24 timer og analysert for IL-8 ved hjelp av ELISA (n = ≥ 3). \* Signifikant effekt av SB202190 (P < 0.05).

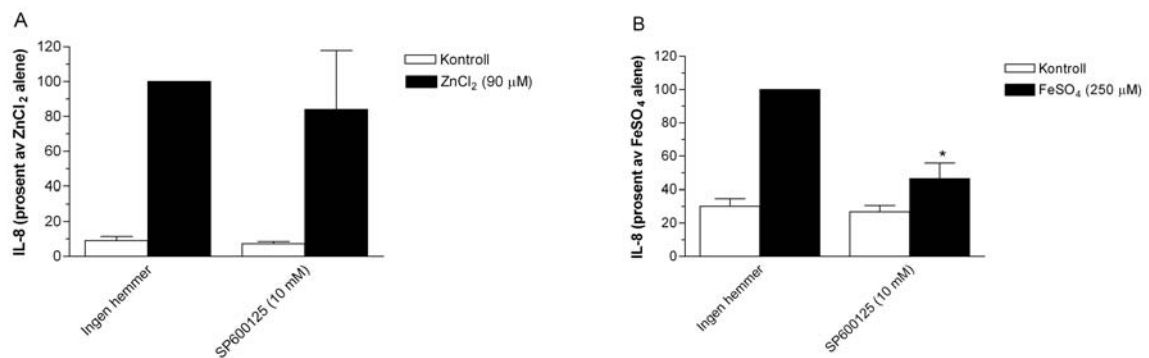
*p38-aktivering:* Den fosforylerte varianten av p38 har en molekylvekt på 38 kDa, og figur 21 viser både den fosforylerte p38 og den totale p38. Eksponeringen skjedde i 1 time. p38 så ut til å bli fosforylert ved ZnCl<sub>2</sub> eksponering, mens eksponering for FeSO<sub>4</sub> så ut til å gi en nedregulering av fosforyleringen.



**Figur 21: Fosforylering av p38 i BEAS-2B cellene etter 1 times eksponering.** Eksponeringen er som følger Kontroll, KP (10 µg/mL) FeSO<sub>4</sub> (250 µM), ZnCl<sub>2</sub> (75 µM), FeSO<sub>4</sub>+KP og ZnCl<sub>2</sub>+KP. Figuren viser både den fosforylerte p-p38 og total p38. Figuren viser et representativt blott (n=4).

### 4.3.3 Betydningen av JNK aktiveringen

*Hemming av JNK-aktivitet:* BEAS-2B cellekulturen ble forbehandlet i en halv time med JNK hemmeren SP600125, før metall-eksponering. Tilstedeværelsen av SP600125 ga ikke en signifikant nedgang i utskillelsen av sink-indusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B cellene (figur 22 A), men en delvis hemming syntes likevel å forekomme. Den jern-indusert IL-8 frigjøringen ble signifikant hemmet (figur 22 B) i forhold til kontroll. Basalnivåer ble ikke påvirket.



**Figur 22: Betydningen av SP600125 for sink- og jernindusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B celler.**

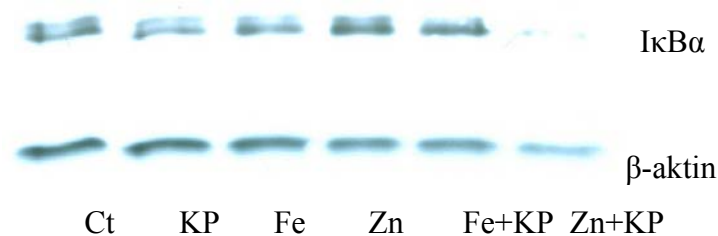
Cellekulturene ble tilsatt 10 µM/mL SP600125 en halv time før eksponering av 90 µM ZnCl<sub>2</sub> (A) eller 250 µM FeSO<sub>4</sub> (B). Cellevekstmediet ble høstet etter 24 timer og analysert for IL-8 ved hjelp av ELISA (n = ≥ 3). \* Signifikant effekt av SP600125 (P < 0.05).

*JNK-aktivering:* Ved fosforylering av JNK-1 og JNK-2 vil en få opp band på hhv. 46 og 54 kDa. Ved Western Blot kan det virke som ikke antistoffet virker som det skal, og ved fremkalling kommer ingen bånd til syne (resultater ikke vist).

#### 4.3.4 Betydningen av I $\kappa$ B aktivering

Figur 23 viser Western Blot av I $\kappa$ B og  $\beta$ -aktin. Cellene ble eksponert i 1 time.

Kombinasjonen av sink og karbonpartikler (KP) ser ut til å bli nedregulert i forhold til kontroll, ellers ingen påvirkning.



**Figur 23: Fosforylering av I $\kappa$ B $\alpha$  i BEAS-2B cellene etter 1 times eksponering.** Eksponeringen er som følger; Kontroll, KP (10  $\mu$ g/mL) FeSO<sub>4</sub> (250  $\mu$ M), ZnCl<sub>2</sub> (75  $\mu$ M), FeSO<sub>4</sub>+KP og ZnCl<sub>2</sub>+KP. Figuren viser både I $\kappa$ B $\alpha$ , og dens  $\beta$ -aktin. Figuren viser et representativt blott (n=4).

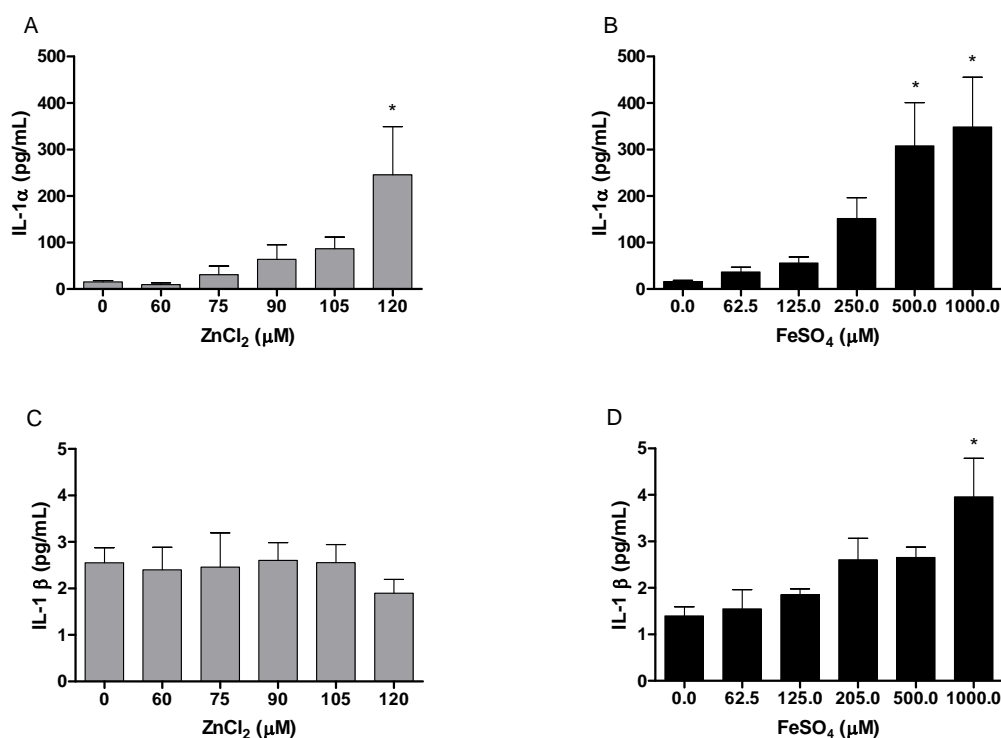
## 4.4 IL-1 $\alpha$ og IL-1 $\beta$

### 4.4.1 IL-1 $\alpha$ og IL-1 $\beta$ frigjøring fra BEAS-2B celler eksponert for sink og jern

IL-1 finnes i to former, IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$ . IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  er blant de cytokinene som raskest aktiverer/utskilles av celler etter skade eller infeksjoner, og virker blant annet ved å regulere produksjon av en rekke andre cytokiner og kjemokiner fra cellene. Studier av viruseksponerte lungeepitelceller har vist at både IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  kan være involvert i reguleringen av IL-8 via autokrin signalisering (Patel et al. 1998). Vi ønsket derfor å undersøke om IL-1 kunne være involvert i sink og jernindusert IL-8 frigjøring. Siden karbonpartikler ikke syntes å aktivere IL-8 i BEAS-2B celler, og heller ikke forsterket de metallinduserte effektene på IL-8 eller andre cytokin- og kjemokingener, ble aktivering av IL-1 og IL-1 sin rolle i IL-8 regulering kun undersøkt for sink og jern alene.

BEAS-2B celler ble eksponert for økende konsentrasjoner ZnCl<sub>2</sub> (0-120  $\mu$ M) og FeSO<sub>4</sub> (0-1000  $\mu$ M) i 24 timer. IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  nivåene ble bestemt ved bruk av ELISA. Eksponering for sink ga en konsentrasjonsavhengig økning i IL-1 $\alpha$  frigjøringen, men som ikke var signifikant før ved 120  $\mu$ M. Økningen av utskillelsen var vedvarende helt til den høyeste

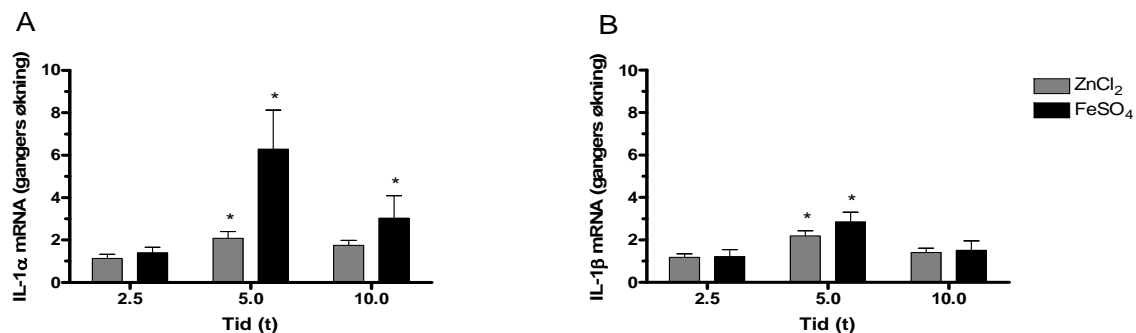
konsentrasjonen sink (figur 24 A). Eksponering for jern ga også en konsentrasjonsavhengig økning av IL-1 $\alpha$  frigjøringen fra BEAS-2B cellene. Effekten av jern ble signifikant først ved 500  $\mu$ M, og responsen av utskillelsen var også vedvarende til de høyeste konsentrasjonene (figur 24 B). Ved eksponering for sink var det ikke en konsentrasjonsavhengig økning i IL-1 $\beta$  nivåene, og heller ingen signifikant økning av IL-1 $\beta$ . Responsen hadde ikke noe maksimumspunkt, og avtok litt ved den høyeste konsentrasjonen (figur 24 C). Eksponering for jern så derimot ut til å kunne gi en konsentrasjonsavhengig økning av IL-1 $\beta$ , og var også signifikant ved den høyeste konsentrasjonen jern. Konsentrasjonseffekten stiger også her til den høyeste konsentrasjonen. Dermed synes IL-1 frigjøringen å anta en ulik konsentrasjonseffektskurve enn den observert for IL-8, som etter maksimumsrespons avtok i frigjøring av cytokin. IL-1 $\alpha$  ble frigjort fra BEAS-2B cellene i mye høyere grad enn det IL-1 $\beta$  ble. IL-1 $\beta$  nivåene var på et knapt detekterbart nivå ved ELISA.



**Figur 24: Frigjøring av IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  fra BEAS-2B celler eksponert for sink og jern.** BEAS-2B celler ble eksponert for økende konsentrasjoner av ZnCl<sub>2</sub> (0-120  $\mu$ M) og FeSO<sub>4</sub> (0-1000  $\mu$ M). Cellevekstmediet ble høstet etter 24 timer og analysert for IL-1 $\alpha$  (A og C) og IL-1 $\beta$  (B og D) ved hjelp av ELISA. (n =  $\geq$  6). \* Signifikant forskjellig fra ubehandlet kontrollceller (P < 0,05).

#### 4.4.2 IL-1 $\alpha$ og IL-1 $\beta$ genekspressjon i BEAS-2B celler eksponert for sink og jern

For å undersøke tidsforløpet for IL-1 responsen, ble cellevekstmediet høstet ved tre tidspunkter; ved 2.5, 5 og ved 10 timer. Kulturene ble eksponert for 75  $\mu$ M sink eller 250  $\mu$ M jern. Sink ga en signifikant oppregulering i IL-1 $\alpha$  ekspresjonen kun ved 5 timer (figur 25 A). Også jern syntes å gi en oppregulering i IL-1 $\alpha$  ekspresjonen, men denne responsen var imidlertid betydelig mer oppregulert enn den sink-induserte responsen, og var omtrent dobbelt så høy. Jerneksponering ga også en signifikant oppregulering ved 10 timer (figur 25 A). Ved oppregulering av IL-1 $\beta$  ga sink en signifikant oppgang kun ved 5 timer. Jern var også her kun signifikant oppregulert ved 5 timer. I motsetning til IL-8 mRNA, var ikke frigjøringen av IL-1 mRNA vedvarende, og hadde en maksimumsrespons ved 5 timer for begge IL-1 cytokinene, for så å bli nedregulert.

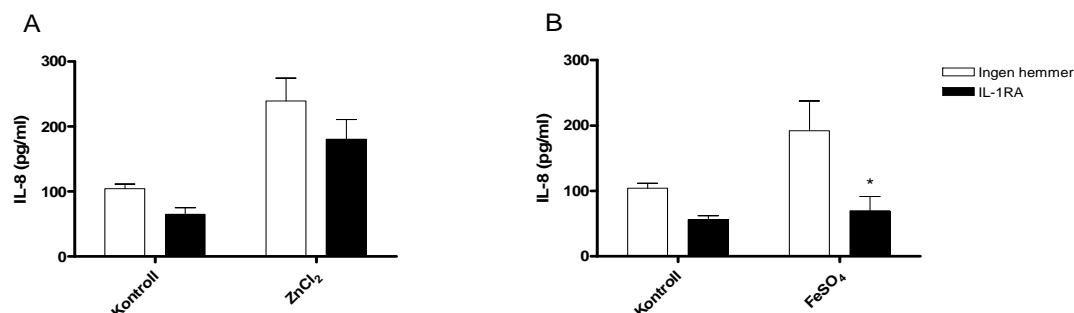


**Figur 25: IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  genekspressjon i BEAS-2B celler eksponert for sink og jern.** Cellene ble eksponert for 75  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> og 250  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> i 2.5 timer, 5 timer eller 10 timer. IL-1 $\alpha$  (A) og IL-1 $\beta$  (B) mRNA fra cellelysater ble målt ved hjelp av real-time PCR. Verdiene er gitt som gangers økning i forhold til ubehandlede kontrollceller ved hvert tidspunkt (n = 4). \* Signifikant oppregulert genekspressjon (P < 0,05).

#### 4.4.3 Effekt av IL-1Ra på sink- og jernindusert IL-8 frigjøring

For å undersøke betydningen av IL-1 i sink og jernindusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B celler, ble IL-1 reseptor blokkert ved å tilsette IL-1 reseptorantagonist (IL-1Ra). BEAS-2B cellene ble eksponert for 15  $\mu$ M IL-1Ra i 30 minutter, før selve metallene ble tilsatt. Cellene ble eksponert for 75  $\mu$ M sink eller 250  $\mu$ M jern, med eksponeringstid på 24 timer.

Eksposering for sinkindusert IL-8 ga en delvis, men ikke signifikant hemming ved bruk av antagonist (figur 26 A). For jernindusert IL-8 frigjøring så en derimot en signifikant hemming av IL-8 frigjøringen ved bruk av antagonist (figur 26 B).

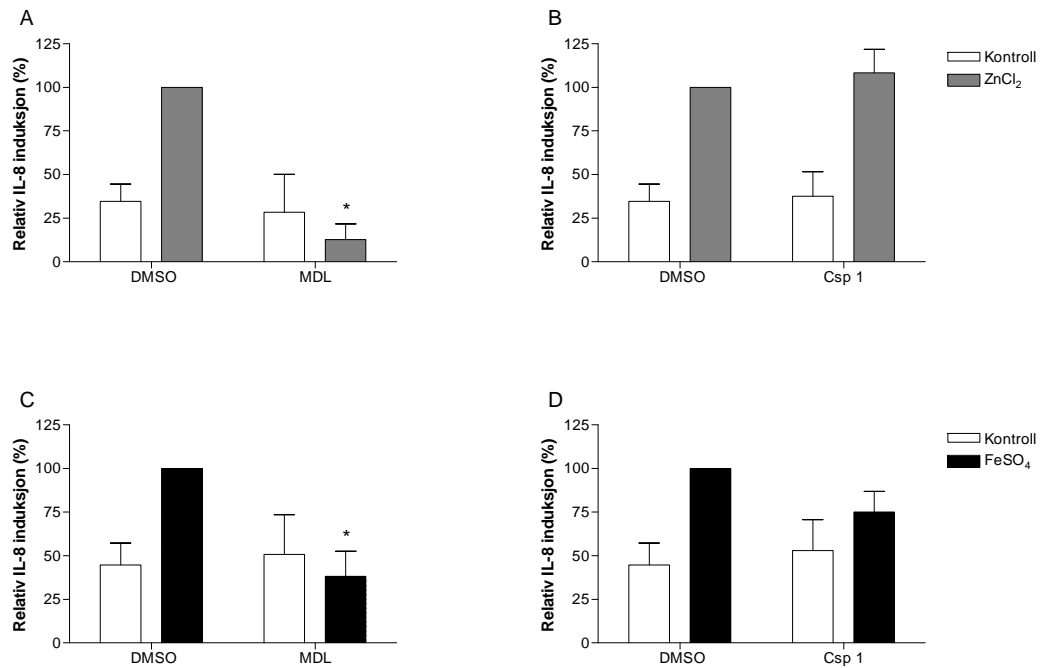


**Figur 26: Betydningen av IL-1 for sink- og jernindusert IL-8 frigjøring fra BEAS-2B celler.**

Cellekulturene ble tilsatt 15  $\mu\text{M}/\text{mL}$  IL-1 reseptorantagonist (IL-1Ra) en halv time før eksponering for 75  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (A) eller 250  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (B). Cellevekstmediet ble høstet etter 24 timer og analysert for IL-8 ved hjelp av ELISA (n = 6). \* Signifikant effekt av IL-1Ra ( $P < 0.05$ ).

#### 4.4.4 Effekt av kalpain- og caspase-1-hemming på sink- og jernindusert IL-8 frigjøring

Kalpain og caspase 1 kløyver pro-formen av henholdsvis IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$ , slik at de aktive formene av cytokinene kan frigjøres fra cellene. For å undersøke betydningen av de to IL-1 isoformene i sink- og jernindusert IL-8 frigjøring, ble BEAS-2B cellene derfor inkubert med en kalpainhemmer (MDL28170) og en caspase-1 hemmer (Z-YVAD-fmk). Resultatene viser at MDL behandling av BEAS-2B cellene fører til en komplett hemming av både sink- og jernindusert IL-8 frigjøring (figur 27 A og C). Caspase-1 hemmeren hadde ingen effekt på sink-indusert IL-8. Caspase-1 hemming førte tilsynelatende til en delvis reduksjon i den jerninduserte IL-8 responsen, men denne effekten var imidlertid ikke statistisk signifikant (figur 27 B og D).



**Figur 27: Betydning av kalpain og caspase-1 for sink- og jernindusert frigjøring av IL-8 i BEAS-2B cellekulturer.** Cellekulturene ble tilsatt 40  $\mu\text{M}$  med kalpainhemmeren MDL28170 (A og C) eller 20  $\mu\text{M}$  Z-YVAD-fmk (B og D), en halv time før eksponering for 75  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (A og B) eller 250  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (C og D). DMSO ble brukt som negativ kontroll. Cellevekstmediet ble høstet etter 24 timer og analysert for IL-8 ved hjelp av ELISA. (A og B:  $n = 4$ , C og D:  $n = 3$ ). \* Signifikant forskjell mellom hemmer og DMSO-behandlede celler ( $P < 0.05$ ).



---

## 5 Diskusjon

Epidemiologiske studier fra ulike deler av verden indikerer en link mellom sykdom/mortalitet og inhalasjon av atmosfærisk svevestøv hos mennesker (Andrews 2000a; Eftim et al. 2008; Forastiere et al. 2008). Det er ikke klart i hvilken grad helseeffektene skyldes inhalasjonen av et stort antall partikler, eller den kjemiske sammensetningen av de inhalerte partiklene (Adamson et al. 2000). Nyere studier viser imidlertid at løselige metallkomponenter på partiklene kan være viktig for utvikling av lunge- og hjertesykdommer. Metaller som jern, nikkel og sink er assosiert med økende dødelighet (Schwarze et al. 2007).

Betennelsesreaksjoner antas å være viktige for svevestøvsrelaterte helseeffekter, og cytokinutskillelse kan derfor brukes som en indikator på ulike stoffers evne til å gi inflammasjon. Inflammasjon er relatert til fysiologiske endringer i både lunge- og hjertesykdommer (Pope et al. 2002; Ghio 2004; Pope et al. 2004; Vidrio et al. 2008)

I denne studien ble det sett på effekten av sink og jern på cytokinproduksjon i en bronkial epitelcellelinje, BEAS-2B. Sink er i mange studier vist å kunne indusere inflammasjon i lungeceller, og sammen med kopper og jern som via Fenton-reaksjonen kan indusere ROS i cellene, er disse metallbundne komponentene viktige i utviklingen av de inflammatoriske cytokinene IL-1 og IL-8 (Shapiro and Dinarello 1997; Samet et al. 1998; Jung et al. 2002; Prieditis and Adamson 2002; Okeson et al. 2004; Schwarze et al. 2006; Wilson et al. 2007)

Det ble brukt konsentrasjoner i mikromolarstørrelsen for begge metallene. En kan kanskje argumentere med at slike konsentrasjoner ikke er representative for konsentrasjoner man finner i atmosfæren. Likevel, svevestøvinneholdet vil alltid variere med utslippskilder, årstider og geografiske områder. Monokulturer av cellelinjer er normalt også langt mindre sensitive enn normale celler, og på studier *in vitro* er det derfor vanlig å bruke relativt høye konsentrasjoner. Og så må det poengteres at ikke hele lungeoverflaten mottar like store konsentrasjoner av luftforurensningene. Spesielt de bronkiale alveolare epitelcellene i lungene kan motta massive konsentrasjoner som er hundre ganger høyere enn den gjennomsnittlige konsentrasjonen for hele lungene (Balashazy et al. 2003b).

---

## Effekter av sink og jern

BEAS-2B cellene ble eksponert for sink i konsentrasjonsområde 0-120  $\mu\text{M}$  og jern i konsentrasjoner fra 0-1000  $\mu\text{M}$ . Resultatene viste at sink induerte signifikant celledød ved lavere konsentrasjoner enn jern. For sinkeksponering lå den på 90  $\mu\text{M}$ , for jerneksponering på 250  $\mu\text{M}$ . Ved disse konsentrasjonene ga også sink og jern henholdsvis 30% og 10% nedgang i forhold til ueksponert kontroll, som lå på 90%. Ved de høyeste konsentrasjonene av metallene ga sink kun 20% viabilitet. Szuster-Ciesielska et al. (2000) viste også i sin studie at sinklorid ble toksisk ovenfor cellene etter eksponering over 100  $\mu\text{M}$ . Jern ga ikke en like markant nedgang i viabilitet, og var på 54% ved den høyeste konsentrasjonen på 1000  $\mu\text{M}$ .

Sink induerte en signifikant utskillelse av IL-8 i forhold til kontroll allerede ved 60  $\mu\text{M}$ , med en maksimumsrespons på 18 gangers økning ved 90  $\mu\text{M}$ . Etter dette sank IL-8 frigjøringen betrakterlig, noe som kan være i overensstemmelse med funnene til Szuster-Ciesielska et al. (2000) Celledøden blir antageligvis for høy til at mer IL-8 kan bli frigjort fra kulturen. Jern ga en signifikant effekt på IL-8 først ved 250  $\mu\text{M}$ , hvorpå maksimumsresponsen ved 500  $\mu\text{M}$  var langt lavere enn ved sinkeksponering, og var på 2.5 gangers økning. I tråd med den lavere toksisiteten syntes jernindusert IL-8 å være mindre påvirket av celledød, med kun en svak reduksjon ved den høyeste konsentrasjonen. I overensstemmelse med IL-8 frigjøringen, ga også sink kraftigere effekter på IL-8 genekspresjonen. IL-8 mRNA nivåer i sinkeksponerte celler var omtrent 5 ganger mer oppregulert enn i jerneksponerte celler. Dette kan være med på å underbygge teorien om at sink er mer potent ovenfor BEAS-2B cellene enn det jern var. mRNA-nivået for både den sink- og jerninduserte frigjøringen av IL-8 så begge ut til å vedvare utover 10 timer, selv om ikke jern ga noe signifikant oppregulering ved noe tidspunkt i forhold til kontroll. Resultatene viser at jern er mindre potent enn sink med hensyn på både IL-8 induksjon og celledød. Dette kan indikere at cellene er bedre rustet til å regulere jern, ved for eksempel opptak og binding til ulike transportproteiner som transferrin/metallothionein etc. Disse molekylene kan kanskje hindre at jern blir like toksisk ovenfor cellene som det sink er ved å binde opp noe av jernet.

mRNA screenen viste også tydelig at IL-8 ble vesentlig oppregulert som følger av eksponering for sink, men også ved jerneksponering. Nivået ved jerneksponering var

---

riktignok en del lavere enn nivået ved sinkindusert IL-8. Disse resultatene er med på å underbygge teorien om at sink er mer potent ovenfor BEAS-2B cellene når det kommer til metallindusert IL-8 frigjøring, enn det jern er.

Den intracellulære signaliseringsmekanismen bak de inflammatoriske proteinene frigitt under inflammasjoner er ofte assosiert med den mitogen-aktiverede signaliseringskaskaden MAPK og aktiveringen av transkripsjonsfaktoren NF- $\kappa$ B i cellene. Aktiverte MAP kinaser fører til fosforylering av proteiner, og kan regulere ulike prosesser i cellen, deriblant genekspressjon. Aktivert NF- $\kappa$ B vil også kunne translokere inn i kjernen fra cytosol, og på lik linje med MAP kinasene starte genekspressjon av blant andre cytokiner som IL-8.

PD98059, som skal hemme ERK1/2, ga en svak, men ikke signifikant, reduksjon i sinkindusert IL-8. Hos jernindusert IL-8 derimot, ble resultatet en signifikant nedregulering i form av mindre utskilt IL-8. Resultatene fra Western Blot viste at sink og jern hadde ulike effekter på ERK1/2 fosforyleringen, hvor jern så ut til å kunne gi en litt kraftigere fosforylering enn sink. Det kan derfor tenkes at sink og jern har ulike virkningsmekanismer i cellen. I forsøk gjort av Kim et al. (2006) på samme celletype (BEAS-2B), viste bruk av PD98059 en signifikant nedregulering av sinkindusert IL-8. Disse forsøkene var riktignok på 12 timer med 50  $\mu$ M sinkeksponering, noe som kan forklare forskjellene fra våre resultater. Resultatene gir dermed sterkere hold for at ERK1/2 er involvert i den jerninduserte IL-8 frigjøringen hos BEAS-2B celler. Hvorvidt ERK1/2 er involvert i den sinkinduserte IL-8 frigjøringen er ikke like sikkert som ved jerneksponering, men en kan ikke utelukke at ERK1/2 også er involvert ved sinkeksponert IL-8 frigjøring.

Hemmeren SB202190 som skal hemme p38 aktiveringen, ga en signifikant hemming av både sink- og jernindusert IL-8. Resultatene fra Western Blot viste også en tydelig fosforylering av p38 ved eksponering for sink, og støtter opp om resultatet fra SB202190-forsøket. Eksponering for jern derimot viste ikke fosforylering av p38. Dette kan tyde på at 1 times eksponering ikke er tilstrekkelig, og at effekter på p38 derfor bør undersøkes også ved andre tidspunkter. Resultatene indikerer dermed at p38 er involvert i aktiveringen av den sinkinduserte IL-8 frigjøringen. For jern er resultatene mindre klare. Da bruken av SB202190 ga signifikant nedregulering ved jernindusert IL-8, kan en anta at også p38 er involvert i aktiveringen av den jerninduserte IL-8 frigjøringen.

---

JNK-hemmeren SP600125 ga ingen signifikant nedregulering av IL-8 ved eksponering for sink. Jernindusert IL-8 frigjøring ble derimot signifikant hemmet. I en undersøkelse gjort av Kim et. al. (2006) med samme hemmer, ble det funnet en signifikant nedregulering ved sinkindusert IL-8. Også Samet et al. (1998) støtter opp om disse funnene. Det er uklart hvorfor ikke JNK-hemmeren påvirket sinkindusert IL-8 i våre forsøk. Det lyktes dessverre ikke å detektere JNK ved Western Blot ved eksponering for begge metallene sink og jern, og det er derfor usikkert om metallene aktiverte JNK i våre celler, selv om jernresultatene antydte en korrelert respons.

NF- $\kappa$ B er en transkripsjonsfaktor som spiller en viktig rolle i reguleringen av immunresponsene ved inflammasjon. Ved aktivering, hvor I $\kappa$ B blir degradert, vil NF- $\kappa$ B translokere fra cytosol og inn i kjernen, hvor den kan starte genekspressjon av blant annet kjemokinet IL-8. Dermed blir degradering av I $\kappa$ B et indirekte tegn på at NF- $\kappa$ B blir aktivert. Resultatene fra Western Blot viste ikke noe degradering ved metalleksponering. Ettersom vi bare har undersøkt effekter ved et tidspunkt, kan det være vi har gått glipp av effekter på I $\kappa$ B. Flere forsøk vil derfor være nødvendig for å trekke noen endelig konklusjon.

IL-1 er viktige cytokiner under aktiveringen av IL-8 (Hildebrand et al. 2005). Sammen med TNF- $\alpha$  er IL-1 blant de første cytokinene som blir frigjort under en inflammatorisk respons, som til slutt kan føre til en induksjon av IL-8. IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  har omtrent samme bindingsaffinitet ovenfor reseptorene i cellen.

Resultatene viste at både sink- og jerneksponering ga en høyere frigjøring av IL-1 $\alpha$  enn av IL-1 $\beta$ . For sink viste IL-1 $\alpha$  frigjøringen en konsentrasjonsavhengig effekt, men var ikke signifikant før ved høyeste konsentrasjon. Dermed følger IL-1 $\alpha$  ikke trenden til sinkindusert IL-8, som hadde en maksimumsrespons ved 90  $\mu$ M for så å avta i respons. Når en tar hensyn til viabilitetsdataene fra sinkeksponerte celler, skulle en kanskje ha forventet at IL-1 $\alpha$  nivåene gikk ned som for IL-8, på grunn av celledød. Det kan være to mulige forklaringer til dette, for eksempel at IL-1 produseres før celledød inntreffer, noe som mRNA dataene kan tyde på. IL-1 $\alpha$  kan også bli frigitt fra døende celler, og således øke frigjøringen til cytokinene (Hogquist et al. 1991; Watanabe and Kobayashi 1994; Dinarello 1997). Jerninduserte også en konsentrasjonsavhengig økning av IL-1 $\alpha$ , og som viste signifikant effekt ved 500  $\mu$ M. Frigjøringen økte helt til høyeste konsentrasjon. Til forskjell fra IL-8 frigjørelsen, hvor sink ga størst effekt, var jern det metallet som induserte høyest utskillelse,

---

og til sammenligning med sinkeksponering økte frigjøringen av IL-1 $\alpha$  omtrent 1.4 ganger. Jernkonsentrasjonen som måtte til var likevel rundt 4 ganger høyere enn den signifikante konsentrasjonen av sinkindusert IL-1 $\alpha$ .

IL-1 $\alpha$  ble omtrent 100 ganger mer utskilt av cellene enn IL-1 $\beta$ , og jerneksponerte celler frigjorde om lag 1,6 ganger så høye nivåer av IL-1 $\beta$  som det sinkeksponerte celler gjorde. En skal merke seg at konsentrasjonene for jerneksponering er mye høyere enn sinkeksponeringene. Sink ga ingen observerbar effekt på IL-1 $\beta$  nivåene, og så ut til å gi konsentrasjonsuavhengig IL-1 $\beta$  frigjøring. Jern derimot så ut til å gi konsentrasjonsavhengig frigjøring av IL-1 $\beta$ , og ga en signifikant effekt ved den høyeste konsentrasjonen. mRNA responsene var i overenstemmelse med cytokinutskillelsen, hvor oppregulering av IL-1 $\alpha$  var 3 ganger så høy som for IL-1 $\beta$ , og hvor jerneksponering ga mer uttrykt mRNA enn sinkeksponering gjorde. Resultatene indikerer at det for IL-1-frigjøring er jern som er det mest potente metallet, i motsetning til IL-8, hvor det var sink som så ut til å være mest potent.

Enkelte forsøk på andre celletyper har indikert at IL-1 $\beta$  muligens kan være mest aktiv i forhold til inflammatoriske responser, og også i utskillelsen av IL-8 (Jung et al. 2002; Dinarello 2004; Church et al. 2008). IL-1 reseptorantagonist (IL-1Ra) er naturlig forekommende i kroppen, og virker som en negativ regulator på IL-1 for å holde IL-1 i balanse i kroppen. Ved bruk av IL-1Ra vil en kunne blokkere virkningsmekanismen til IL-1, og dermed også kunne undersøke om IL-1 er ansvarlig for IL-8 utskillelsen. Ved sinkeksponering ga IL-1Ra en delvis hemming av IL-8 frigjøringen, men den var ikke statistisk signifikant. For jerneksponering derimot ga IL-1Ra en signifikant nedregulering av IL-8 utskillelsen, og omtrent totalt hemming i forhold til kontroll. Dette indikerer at IL-1 ikke er like viktig i den sinkinduserte IL-8 frigjøringen som ved den jerninduserte, hvor det kan se ut som IL-1 er svært viktig ved frigjøring av IL-8 da hemmingen er total.

For å se nærmere på hvilket cytokin som var mest gjeldende for utskillelsen av IL-8, ble utvalgte hemmere for IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  benyttet. For IL-1 $\alpha$  ble kalpainhemmeren MDL28170 benyttet. MDL vil hemme spaltingen av proIL-1 $\alpha$  til aktivt IL-1 $\alpha$  ved å hemme kalpain, som normalt spalter IL-1 $\alpha$  i cellene. Caspase-1-hemmeren Z-YVAD-FMK virker på samme måte ovenfor IL-1 $\beta$  som kalpainhemmeren gjør ovenfor IL-1 $\alpha$ , og vil hindre spaltingen av proIL-1 $\beta$  til den aktive formen. Begge cytokinene er tenkt å kunne aktivere IL-8 transkripsjonen.

Resultatet fra caspase-1-hemming viste at den sinkinduserte frigjøringen av IL-8 ikke ble signifikant nedregulert i det hele tatt. For jernindusert IL-8 frigjøring kunne en se en svak nedregulering i effekten, men ikke noe signifikant. Resultatene fra bruk av kalpainhemmeren på sinkindusert IL-8 frigjøring, så en én signifikant hemming av IL-8, som var total. For den jerninduserte IL-8 frigjøringen så en også en signifikant nedregulering av IL-8 frigjøringen, men denne var ikke like markant som ved den sinkinduserte. Ut i fra disse resultatene kan en anta at IL-1 $\alpha$  er mer viktig for IL-8 utskillelsen hos BEAS-2B cellene enn det IL-1 $\beta$  er. Men det viser også at sink er mer potent i forhold til IL-1 $\alpha$  enn det jern er, noe som ikke er i overensstemmelse med funnene fra IL-1Ra-resultatene. Der viste sinkindusert IL-1 å ikke ha noen særlig betydning ovenfor IL-8, mens IL-8 frigjøringen ved jerneksponte celler så ut til å være totalt avhengig av IL-1. Hvorfor det er slik er uklart. Det kan indikere at kalpain ikke bare er involvert i IL-1 $\alpha$  regulering, men også andre prosesser som er involvert i reguleringen i sinkindusert IL-8. Alternativt kan det bety at MDL også har uspesifikke effekter som påvirker den sinkinduserte responsen.

Metaller alene ser ut til å gi en signifikant forskjell fra kontroller. Men hvordan metallene sink og jern på sin side aktiverer disse signaliseringskaskadene, er heller uvisst. At sink og jern ikke aktiverer de samme mekanismene i cellene, må heller kunne konkluderes med ut i fra funnene her. Sink er vist å kunne påvirke flere cellulære proteiner og fosforyleringsavhengige signaliseringsveier som epidermal vekstfaktorreseptorer og mitogenaktiverte proteinkinaser (EGFR- og MAPK) (Tal, Graves et al. 2006). Disse kaskadene starter med fosforylering av tyrosin-kinaser, som blir regulert av tyrosinfosfatasehemmere. Sink er vist å kunne hemme disse tyrosinfosfatasehemmerene, og således aktivere inflammatoriske mediatorer som EGFR (Samet, Silbajoris et al. 1999; Wu, Graves et al. 1999; Tal, Graves et al. 2006). EGFR er også involvert i MAPK-kaskaden, og kan via dette indusere utskillelsen av IL-8. Om sinkkonsentrasjonene økes kraftig i cellen, vil sink kunne forstyrre andre metall-avhengige prosesser, som for eksempel kalsium, eller hindre andre proteiner (eller begge deler) (Maret 2000). I motsetning til sink, som ved lave konsentrasjoner kan virke som en antioksidant (Bury, Walker et al. 2003), er jern vist å kunne indusere dannelsen av ROS via Fenton eller Haber-Weiss reaksjonen (Knaapen, Shi et al. 2002; Vidrio, Jung et al. 2008). ROS kan indusere direkte skade på cellene, som igjen kan trigge en kaskade av radikal-reaksjoner som øker den sekundære dannelsen av ROS. Økt dannelse av ROS kan igjen føre til stimulering av inflammatoriske prosesser, som aktivering av MAPK (Leonard, Bower et al. 2004). Et annen studie indikerer at jern-mediert ROS

---

dannelse av hydroksylradikaler, kan aktivere MAPK/ERK signaliseringsveien via aktiverte kalsiumkanaler i nerveceller (Munoz, Zavala et al. 2006). For metallet sink er det jo som nevnt over vist at de hemmer tyrosinfosfatasehemmere (PTP), men også hydrogenperoksidet i ROS familien er vist å kunne hemme PTP aktiviteten, og således også stimulere aktiveringen av MAPK (Lee and Esselman 2002).

### **Kombinasjonseffekter av sink/jern og karbonpartikler**

Et av delmålene i oppgaven var å undersøke om det kunne være noen samvirkende effekter mellom karbonpartikler og metaller ved eksponering av lungeceller (BEAS-2B). Derfor ble karbonpartiklene først kjørt i økende konsentrasjoner med konstante mengder metaller, for å se hvilken konsentrasjon som gav best resultater (data ikke vist). Konsentrasjonen som ble valgt lå på 10 µg/mL og partiklene var ultrafine karbonpartikler. Disse ble eksponert i kombinasjoner med metallene sink eller jern. Samme konsentrasjonsområde som ble brukt for metallene alene ble også benyttet her.

Resultatene fra viabilitetsforsøket viste ingen signifikant forskjell i effekt med og uten karbonpartikler, verken for jern eller sink. Sink i kombinasjon med karbonpartikler ga tilsynelatende mindre IL-8 frigjøring enn sink gjorde alene, men forskjellen i responsen var ikke signifikant. Også kombinasjonen jern og karbonpartikler ga en tilsynelatende mindre effekt enn jern alene på IL-8 frigjøringen. Men ved konsentrasjonen 500 µM jern var det en signifikant forskjell mellom jern alene og kombinasjonseffekten, fra frigjøringen av IL-8. Den reduserte effekten ved kombinasjonen av metall/karbonpartikler kunne tenkes å skyldes at karbonpartiklene bandt opp noe av cytokinet (Kocbach et al. 2008b), slik at de ikke var tilgjengelig for måling ved ELISA. For å sjekke om IL-8-binding til partiklene var tilfellet, undersøkte vi prøvene våre ved mRNA analyse. Resultatene kan tyde på at cytokinfrigjøringen blir langt mer redusert av karbonpartikler enn det mRNA nivåene blir. Dermed kan en anta at det faktisk er en binding av IL-8 til karbonpartiklene. Det er imidlertid også en antydning til reduksjon av mRNA-nivåene med karbonpartikler til stede. Disse er ikke signifikante. Det kan tenkes at karbonpartiklene også kan binde noe av metallene, slik at mindre metall blir tilgjengelig for cellene. En teori kan også være at karbonpartiklene likevel kan binde noe mRNA under lyseringen av cellene ved høsting, da partiklene også her blir sentrifugert ut av supernatanten. Det er imidlertid ingen funn i litteraturen som støtter opp om disse teoriene så langt vi kunne se. mRNA screenen for

---

metallindusert frigjøring av ulike cytokiner og kjemokiner, viste ingen signifikante effekter av kombinasjonen metall og karbonpartikler. Korrelasjonsgrafene tydet også på at det ikke var noen stor variasjon av genekspressjon mellom metallinduksjon alene, eller i kombinasjon med karbonpartikler.

Det ble også undersøkt hvorvidt kombinasjonen av metaller og karbonpartikler kunne induserer en aktivisering av MAP-kinasene, samt en degradering av I $\kappa$ B.

ERK1/2 så ut til å kunne bli svakt oppregulert av kombinasjonen sink og karbonpartikler i forhold til sink alene. Jern viste en svak nedgang i fosforylering i forhold til metallet alene. Fordi vi bare har undersøkt effekter på et tidspunkt, er det vanskelig å trekke noen endelig konklusjon. p38 derimot viste en motsatt fosforylering, og ga en svak nedgang i fosforyleringen av sink og karbonpartikler i forhold til sink alene. Jern ga en svak oppregulering av kombinasjonen jern og karbonpartikler i forhold til det jern gjorde alene. Forsøket ble bare utført på et tidspunkt, og det blir derfor vanskelig å trekke noen endelig konklusjon. Resultatet fra I $\kappa$ B, viste en degradering ved kombinasjonen av sink og karbonpartikler. Ettersom vi bare har undersøkt effekter ved et tidspunkt, kan det være vi har gått glipp av effekter på I $\kappa$ B. Flere forsøk vil derfor være nødvendig for å trekke noen endelig konklusjon.

Resultatene fra oppgaven tyder på at kombinasjonen av metaller og karbonpartikler kan ha ulike aktiveringsmekanismer i cellen, men denne forskjellen kommer nok mer av metallene bundet til partiklene, enn av partiklene selv. Kombinasjon av karbonpartikler og sink ga riktignok en effekt ved frigjøringen av IL-8, men er mindre interessant fordi effekten mest sannsynlig skyldes metallene alene, og ikke kombinasjonen. I motsetning til våre data, har Wilson et al. vist at ultrafine karbonpartikler alene kan øke frigjøringen av betennelsesmediatoren TNF- $\alpha$ , som sammen med sink er vist å kunne øke frigjøring av mediatorerne synergistisk. TNF- $\alpha$  sammen med IL-1 er vist å kunne indusere IL-8 frigjøring (Mills et al. 1999; Wilson et al. 2002; Kocbach et al. 2008a). Brown et al (Brown et al. 2000). viste også at ultrafine karbonpartikler hadde en effekt på lungeinflammasjon, uavhengig av løselige overgangsmetaller.



## 6 Konklusjon

- Sink og jern ga en signifikant, konsentrasjonsavhengig økning i IL-8 utskillelsen fra BEAS-2B celler, men ved varierende konsentrasjoner og i forskjellig grad. Sink var mer potent enn jern ovenfor induksjon av IL-8, og induserte også mer celledød ved lavere konsentrasjoner enn jern.
- Resultatene tyder på at aktiveringen av MAP-kinasene ERK1/2 og p38 var involvert i reguleringen av IL-8 responsen etter eksponering for jern. Aktivering av JNK kan muligens også være involvert ved jernindusert IL-8 i våre celledsystemer. Resultatene tyder videre på at aktivering av MAP-kinasen p38 var involvert i reguleringen av IL-8 responsen etter eksponering for sink. Aktivering av ERK1/2 og JNK så ut til å være av mindre betydning for IL-8 reguleringen i celler eksponert for sink, sammenlignet med jern.
- Både sink og jern ga en signifikant, konsentrasjonsavhengig økning i IL-1 $\alpha$ . Igjen var sink mer potent enn jern, men forskjellen var mindre enn ved IL-8 induksjonen. IL-1 $\beta$  utskillelsen fra BEAS-2B celler var betydelig lavere enn IL-1 $\alpha$ , og kun jern ga en signifikant økning ved de testede konsentrasjonene.
- IL-1 $\alpha$  syntes å være mer involvert i den metallinduserte IL-8 frigjøringen, enn IL-1 $\beta$ . Resultatene indikerer også at induksjon av IL-1 spiller en viktigere rolle for induksjon av IL-8 i BEAS-2B celler eksponert for jern, sammenlignet med sink.
- Kombinasjonseksponering med metaller og karbonpartikler så ut til å gi en redusert IL-8 induksjon, i forhold til eksponering for metaller alene.

---

## Kildeliste

- Adachi, K. and Y. Tainosho (2004). "Characterization of heavy metal particles embedded in tire dust." *Environment International* **30**(8): 1009-1017.
- Adamson, I. Y. R., H. Prieditis, C. Hedgecock and R. Vincent (2000). "Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample." *Toxicology and Applied Pharmacology* **166**(2): 111-119.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). *Pathogens, infection, and innate immunity. Molecular biology of The Cell.*
- Andrews, N. C. (2000a). "Iron homeostasis: Insights from genetics and animal models." *Nature Reviews Genetics* **1**(3): 208-217.
- Andrews, N. C. (2000b). "Iron metabolism: Iron deficiency and iron overload." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **1**: 75-98.
- Asgharian, B., M. G. Menache and F. J. Miller (2004). "Modeling age-related particle deposition in humans." *Journal of Aerosol Medicine-Deposition Clearance and Effects in the Lung* **17**(3): 213-224.
- Balashazy, I., A. Farkas, I. Szoke, W. Hofmann and R. Sturm (2003a). "Simulation of deposition and clearance of inhaled particles in central human airways." *Radiation Protection Dosimetry* **105**(1-4): 129-132.
- Balashazy, I., W. Hofmann and T. Heistracher (2003b). "Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer." *Journal of Applied Physiology* **94**(5): 1719-1725.
- Bishop, A. E. (2004). "Pulmonary epithelial stem cells." *Cell Proliferation* **37**(1): 89-96.
- Bjålie, J. G., E. Haug, O. Sand and Ø. V. Sjaastad (2001). *Blodet og kroppens forsvarssystem. Menneskekroppen Fysiologi og anatomi*: 268-296.
- Bobayashi, Y., K. Yamamoto, T. Saido, H. Kawasaki, J. J. Oppenheim and K. Matsushima (1990). "Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1a." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**: 5548-5552.
- Brook, R. D., B. Franklin, W. Cascio, Y. L. Hong, G. Howard, M. Lipsett, R. Luepker, M. Mittleman, J. Samet, S. C. Smith and I. Tager (2004). "Air pollution and cardiovascular disease - A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association." *Circulation* **109**(21): 2655-2671.
- Brown, D. M., V. Stone, P. Findlay, W. MacNee and K. Donaldson (2000). "Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is

---

independent of transition metals or other soluble components." *Occupational and Environmental Medicine* **57**(10): 685-691.

Brunekreef, B. and S. T. Holgate (2002). "Air pollution and health." *Lancet* **360**(9341): 1233-1242.

Burnett, R. T., J. Brook, T. Dann, C. Delocla, O. Philips, S. Cakmak, R. Vincent, M. S. Goldberg and D. Krewski (2000). "Association between particulate- and gas-phase components of urban air pollution and daily mortality in eight Canadian cities." *Inhalation Toxicology* **12**: 15-39.

Burns-Naas, L. A., B. J. Meade and A. E. Munson (2001). Toxic responses of the immune system. *Casarett & Doull's Toxicology - The basic science of poisons*. C. D. Klaassen.

Bury, N. R., P. A. Walker and C. N. Glover (2003). "Nutritive metal uptake in teleost fish." *Journal of Experimental Biology* **206**(1): 11-23.

Calderon-Garciduenas, L., B. Azzarelli, H. Acuna, R. Garcia, T. M. Gambling, N. Osnaya, S. Monroy, M. D. Tizapantzi, J. L. Carson, A. Villarreal-Calderon and B. Rewcastle (2002). "Air pollution and brain damage." *Toxicologic Pathology* **30**(3): 373-389.

Calderon-Garciduenas, L., W. Reed, R. R. Maronpot, C. Henriquez-Roldan, R. Delgado-Chavez, A. Calderon-Garciduenas, I. Dragustinovis, M. Franco-Lira, M. Aragon-Flores, A. C. Solt, M. Altenburg, R. Torres-Jordon and J. A. Swenberg (2004). "Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution." *Toxicologic Pathology* **32**(6): 650-658.

Carter, J. D., A. J. Ghio, J. M. Samet and R. B. Devlin (1997). "Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent." *Toxicology and Applied Pharmacology* **146**(2): 180-188.

Church, L. D., G. P. Cook and M. F. McDermott (2008). "Primer: inflammasomes and interleukin 1 beta in inflammatory disorders." *Nature Clinical Practice Rheumatology* **4**(1): 34-42.

Costa, D. L. (2003). Air Pollution. *Essentials of toxicology*. C. D. Klaassen and J. B. W. III: 407-418.

Council, T. B., K. U. Duckenfield, E. R. Landa and E. Callender (2004). "Tire-wear particles as a source of zinc to the environment." *Environmental Science & Technology* **38**(15): 4206-4214.

Dinareello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *The Journal of The American Society of Hematology* **87**(6): 2095-2147.

Dinareello, C. A. (1997). "Interleukin-1." *Cytokine & Growth Factor Reviews* **8**(4): 253-265.

- 
- Dinareello, C. A. (2004). "Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation." *Current Opinion in Pharmacology* **4**(4): 378-385.
- Dreher, K. L., R. H. Jaskot, J. R. Lehmann, J. H. Richards, J. K. McGee, A. J. Ghio and D. L. Costa (1997). "Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury." *Journal of Toxicology and Environmental Health* **50**(3): 285-305.
- Eftim, S. E., J. M. Samet, H. Janes, A. McDermott and F. Dominici (2008). "Fine particulate matter and mortality - A comparison of the six cities and American Cancer Society cohorts with a medicare cohort." *Epidemiology* **19**(2): 209-216.
- Fehrenbach, H. (2001). "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." *Respiratory Research* **2**(1): 33-52.
- Fernandez, E. J. and E. Lolis (2002). "Structure function, and inhibition of chemokines." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**: 469-499.
- Forastiere, F., M. Stafoggia, G. Berti, L. Bisanti, A. Cernigliaro, M. Chiusolo, S. Mallone, R. Miglio, P. Pandolfi, M. Rognoni, M. Serinelli, R. Tessari, M. Vigotti and C. A. Perucci (2008). "Particulate matter and daily mortality - A case-crossover analysis of individual effect modifiers." *Epidemiology* **19**(4): 571-580.
- Ghio, A. J. (2004). "Biological effects of Utah Valley ambient air particles in humans: A review." *Journal of Aerosol Medicine-Deposition Clearance and Effects in the Lung* **17**(2): 157-164.
- Gilmore, T. D. (2006). "Introduction to NF-kappa B: players, pathways, perspectives." *Oncogene* **25**(51): 6680-6684.
- Gordon, T., L. C. Chen, J. M. Fine, R. B. Schlesinger, W. Y. Su, T. A. Kimmel and M. O. Amdur (1992). "PULMONARY EFFECTS OF INHALED ZINC-OXIDE IN HUMAN-SUBJECTS, GUINEA-PIGS, RATS, AND RABBITS." *American Industrial Hygiene Association Journal* **53**(8): 503-509.
- Gordon, T. and J. M. Fine (1993). "METAL FUME FEVER." *Occupational Medicine-State of the Art Reviews* **8**(3): 505-517.
- Goyer, R. A. and T. W. Clarkson (2003). *Toxic effects of metal. Casarett & Doull's Toxicology - The basic science of poisons.* C. D. Klaassen.
- Hildebrand, F., H. C. Pape and C. Krettek (2005). "The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction." *Unfallchirurg* **108**(10): 793-+.
- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann and M. Kracht (2002). "Multipel control of interleukin-8 gene expression." *Journal of Leukocyte Biology* **72**(5): 847-855.
- Hogquist, K. A., M. A. Nett, E. R. Unanue and D. D. Chaplin (1991). "INTERLEUKIN-1 IS PROCESSED AND RELEASED DURING APOPTOSIS." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(19): 8485-8489.

- 
- Hommes, D. W., M. P. Peppelenbosch and S. J. H. van Deventer (2003). "Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets." *Gut* **52**(1): 144-151.
- <http://www.emergencymedicaled.com/images/respsys.gif>. (2008). "The respiratory system - Illustrations." from <http://www.emergencymedicaled.com/images/respsys.gif>.
- Jung, Y. D., F. Fan, D. J. McConkey, M. E. Jean, W. B. Liu, N. Reinmuth, O. Stoeltzing, S. A. Ahmad, A. A. Parikh, N. Mukaida and L. M. Ellis (2002). "Role of P38 MAPK, AP-1, and NF-kappa B in interleukin-1 beta-induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells." *Cytokine* **18**(4): 206-213.
- Kampa, M. and E. Castanas (2008). "Human health effects of air pollution." *Environmental Pollution* **151**: 362-367.
- Kim, Y. M., W. Reed, A. G. Lenz, I. Jaspers, R. Silbajoris, H. S. Nick and J. M. Samet (2005). "Ultrafine carbon particles induce interleukin-8 gene transcription and p38 MAPK activation in normal human bronchial epithelial cells." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **288**(3): L432-L441.
- Kim, Y. M., W. Reed, W. D. Wu, P. A. Bromberg, L. M. Graves and J. M. Samet (2006). "Zn<sup>2+</sup>-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **290**(5): L1028-L1035.
- Knaapen, A. M., T. M. Shi, P. J. A. Borm and R. P. F. Schins (2002). "Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter." *Molecular and Cellular Biochemistry* **234**(1): 317-326.
- Kobach, A., E. Namork and P. E. Schwarze (2008a). "Pro-inflammatory potential of wood smoke and traffic-derived particles in a monocytic cell line." *Toxicology* **247**(2-3): 123-132.
- Kobach, A., A. I. Totlandsdal, M. Låg, M. Refsnes and P. E. Schwarze (2008b). "Differential binding of cytokines to environmentally relevant particles: A possible source for misinterpretation of in vitro results?" *Toxicology Letters* **176**(2): 131-137.
- Lagorio, S., F. Forastiere, R. Pistelli, I. Iavarone, P. Michelozzi, V. Fano, A. Marconi, G. Ziemacki and B. D. Ostro (2006). "Air pollution and lung function among susceptible adult subjects: a panel study." *Environmental health* **5**: 11.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*.
- Lee, K. and W. J. Esselman (2002). "Inhibition of PTPs by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the activation of distinct MAPK pathways." *Free Radical Biology and Medicine* **33**(8): 1121-1132.
- Maret, W. (2000). "The function of zinc metallothionein: A link between cellular zinc and redox state." *Journal of Nutrition* **130**(5): 1455S-1458S.

- 
- Miller, A. C. K., D. G. Schattenberg, A. M. Malkinson and D. Ross (1994). "Decreased content of the IL1[alpha] processing enzyme calpain in murine bone marrow-derived macrophages after treatment with the benzene metabolite hydroquinone." *Toxicology Letters* **74**(2): 177-184.
- Mills, P. R., R. J. Davies and J. L. Devalia (1999). "Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **160**(5): S38-S43.
- Mostad, A. (2008). "(Zn) Sink." from <http://www.kjemi.uio.no/periodesystemet/vis.php?e=Zn&vis=alt>.
- Mukaida, N. (2003). "Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **284**(4): L566-L577.
- Okeson, C. D., M. R. Riley and E. Riley-Saxton (2004). "In vitro alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals." *Toxicology in Vitro* **18**(5): 673-680.
- Patel, J. A., Z. Jiang, N. Nakajima and M. Kunimoto (1998). "Autocrine regulation of interleukin-8 by interleukin-1 alpha in respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells in vitro." *Immunology* **95**(4): 501-506.
- Pauluhn, J., M. Emura, U. Mohr and M. Rosenbruch (2003). "Inhalation toxicity of propineb. Part II: Results of mechanistic studies in rats." *Inhalation Toxicology* **15**(5): 435-460.
- Pearson, G., F. Robinson, T. B. Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions." *Endocrine Reviews* **22**(2): 153-183.
- Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappa B and IKK function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**(1): 49-62.
- Pope, C. A., R. T. Burnett, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, K. Ito and G. D. Thurston (2002). "Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution." *Jama-Journal of the American Medical Association* **287**(9): 1132-1141.
- Pope, C. A., R. T. Burnett, G. D. Thurston, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski and J. J. Godleski (2004). "Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution - Epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease." *Circulation* **109**(1): 71-77.
- Prieditis, H. and I. Y. R. Adamson (2002). "Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts." *Experimental Lung Research* **28**(7): 563-576.

- 
- Pritchard, R. J., A. J. Ghio, J. R. Lehmann, D. W. Winsett, J. S. Tepper, P. Park, M. I. Gilmour, K. L. Dreher and D. L. Costa (1996). "Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentrations of associated metals." *Inhalation Toxicology* **8**(5): 457-477.
- Puddicombe, S. M. and D. E. Davies (2000). "The role of MAP kinases in intracellular signal transduction in bronchial epithelium." *Clinical and Experimental Allergy* **30**(1): 7-11.
- Remick, D. G. (2005). "Interleukin-8." *Critical Care Medicine* **33**(12): S466-S467.
- Risom, L., P. Moller and S. Loft (2005). "Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution." *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **592**(1-2): 119-137.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." *Blood* **90**(3): 909-928.
- Salnikow, K., X. M. Li and M. Lippmann (2004). "Effect of nickel and iron co-exposure on human lung cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* **196**(2): 258-265.
- Samet, J. M., L. M. Graves, J. Quay, L. A. Dailey, R. B. Devlin, A. J. Ghio, W. D. Wu, P. A. Bromberg and W. Reed (1998). "Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **19**(3): L551-L558.
- Samet, J. M., R. Silbajoris, W. D. Wu and L. M. Graves (1999). "Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **21**(3): 357-364.
- Sand, O., Ø. V. Sjaastad and E. Haug (2002a). *Immunsystemet. Menneskets fysiologi*: 360-376.
- Sand, O., Ø. V. Sjaastad and E. Haug (2002b). *Respirasjonssystemet. Menneskets fysiologi*: 378-412.
- Scapellato, M. L. and M. Lotti (2007). "Short-term effects of particulate matter: An inflammatory mechanism?" *Critical Reviews in Toxicology* **37**(6): 461-487.
- Schwartz, J. (1994). "AIR-POLLUTION AND DAILY MORTALITY - A REVIEW AND META ANALYSIS." *Environmental Research* **64**(1): 36-52.
- Schwarze, P. E., J. Ovrevik, R. B. Hetland, R. Becher, F. R. Cassee, M. Lag, M. Lovik, E. Dybing and M. Refsnes (2007). "Importance of size and composition of particles for effects on cells in vitro." *Inhalation Toxicology* **19**: 17-22.
- Schwarze, P. E., J. Ovrevik, M. Lag, M. Refsnes, P. Nafstad, R. B. Hetland and E. Dybing (2006). "Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies." *Human & Experimental Toxicology* **25**(10): 559-579.

- 
- Sehlstedt, M., B. Forsberg, R. Westerholm, C. Boman and T. Sandström (2007). The role of particle size and chemical composition for health risks of exposure to traffic related aerosols -A review of the current litterature.
- SFT (2007). Helseeffekter av luftforurensning i byer og tettsteder i Norge. A. Totlandsdal, C. Madsen, M. Låget al.
- Shapiro, L. and C. A. Dinarello (1997). "Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production." *Experimental Cell Research* **231**(2): 354-362.
- Szuster-Ciesielska, A., I. Lokaj and M. Kandefor-Szerszen (2000). "The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aorta endothelial cells." *Toxicology* **145**(2-3): 135-145.
- Tal, T. L., L. M. Graves, R. Silbajoris, P. A. Bromberg, W. Wu and J. M. Samet (2006). "Inhibition of protein tyrosine phosphatase activity mediates epidermal growth factor reseptor signaling in human airway epithelial cells exposed to Zn<sup>2+</sup>." *Toxicology and Applied Pharmacology* **214**: 16-23.
- Totlandsdal, A. I., T. Skomedal, M. Låg, J.-B. Osnes and M. Refsnes (2008). "Pro-inflammatory potential of ultrafine particles in mono- and co-cultures of primary cardiac cells." *Toxicology* **247**(1): 23-32.
- Vidrio, E., H. Jung and C. Anastasio (2008). "Generation of hydroxyl radicals from dissolved transition metals in surrogate lung fluid solutions." *Atmospheric Environment* **42**(18): 4369-4379.
- Watanabe, N. and Y. Kobayashi (1994). "SELECTIVE RELEASE OF A PROCESSED FORM OF INTERLEUKIN-1-ALPHA." *Cytokine* **6**(6): 597-601.
- Weber, C., L. Fraemohs and E. Dejana (2007). "The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation." *Nature Reviews Immunology* **7**.
- WHO (1987). WHO. Air quality guidelines for Europe.
- Wilson, M. R., L. Foucaud, P. G. Barlow, G. R. Hutchison, J. Sales, R. J. Simpson and V. Stone (2007). "Nanoparticle interactions with zinc and iron: Implications for toxicology and inflammation." *Toxicology and Applied Pharmacology* **225**(1): 80-89.
- Wilson, M. R., J. H. Lightbody, K. Donaldson, J. Sales and V. Stone (2002). "Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro." *Toxicology and Applied Pharmacology* **184**(3): 172-179.
- Wright, J. R. (2005). "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." *Nature Reviews Immnology* **5**: 58-68.



- Wu, W. D., L. M. Graves, I. Jaspers, R. B. Devlin, W. Reed and J. M. Samet (1999). "Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **277**(5): L924-L931.
- Yamagata, T. and M. Ichinose (2006). "Agents against cytokine synthesis or receptors." *European Journal of Pharmacology* **533**(1-3): 289-301.