

ARBETSMILJÖ

FONDENS

SAMMANFATTNINGAR

1292

Effekter av metaller på kaninlunga

För innehållet i sammanfattningen svarar Per Camner, Institutet för miljömedicin, Box 60208, 104 01 Stockholm, tel 08-23 69 00.

Pnr 80-0870 Metaller och metallföreningar (18)

Juni 1989

Bakgrund — syfte

I många industrier är anställda exponerade via andningsvägarna för kombinationer av potentiellt toxiska ämnen, tex olika metallföreningar. Kunskapen om kombinationseffekter är dock mycket liten och yrkeshygieniska gränsvärden är som regel oberoende av om ett ämne förekommer ensamt eller tillsammans med andra ämnen. Kombinerad exponering för nickel och krom kan förekomma i stål- och metallindustri samt inom verkstadsindustri. Kobolt kan förekomma tillsammans med både nickel och krom inom tex koboltindustri och industri som sysslar med skrotsmältning.

Vi har undersökt effektmönstren i lungorna hos kaniner som inandats olika metaller i relativt låga koncentrationer, vanligen 0,1–1 mg/m³. Vi har studerat gränsskiktet mellan luft och vävnad, dvs den del som först kommer i kontakt med partiklar som deponerats i lungblåsorna och därför bör uppvisa de tidigaste förändringarna. Gränssytan består av alveolära makrofager, epiteli-

ala alveolära typ I och typ II celler samt surfaktant. Makrofagerna fagocyterar (tar upp) de flesta partiklar, som deponeras i lungblåsorna, inom några timmar. Typ I cellerna består av tunna och utbredda celler som bekläder lungblåsorna. Tillsammans med blodkapillärernas celler och ett mycket tunt membran utgör de barriären mellan luft och blod. Typ II cellerna har två funktioner. Vid skador på typ I cellerna delar sig typ II cellerna och ombildas till typ I celler. Typ II cellerna utsöndrar också det sk surfaktantskiktet, en tunn fettrik film som täcker insidan av lungblåsorna och har en ytspänningsnedsättande funktion. Detta stabiliserar lungblåsornas form, vilket är nödvändigt för normal funktion. Surfaktantskiktet består huvudsakligen av en typ av fetter som kallas fosfolipider. Huvuddelen är mättade fosfatidylkolinler. Lysozym bildas och utsöndras av makrofager och verkar främst mot bakterier, men har även en antitumöreffekt.

I ett första steg är vår målsättning att

kartlägga de effektmönster som olika metaller ger upphov till i lungblåsorna. I ett andra steg utför vi på grundval av resultaten av exponeringarna för de enskilda metallerna sådana kombinationsexponeringar, där förstärkning av de enskilda metallernas effekter kan förväntas.

Uppläggnig

Kaniner har exponerats i exponeringskammare för de olika metallföreningarna i koncentrationer av storleksordningen 1 mg/m³. Exponeringstiderna var mellan 1 och 4 månader (6 timmar/dag, 5 dagar/vecka).

Makrofagerna har uppsamlats genom sköljning av lungorna och deras utseende studerats i ljus- och elektronmikroskop. Deras förmåga att fagocytera (ta upp) testpartiklar har undersökts. Makrofagernas oxidativa metabolism har bestämts genom mätning av deras förmåga att reducera färglöst nitroblue tetrazolium (artificiell elektronacceptor) till blått formazan med och utan tillsats av *E. coli* bakterier (NBT-test). Lungvävnadens struktur har studerats i ljusmikroskop, särskilt med avseende på inflammatoriska förändringar, lungblåsornas epitel och anhopning av alveolära makrofager. Lungvävnadens och makrofagernas finstruktur har studerats i elektronmikroskop. En kvantitativ bestämning av andelen typ II celler i lungvävnaden har utförts och i vissa fall av deras storlek och antal. Makrofagernas utseende har kartlagts främst med avseende på cellytan (slät eller rik på utskott), förekomst av inklusioner innehållande surfaktant och lysosomernas antal och utseende. Fetterna har extraherats från lungvävnad och lungsköljvätska och uppdelats i fosfolipider, kolesterol och triglycerider. Fosfolipiderna har sedan uppdelats i olika undergrupper, tex fosfatidylkoliner, fosfatidyletanolaminer och fosfatidylinositoler, vars sammansättning av fettsyror bestämts. Vidare har lysozymaktiviteten studerats i lungsköljvätska och alveolära makrofager. Fullständiga beskrivningar av de använda metoderna presenteras i de vetenskapliga originalpublikationerna.

Resultat

Resultat av tidigare undersökningar har publicerats i arbetsmiljöfondens sammanfattning nr 960, 1986. Nedan redogörs kortfattat för dessa tidigare resultat samt resultat av undersökningar som utförts efter publiceringen av rapporten.

Nickel

Nickel, både i metallisk och löslig form, orsakade en ökning av storlek och antal av typ II cellerna, som producerar surfaktantmaterialet, samt av mängden mättade fosfatidylkoliner, som är huvudkomponenten i surfaktantmaterialet. Detta tyder på att produktionen av surfaktant var förhöjd. Särskilt vid exponering för metalliskt nickel kunde denna ökning av mängden surfaktant bli mycket kraftig, mer än fem ggr det normala värdet. Makrofagerna påverkades sekundärt av denna lipidökning. Den oxidativa metaboliska aktiviteten ökade liksom fagocytosaktiviteten. Makrofagernas utseende var förändrat, bla var både andelen makrofager med slät, inaktiv yta och andelen med aktiv "taggig" yta ökad. Vidare sågs anhopningar, noduli, av makrofager i lungvävnaden och ett ökat antal makrofager i lungsköljvätskan. Tillståndet efter exponering för nickel har många likheter med tillståndet som beskrivits efter exponering av råttor för kvartsdamm och den patologiska bilden vid sjukdomen pulmonär alveolär proteinos.

Nickel gav också en markant sänkning av lysozymhalten såväl i makrofager som i lungsköljvätska. Detta var dock en direkt effekt av nickeljoner på makrofagerna och inte en indirekt effekt av den ökade surfaktantproduktionen.

Kadmium

Exponering för lösligt kadmium gav upphov till flera av de effekter som nickel orsakade, tex liknande påverkan på typ II cellerna, ökning av mängden mättade fosfatidylkoliner (surfaktant) och ökning av makrofager i lungorna. Det förelåg också skillnader i effekter jämfört med nickel, tex en kraftig ökning av granulocyter och lymfocyter i lungsköljvätska och förhöjd lysozymaktivitet i makrofagerna och lungsköljvätskan.

Kobolt

Exponering för lösligt kobolt gav framför allt en förändring av typ II cellerna. De växte i tumörliknande grupper och mellan dessa grupper var förekomsten av typ II celler mindre än normalt. Tillsammans med anhopningarna av typ II celler förekom också makrofager och andra inflammatoriska celler. Makrofagerna i lungsköljvätskan uppvisade liknande förändringar som de som sågs efter exponering för nickel, men endast en mindre andel av cellerna hade dessa förändringar. En del av makrofagerna innehöll rikligt med surfaktantliknande material. Sådant material förekom även lokalt rikligt i luftrummen invid anhopningarna av typ II cellerna.

Krom

Både exponering för trevärt krom ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) och sexvärt krom (Na_2CrO_4) gav förändringar på makrofagerna, tex en anhopning av makrofager i lungorna. Där emot förekom ingen signifikant effekt på typ II cellerna eller mängden fosfolipider i lungan. Makrofagerna uppvisade de största förändringarna efter exponering för trevärt krom. Här förekom en kraftig ökning av surfaktantliknande material. Lysosomerna var förstörade och innehöll membranfragment. Ökningen av surfaktant i makrofagerna trots avsaknad av påvisbar fosfolipidökning i lungvävnaden tillsammans med lysosomförändringarna tyder på en minskad nedbrytning av surfaktantmaterialet.

Övriga metaller

Effekter av litium (LiCl) koppar (CuCl_2) och mangan (MnCl_2) har undersökts. Koppar gav en lätt ökning av den relativa volymen (volume density) av typ II celler, men för övrigt gav ingen av metallerna några klara effekter på lungan.

Kombinationsexponeringar

Nickel – trevärt krom

Bakgrunden till exponering för kombinationen av nickel och trevärt krom var att nickel ökar produktionen av surfaktant och trevärt krom tycks minska nedbrytningen av surfaktant i makrofagerna. Åtta kaniner

exponerades för $0,6 \text{ mg/m}^3$ nickel i form av NiCl_2 , 8 kaniner för samma koncentration av nickel och dessutom $1,2 \text{ mg/m}^3$ av trevärt krom i form av $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ samt 8 kontrollkaniner för endast filtrerad luft. Exponeringstiden var fyra månader.

Den kombinerade exponeringen gav mer än additiva effekter på lungvikt. Den vänstra underlobens vikt var 2,8 (S.D. 0,4) g (våtvikt) hos kontrollerna, 4,2 (S.D. 0,6) g hos gruppen som exponerats för endast nickel och 5,4 (S.D. 0,6) g hos gruppen med kombinerad exponering. Krom enbart gav ingen signifikant viktökning ens vid koncentrationen $2,3 \text{ mg/m}^3$.

Den ljusmikroskopiska undersökningen visade liknande typ av förändringar hos de djur som exponerats för endast nickel som hos de djur som exponerats för både nickel och krom. Förändringarna utgjordes av ansamlingar (granulom) av makrofager av vilka många hade förändrat utseende. I avslutning till vissa av dessa granulom förekom andra inflammatoriska celler som lymfocyter och neutrofila och eosinofila granulocyter. Även det alveolära epitelet var förändrat, bla förekom en ökning av förstörade alveolära typ II celler. De ljusmikroskopiska förändringarna graderades genom att en indelning i fyra klasser genomfördes. Klass 0 betecknade normala lungor, klass 1 och 2 lätt respektive måttlig grad av granulomatös reaktion och klass 3 utbredda förändringar med stora granulomatösa områden. Alla kontroldjur tillhörde klass 0 och alla djur exponerade för både nickel och krom tillhörde klass 3. Av de nickelxponerade djuren hamnade ett vardera i klasserna 0 och 1, fyra i klass 2 och två i klass 3.

Elektronmikroskopisk undersökning av lungvävnaden visade att de ofta förstörade makrofagerna efter metallexponeringarna, särskilt efter den kombinerade exponeringen för nickel och krom, innehöll rikligt med surfaktant material. Sådant material förekom också rikligt utanför makrofagerna i lungblåsorna. Utseendet av typ II cellerna var förändrat, särskilt efter exponering för kombinationen nickel och krom. Andelen typ II celler i lungvävnaden var fördubblad efter exponering för nickel och fyrdubblad efter exponering för både nickel och krom.

Efter exponeringen för både nickel och krom förekom vidare skador på typ I cellerna.

Massan av fosfatidylkoliner i lungan, som utgör huvuddelen av surfaktantmaterialet, var i gruppen som exponerats för endast nickel ökad med 20% och i gruppen som exponerats för kombinationen av nickel och krom ökad med 250%. Detta skall ses mot bakgrund av att fosfolipiderna inte var signifikant förhöjda efter fyra månaders exponering för 2,3 mg/m³ trevärt krom. Den procentuella fördelningen av olika sorters fosfatidylkoliner skilde sig dock endast i liten grad mellan kontrollerna och de exponerade grupperna. Detta tyder på att det främst är fråga om en ökad produktion av relativt normal surfaktant. Också andra fosfolipider än fosfatidylkoliner var förhöjda efter metallexponeringarna och särskilt efter den kombinerade exponeringen för nickel och krom, nämligen fosfatidyletanolaminer och fosfatidylinositoler.

Antalet fria celler i lungsköljningsvätskan, av vilka den stora majoriteten var makrofager, var fördubblat i gruppen exponerad för enbart nickel och mer än 7 ggr förhöjt i gruppen exponerad för både nickel och krom. Exponering för såväl enbart nickel som nickel och krom gav också en lätt ökning av neutrofila granulocyter. Makrofagernas utseende var förändrat efter metallexponeringarna och särskilt efter exponering för kombinationen nickel och krom. Många makrofager innehöll stora mängder surfaktantliknande material. Både en ökning av andelen celler med jämn, inaktiv yta och andelen celler med taggig, aktiv yta förekom. Den oxidativa metaboliska aktiviteten och fagocytosaktiviteten hos makrofagerna var förhöjd i ungefär samma grad i båda exponerade grupperna.

Nickel – kobolt

Åtta kaniner exponerades för c:a 0,5 mg/m³ kobolt i form av CoCl₂, 8 kaniner för samma koncentration av kobolt och dessutom 0,5 mg/m³ nickel i form av NiCl₂ samt 8 kontrollkaniner för endast filtrerad luft. Exponeringstiden var 4 månader. Preliminära data angående undersökningar av de utsköljda makrofagerna visar en kraftig ök-

ning av antalet efter den kombinerade exponeringen samt en måttlig ökning för enbart kobolt. Makrofagerna från de exponerade kaninerna, och särskilt de som exponerats för både kobolt och nickel, uppvisade klara förändringar, bl.a. förhöjd andel makrofager med rikligt med surfaktantliknande material samt makrofager med såväl slät, inaktiv yta som taggig, aktiv yta. Utvärdering av materialet pågår.

Diskussion

Våra undersökningar där kaniner inandats enskilda metaller har visat att flera av dessa kan orsaka förändringar i lungan i koncentrationer som inte ligger långt över gällande yrkeshygieniska gränsvärden och i flera fall i koncentrationer som t o m underskrider gällande gränsvärden. Effekterna av de olika metallerna var mycket olika. För en mer detaljerad diskussion av effekterna av de olika metallerna, se arbetsmiljöfondens sammanfattningar, 960/1986. De effekter som setts efter 1-månadsexponeringar för trevärt krom och kobolt i form av koboltklorid har konfirmerats i exponeringar över fyra månader med olika metallkoncentrationer. Beträffande kobolt tyder den senare undersökningen på att även utseendet av typ II cellerna är förändrat och att förändringarna av typ II cellerna med anhopning av dessa celler i vissa områden är den primära skadan. Exponering för kobolt ökade även signifikant fibronektinhalten i lungorna. Detta är av intresse eftersom kobolt anses vara orsak till sk hårdmetallunga, en fibrotisk lungsjukdom, och att kraftigt förhöjd fibronektinhalten utsöndras från makrofager hos patienter med fibrotiska lungförändringar vid en viss typ av reumatisk sjukdom. Det skulle således kunna finnas ett samband mellan bindvävsomvandling av lungan och fibronektinhalten. Beträffande nickel har de senare undersökningarna visat att sänkningen av lysozymhalt i lungsköljvätskan orsakas av en direkt effekt på makrofagerna och inte förmedlas via överproduktionen av surfaktant.

Efter den kombinerade exponeringen för nickel och krom föreföll mer än additiva förändringar förekomma på lungvikt, struk-

tur av lungvävnad och utsköljda makrofager samt koncentrationer av vissa fosfolipider, speciellt fosfatidylkolin, i lungan. Ökningen av den relativa volymen typ II celler och av fosfolipiderna bör rimligen huvudsakligen ha initierats av nickel, eftersom krom ensamt inte ens i dubbelt så höga koncentrationer som i kombinationsundersökningen inte gav sådana förändringar. Samtidig exponering för krom förefaller att öka effekten av nickel på typ II celler eftersom den relativa volymen var dubbelt så hög i den kombinationsexponerade gruppen som i den nicklexponerade. Det är troligt att den kraftiga effekten vid kombinerad exponering för nickel och trevärt krom har två orsaker. För det första tycks krom förstärka effekten av nickel på typ II cellerna och därigenom ytterligare öka produktionen av surfaktant i dessa celler. För det andra minskar krom troligen nedbrytningen av surfaktant i de alveolära makrofagerna.

Redan exponering för nickel, särskilt metalliskt, ger en bild som har många likheter med sjukdomen pulmonär alveolär protinos hos människa. Denna sjukdom är allvarlig, särskilt därför att den är förenad med svårartade infektioner i lungan. Eftersom nicklexponering även orsakar en sänkning av lysozymaktiviteten i lungsköljvätska och makrofager bör detta ytterligare öka risken för infektioner i lungan. Eftersom krom mycket kraftigt förstärkte effekten av nickel på lungan och eftersom halterna av nickel och krom låg relativt nära de yrkeshygieniska gränsvärdena, bör det vara angeläget att noggrant undersöka om personer som i yrkeslivet är utsatta för en kombinationsexponering av nickel och krom kan riskera allvarliga lungskador.

Sammanfattningen utgör projektets slutrapportering.

Arbetsmiljööfonden

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

ISSN 0283-6718 Norstedts Tryckeri, Stockholm 1889