

# ARBETSMILJÖ FONDENS SAMMANFATTNINGAR

1233

## Alveolära makrofagers förmåga att lösa upp metallpartiklar

*För innehållet i sammanfattningen svarar Per Camner Statens Miljömedicinska laboratorium, Box 60208, 104 01 Stockholm. tel 08-23 96 00.*

*Pnr 80-0870 Metaller och metallföreningar (18)*

*November 1988*

### Bakgrund, syfte

Det är väl känt att många föroreningar i partikelform i arbetsmiljön kan orsaka sjukdomar i lungorna. Risken för lungsjukdom vid exponering för en förorening i partikelform ökar vanligen med koncentrationen av partiklarna i lungvävnaden samt tiden partiklarna finns i lungan. För att kunna bedöma riskerna med en viss typ luftbruna partiklar, är det därför viktigt att känna till hur snabbt dessa partiklar transporteras bort från lungan.

Experimentella undersökningar på människor har visat att borttransporten från lungan av hela partiklar, som hamnat i lungblåsorna, sker mycket långsamt med en halveringstid av något eller många år. Det är också väl känt att partiklar, som hamnat i lungblåsorna, inom något dygn fagocyteras av alveolära makrofager. Det har nyligen visats att de alveolära makrofagerna har en betydande förmåga att lösa upp flera par-

tiklar av oorganiskt material, som vanligen betecknas som olösligt, t ex mangandioxid, blyarsenat och koboltoxid. Mot bakgrund av den mycket långsamma borttransporten av hela partiklar är det rimligt att tro att förmågan hos makrofagerna att lösa upp partiklar är den viktigaste borttransportmekanismen från den alveolära delen av lungan för många partiklar.

Ett syfte med det aktuella projektet var att utveckla en metod för att bestämma pH i fagosomer hos alveolära makrofager. Ett annat syfte var att undersöka clearancehastigheten i lungan av radioaktivt märkt blyarsenat som inandats av en grupp kaniner och studera sambandet mellan denna clearancehastighet och pH i fagosomerna.

### Bestämning av pH hos fagosomer hos makrofager

Partiklar som tas upp av en cell innesluts i en liten blåsa, primär fagosom. Redan efter

några minuter börjar denna att samman-smälta med lysosomer, som bl a avger olika enzymer till fagosomerna. I detta projekt handlar det om pH-mätningar i sk sekundära fagosomer som utgör en samman-smältning av primära fagosomer och lysosomer.

#### Jästpartiklar märkta med fluorescein

En fast märkning av jästpartiklarna med fluorescein har erhållits genom att jästceller som avdödats genom upphettning blandats med fluoresceinisotiocyanat. pH i fagosomer från alveolära makrofager bestämdes dels i makrofager som fagocyterat partiklar *in vitro* efter lungsköljning och dels hos makrofager som fagocyterar jästpartiklarna som sprutats in i lungan medan kaninerna levde (*in vivo*). Vid *in vitro* försöken sattes jästpartiklarna till de utsköljda makrofager-na dels omedelbart efter utsköljningen ur lungorna (dag 1), dels när makrofager-na odlats i 24 timmar (dag 2). I båda fallen bestämdes pH tre timmar efter det att jästpartiklarna satts till makrofager-na. Täckglas med adhererade makrofager monterades i en kuvett med saltlösning, varefter kvoten av fluorescenceintensiteten bestämdes i en fluorescencespektrometer när kuvetten be-strålades med ljus av våglängderna 450 nm och 495 nm. Vid *in vivo* proceduren avlivades kaninerna 3 eller 24 timmar efter det att jästpartiklarna instillerats i lungan. pH bestämdes sedan på samma sätt som vid *in vitro* förfarandet, dels någon timme efter lungsköljningen och dels 24 timmar senare.

Vid *in vitro* förfarandet var pH omkring 6 i de mätningar som utfördes dag 1 och omkring 5 dag 2. Även vid *in vivo* förfarandet förelåg en minskning från dag 1 till dag 2, och värdena låg här dag 2 några tiondelar

högre än vid *in vitro* förfarandet. Det upp-mätta pH-värdet var oberoende av antalet jästpartiklar som tillsattes makrofager-na *in vitro*.

#### Kiselpartiklar märkta med fluorescein

Partiklar av amorft kisel (kiselgel) märktes på liknande sätt som jästpartiklarna med fluorescein. Inga påtagliga förändringar hos makrofager-na sågs ens när dessa partiklar tillsattes i koncentrationer 10 ggr högre än den som användes vid pH-bestämningarna. pH i fagosomerna hos makrofager-na som fagocyterat kiselpartiklarna *in vitro* och *in vivo* bestämdes på likande sätt som med jästpartiklarna.

Tabell 1 visar pH i fagosomer hos makro-fager som *in vitro* fagocyterat jästpartiklar eller kiselpartiklar märkta med fluorescein. Vid bestämning med jästpartiklarna förelåg som tidigare ett klart lägre värde dag 2 än dag 1, medan det vid bestämning med kisel-partiklarna inte förelåg någon sådan skill-nad. Bestämningarna dag 2 med jästpartik-larna gav ungefär samma resultat som be-stämningarna med kiselpartiklarna, d v s pH 5.

Elektronmikroskopiska undersökningar visade en klar skillnad mellan de makro-fager som fagocyterat kiselpartiklar och de som fagocyterat jästpartiklar. Antalet lyso-somer i kontakt med fagosomerna var mar-kant större för fagosomer med jästpartiklar än med kiselpartiklar. Beträffande jästpar-tiklarna förelåg ett större antal lysosomer i kontakt med fagosomer dag 1 än dag 2. Vidare var den procentuella andelen par-tiklar i vacualiserade fagosomer (tomrum mellan partikelyta och fagosommembran), större för jästpartiklarna.

Tabell 1. pH i makrofager som *in vitro* fagocyterat jästpartiklar eller kiselpartiklar märkta med fluorescein.

pH-mätning efter 3 timmars inkubation av partiklar med makrofager omedelbart efter lungsköljning (dag 1)		pH-mätning efter 3 timmars inkubation av partiklar med makrofager 24 tim. efter lungsköljning (dag 2)	
Jästpartiklar	Kiselpartiklar	Jästpartiklar	Kiselpartiklar
5.8 ± 0.2 <sup>1</sup>	4.9 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.9 ± 0.1

<sup>1</sup> medelvärde ± standardavvikelse av makrofager från sex kaniner

Tabell 2 visar pH i fagosomer hos alveolära makrofager som bestämts med hjälp av fluoresceinmärkta kiselpartiklar som fagocyterats *in vitro* samt *in vivo* dels då partiklarna insprutats via luftstrupen 24 timmar före utsköljning av makrofagerna och dels en vecka före utsköljningarna. pH-värdet var lägre vid *in vivo* förfarandet, i synnerhet när kiselpartiklarna instillerades en vecka före lungsköljning och pH-mätning.

Tabell 2. pH i alveolära makrofager bestämd med fluoresceinmärkta kiselpartiklar som fagocyterats *in vitro* och *in vivo*.

	Antal kaniner	pH i makrofagerna
<i>In vitro</i>	4	5.1 ± 0.1 <sup>1</sup>
<i>In vivo</i>		
Partiklarna instillerade 24 tim. före lungsköljn.	8	4.9 ± 0.1
<i>In vivo</i>		
Partiklarna instillerade en vecka före lungsköljn.	4	4.5 ± 0.1

<sup>1</sup> Medelvärde ± standardavvikelse

## Samband mellan clearance och pH i makrofager

### Mätning av lungclearance

Partiklar av blyarsenat märkta med <sup>74</sup>As med en genomsnittlig diameter av 1–2 µm uppslammades i vatten och sprayades upp i ett c:a 10 liter stort torn av plexiglas. Kaniner, som sövts och intuberats (försetts med en plastslang ned till luftstrupen), inandades aerosolen ur exponeringstornet. Konstgjord andning åstadkoms genom att kaminen placerades i en box där trycket varierades. Radioaktiviteten i lungorna mättes med två natriumjodidkristaller försedda med kollimatorer som sakta rörde sig över bröstkorgen på kaninerna. Radioaktiviteten i lungorna följdes åtta dagar efter inandning av partiklarna.

### pH-mätningar

Åtta dagar efter att partiklarna av blyars-

enat inandats insprutades fluoresceinmärkta jästpartiklar via luftstrupen. Ett dygn senare sköljdes makrofagerna ut från lungan och pH bestämdes på det sätt som beskrivits ovan.

## Resultat

Tabell 3 visar retentionen i lungan efter åtta dagar i procent av retentionen en dag efter inandning av blyarsenatpartiklarna. Clearance första dygnet har inte medtagits, eftersom denna clearancefas representerar partiklar som förs bort med slemflimmerhårstransporten och därför bör vara oberoende av pH i fagosomerna. Som framgår av tabell 3 förelåg inget samband mellan pH och lungretention efter åtta dagar.

Tabell 3. pH-bestämning i alveolära makrofager med fluoresceinmärkta jästpartiklar som instillerats i kaninerna 24 timmar före lungsköljning och pH-mätning samt retentionen i lungan efter åtta dygn av inandade blyarsenatpartiklar märkta med <sup>74</sup>As i procent av retentionen efter ett dygn.

Kanin	pH i makrofager	Lungretention efter 8 dygn % av retentionen efter 1 dygn
1	5.6	53
2	5.6	47
3	5.4	49
4	5.4	60
5	5.7	46
6	5.9	55
7	5.7	52
9	5.9	47
10	5.4	52
Medelvärde	5.6	51
Standardavvikelse	0.2	5

## Diskussion

pH i fagosomer hos alveolära makrofager från kaniner har bestämts med hjälp av jästpartiklar samt partiklar av amorft kisel. Jästpartiklarna består av organiskt material

som löses upp och metaboliseras av makrofager. Kiselpartiklarna däremot löses inte upp av makrofagerna och utövar inte heller någon påtaglig toxisk effekt på dessa celler ens vid betydligt högre koncentrationer än vad som använts vid pH-mätningarna. Även om de pH-värden som erhållits med de två partikelslagen är någorlunda likartade, föreligger klara skillnader. Med jästpartiklarna erhöles högre värden omedelbart efter utsköljning av makrofager än efter odling i 24 timmar. Vidare förelåg en tendens till högre värden när partiklarna fagocyterats *in vivo* än *in vitro*. Detta skulle kunna förklaras av att nedbrytningen av jästpartikeln leder till högre pH-värden, kanske genom att nedbrytningsprodukterna har en neutraliserande inverkan, och att nedbrytningen sker effektivare ju närmare *in vivo* situationen cellen befinner sig, dvs effektivare dag 1 än dag 2. Med kiselpartilarna däremot erhöles ingen skillnad då pH studerades omedelbart efter och 24 timmar efter det att makrofagerna sköljts ut ur lungorna. Vidare förelåg här något lägre värden när partiklarna fagocyterats *in vivo* än *in vitro*. Resultaten tyder på att det pH som erhålls med kiselpartiklarna representerar ett mer basalt värde än det värde som erhålls med jästpartiklarna.

Detta stöds även av de mer omfattande elektronmikroskopiska förändringar som sågs efter fagocytos av jästpartiklarna än av kiselpartiklarna.

I en tidigare undersökning har alveolära makrofager *in vitro* under ett dygn löst upp 6,2 % av blyarsenatpartiklar av samma typ som använts i den nuvarande undersökningen. Om samma utlösningshastighet per dag skulle ske i sju dagar, dvs under samma tidsperiod som i nuvarande clearanceför-sök, skulle detta innebära att 36 % av partiklarna skulle ha lösts upp och eliminerats. Denna siffra kan jämföras med 50 % i det nuvarande försöket. Den något mindre elimineringen i *in vitro* exemplet skulle kunna förklaras av att pH *in vivo* enligt resultaten med kiselpartiklarna är något lägre än *in vitro*. Clearance av blyarsenatpartiklar mellan ett och åtta dygn efter exponeringen skulle således kunna bero på upplösning av partiklarna. I den undersökta gruppen av

kaniner förelåg dock inget samband mellan pH uppmätt med jästpartiklarna och retentionen efter åtta dygn. Denna brist på samband skulle kunna förklaras av två saker. För det första utfördes clearancestudien innan metoden med kiselpartiklarna utarbetats, dvs med jästpartiklarna. Jämförelsen av pH-mätningar med kisel- och jästpartiklarna visar att jästpartiklarna knappast ger värden som är representativa för de basala förhållanden som kan förväntas vid fagocytos av oorganiska partiklar. För det andra förelåg en oväntat liten spridning i retentionsvärdena efter åtta dygn.

Sammanfattningsvis tyder den utförda studien på att inandade blyarsenatpartiklar till stor del elimineras från lungan pga att de upplöses i den sura miljön i makrofagernas fagosomer. Hur stor del upplösningen i makrofagerna utgör av det totala clearanceförloppet är dock fortfarande oklart. I och med att metoden för pH-bestämningar med fluoresceinmärkta kiselpartiklar utvecklats finns förutsättningar att erhålla representativa mätningar av pH i den miljö oorganiska partiklar befinner sig sedan de tagits upp av makrofagerna. En förnyad undersökning där kiselpartiklarna används och där clearance också studeras i en grupp av kaniner där pH i makrofagernas fagosomer förändrats borde tillsammans med upplösningförsök i vatten vid olika pH kunna ge svar på denna frågeställning.

## Publikationer från projektet

Nilsen, A., Nyberg, K., and Camner, P. (under tryckning).

**Intracellular pH in alveolar macrophages after phagocytosis *in vivo* and *in vitro* of fluoresceinlabelled yeast particles.** Exp. Lung Res.

Nyberg, K., Johansson, A., and Camner, P. (insänd för publicering).

**Intraphagosomal pH in alveolar macrophages studied with fluorescein-labelled amorphous silica particles.**

**Arbetsmiljöfonden**

Box 1122, 111 81 Stockholm  
Tel 08-796 47 00 (vx)