

OBSERVATION

UDC 613.633:677.312:57.085.2

## KARAKTERIZIRANJE EKSTRAKTA VUNENE PRAŠINE *IN VITRO*

EUGENIJA ŽUŠKIN I JADRANKA  
MUSTAJBEGOVIĆ

Škola narodnog zdravlja »Andrija  
Štampar« Medicinskog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primljeno 20. veljače 1996.

Vunena prašina opisana je kao uzročnik respiracijskih poremećaja u radnika profesionalno izloženih u industriji na preradi vune. Ovo farmakološko istraživanje obavljeno je na izoliranoj traheji 30-ero zamorčadi s vodenim ekstraktima vune pripremljenim od materijala skupljenog na radnim mjestima izloženih radnika. Ekstrakt vunene prašine dodavan je u sistem Krebsove otopine u progresivno povećanim koncentracijama od 10, 30, 100, 300 i 1000  $\mu$ L.

Ekstrakt vunene prašine uzrokovao je konstrikciju glatke muskulature traheje, koji je učinak znatno smanjen uz prethodnu primjenu pirilamina (antihistamina) i verapamila (agens koji blokira intracelularni i ekstracelularni kalcij). Atropin (antikolinergik) i indometacin (blokator sinteze prostaglandina) pokazivali su vrlo slab učinak na konstrikciju glatke muskulature traheje uzrokovanu ekstraktom vunene prašine. Ovi rezultati upućuju na to da je djelovanje vunene prašine djelomično posredovano medijatorima konstrikcije (tj. histaminom) ili kalcijem.

*Ključne riječi:*  
farmakološko ispitivanje, izloženost vunenoj prašini, izolirana traheja zamorčadi, respiracijski poremećaji

Učinak tekstilne prašine na respiracijski sustav izloženih radnika poznat je još od vremena *B. Ramazzinija* (1). Epidemiološka istraživanja upućuju na visoku učestalost respiracijskih poremećaja u radnika na izradi vunениh tepiha (2-7). *Sigsgaard i suradnici* (8) utvrdili su promjene plućne funkcije radnika s atopijom na preradi vune u usporedbi s ostalim tekstilnim radnicima. Sličnost kliničke simptomatologije između radnika na preradi vune i pamuka opisao je *Ozesmi* (9). Isti

je autor utvrdio u 22% radnika na preradi vunениh tepiha simptome slične bisinozi. Izloženost laboratorijskih životinja vunenoj prašini uzrokovala je upalu dišnih putova (10).

Ovim istraživanjem pokušali su se okarakterizirati učinci vodenog ekstrakta vunene prašine na glatkoj muskulaturi izolirane traheje zamorčadi i usporediti dobiveni rezultati s učincima ekstrakata prašine pamuka i konoplje na istom modelu.

## METODE RADA

### *Priprema ekstrakta vunene prašine*

Uzorci vunene prašine skupljeni su na radnim mjestima radnika koji su bili uključeni u epidemiološko ispitivanje učinaka vunene prašine na respiracijski sustav. Vodeni ekstrakt vunene prašine pripremljen je metodom po *Sheldonu* (11) u koncentraciji 1:10 w/v u Imunološkom zavodu u Zagrebu.

### *Preparacija traheje zamorčeta*

Korištene su traheje 30 ero albino zamorčadi težine 300–400 grama. Smrt životinja izazvana je udisanjem CO<sub>2</sub> nakon čega je izvađena traheja i stavljena u sistem s Krebs-Hanseliet otopinom koja sadržava NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KHPO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, dekstrozu i Na<sub>2</sub>EDTA. Temperatura otopine u sistemu iznosila je 36,5±0,5 °C uz kontinuirano provođenje struje zraka koja sadržava 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> tako da je održavan pH od 7,5±0,1. Traheja svakog zamorčeta razrezana je na pet jednako velikih segmenata od kojih je svaki stavljen u odvojeni sistem s Krebsovom otopinom. Jedan od pet segmenata služio je kao kontrola (testiran Krebsovom otopinom) i ekstraktom vune, a ostala četiri segmenta tretirana su odgovarajućim farmakološkim agensom nakon čega je dodavan ekstrakt vune.

Izometrična kontrakcija traheje registrirana je na poligrafu Grass FTO3C s Grass pisačem. Prije početka eksperimenta s ekstraktima vunene prašine u sistem je dodavan karbakol (10<sup>-4</sup> M). Ekstrakt vune ili Krebsove otopine (kao kontrola) dodavani su u sistem progresivnim povećanjem volumena od 10, 30, 100, 300 i 1000 µl. Biološka aktivnost ekstrakta vune testirana je i uz dodavanje farmakoloških agensa kao što su atropin (10<sup>-6</sup> M, antikolinergik), pirilamin (10<sup>-6</sup> M, antihistamin H1, blokirajući agens) indometacin (10<sup>-6</sup> M, inhibitor sinteze prostaglandina) i verapamil (10<sup>-5</sup> M, blokator intracelularnog i ekstracelularnog kalcija). Izolirana traheja zamorčadi inkubirana je Krebsovom otopinom ili farmakološkim medijatorima tijekom 20 minuta nakon čega je dodavan ekstrakt vune. Aktivnost ekstrakta vune izražena je kao postotak maksimalne početne kontrakcije glatke muskulature traheje zamorčadi izazvane karbakolom (10<sup>-4</sup> M).

### Statistička analiza

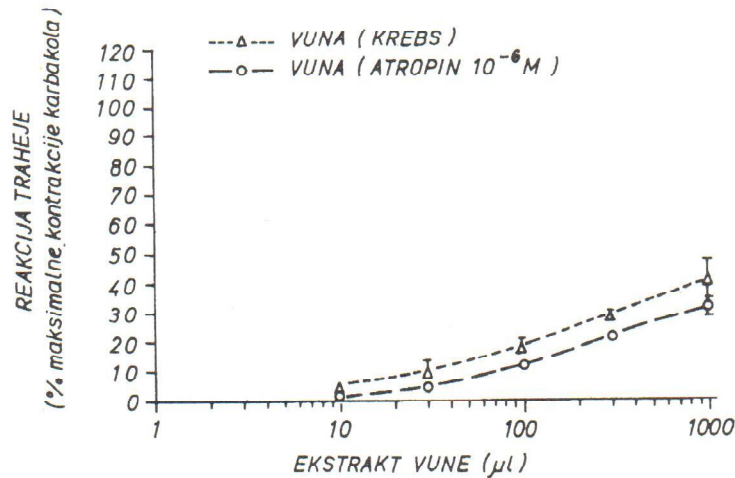
Srednje vrijednosti biološke aktivnosti između ekstrakta vune nakon primjene karbakola te Krebsove otopine i raznih farmakoloških medijatora uspoređivane su t-testom (Staview, Brain Power Inc., Calabasas, CA). Uspoređivane su vrijednosti kontrakcije istog zamorčeta. Podaci su obrađeni prema logističkoj funkciji:

$$E = E_{maks} / (1 + (EC_{50} / (A))^n)$$

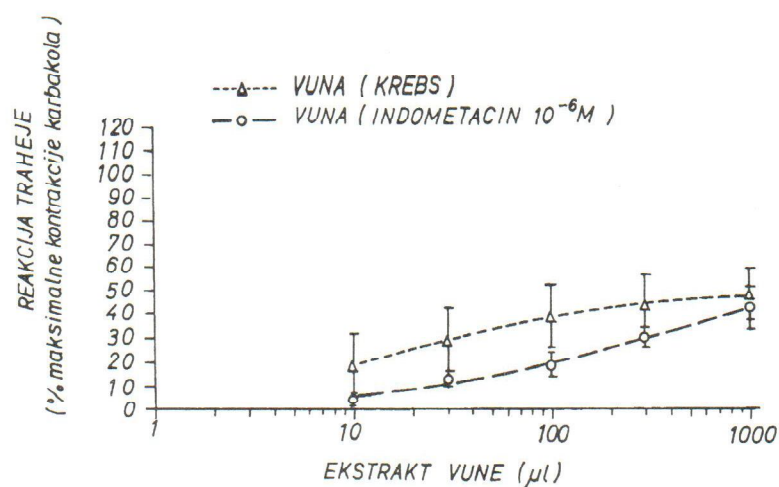
$E_{maks}$  = utvrđena maksimalna kontrakcija traheje (grami iznad bazične linije)  
(A) = koncentracija agonista  
 $EC_{50}$  = polovica maksimalne kontrakcije traheje  
n = nagib krivulje.

### REZULTATI

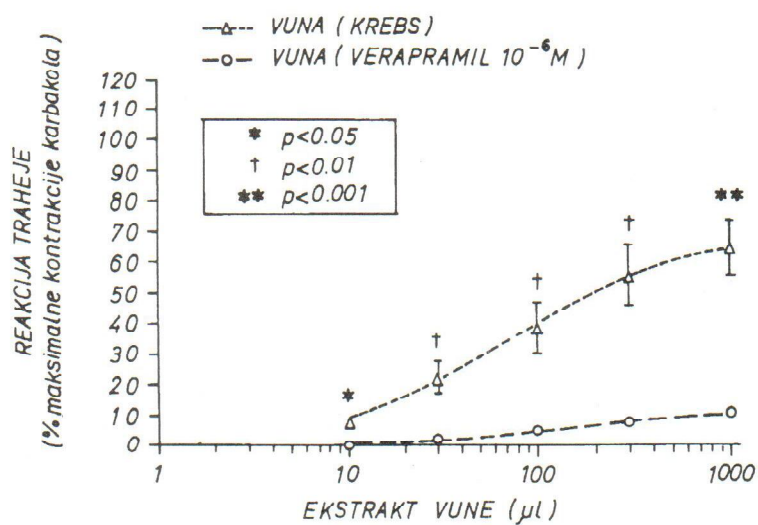
Krivulja doza-odgovor s ekstraktom vune izražena kao postotak maksimalne početne kontrakcije izazvane karbakolom  $10^{-4}$  M prikazana je na slici 1. nakon prethodne primjene Krebsove otopine i atropina ( $10^{-6}$  M), na slici 2. nakon prethodne primjene Krebsove otopine i indometacina, na slici 3. nakon prethodne primjene Krebsove otopine i verapamila te na slici 4. nakon primjene Krebsove otopine i pirilamina ( $10^{-6}$  M). Pirilamin je djelomično blokirao učinke ekstrakta



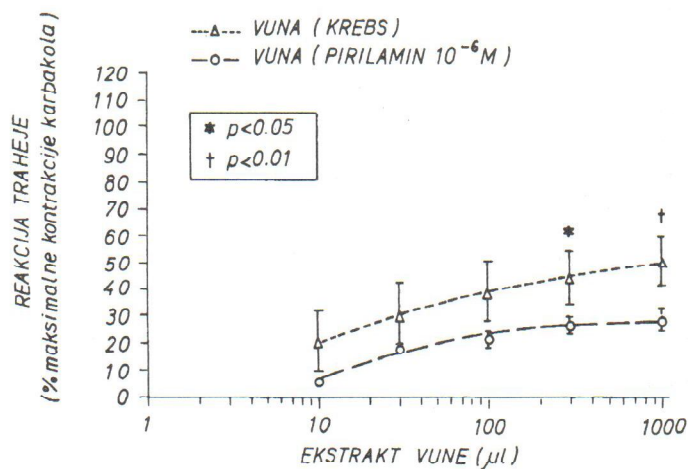
Slika 1. Kontrakcijska aktivnost ekstrakta vunene prašine na glatkoj muskulaturi izolirane traheje zamorčadi nakon prethodne primjene Krebsove otopine i atropina  $10^{-6}$  M ( $\bar{X} \pm SE$ )  
Figure 1 Contractile activity of wool dust extract on isolated guinea pig tracheal smooth muscle following pretreatment with Krebs solution and atropine  $10^{-6}$  M (mean  $\pm$  SE)



Slika 2. Kontraktorna aktivnost ekstrakta vunene prašine na glatkoj muskulaturi traheje zamorčadi nakon prethodne primjene Krebsove otopine i indometacina  $10^{-6}$  M ( $\bar{X} \pm SE$ )  
 Figure 2 Contractile activity of wool dust extract on isolated guinea pig tracheal smooth muscle following pretreatment with Krebs solution and indomethacin  $10^{-6}$  M (mean  $\pm$  SE)



Slika 3. Kontraktorna aktivnost ekstrakta vunene prašine na glatkoj muskulaturi traheje zamorčadi nakon prethodne primjene Krebsove otopine i verapamila  $10^{-6}$  M ( $\bar{X} \pm SE$ )  
 Figure 3 Contractile activity of wool dust extract on isolated guinea pig tracheal smooth muscle following pretreatment with Krebs solution and verapamil  $10^{-6}$  M (mean  $\pm$  SE)



Slika 4. Kontrakcijska aktivnost ekstrakta vunene prašine na glatkoj muskulaturi traheje zamorčadi nakon prethodne primjene Krebsove otopine i pirilamina 10<sup>-6</sup> M ( $\bar{X} \pm SE$ )  
 Figure 4 Contractile activity of wool dust extract on isolated guinea pig tracheal smooth muscle following pretreatment with Krebs solution and pyrilamine 10<sup>-6</sup> M (mean  $\pm$  SE)

vune na glatkoj muskulaturi traheje. Verapamil je gotovo potpuno blokirao kontrakcijske reakcije ekstrakta vune u svim dodanim koncentracijama.

Vrijednosti  $E_{maks}$  za pojedine farmakološke blokirajuće agense i za kontrolu (Krebsova otopina) prikazane su na tablici 1. Najjači blokirajući učinak na kontrakciju glatke muskulature traheje vidljiv je za verapamil i pirilamin.

Tablica 1. Usporedba  $E_{maks}$  traheje zamorčadi nakon primjene farmakoloških agensa i kontrole  
 Table 1 Comparison of  $E_{max}$  for drug treated guinea pig tracheas with matched controls

Agensi Drugs	Koncentracija Concentration	$E_{maks} / E_{max}$	
		tretirani Treated	kontrola Control
Pirilamin Pyrilamine	10 µl	28,9 ± 4,2	51,0 ± 9,7
Atropin Atropine	10 µl	36,1 ± 5,7	37,7 ± 8,7
Indometacin Indomethacin	10 µl	41,7 ± 9,5	53,4 ± 11,6
Verapamil Verapamil	10 µl	10,8 ± 2,1	64,9 ± 10,3

Podaci su prikazani kao  $\bar{X} \pm SE$  / Data are presented as mean  $\pm$  SE

## RASPRAVA

Farmakološke reakcije na razne specifične antagoniste omogućuju razlikovanje učinaka ekstrakta vune od ekstrakta prašine pamuka. Tablica 2. prikazuje uspoređivanje učinaka farmakoloških agensa s ekstraktom vunene prašine i ekstraktom pamučne prašine. Konstrikcija uzrokovana ekstraktom pamučne prašine značajno je blokirana brojnim farmakološkim agensima, dok učinci ekstrakta vunene prašine nisu toliko pod djelovanjem farmakoloških agensa.

Tablica 2. Usporedba farmakoloških agensa na odnos doza-reakcija ekstrakta dviju tekstilnih prašina  
 Table 2 Comparison of pharmacological agents of the dose-response characteristics of two textile dust extracts

Agens / Drug	Ekstrakt prašine / Dust extract	
	Pamuk / Cotton	Vuna / Wool
Pirilamin <i>Pyrilamine</i>	+	+/-
Atropin <i>Atropine</i>	+	-
Indometacin <i>Indomethacin</i>	X	-

- = bez učinka

- = no effect

+ = pojačanje

+ = enhancement

X = smanjenje pri niskim koncentracijama ekstrakta, pojačanje pri visokim koncentracijama

X = attenuation at low dust extract concentrations, enhancement at high concentrations

Farmakološko ispitivanje učinaka ekstrakta vunene prašine na glatku muskulaturu traheje zamorčadi upućuje na kompleksni mehanizam nadražajnog djelovanja vune. Ova početna ispitivanja upućuju na to da je barem jedan od medijatora uključen u konstrikciju uzrokovanu *in vitro*. Takav mehanizam čini se opravdanim budući da ekstrakti drugih tekstilnih prašina (npr. pamuk i sisal) u eksperimentima *in vitro* oslobađaju histamin iz plućnog tkiva svinje i čovjeka (12-14). Ispitivanja s ekstraktom ovojnice pamuka upućuju na to da neki farmakološki agensi mogu modulirati konstrikciju dišnih putova *in vivo* (15-17). Oslobađanje medijatora u izloženosti vuni, osobito histamina, kao i učinak histamina prisutnog u vunenoj prašini, čini se kao opravdani mogući mehanizam za konstrikcijski učinak registriran u ispitivanjima *in vitro* i *in vivo*.

Epidemiološka istraživanja opisala su mogućnost razvoja profesionalnih plućnih bolesti u izloženosti vunenoj prašini (4, 3, 9). Žuškin i suradnici (4) opisali su značajno smanjenje plućne funkcije u zdravih osoba nakon inhalacije ekstrakta

vune. *Donaldson i suradnici* (10) utvrdili su da unošenje vunene prašine u pluća štakora dovodi do upalnih promjena.

Učinci ekstrakta vunene prašine na izoliranoj traheji nesenzibilizirane zamorčadi u našem istraživanju upućuju na neimunosne (ne-IgE) mehanizme. Ti su nalazi slični onima s ekstraktom ovojnice pamuka (15-17), ekstrakta pamučne prašine (19) i ekstrakta prašine konoplje (18). Ti su nalazi potvrđeni ispitivanjem *Browna* (20) koji je opisao negativne prick kožne testove na vunu u radnika u tekstilnoj industriji.

Analiza reakcija na različite farmakološke agense u našem eksperimentalnom istraživanju upućuje na to da blokada specifičnih receptora osim histaminskih, ima slab učinak na konstrikciju glatke muskulature traheje uzrokovanu ekstraktom vunene prašine. Osobito atropin nije pokazivao značajni učinak na Emaks. Verapamil (agens koji blokira kalcij) značajno je umanjio konstrikcijski učinak ekstrakta vunene prašine. Mobilizacija kalcija za kontrakcijski mehanizam može potjecati od intracelularnih i ekstracelularnih staničnih depoa. Povećanje intracelularnog  $Ca^{++}$  javlja se u glatkoj muskulaturi i uzrokuje konstrikciju podražajem receptora ili bez podražaja receptora (21, 22). Ulogu farmakoloških tvari koje blokiraju kalcij u prevenciji opstrukcije dišnih putova treba još detaljnije ispitati. Međutim, takvi nalazi mogu imati kliničku i terapijsku primjenu za akutne i kronične respiracijske simptome i plućne funkcionalne promjene opisane u epidemiološkim i kliničkim ispitivanjima tekstilnih radnika na preradi vune.

## LITERATURA

1. *Ramazzini B.* Diseases of Workers (prevedeno s latinskog teksta *De Morbis Artificum*, 1917). New York, London: Hafner Publishing Co., 257-61.
2. *Moll HH.* Occupational asthma with reference to wool sensitivity. *Lancet* 1933;1:1340-2.
3. *Allardice JT, Clarke EC, Jones RD.* A study of the prevalence of epistaxis and respiratory symptoms in carpet backwinders. *J Soc Occup Med* 1983;33:36-41.
4. *Žuškin E, Valić F, Bouhuys A.* Effect of wool dust on respiratory function. *Am Rev Respir Dis* 1976;114:705-9.
5. *Love RG, Smith TA, Gurr CA, Scarisbrick DA, Seaton A.* Respiratory and allergic symptoms in wool textile workers. *Br J Ind Med* 1988;45:727-41.
6. *Love RG, Smith TA, Jones CO, Gurr CA, Soutar CA, Seaton A.* Respiratory symptoms in wool textile workers. *Thorax* 1987;42:208.
7. *Love RG, Smith TA, Soutar CA.* Estimated prevalence and relative risk of respiratory and allergic symptoms in wool textile workers. *Thorax* 1987;42:727.
8. *Stigsgaard T, Pedersen OF, Juul S, Gravesen S.* Respiratory disorders and atopy in cotton, wool, and other textile mill workers in Denmark. *Am J Ind Med* 1992;22:163-84.
9. *Ozesmi M, Aslan H, Hillerdal G, Rylander R, Ozesmi C.* Byssinosis in carpet weavers exposed to wool contaminated with endotoxin. *Br J Ind Med* 1987;44:479-83.
10. *Donaldson K, Love RG, Cullen RT, Brown GM, Brown DM, Soutar CA.* Inflammation effects in the rat lung caused by dust collected from the air of British wool factories. *Thorax* 1988;43:262P.
11. *Sheldon JM, Lowell RG, Mathews KP.* Manual of Clinical Allergy. Philadelphia: WB Saunders, 1967:507-31.

12. *Nicholls PJ*. Some pharmacological actions of cotton dust and other vegetable dusts. *Br J Ind Med* 1962;19:33-41.
13. *Nicholls PJ, Evans E, Valič F, Žuškin E*. Histamine-releasing activity and bronchoconstricting effects of sisal. *Br J Ind Med* 1973;30:142-5.
14. *Hitchcock M, Piscitelli D, Bouhuys A*. Histamine release from human lung by a component of cotton bracts. *Arch Environ Health* 1973;26:177-82.
15. *Schachter EN, Brown S, Žuškin E, Beck GJ, Buck M, Bouhuys A*. The effect of mediator modifying drugs in cotton bract induced bronchospasm. *Chest* 1981;79:73-6s.
16. *Schachter EN, Žuškin E, Witek TJ, et al*. Pharmacologic studies of cotton bract extract in isolated guinea pig trachea. Proceedings of the 12th Cotton Dust Research Conference, New Orleans, LA, 1988:89-91.
17. *Witek TJ, Mazzar CA, Žuškin E, Beck GJ, Buck MG, Schachter EN*. Bronchial responsiveness after inhalation of cotton bract extract. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:1579-83.
18. *Žuškin E, Kanceljak B, Schachter EN, et al*. Immunological findings and respiratory function in cotton textile workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;64:31-7.
19. *Žuškin E, Kanceljak B, Schachter EN, et al*. Immunological findings in hemp workers. *Environ Res* 1992;59:350-61.
20. *Brown H*. Sheep's wool as an environmental allergen. *Immunol Allergy Pract* 1992; 14:145-9.
21. *Alexandre MA, Pintado King A, Puerro M*. KCl induced-contractions in isolated rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 1993;24:921-8.
22. *Gustavsson H, Nilsson H*. Contractions of isolated small arteries from rats: role of calcium. *Acta Physiol Scand* 1993;149:283-91.

### Summary

#### CHARACTERIZATION OF WOOL DUST EXTRACT *IN VITRO*

Wool dust has been described as a cause of respiratory impairment in workers occupationally exposed in wool processing. A pharmacological investigation was performed on 30 samples of isolated guinea pig trachea with wool dust water extracts prepared from the material collected at the workplaces of exposed workers. Wool extract was added into the system with Krebs solution in progressively increased concentrations of 10, 30, 100, 300 and 1000  $\mu$ l. The constriction of the tracheal smooth muscle caused by wool dust extract was diminished after pretreatment with pyrilamine (antihistamine) and verapamil (intracellular and extracellular calcium blocking agent). Atropine (anticholinergic) and indomethacin (inhibitor of prostaglandin synthesis) had very little impact on the bronchoconstrictive effect of wool dust extract on the tracheal smooth muscle. This finding suggests that the airway constriction induced by wool dust is partly attributable to mediators like histamine and also to calcium.

#### Key terms:

pharmacological investigation, exposure to wool dust, isolated guinea pig trachea, respiratory disorders

#### Requests for reprints:

Prof. dr. Eugenija Žuškin  
Škola narodnog zdravlja »Andrija Štampar«  
Rockefellerova 4  
10000 Zagreb