

Biomarkers of mineral dust induced lung disorders : molecular epidemiologic studies in coal workers

Citation for published version (APA):

Schins, R. P. F. (1996). *Biomarkers of mineral dust induced lung disorders : molecular epidemiologic studies in coal workers*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19961030rs>

Document status and date:

Published: 01/01/1996

DOI:

[10.26481/dis.19961030rs](https://doi.org/10.26481/dis.19961030rs)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Elk meetbaar biologisch effect tussen blootstelling en een daaruit resulterende ziekte kan men als "biomarker" bestempelen. Dit proefschrift beschrijft de evaluatie van een aantal biomarkers in relatie tot blootstelling aan mineraal stof. Aan de hand van een 5-jaar follow-up van mijnwerkers (Kempense Steenkoolmijnen, België) die oorspronkelijk bij diverse dwarsdoorsnede-studies betrokken zijn geweest, is onderzocht in hoeverre deze parameters in het bloed relevant zijn voor mensen die (beroepsmatig) zijn blootgesteld aan mineraal stof en derhalve mogelijk een verhoogd risico lopen op het ontstaan dan wel voortschrijden van aan deze blootstelling gerelateerde ziekten.

In **hoofdstuk 1** wordt een kort overzicht gegeven van de voornaamste soorten longaandoeningen die kunnen ontstaan bij blootstelling aan bekende en veel voorkomende vormen van mineraal stof zoals asbest, silica en mijnstof. Naast stof-specifieke ziektebeelden (bijvoorbeeld mesothelioom door asbest) veroorzaken diverse soorten mineraal stof ook min of meer gemeenschappelijke gezondheidseffecten waaronder longfunctie-verlies en longfibrose. Tot de voornaamste gezondheidseffecten die kunnen optreden na inhalatie van mijnstof (samengevat in **hoofdstuk 2**) behoren mijnwerkerpneumoconiose (MWP), chronische bronchitis, vermindering van longfunctie en emphyseem. De vraag of (silica bevattend) mijnstof al dan niet (long)kanker kan veroorzaken is vooralsnog niet opgehelderd en is momenteel (oktober '96) onderwerp van een IARC-werkgroep. MWP wordt gediagnostiseerd door beroepsanamnese en een thoraxfoto aan de hand van standaard criteria vastgesteld door het "International Labour Office" (ILO), waarbij MWP in diverse stadia geclassificeerd wordt op grond van aantal en grootte van opaciteiten. In tegenstelling tot progressieve massieve fibrose (PMF) is er bij milde vormen van MWP slechts sprake van geringe longfibrose. Het ontstaan van longfibrose uit zich in een excessieve toename in depositie van collagenen.

De biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan de door mijnstof geïnduceerde aandoeningen worden beschreven in **hoofdstuk 3** aan de hand van *in vitro* en *in vivo* studies. Veelal wordt naast de effecten van mijnstof ook verwezen naar die van silica en asbest. Diverse soorten mineraal stof genereren aan de hand van directe (oppervlakte) eigenschappen van het stof dan wel via activatie van fagocyterende cellen (macrofagen, neutrofielen) reactieve zuurstofspecies (RZS). Wanneer de vorming van RZS dermate groot is dat antioxidatieve afweermechanismen waarover de mens beschikt niet afdoende zijn, kan oxydatieve schade optreden aan onder meer eiwitten, celmembranen (lipidperoxydatie) en DNA. Elke verandering in activiteiten of concentraties van antioxidanten kan worden beschouwd als indicatie voor deze zogenaamde "oxydatieve stress". Naast RZS produceren de door stof geactiveerde fagocyten (maar ook andere celtypen zoals alveolair epitheel) onder meer cytokines en groeifactoren die op hun beurt weer in staat zijn om secundaire cellen te

activeren en aan te zetten tot productie van diverse factoren (o.a. cytokines, RZS). Zo blijkt bijvoorbeeld dat mineraal stof macrofagen *in vitro* kan aanzetten tot de "release" van TNF. Dit cytokine blijkt in staat om *in vitro* de deling van fibroblasten te stimuleren en blijkt bij proefdieren het ontstaan van fibrose door silica aanzienlijk te versterken; anderzijds wordt in aanwezigheid van TNF-antilichamen in het zelfde model silicose grotendeels voorkomen. RZS en diverse cytokines worden in verband gebracht met het ontstaan van fibrose alsook andere longaandoeningen (emphyseem, kanker). Longfibrose ontstaat als gevolg van verhoogde depositie van met name door fibroblasten geproduceerde type III collagenen (in vroege lesies) en type I collagenen. De in dit proefschrift beschreven studies zijn opgesplitst in drie delen waarin achtereenvolgens markers van oxydatieve stress, cytokine release en collageen depositie zijn bestudeerd in relatie tot longaandoeningen bij mijnwerkers.

Het onderzoeksdesign (beschreven in **hoofdstuk 4**) is als volgt: 156 mijnwerkers (Kempense Steenkoolmijnen, België) participierend in drie studies uit 1987, zijn opgevolgd met het doel om de bij deze studies onderzochte parameters prospectief te relateren aan het ontstaan dan wel het voortschrijden van MWP. Dit is gebeurd op grond van gepaarde analyse van thoraxfoto's over een tijdsinterval van vijf jaar. Aan het eind van de follow-up zijn de betreffende markers opnieuw bepaald, en zijn tevens nieuwe markers bestudeerd (transversale en retrospectieve analyses). Om een mogelijke verband tussen de diverse parameters met blootstelling te bestuderen is de cumulatieve blootstelling aan respirabel mijnstof geschat aan de hand van "job-exposure" matrices, en is een controle groep van niet beroepsmatig aan (mineraal) stof blootgestelde personen meegenomen. Obstructieve longaandoeningen zijn door middel van spirometrie, impendatiemeting en vragenlijsten in kaart gebracht. In deelgroepen zijn additionele analyses uitgevoerd waaronder HRCT-scans en bepalingen van diffusiecapaciteit, en is retrospectief longfunctiedaling berekend over een periode van 10 jaar voorafgaand aan de oorspronkelijke studies.

Uit de resultaten van de follow-up (n=104) blijkt dat ondanks dat alle mijnwerkers niet meer actief zijn (vanwege algehele mijnsluiting in België) bij een aanzienlijk aantal personen progressie (45%) en in enkele gevallen zelfs nieuwvorming van MWP voor te komen (5%) (**hoofdstukken 8 en 11**). Schatting van de cumulatieve stofblootstelling toont een viervoudige variatie van blootstelling aan ten op zichte van het aantal jaren ondergronds (**hoofdstuk 12**), en blijkt gerelateerd aan de score van de thoraxfoto's, aan de HRCT-scans (**hoofdstuk 12**), én aan de progressie van MWP (**hoofdstuk 8**).

In **hoofdstukken 5 t/m 7** worden de oxydatieve DNA schade en antioxydatieve status besproken. Aan het eind van de follow-up is de antioxydatieve capaciteit van serum bepaald aan de hand van de TRAP-assay (**hoofdstuk 5**). Deze blijkt significant verhoogd te zijn bij mijnwerkers die gedurende de vijfjarige periode voorafgaand aan de bloedafname MWP ontwikkelden, zowel ten opzichte van

mijnwerkers zonder MWP als ten opzichte van mijnwerkers met reeds aanwezige MWP. Als maat voor oxydatieve DNA schade is in het DNA van lymfocyten de hoeveelheid 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine bepaald (**hoofdstuk 6**). De schade blijkt niet te verschillen tussen mijnwerkers met of zonder MWP; deze is echter wel verhoogd bij mijnwerkers ten opzichte van niet-blootgestelde controles. De verhoogde oxydatieve schade in de lymfocyten van de mijnwerkers staat in mogelijk verband met de door anderen aangetoonde aanwezigheid van stabiele radicalen (en meer specifiek in de lymfeklieren) in longbiopten van (ex) mijnwerkers. In **hoofdstuk 7** zijn diverse antioxidanten gerelateerd aan prospectieve veranderingen in MWP, aan longfunctiedalingen (retrospectief), en aan chronische bronchitis. Tevens wordt in dit hoofdstuk de relevantie van de gecombineerde analyse van diverse antioxydant parameters in relatie tot pneumoconiose alsmede obstructieve longaandoeningen besproken. Voornaamste bevindingen zijn een verhoogde SOD-activiteit in erythrocyten van de personen die vervolgens MWP ontwikkelden, en een verlaagde GSH concentratie in chronische bronchitis. Aangezien zowel *in vitro* als *in vivo* is aangetoond dat verhoogde MnSOD expressie een indicator van oxydatieve stress is, zou men de verhoogde SOD-waarden in erythrocyten van personen met progressie van MWP kunnen verklaren als een weerspiegeling van verhoogde pathogene activiteit van stof in de long. Een verlaagde GSH activiteit in bronchoalveolaire lavage bij obstructieve longaandoeningen is door andere onderzoekers beschreven. In algemene zin tonen de in dit deel van het proefschrift beschreven resultaten aan dat oxydatieve stress, alsmede de hiermee geassocieerde oxydatieve DNA schade in personen blootgesteld aan mineraal stof in verhoogde mate aanwezig zijn buiten de long c.q. in perifeer bloed, én zelfs aanwezig blijven ondanks een (jarenlange) afwezigheid van deze (beroepsmatige) blootstelling.

De **hoofdstukken 8 t/m 10** behandelen achtereenvolgens de *ex vivo* release van TNF door perifere bloed monocyten (**h8**), de plasma concentraties van de 55kD en 75kD receptoren van TNF (**h9**), en de gecombineerde evaluatie van TNF, TGF β en IL-6 (**h10**). In overeenstemming met de rol van TNF in silicose bij de muis, indiceren de resultaten dat dit cytokine ook een cruciale factor is bij fibrose geïnduceerd door mijnstof. De herhaalde dwarsdoorsnede analyse toont aan dat release van TNF na *ex vivo* stimulatie van monocyten door mijnstof zowel in actieve als in ex-mijnwerkers verhoogd is ten opzichte van de niet blootgestelde controles, en laat tevens zien dat deze release in beide studies een afnemende trend vertoont met een toenemende gradatie van MWP. Voorts blijkt uit prospectieve analyse dat zowel een verhoogde TNF release, alsook de cumulative stofblootstelling de progressie van MWP verklaren. Stofblootstelling en TNF release zijn echter niet aan elkaar gecorreleerd. De gestimuleerde TNF release op beide meetpunten is duidelijk gecorreleerd, echter met name in de mijnwerkers zonder progressie, hetgeen indirect wijst op een invloed van het

ziekteproces op de release van TNF door monocyten. De relatief stabiele fenotypische variaties in TNF release berusten mogelijk op in het kader van andere aandoeningen beschreven polymorfismen van het TNF-promotor gen. In tegenstelling tot de gestimuleerde TNF release blijkt de spontane TNF release verlaagd te zijn in de ex-mijnwerkers ten opzichte van de actieve mijnwerkers. Waarschijnlijk wordt deze spontane release met name door "actuele" blootstelling bepaald, terwijl de gestimuleerde release gekoppeld is aan blootstellingsverleden, al dan niet bepaald door een voortdurende reactie in de long op geaccumuleerd mijnstof. Daarentegen blijkt de release van TGF β zowel spontaan als na *ex vivo* stimulatie verhoogd te zijn in de ex-mijnwerkers, en in beide gevallen verhoogd ten opzichte van de nooit blootgestelden. IL-6 release vertoont overeenkomsten met die van TNF, met uitzondering van de door silica gestimuleerde IL-6 release die nagenoeg gelijk blijkt te zijn aan de baseline release van IL-6. De *ex vivo* gestimuleerde release van TGF β en TNF is positief gecorreleerd in niet blootgestelde controles, maar negatief in de mijnwerkers met MWP, hetgeen wijst op de mogelijk tegengestelde rol van beide cytokines in de pathogenese van MWP. Tevens zijn bij de mijnwerkers ook verhoogde plasma concentraties van de TNF receptoren (sTNF-R55 en -R75) gevonden ten opzichte van de niet blootgestelde controles, en blijkt dat medicijngebruik ten tijde van bloedafname een verhogend effect op sTNF-R55 concentraties heeft. Prospectief onderzoek is echter nodig om te bepalen in hoeverre de sTNF-R's, TGF β en IL-6 in navolging van TNF een voorspellende waarde hebben met betrekking tot de progressie van MWP.

In de hoofdstukken 11 en 12 is de rol van serum type III procollageen peptide (PIIIP) bestudeerd. In tegenstelling tot het oorspronkelijke dwarsdoorsnede onderzoek is bij de ex-mijnwerkers geen verband tussen PIIIP en thorax of HRCT score aanwezig, en blijkt PIIIP niet gerelateerd aan de longfunctie (spirometrie, impedantiemeting, diffusiecapaciteit) (hoofdstuk 12). Bovendien blijkt er geen verband met enige parameter van blootstelling te zijn, uitgezonderd een negatieve correlatie tussen cumulatieve stofblootstelling en PIIIP in personen met MWP. De resultaten staan in contrast met andere studies waarbij PIIIP gerelateerd bleek te zijn aan asbestblootstelling en aan de ernst van sarcoidose. Longitudinale analyse toont aan dat serum PIIIP meting in MWP geen marker is voor de individuele gevoeligheid voor het ontstaan of de progressie van fibrose (hoofdstuk 11). Nadere studie is noodzakelijk om het precieze verband tussen serum PIIIP en processen van collageen depositie en afbraak zowel in de "gezonde" long als in MWP beter te begrijpen.

In dit proefschrift zijn diverse markers van blootstelling aan- en effecten van mijnstof bestudeerd en zijn parallel nieuwe inzichten in het ontstaan van longaandoeningen door blootstelling aan mijnstof gegenereerd. De vraag rijst nu in hoeverre de betreffende bevindingen geëxtrapoleerd kunnen worden naar

effecten van blootstelling aan andere soorten mineraal stof. Op grond van de resultaten beschreven in dit proefschrift en aanwijzingen uit dierexperimenteel en *in vitro* onderzoek lijkt dit "generaliseren" voor markers als TNF en antioxidant parameters meer op te gaan dan bijvoorbeeld voor PIIP. Enerzijds dus verdient het aanbeveling om de gepresenteerde bevindingen verder te evalueren voor mijnstof in relatie tot specifieke onderzoeksvragen zoals de voorspellende waarde van de markers in nieuwe mijnwerkers of in patiënten met PMF. Anderzijds echter kan ook aan onderzoek worden gedacht in het kader van andere vormen van blootstelling of andere soorten mineraal stof, zoals werknemers in de keramische industrie, of bij blootstelling aan stof tijdens processen als (steen)slijpen en zandstralen, en bijvoorbeeld in de bouw. De in dit proefschrift gepresenteerde studies kunnen hierbij als een soort leidraad dienen waarbij zowel het gepresenteerde raamwerk van biomarkers van longaandoeningen door mineraal stof alsmede de specifiek geëvalueerde markers in te passen zijn.