

MODELE CELULARE PENTRU STUDIUL MODIFICĂRILOR STRUCTURALE ȘI FUNCTIONALE ALE FIBROBLASTELOR PULMONARE IN MALADII PROFESIONALE ȘI ASOCIATE MEDIULUI

	Nr.contract	Buget
I	41022/2003	40.922.000
II	33379/2004	138.000.000
III	34699/2005	162.800.000

Raport de Cercetare

Studiul unor maladii profesionale sau asociate mediului este un domeniu de vârf în cercetarea bio-medicală. Dintre compușii care produc maladii pulmonare menționăm : pulberile de cărbune, granit și ciment, diferitele făinuri (de la cereale, pește, oase), fibrele de azbest utilizate în construcții, metalele tranzitionale și compușii lor (beriliu, cadmiu, vanadiu, nichel, cupru, fier) din mediul zonelor industrializate [Samet și Utell, 1991 ; Singh și Davis, 2002 ; Tager, 2000 ; van Tongeren și colab., 2002].

Expunerea profesională la beriliu - noxă în industria oțelurilor, ceramicii, electronicii, în producția lămpilor fluorescente - produce o stare granulomatoasă a plămânilor, numită *berilioză* deoarece Be este un agent toxic și carcinogen [Maier, 2002]. De fapt, *berilioza* ia naștere în urma combinării efectelor expunerii la Be cu factori de risc genetic, genotipul HLA-DP fiind corelat cu o sensibilitate la Be [Wang și colab., 2001]. NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) din SUA publică în 1992 un studiu epidemiologic [Ward și colab., 1992], privind incidența mare a cancerelor la persoanele care lucrează în fabrici ce prelucrează Be. Caracteristica fundamentală a *beriliozei* este masiva proliferare a mai multor tipuri de celule din plămâni printre care și fibroblastele. Paradoxal, datele din literatura de specialitate arată că sărurile de Be au efecte inhibitoare asupra creșterii fibroblastelor pulmonare [Lehnert et al., 2001].

Cd²⁺ este un important contaminant al culturilor de tutun și participă la patogeniza gudoanelor fumului de țigară [Snider și colab., 1973]. Există studii care au arătat că expunerea la Cd²⁺ în stare de pulbere sau gazoasă conduce la dezvoltarea emfizemului [Davison și colab. 1988] și a fibrozei pulmonare [Damiano și colab., 1990]. Dezechilibrele de la nivelul turnoverului proteinelor țesutului conjunctiv pulmonar conduc la depozitarea sau dezintegrarea țesutului, modificări implicate în fibroza și respectiv în emfizemul pulmonar [Laurent, 1986]. În parte, acțiunea Cd²⁺ este datorată efectului lui direct asupra fibroblastelor, principalele celule producătoare de componente ale țesutului conjunctiv din plămâni. În suportul acestei ipoteze vin studiile lui Chambers și colab. [1998] care au arătat că Cd²⁺ inhibă proliferarea fibroblastelor, sinteza procolagenului și a proteoglicanilor. Brzoska și colab. [2000] au arătat că etanolul crește permeabilitatea membranelor biologice la Cd²⁺, majoritatea alcoolicii fiind mai susceptibili la acest metal greu.

Implicarea compușilor vanadiului în patologia plămânilor, corelată cu expunerea profesională sau la un mediu poluat, este studiată atât pe subiecți umani cât și pe sisteme model utilizând animale expuse la vanadați, pentaoxid de vanadiu sau cenușa unor reziduuri industriale uleioase ROFA (« residual oil fly ash »). ROFA, un subprodus al combustiei uleiurilor, este o sursă importantă de emisie a particulelor metalice, care are un conținut mare de vanadiu (18,8 %) în afara Ni și Fe și care poluează puternic atmosfera. Chong și colab. [2000] utilizează șobolani cu inflamație pulmonară acută indusă de instilarea intratraheală de NaVO₃ și evidențiază un influx masiv de leucocite polimorfonucleare (PMN) în plămâni după patru ore de la tratament, precedat de o expresie crescută a mRNA proteinei MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*), un puternic chemoattractant al PMN. Longphre și colab. [2000] realizează un studiu pe muncitori implicați în fabricarea sau utilizarea instalațiilor de apă caldă, expuși la ROFA constatând creșterea producției de mucine de la nivelul plămânilor și a susceptibilității la infecții. Inducția mucinii de ROFA este mediată de căi de semnalizare care presupun reacții de tirozin fosforilare/defosforilare iar vanadatul este un potent inhibitor al fosfotirozin fosfatazelor. Pentaoxidul de vanadiu (V₂O₅) produce hipersensibilitate la nivelul bronhiilor și astm care persistă până la 23 luni după expunere [Irsigler și colab., 1999].

În cadrul acestui proiect s-au studiat efectele tratamentelor *in vitro* a fibroblastelor pulmonare umane (HLF) cu diferite concentrații de Be^{2+} , Cd^{2+} și V^{5+} în scopul evaluării citotoxicității acestor ioni, corelat cu modificări în proliferarea și apoptoza acestui tip celular. S-a investigat elaborarea citokinei proinflamatorii IL-4 implicată în patogeneza fibrozei pulmonare, precum și implicarea metaloproteinazelor MMP-1 (colagenaza) și MMP-3 (stromelisină-1) și a inhibitorului lor TIMP-1 în modularea metabolismului matricei extracelulare.

Materiale și metode

Izolarea fibroblastelor pulmonare umane (HLF).

Culturile primare de HLF au fost separate din țesut pulmonar embrionar obținut din avortoni umani, utilizând tehnica explantului. Cultivarea HLF s-a realizat în mediul DMEM (Sigma) suplimentat cu 15% ser fetal bovin (Sigma), 1 % L-glutamină și antibiotice (100 U/ml penicilină, 10 mg/ml streptomycină), la 37°C într-un termostat într-o atmosferă cu 5% CO_2 -95% aer. Mediul a fost schimbat la 2-3 zile, iar pasajele s-au realizat cu o soluție de tripsină 0,25 %, EDTA 0,2 % în tampon fosfat salin (PBS). Morfologia celulelor a fost monitorizată periodic cu un microscop cu inversie Nikon TS 100 F.

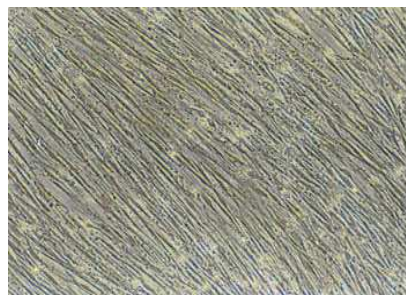


Fig.1. Fibroblaste pulmonare umane control

Tratamentul HLF (pasajul 5) a fost realizat astfel :

- însămânțare în flascuri T_{25} la o densitate de 2×10^5 celule/flasc ;
- cultivare în DMEM + 10 % SFB până ajung la 70 % confluență ;
- îndepărtarea mediului și adăugarea mediului DMEM fără sau cu numai 0,1 % SFB ;
- incubare 24 ore ;
- tratare cu diferite concentrații de cloruri în DMEM fără SFB, timp de 24 – 72 ore :

Na_3VO_4		10 μM		50 μM	100 μM	1 mM
BeCl_2	1 μM	10 μM			100 μM	
CdCl_2		10 μM	30 μM		100 μM	

Viabilitatea celulelor din cultură a fost evaluată prin testul cu Trypan blue, în care colorantul penetrează numai membrana celulelor moarte, colorându-le în albastru [Patterson, 1979].

Citotoxicitatea celor trei tratamente a fost studiată determinându-se conținutul procentual al lactat dehidrogenazei care iese din celulă ca rezultat al distrugerii membranei plasmatică, urmărind oxidarea NADH prin scăderea absorbției la 340 nm. Pentru exprimarea rezultatelor s-a dozat concentrația proteică în mediu și în extractele celulare prin metoda Bradford [1976].

Proliferarea celulelor a fost evaluată prin determinarea cantitativă a DNA cu bisbenzimidazol (Hoechst 33258) conform metodei descrise de Rago și colab. [1990]. Pentru dozarea DNA, se adaugă 0.1 ml soluție fluorocrom 0,02 mg/ml în tampon 1 mM EDTA, 10 mM Tris și 2M NaCl, pH 7.4. Fluorescența este evaluată la un spectrofluorimetru la λ_{ex} 360 nm și λ_{em} 460 nm.

Apoptoza celulelor a fost evaluată prin aprecierea fragmentării DNA cu kitul "Cell Death detection ELISA Plus" conform indicațiilor producătorului Roche Diagnostics. Rezultatele au fost exprimate ca o absorbanță relativă la 405 nm, o măsură a nivelului nucleosomilor citoplasmatici.

Nivelul citokinei IL-4 eliberată în mediul de cultură al fibroblastelor a fost dozat utilizând tehnica ELISA «sandwich» Quantikine HS R&S Systems.

Activitatea enzimelor MMP secretate de celule în mediul de cultură, a fost studiată după separarea electroforetică a proteinelor în gel de poliacrilamidă 7,5% în care s-a inclus 0,1 % gelatină sau caseină. Benzile proteice cu activitate enzimatică, care apar ca plaje de liză, au fost analizate semi-cantitativ prin densitometrare cu un scanner profesional utilizând Bio1D software (Vilber-Lourmat, France). Identificarea tipului de MMP s-a realizat pe baza maselor moleculare. Metoda Western Blotting a permis stabilirea cu precizie a tipului de MMP și a inhibitorului TIMP-1 în zimogramele proteinelor separate electroforetic din mediul de cultură. Utilizând kituri ELISA Chemicon s-a realizat dozarea MMP-1, MMP-3 și TIMP-1 în mediul de cultură a celulelor tratate.

Rezultate și discuția lor

Morfologic, incubarea culturii celulare cu vanadat de sodiu, clorură de beriliu sau clorură de cadmiu afectează aspectul HLF într-o manieră dependentă de natura metalului, doză și de timpul de incubare.

Tratamentul celulelor cu vanadat în concentrații 10 – 100 μM nu afectează viteza de proliferare a celulelor, care însă capătă un aspect mai acicular, elaborând mai multe prelungiri citoplasmice prin care aderă la suport. La doze mai mari de vanadat (> 1 mM) se observă desprinderea celulelor de pe suport, prezența unor celule moarte care plutesc în mediu și numărul mare de resturi celulare ca rezultat al unui proces necrotic (Figura 2).

Datele Tabelului 1 arată rezultatele experimentale care arată toxicitatea tratamentului cu diferite concentrații de vanadat

Se observă că numai tratamentul cu concentrații de vanadat mai mari de 1 mM conduce la efecte citotoxice. Tratamentul cu vanadat 10 mM conduce la scăderea viabilității HLF cu 73 %, o eliberare a LDH în mediu cu 316 % și scăderea nivelului DNA celular cu 67 %.

Interesantă este observația că la concentrații mici de vanadat: 10 μM , 50 μM și 100 μM – nu este afectată viabilitatea celulară, nu apar efecte citotoxice, observându-se chiar efecte de stimulare a proliferării. Există deja studii care sugerează că vanadatul poate acționa în anumite condiții ca un factor de creștere, ca insulina.

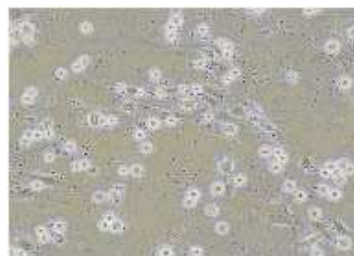


Fig.2. HLF tratate cu 10 mM vanadat, timp de o oră

Tabelul 1. Datele experimentale obținute în urma tratamentului HLF cu vanadat, timp de o oră

Vanadat	% Viabilitate (Trypan Blue)	Eliberarea LDH (% total)	DNA (unități fluorescență)	Apoptoza Abs 405 nm
0	100	100	128 ± 24,6	0,038
10 μM	102 ± 4,7	103 ± 2,6	122 ± 22,4	0,062
50 μM	87 ± 7,1	103 ± 5,3	141 ± 18,2	0,044
100 μM	98 ± 6,6	108 ± 4,6	252 ± 20,4	0,038
1 mM	73 ± 6,4	222 ± 12,4	56 ± 10,2	0,982
10 mM	27 ± 0,4	416 ± 23,8	42 ± 4,8	0,145

Tratamentul cu diferite concentrații (0,1 – 100 μM) de clorură de beriliu afectează morfologia HLF într-o manieră dependentă de concentrație și durata tratamentului. Astfel, tratamentul cu 1 μM BeCl_2 timp de 24 ore permite creșterea celulelor în monostrat, în timp ce 100 μM BeCl_2 (72 ore) dezorganizează celulele, care se desprind de pe suport și apar cu un contur luminos, în mediu existând reziduri celulare (Figura 3).

În Tabelul 2 prezentăm rezultatele obținute în urma monitorizării viabilității, citotoxicității, proliferării și apoptozei celulelor tratate cu BeCl_2 , timp de 24, 48 și 72 ore. Gradul de inhibiție al creșterii HLF de către Be^{2+} persistă timp de 3 zile chiar după îndepărtarea sării din mediul de reacție. Interesant că procesul apoptotic, la nivelul fragmentării DNA, devine semnificativ numai în cazul dozei de BeCl_2 100 μM , după 72 ore de tratament la 37°C.

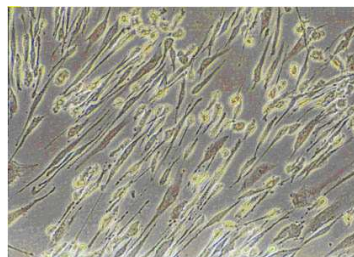


Fig. 3. HLF cu 100 μM BeCl_2 timp de 3 zile

Tabelul 2. Monitorizarea tratamentelor cu clorură de beriliu

BeCl_2	ore tratament	Viabilitatea %	Citotoxicitatea %	Nivelul DNA Unități fluorescență	Apoptoza* Abs 405 nm
0		92,7 ± 5,8	4,5 ± 0,4	267,5 ± 27,5	0,045
1 μM	24	93,5 ± 2,4	6,9 ± 0,4	305,0 ± 44,5	0,048
	48	96,1 ± 2,9	4,4 ± 0,7		
	72	92,8 ± 11,2	8,1 ± 1,2		
10 μM	24	90,3 ± 2,4	6,9 ± 1,3	255,7 ± 12,3	0,045
	48	89,0 ± 1,7	8,9 ± 1,7		
	72	87,5 ± 9,5	11,3 ± 1,2		

100 μ M	24	83,0 \pm 6,5	38,4 \pm 4,1	144,5 \pm 22,0	1,012
	48	66,5 \pm 9,3	39,8 \pm 6,9		
	72	48,3 \pm 8,7	38,9 \pm 7,7		

Studiul acțiunii Cd^{2+} asupra HLF arată o creștere a vitezei cu care celulele ajung la confluență și a taliei celulelor (Figura 4) sugerând o intensificare a activității metabolice și posibil a sintezei de collagen. În domeniul de concentrații testate, clorura de cadmiu are un puternic efect stimulator asupra creșterii și proliferării celulare, la cele două doze mici (10 și 30 μ M) și ușoare efecte citotoxice la doza maximă de 100 μ M. Astfel, în cazul dozei de 30 μ M, la care s-au observat efecte proliferative maxime, tratamentul conduce la creșterea nivelului DNA cu 24 % după 24 ore și cu 52,8 % după 72 ore, fără a se evidenția procese citotoxice.

Creșterea dozei de CdCl_2 la 100 μ M nu accentuează efectul proliferativ, dar apar ușoare efecte citotoxice după 72 ore de citotoxice tratament manifeste prin creșterea eliberării LDH în mediu (cu 22,3 %) și prin scăderea adeziunii celulelor pe suportul flascăului de cultură.

Pentru a studia eventuale efecte pro-inflamato-rii produse de aceste tratamente s-a studiat eliberarea în mediu a unei citokine pro-inflamatoare IL-4, implicată în activarea fibroblastelor, creșterea producției componentelor matricei extracelulare, precum collagenul și fibronectina și în dezvoltarea fibrozei pulmonare [Izbicki și colab., 2002].

Nu am depistat un semnal pentru IL-4 în cazul fibroblastelor control, netratate; nivelul acestei citokine fiind crescut la concentrații mai mari de 90-100 μ M Be^{2+} , Cd^{2+} și V^{5+} . La aceeași concentrație de efector (100 μ M) inducția sintezei IL-4 crește în ordinea $\text{Be}^{2+} < \text{V}^{5+} < \text{Cd}^{2+}$. Datele noastre arată că tratamentele cu Be^{2+} , Cd^{2+} și V^{5+} induc un răspuns inflamator și modificări în metabolismului proteinelor matricei extracelulare sugerând o acțiune profibrotică.

Metaloproteinazele matriceale (MMP) sunt o familie de metalo-endopeptidaze ce scindează componente proteice ale MEC și joacă un rol fundamental în remodelarea țesuturilor. MMP-1 (numită și collagenaza-1, collagenaza interstițială, collagenaza din fibroblaste) a fost detectată inițial în fibroblastele gingivale. Regiunea promotor a genei umane ce codifică MMP-1 conține elemente AP-1 (*activator protein-1*), care sunt capabile să medieze cel puțin procesul inductiv realizat de către PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). Gena pentru MMP-1 este transcrisă într-o specie moleculară mRNA de 2,5 kb. Există două forme latente a MMP-1 de 57 kDa și 52 kDa, care se găsesc în țesuturi în raport de 1:4. pro-MMP-1 de 57 kDa este rezultatul N-glicozilării formei de 52 kDa. Formele active ale MMP-1 au 48 kDa și respectiv 42 kDa, în care MMP-1 de 42 kDa reprezintă enzima stabilă și activă. Activitatea collagenolitică a MMP-1 este mediată de motivul $^{183}\text{RWTNRFREY}^{191}$ din domeniul catalitic în cooperare cu domeniul hemopexinic C-terminal. Enzima activă hidrolizează colagene tip I și III în fragmente N-terminale și C-terminale. MMP-1 catalizează scindarea catenelor α din colagene tip II, VII, X și VIII. Alte substraturi ale MMP-1 sunt: α_2 -macroglubulina, gelatina și caseina, inhibitorul α_1 -proteinazei, α_1 -antichimotripsina, tenascina și IL-1 β [Chung și colab., 2000].

MMP-3 a fost purificată și caracterizată din fibroblaste sinoviale reumatoide umane și cele din piele. Promotorul genei MMP-3 conține trei secvențe pentru inducerea mitogenică: SPRE (*stromelysin-1 PDGF-responsive element*), PEA3 (*polyomavirus enhancer A-binding protein-3 site*) și AP-1. SPRE este un situs de legare a factorului transcripțional SPBP (*SPRE-binding protein*), ce induce transcrierea altor factori de transcripție [Rekdal și colab., 2000]. TPA (*12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate*) se leagă la situsul PEA3 și mediază transcrierea genei MMP-3 umane. Situsul AP-1 mediază exprimarea bazală a genei MMP-3. Studii pe animale au dezvăluit că TIE (*TGF- β 1 inhibitory element*) din regiunea promotor mediază efectul inhibitor al TGF- β 1 asupra exprimării genei MMP-3. În funcție de vârsta populației celulare MMP-3 este indusă sau repressată de TGF- β 1. În fibroblastele tinere, TGF- β 1 represează inducerea genei, în timp ce în celulele îmbătrânite, repressia nu este evidentă.

MMP-3 și MMP-1 prezintă o identitate de 54% a secvenței proteice. pro-MMP-3 are 57 kDa și poate fi glicozilată la o formă moleculară de 60 kDa. Ea este procesată la o formă intermediară de 53 kDa, prin îndepărtarea unei pro-peptide de 35 aminoacizi. Autoliza formei intermediare are ca rezultat o formă MMP-3 activă de 45 kDa, ce poate fi procesată mai departe la o formă activă de 28 kDa. Enzimele latentă și activă a MMP-3 cu masă moleculară mare se pot lega la fibrile de collagen și la

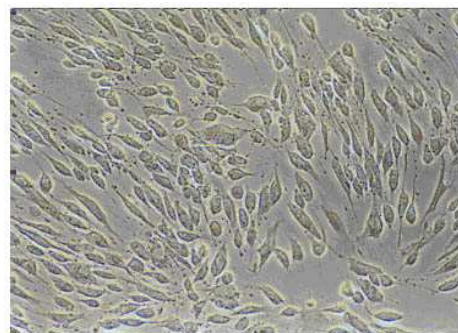


Fig. 4. HLF tratate cu 30 μ M CdCl_2 , după 24 ore

alte componente ale MEC prin domeniul C-terminal, în timp ce formele active cu masă moleculară mică nu pot realiza acest lucru.

MMP-3 activă scindează proteoglicanii din cartilaj, gelatina, colagene tip IV și IX, pro-colagenul tip III, laminina și fibronectina. Acționează ca o telopeptidază față de colagene tip II și XI și hidrolizează colagenul tip X și agrecanul. Mai mult, MMP-3 degradează fibrinogenul și fibrina, IL-1 β , decorina, activatorul plasminogenului tip urokinază și PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) și IgG. pro-MMP-3 activează plasminogenul prin complexare cu acesta și cu t-PA (*tissue-type plasminogen activator*) [Arza și colab., 2000].

Intr-o primă etapă a studiului enzimelor MMP s-au realizat gelatin- și cazein zimografii a proteinelor secretate în mediul de cultură (Figura 5). Prin gelatin zimografie se observă apariția a două benzi proteice majore ale MMP-2 (72 kDa) și MMP-9 (92 kDa). Prin cazein zimografie se observă o bandă proteică majoră cu activitate proteolitică de circa 50 kDa ce poate fi datorată MMP-1, normal secretată ca o pro-enzimă de 52 kDa și care suferă activare la o formă de 42 kDa.

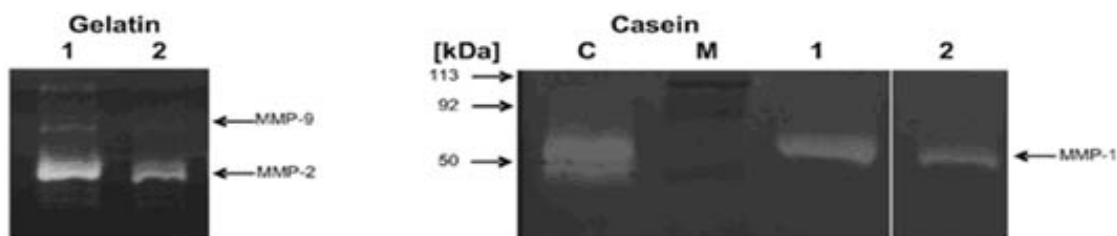


Fig. 5. Fotografii tip preluate în urma separării pe geluri de poliacrilamidă în care s-a inclus gelatină sau cazeină

MMP-3 ce are o forma zimogenă de 57 kDa și poate fi procesată la o formă activă de circa 45 kDa nu se poate deosebi clar prin zimografie de MMP-1. Din acest motiv s-a realizat o analiză Western blotting – metodă care se bazează pe identificarea unui antigen (MMP, TIMP) cu un anticorp specific. Inițial proteinele din mediul de cultură sunt separate electroforetic în gel de SDS-poliacrilamidă, după care sunt transferate electroforetic pe un substrat solid (membrană de difluorură de polivinidil). Proteinele imobilizate reacționează cu anticorpi mono- sau policlonali, iar complexe antigen-anticorp sunt localizate radiografic, cromogenic sau prin reacții chemiluminiscente.

Metoda Western Blotting a permis stabilirea cu precizie a tipului de MMP și a inhibitorului TIMP-1 în zimogramele proteinelor separate electroforetic din mediul de cultură (Figura 6).

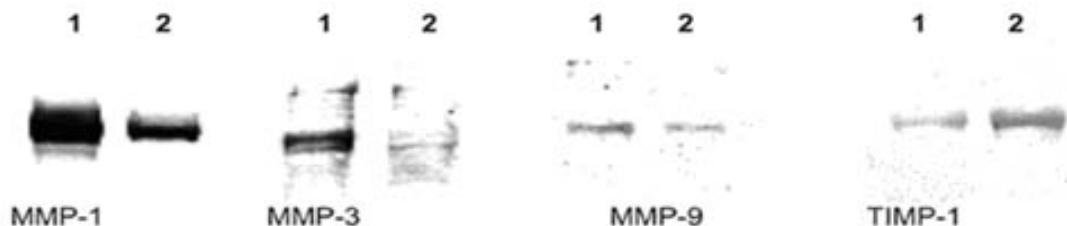


Figura 6. Comparație între rezultatele obținute prin cazein zimografie și western blotting

Tehnica ELISA (*Chemicon*) permite dozarea cantitativă a pro-MMP-1, pro-MMP-3 și TIMP-1 umane care se bazează pe dozarea unei proteine în urma interacției cu anticorpul ei specific. În experimentul control s-au determinat următoarele concentrații: $3,75 \pm 0,70$ ng/ μ g proteină MMP-1; $0,87 \pm 0,14$ ng/ μ g proteină MMP-3 și $4,91 \pm 0,28$ ng/ μ g proteină TIMP-1. Concentrații mai mari de 90-100 μ M Be $^{2+}$, Cd $^{2+}$ și V $^{5+}$ inhibă total activitatea MMP, TIMP sau/și reacția de dozare a activității enzimei legate la anticorpul secundar. În cazul tratamentului cu BeCl $_2$ 1 μ M timp de 24 ore are loc creșterea nivelului MMP-1 cu 32,4 % și inhibiția MMP-3 cu 12,7 % fără a afecta nivelul TIMP-1. Tratamentul cu CdCl $_2$ 30 μ M timp de 24 ore conduce la creșterea nivelului MMP-1 cu 74,5 % și inhibiția concentrației MMP-3 și TIMP-1 cu 24,8 % și respectiv 71,8 %. Incubarea timp de 24 ore a

HLF cu vanadat 100 μ M produce activarea MMP-1 cu 36,8 % și inactivarea MMP-3 și TIMP-1 cu 19,8 % și respectiv 48, 5 %

Activarea producției MMP-1 și inhibiția MMP-3 este greu de interpretat deoarece cele două enzime au structuri și proprietăți apropiate, ambele gene având în regiunea promotor elemente "response" similare. Totuși în literatura de specialitate este semnalată inhibiția MMP-3 de către TGF- β 1, observație care poate sugera că tratamentele preconizate de noi induc eliberarea citokinei pro-inflamatoare și profibrotice. Activarea MMP-1 și inhibiția TIMP-1 sugerează că tratamentele cresc activitatea colagenolitică eliberând inhibiția și controlul exercitat de inhibitor.

Bibliografie

Arza, B., Hoylaerts, M.F., Felez, J., Collen, D., Lijnen, H.R. Prostromelysin-1 (proMMP-3) stimulates plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 267: 6378–84, 2000.

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254, 1976

Brozoska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Jurczuk, M., Galazyn-Sidorczuk, M., Rogalska, J., Effect of short-term ethanol administration of cadmium retention and bioelement metabolism in rats continuously exposed to cadmium, *Alcohol & Alcoholism*, 35, 439-445, 2000

Chambers, R. C., Laurent, G.J., Westergreen-Thorsson, G., Cadmium inhibits proteoglycan and procollagen production by cultured lung fibroblasts, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 19, 498-506, 1998

Chong, I.W., Shi, M.M., Love, J.A., Christiani, D.C., Paulauskis, J.D., Regulation of chemokine mRNA expression in a rat model of vanadium-induced pulmonary inflammation, *Inflammation*, 24, 505-517, 2000

Chung, L., Shimokawa, K., Dinakarandian, D., Grams, F., Fields, G.B. și Nagase, H. Identification of the (183)RWTNRFREY(191) region as a critical segment of matrix metalloproteinase 1 for the expression of collagenolytic activity. *J. Biol. Chem.* 275: 29610–7, 2000.

Damiano, V. V., Varghese Cherian, P., Frankel, F. R., Steeger, J.R., Sohn, M., Oppenheim, D., Weinbaum, G. Intraluminal fibrosis induced unilaterally by lobar instillation of CdCl₂ into the rat lung. *Am. J. Pathol.* 137:883–894.1990

Davison, A. G., Newman Taylor, A.J., Darbyshire, J., Chettle, D.R., Guthrie, C.J.G., O'Malley, D., Mason, H.J., Fayers, P.M., Venables, K.M., Pickering, C.A.C., Franklin, D., Scott, M.C., Holden, H., Wright, A.L., Gompertz, D. Cadmium fume inhalation and emphysema. *Lancet* 26:663–667, 1988.

Irsigler, G.B., Visser, P.J., Spangenberg, P.A., Asthma and chemical bronchitis in vanadium plant workers, *Am. J. Ind. Med.*, 35, 366-374, 1999

Izbicki, G., Or, R., Christensen, T.G., Segel, M.J., Fine, A., Goldstein, R.H., Breuer, R., Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4 overexpressing and knockout mice, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 283, L1110-1116, 2002

Laurent, G. J. 1986. Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax* 41:418–428.

Lehnert, N.M., Gary, R.K., Marrone, B.L., Lehnert, B.E., Inhibition of normal human lung fibroblast growth by beryllium, *Toxicology* 160 , 119–127, 2001

Longphre, M., Li, D., Li, J., Matovicovic, E., Gallup, M., Samet, J.M., Basbaum, C.B., Lung mucin production is stimulated by the air pollutant residual oil fly ash, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 162, 86-92, 2000

Maier, L.A., Clinical approach to chronic beryllium disease and other nonpneumoconiotic interstitial lung diseases, *J. Throc. Imaging*, 17, 273-284, 2002

Patterson, M.K., Measurement of growth and viability of cells in culture, *Methods Enzymol.*, 58, 141-152, 1979

Rago, R., Mitchen, J., Wilding, G., fluorometric assay in 96well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal Biochem.*, 191, 31–34, 1990.

Rekdal, C., Sjøttem, E., Johansen, T., The nuclear factor SPBP contains different functional domains and stimulates the activity of various transcriptional activators. *J. Biol. Chem.*, 275: 40288–300, 2000.

Samet, J.M., Utell, M.J., The environment and the lung. Changing perspectives. *JAMA*, 266, 670-675, 1991

Singh, N., Davis, G.S. Review: occupational and environmental lung disease, *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 8, 117-125, 2002

Snider, G. L., Hayes, J.A., Korthy, A.L., Lewis, G.P. Centrilobar emphysema experimentally induced by cadmium chloride aerosol. *Am. Rev. Respir. Dis.* 108:40–47, 1973

Tager, I.B., Current view of epidemiologic study designs for occupational and environmental lung diseases, *Environ. Health Perspect.*, 108, 615-623, 2000

Van Tongeren, M.J., Gardiner, K., Rossiter, C.E., Beach, J., Harber, P., Harrington, M.J., Longitudinal analyses of chest radiographs from the European Carbon Black Respiratory Morbidity Study, *Eur. Respir.*, 20, 417-425, 2002

Wang, Z., Farris, G.M., Newman, L.S., Shou, Y., Maier, L.A., Smith, H.N., Marrone, B.L., Beryllium sensitivity is linked to HLA-DP genotype, *Toxicology*, 165, 27-38, 2001

Ward, E., Okun, A., Ruder, A., Fingerhut, M., Steenland, K., A mortality study of workers at seven beryllium processing plants, *Am. J. Ind. Med.*, 22, 885-904, 1992