

16859

RAPPORT FRA STUDIEREISE TIL

MEDICAL RESEARCH COUNCIL

PNEUMOCONIOSIS UNIT

PENARTH, WALES

8. MARS - 4. APRIL 1981

HD/858/19810625

AV

VIDAR SKAUG

ARBEIDSFORSKNINGSINSTITUTTENE
BIBLIOTEKET
Gydas vei 8
Postboks 8149 Oslo Dep. Oslo 1

INNHOOLD

	side
1. REISENS BAKGRUNN OG HENSIKT	1
2. STRUKTUR OG FUNKSJON AV MRC PNEUMOCONIOSIS UNIT	3
3. IN VITRO TESTSYSTEM FOR CYTOTOKSISITETSTESTING AV STØV	5
3.1. Cytotoksisitetstesting av støv på peritoneale musemakrofager	6
3.1.1. Innsamling av peritoneale makrofager	6
3.1.2. Celleutbytte	7
3.1.3. Framstilling av makrofag- kulturer	7
3.1.4. Tilsetting av støv	8
3.1.5. Inkubering	8
3.1.6. Avlesning av celletesten	8
3.1.6.a. Generelt	8
3.1.6.b. Behandling av cellekulturene med frigjorte enzymer ..	8
3.1.6.c. Praktisk enzym- analyse	9
3.1.7. Vurdering/diskusjon	11
3.2. V-79-4 Cellelinjer i cytotoksisitets- testing	12
3.2.1. Generelt	12
3.2.2. Trypsinering og overgang til ny cellepassage	13
3.2.2.a. Materiale	13
3.2.2.b. Framgangsmåte	14
3.2.3. Praktiske momenter ved arbeide med V-79-4	16
3.2.4. Praktisk gjennomføring av cytotoksisitetstesten	19
3.3. Støvindusert dannelse av kjempeceller i A-549-cellelinjene	20
3.4. Oppbevaring av cellelinjene	21
4. HISTOPATOLOGISK LABORATORIUM	22
4.1. Praktisk arbeidsgang	22
4.2. Storsnitt (2 x 2 inches)	22
4.3. Engangskniver	23

4.4. Vakumbehandling av lungevev	23
4.5. Vevsmateriale fra fyr til histologisk undersøkelse	24
4.6. Papirmonterte storsnitt av lungevev	24
5. DYREAVDELINGEN. Intrapleural injeksjonsteknikk	26
6. HISTOLOGISK GRADERING AV HUMAN ASBESTOSE	29
7. PATOLOGISK ANATOMISK DIAGNOSTIKK AV MALIGNT MESOTELIOM	30
8. ULTRASTRUKTURELL LUNGEPATOLOGI OG BRUK AV ELEKTRONMIKROSKOPI VED BIOLOGISKE FORSØK MED MINERALSK STØV	31

1. REISENS BAKGRUNN OG HENSIKT

Det var på forhånd etablert kontakt mellom MRC pneumoconiosis Unit og YHI. Direktør Peter Elmes og hans medarbeidere tilbød en måneds opphold ved instituttet spesielt for å studere pågående teknikker for cytotoxicitetstesting av mineralisk støv.

Denne reisen ble videre muliggjort ved permisjon fra YHI med lønn og finansiell støtte til reise og opphold fra NTNF og Arbeidsforskningsinstituttene. Hensikten med reisen var derfor i første rekke å lære:

In vitro teknikker for testing av
mineralsk støvs biologiske
skadevirkninger.

Instituttet ga videre god anledning til fordypelse i lungepatologi relatert til yrksbetinget inhalering av støv (pneumokonioser) ved at jeg på forhånd hadde hatt noe kontakt med Dr. C. Wagner vedrørende eksperimentelle lungefibroser og malign mesoteliomer (ondartede svulster med utgangspunkt overveiende i brysthinnen)

Instituttet har stor erfaring i pneumokonioser og pneumokonioseorientert forskning, i tillegg til at det også har engasjert seg i bl.a. støvbetingede lungesvulster. De har i de senere år tatt i bruk nyere teknikker slik som celle/vevskultur og elektronmikroskopi for støvkarakterisering og undersøkelse av lungevev.

YHI er i ferd med oppbygging av inhalasjonsstudier på dyr og det var derfor naturlig å benytte seg av den erfaring som allerede foreligger ved MRC pneumoconiosis unit og som er blitt oss til del takket være den store gjestfrihet og velvilje ved dette instituttet.

Den foreliggende rapport tar for seg endel momenter fra oppholdet og omhandler enkelte tema som det ble anledning til å studere noe nærmere. Rapporten gjør ikke på noen måte krav på å dekke alle aktiviteter ved MRC pneumoconiosis unit. Den har i enkelte avsnitt sannsynligvis størst nytte som egen memento.

Det vises forøvrig til andre utarbeidede rapporter i forbindelse med dette besøket.

- HD 857/81 In vitro cytotoxicitet av taconitt, amorf SiO_2 og pimpsten.
- HD 858/81 Rapport fra besøk ved MRC pneumoconiosis unit.
- HD 859/81 Histologiske kvalitetskrav til rottelunger for inhalasjonsforsøk.
Patologisk anatomisk diagnostikk av malignt mesoteliom.

2. STRUKTUR OG FUNKSJON AV MRC PNEUMOCONIOSIS UNIT

Instituttet er en av de mange MRC units og ble etablert i Penarth i slutten av 40-årene for å utrede og behandle de mange tilfelle av pneumoconioser i gruveindustrien. Instituttet ble bygget i tilslutning til et sykehus som tradisjonelt hadde mange tilfelle av pneumoconioser fra den lokale kullgruveindustri - Llandough Hospital, Penarth. Den nødvendige tilgang av pasienter til et slikt institutt skulle derved være sikret.

I dag fungerer instituttet med et tverrfaglig team hvor mange spesialiteter er sentrert omkring pneumokoniose-forskningen: Klinikk, røntgendiagnostikk, respirasjonsfysiologi, biokjemi, immunologi, patologi, epidemiologi/statistikk, cellebiologi. Av aktuelle teknikker som er i bruk skal nevnes cellekulturer, elektromikroskopi for mineralogiske og biologiske undersøkelser, samt dyreavdelingen med inhalasjonsstudier og dertil utviklede teknikker for støvgenerering.

Antall pasienter har gått ned de senere årene mens cellebiologi og patologi har orientert seg mer i retning av mekanismeforskning (patogenese).

Innad er det et utstrakt samarbeid mellom de enkelte spesialiteter generelt og enkeltprosjekter involverer mange forskere på tvers av spesialitetsgrensene.

Utad hadde instituttet et bredt samarbeid med en rekke avdelinger og institutter i inn- og utland. Det ble

dessuten utført testing av industristøv og annen kontraktforskning for industrien. Staben ved instituttet ble ofte benyttet til kongress/kursvirksomhet og undervisning også andre steder i Storbritannia og i utlandet. Det var medisinerstudentundervisning for University College, Cardiff og det ble holdt spesielle årlige kurs for leger fra utviklingsland.

3. IN VITRO TESTSYSTEM FOR CYTOTOKSISITETSTESTING AV STØV

Det finnes i dag en rekke in vitro systemer for å sammenligne forskjellige støvtypers biologiske effekt på celler. Ved MRC pneumoconiosis unit har cellebiologigruppen vært sentral i utviklingen av tre slike systemer, hvorav en benytter seg av ustimulerte peritoneale makrofager fra mus, og de to andre baseres på etablerte cellelinjer i kultur.

3.1. Cytotoksisitetstesting av støv på peritoneale musemakrofager

Metoden baserer seg på frigjøring av enzymer fra ustimulerte makrofager fra mus etter at disse er tilsatt mineralsk støv in vitro. Cellenekrose er ikke nødvendig betingelse. Celletesten synes å være en god indikator på mineralsk støvs fibrogene egenskaper. Den har også gitt nye opplysninger om mineralske fibres effekt på makrofager.

Metoden er også egnet til å sammenligne forskjellige behandlingsformer av støv, for, om mulig, å si noe om endring i evnen til å forårsake lungefibrose.

3.3.1 Innsamling av peritoneale musemakrofager

Swiss T.O. (Theillers Original) mus gir flest celler. ♂ gir mindre enn ♀. Optimal vekt er 22-27 gram.

Dyrene avlives ved overdose av eter. Dyret legges så på rygg, spennes fast på korkplate med nål i alle ekstremiteter. Buken vaskes med desinfeksjonsmiddel (methylalkohol 74 0.p.). Bukveggen klippes opp i midtlinjen uten å skade peritoneum. Bukveggen frigjøres helt fra peritoneum slik at kun denne med abdominalinnhold ligger bar. Peritoneum holdes med pinsett og 3 ml M.E.M. medium (Medium 199 Flom Laboratories) injiseres inn i abdominalhulen uten å skade tarm. Det brukes en kort, tynn sprøytespiss. Mediet er tilsatt 5:1 enheter heparin (0,5 ml Heparin Sodium Injection BP (mucous) 1000 units/ml, i

100 ml M.E.M. medium), 100 enheter benzylpenicillin og 100 µg streptomycin/ml. Det oppbevares i isvann før bruk. Buken masseres mellom pekefinger og tommel hvoretter det klippes en tynn spalte i peritoneum ved hjelp av saks og pinsett. Dyret tas så med en hånd om forlabben og den andre om baklabber og buken snus rundt over en steril glasstrakt som fører væsken omkring bukorganene ned i en steril flaske som står i isbad. Flasken er silikonbehandlet innvendig for at makrofagene ikke skal feste seg til glassveggen.

3.1.2 Celleutbytte

Hvert dyr gir ca. 5-7 millioner celler, nok til ca. 6 kulturskåler, idet $1,2 \times 10^6$ celler i 2 ml medium settes ut i hver skål.

3.1.3 Framstilling av makrofagkulturen

Makrofagene vil falle mot bunnen og feste seg til denne etter ca. 1 time i 37°C , 5% CO_2 og 95% luftfuktighet. Mediet helles da av og cellebunnen skylles forsiktig med PBS. Deretter tilsettes medium M199 + 10% New Born Calf serum, i alt 2 ml til hver skål, og dette inkuberes over natten i 37°C , 5% CO_2 og 95% luftfuktighet. Skålene som ble brukt bestod av 12 sammenhengende brønner med diameter mm. Mediet er varmeaktivert (56°C i 30 min.) for at ikke serumkomplement skal aktiveres av støvet. Serum er dessuten syrebehandlet i pH 3.5 i 2 timer for å ødelegge dets enzymer. (Ref. Gordon, S. 1977. Fed. Proc. 36, 2707). Varmeaktivert serum filtreres fra

percipitert protein med gradvis finere porestørrelse til millipor 0.22 μ .

3.1.4 Tilsetting av støv

Neste dag tilsettes støvet til cellene, i konsentrasjoner på 20, 40, 60 $\mu\text{g/ml}$. Mediet som ble tilsatt dagen i forveien ble først helt av. I dette var det dessuten en god del avløsnede granulocytter, slik at det var ca. 95% makrofager når støvet ble tilsatt.

3.1.4 Inkubering

Inkuberes i 18 timer. 37°C , 95% vanndamp, 5% CO_2

3.1.5 Avlesning av celledestensen

a) Generelt

Etter tilsetting av støv til cellekulturene og inkubering i 18 timer undersøkes cellene i mikroskop hvor det er mulig å danne seg en ide om celledestensen ved å se på graden av overlevelse i forhold til kontrollen og økende støvkonsentrasjon. Infeksjon avsløres også. Metoden baserer seg imidlertid ikke på morfologisk bedømmelse av cellene, men på selektiv frigjøring av enzymer. Det er valgt et lysosomalt enzym, beta-glucoronidase og et cytoplasmatisk enzym, LDH.

b) Behandling av cellekulturene med frigjorte enzymer

Mediet suges ut av kulturskålene med engangspipette og overføres til små sentrifugerbare

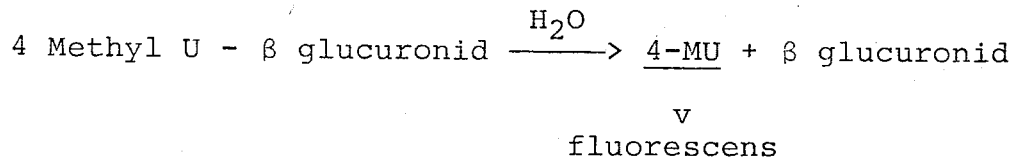
glass med kork. Skålene tilsettes deretter 2 ml fysiologisk saltvann og albumin (NaCl 9% tilsatt 0,1% Bovine serum albumin (fås i pulver fra sigma) og 0,1% Triton x 100 (et ikke ionisk detergens)) slik at resterende cellemateriale i skålene kan knuses i dette mediet. Det avpipetterte mediet med støv-indusert enzymfrigjøring sentrifugeres (mange celler er ikke festet til bunnen av skålene og vil derfor ellers kunne komme over sammen med mediet) og supernatanten analyseres for LDH med autoanalyser. Se nedenfor. Når analyse-maskinen er satt i gang, kan mekanisk disintegrering av resterende celler i skålene begynne: Med en silikonkork knuses cellene kraftig ved press og vridning av korken mot bunnen av hver skål. Dette gjøres manuelt i ca. $\frac{1}{2}$ minutt. Mediet med disintegrerte celler sentrifugeres og supernatanten analyseres for LDH når autoanalyseren er ferdig med første analyserunde for LDH. LDH er relativt ustabil og undersøkes den samme dag, mens beta-glucuronidase kan vente til neste dag i kjøleskap. Autoanalyseren omstilles for analyse av dette enzym.

c) Praktisk enzymanalyse

Til dette bruk har instituttet et Perkin-Elmer 3000 fluorescens spectrometer. En sensitiv metode for påvisning av slik små mengder

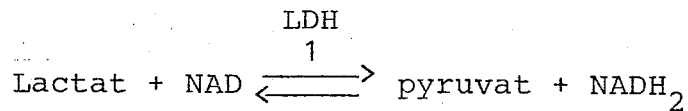
enzymer som en enlaget cellekultur gir, er nødvendig.

- 1) Betaglucoronidase: 4 Methylumbelliferone (4-mu) er en av de mest intense fluorescerende stoffer som kjennes. Denne er kommersielt tilgjengelig koblet til beta-glucuronid og ved tilsetning av β -glucuronidase vil fluorescens intensitet på det frigjorte materiale være direkte proporsjonal med mengden. (D.M.L. Morgan et al. 1978), (Learback 1975).



Buffere og substract settes opp for enzym-analyse i Technicon* eller flow-skjema.

- 2) LDH: Aktiviteten uttrykkes i $\mu\text{mol NAD}$ omgjort til $\mu\text{mol NADH}_2$ pr. milliliter av reagens pr. minutt.



Spectrofotometrisk måles økt absorbans av NADH_2 .

Dersom fluorescensspectrometer ikke brukes, trengs det et betydelig større antall makrofager for å måle de frigjorte enzymer, p.g.a. de mindre sensitive metoder.

3.1.7 Vurdering/diskusjon

Peritoneale makrofager fra mus frigjør LDH og beta-glucoronidase ved inkubering i serum med fibrogene mineralske fibre; ikke-fibrogene mineraler er bare svakt aktive hittil i dette systemet som har vært i sving i ca. 4 år. Mineralske fibre som er lange frigjør mer glucoronidase enn LDH. Morfologisk ser det ut som cellene kan frigjøre lysosomale enzymer i større mengder enn cytoplasmaenzymer uten å nekotisere. Det er vist at krysofil kan føre til en slik selektiv frigjøring av lysosomale enzymer uten at LDH frigjøres samtidig og at makrofager tilsynelatende er levende (Davies et al. 1974).

Selektiv frigjøring av LDH oppfattes som resultat av bare fagocytose dvs. uten sammensmeltning av det fagocyterte materialet til sekundære fagolysosomer. Dette testsystemet bruker serum og kan derfor oppfattes som en forsinket cytotoxicitet idet partiklene innleires i serum før kontakt med cellemembranen, i motsetning til hemolysetesten med straks reaksjon mellom støvet og erythrocyttmembranen som på forhånd er vasket i PBS. Hemolysetesten har heller ikke vist seg å holde mål for å forutsi støvs fibrogene egenskaper av vivo, slik som opprinnelig foreslått av Hefner et al. i 1975: Am. ind. Hygien Ass. J. 36, 734.

De støvtyper som har hatt ingen eller minimal enzymfrigjøring i dette systemet har heller ikke fram til i

dag hatt påvisbar lungefibrose i dyreforsøk f.eks. magnetitt, hematitt. Det omvendte har også hittil vært tilfelle - nemlig høy frigjøring av enzymer er sett ved støvtyper som gir lungefibre, f.eks. kvarts.

Hvorvidt disse peritoneale makrofager kan bevege seg mot mineralske partikler på bunnen av kulturskålene, og eventuelt i hvilken grad vites ikke. En slik effekt er observert for de etablerte cellelinjene som skal beskrives nedenfor.

Hvordan dette systemet virker sammenliknet med å bruke mer "fysiologisk" materiale i form av alveolære makrofager vites heller ikke. Det er imidlertid kjent at alveolære makrofager ikke har den samme evnen til å feste seg til bunnen av kulturskålene.

3.2 V79-4 cellelinjer for cytotoxicitetstesting av mineralsk støv

3.2.1 Generelt

Denne cellelinjen ble opprinnelig brukt for mutagenisitetstesting, og har senere vært brukt som indikator for karsinogenisitet av mineralsk støv, i første rekke fibre. Cellene har lite utviklet enzym-system for metabolsk de-toksifisering. Systemet virker uavhengig av tilstedeværelse eller fravær av komplement. Samtlige fiber-mineraler testet til nå i dette systemet har gitt maligne svulster ved intrapleural injeksjon i dyreforsøk. Testen baserer seg på forskjellige mineralske støvpartiklers evne til å hemme dannelse av cellekolonier når støv og celler inkuberes sammen.

3.2.2 Trypsinering og overgang til ny cellepassage

a) Materiale

Medium: Penicillin
Streptomycin
Eagles minimal essential medium +
Earls salts
2 mMol L-GLU

kan lagres i 4°C i 2-3 mnd., men L-GLU må etterfylles.

Vekstmedium: 15% føtalt kalveserum (FCS) tilsettes før bruk - I dette systemet har man brukt FCS tilsatt mediet i opp til en uke før bruk.

Trypsin: enheter á 10 ml tillages og nedfryses.

trypsin 0.025%

EDTA 0.02%

PBS ad 10 ml

tines ved inkubering i 37°C i ca. 10 min.

Kulturskåler: her brukes kulturflasker med flate 75 cm² og lukket kork.

CO₂ 5%: 15 ml i hver flaske,
kontinuerlig i inkubator.

PBS: Fosfatbuffret fysiologisk saltvann

Sterilbenk: Kontinuerlig flow ovenfra og ned, gult lys når i bruk, ellers U.V. lys materiale. Det brukes ikke bunsenbrenner for sterilisering av flaskehals, korker o.s.v. Flammesterilisering brukes ikke fordi dette i følge Marc Chamberlain ødelegger luftstrømningen i benken. Det er montert et plastskjold i den øvre delen av benkens åpning.

b) Framgangsmåte:

Utgangspunktet er en cellekulturflaske med konfluerende celler i et lag, eller nær mot konfluens. Disse oppnås ved å så ut celler noen dager i forveien. Cellepopulasjonens doblings-tid er 12 timer. Antall celler i bunnen av flasken er 10^7 ved konfluens.

Kulturmediet pipeteres ut og cellene vaskes tre ganger med PBS, ca. 20 ml hver gang. PBS settes inn i flasketaket, hvoretter flasken snus og skyllevæsken tas ut igjen. Denne prosessen foregår ideelt sett med bruk av pipetter.

Opptin̄ trypsin overføres til kulturflasken og inkuberes i 10 minutter i 37°C , 5% CO_2 og 95% fuktighet. Flasken ristes forsiktig en gang. Løse celler og medium med trypsin (10 ml) tas ut av kulturflasken og overføres til centrifugeglass ("universal") med 10 ml medium (tynner trypsinet). Sentrifugeres deretter i 10 mn v/1000 omdr./mn.

Medium (10 ml) helles i den trypsinerte flaskebunnen. Det vil alltid være igjen noen celler etter avtrypsineringen og man kan derved ta igjen celleavlingen på dette stadium i tilfelle infeksjon. Kulturflasken med medium inkuberes derfor videre.

Etter sentrifugeringen og avhelling av mediet vil det ligge en cellepellet i bunnen av glasset. Denne resuspenderes i 10 ml vekstmedium ved at materialet suges opp og pressen ut av pipetten kraftig 5-6 ganger. NB pass på så det ikke spruter.

Telling av avtrypsinerte celler

Den oppnådde celleløsningen fortynnes 1/100. Cellene telles i tellekammer. Her brukes et modifisert tellekammer av type Fuchs-Rosental. Det tykke dekkglasset presses over ruteinndelingen slik at fargespekteret synes i skrått påfallende lys. En dråpe fra pipettespissen trekkes seg inn i kammeret. Dersom cellene klumper seg i tellekammeret må de resuspenderes kraftigere, som ovenfor anført.

Minst 200 celler telles i det sentrale rutenett bestående av 16 mindre kvadrater, med volum 0.2 mm^3 .

Celleløsningen fortynnet 1/100 inneholder derfor antall talte celler $\times 5000/\text{ml}$ celleløsning og kulturflasken inneholdt 10 \times dette antall.

Beregning av antall celler nødvendig å så for å få konfluens i kulturflasken

Tiden for dobling av cellepopulasjonen er 12 timer. Det er vanlig å så ut celler slik at det er konfluens etter 2-3 dager. Cellene vokser

eksponensielt og det er derfor lett å regne ut hvor mange celler som trengs ved suksessive halveringer av antall celler ved konfluens.

eksempel:

1×10^7 celler ved konfluens

Dersom cellene skal gro i 3 hele dager er antall celler som må sås:

$$10^7 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 = 1,5 \times 10^5$$

V79-cellelinjen trives ikke dersom den vokser over konfluens. Cellene har da tendens til flerlagning, avrunding, vakuolisering og elongasjon. I nødtilfelle kan dette bøtes på ved å la cellene stå i romtemperatur for å nedsette celledelingen. Celler som har vokst over konfluens kan ikke brukes til eksperimenter.

Utsetting av celler for ny passage

Den utregnede cellekonsentrasjon tilsettes 10 ml medium i kulturflasker. Den feilen som oppstår ved at totalvolumet av mediet er mer enn 10 ml (f.eks. 12 ml) ses bort fra. Før korking tilsettes 15 ml CO₂. Deretter i kulturskap i ønskede/beregnete antall dager.

3.2.3 Praktiske momenter ved arbeide med V79-4

Desinfeksjon

Hender og arbeidsbenk vaske i 70% alkohol. Ved søl med celler/medium gjentas dette ofte. Avfallsmedium og celler blandes i "Chloros" (KERNICK®) (Natriumhypokloritt) før

det helles ut i vask/sluk. Viktig pga. arbeide med potensielle karsinogener. Alt brukt plastmateriale autoklaveres før det kastes fra instituttet. Brukte pipetter rett i "Chloros".

Generelle hygieniske forholdsregler ved arbeidet i cellekulturbenken

- flammesterilisering er ikke nødvendig ved gode arbeidsrutiner.
- pipetter, reagensrør og flasker holdes mest mulig horisontalt for å forhindre dypping fra pipetter og ovenfra-ned kontaminering.
- korker som skal tilbake til beholder med celler skal ikke legges på benken, men holdes mellom lillefinger og mediale volare håndflate, med korkens topp i retning lateralt. Korken kan skrus av og på på denne måten.
- færrest mulig ting på benken. Kast brukt materiale med en gang.

Trypsinering

Mekanisk løsning av cellene uten trypsinering vil gi store celleflak og mye celledøde hvorfor løsning av cellene i dette systemet må gjøres kjemisk. Trypsin-EDTA forandrer celleoverflaten og chelaterer kalsium/Magnesium. Celler kan også løsnes ved bruk av Lidocain og forandringene på celleoverflaten blir da de samme. Det er ingen forskjell i forsøkene om Lidocain brukes istedenfor trypsin-EDTA.

Autoklavering

Det brukes mye sterilt engangsutstyr. Autoklavering av smått utstyr i vanlig trykkoker. Større ting i damp-autoklave.

Dosering av CO₂. Praktisk løsning

En anestesibag er montert i stativ med slange som har en T-kran som fører et løp til montert gradet 30 ml sprøyte. CO₂ fylles direkte via slangen til bagen og T kranen stilles slik at CO₂ må suges opp i sprøyten og sendes i gradert volum til kulturflasken.

Sterilsjekk av mediet

10 ml medium tilsettes 1 ml trypsin. Inkuberes i 7 dager. Bakterievekst vil vise seg etter noen dager, mens soppvekst kommer etter ca. 1 uke. Ved oppvekst kastes det aktuelle parti av mediet.

Morfologisk vurdering av cellene

Cellene i vekst løsner fra underlaget slik at celler som skal dele seg blir runde og flyter over flakene av festede celler. Mitosefasen er 10 minutter. Det er mulig å følge mitosefasens stadier. De festede cellene er polygonale, med store nucleoli. Differensiering mot spolforn og langstrakte cytoplasmaformer er tegn på mistrivsel. Det er viktig ikke å riste på kulturene i vekst. Dette gjelder spesielt hvor forsøkene er kommet i gang og hvor det kan bli flere kolonier enn ellers med falskt negativt resultat til følge.

3.2.4 Praktisk gjennomføring av cytotoxisitetsstesten

Cellene: Utgangspunktet er en cellekulturflaske som den samme dag har nådd konfluens = 1×10^7 celler. En ønsker å tilsette 5 ml medium med 250 celler (50 celler/ml) til 4 petriskåler for hver konsentrasjon av støvprøvene. Dette totale antall celler og medium må derfor tillages før fordeling. Det lages en stor beholder med det beregnede totalvolum av medium slik at konsentrasjonen blir 50 celler/ml. Fordeles videre til 20 ml beholdere som svarer til de 4 paralleller for hver støvkonsentrasjon.

Støvet: Støvprøvene er i respirable fraksjoner. Veies inn i rør som kan utoklaveres i trykkoker i 15 minutter. Medium tilsettes slik at konsentrasjonen blir 1 mg/ml, hvoretter prøvene ultralyd-behandles i bad i ett minutt. Tilsettes deretter 20 ml beholderne med celler og medium, fra gradert pipette 0-1 ml slik at den tilnærmede konsentrasjon blir 5, 10, 20, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$. For krokidolitt som positiv kontroll brukes 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$. Ingen støvtilsetning for negativ kontroll. Ved lange serier trengs kontrollen først og sist i forsøkene.

Fiksering,
farging,
avlesning:

Etter 4 døgn helles mediet av, desinfiseres, og erstattes med 10 % formalin i 10 min. Dette tømmes så av og cellekoloniene farges i 10 minutter med 1% methylenblått ^{α} . Dette skylles av 3 x i kaldt vann og koloniene telles (automatkoloniteller) ^{β} .

Resultater: Dose-respons kurver for støvkonsentrasjonene. Uttrykkes i forhold til 100% overlevelse av negative kontroller.

Ref.: Chu og Malling: Mammalian Cell Genetics II. Chemical Induction of Specific Locus mutations in Chinese Hamster cells in vitro. Proc. Natn. Acad. Sci. 61, 1306 (1968).

α : Ikke la metylenblått stå i skålene over lengre tid, da det dannes krystaller.

β : Maskinen teller kolonier som består av minst 50 celler.

3.3 Støvindusert dannelse av kjempeceller i A-549 cellelinjene (humane pneumocyt type II tumor)

Det vises til generelle momenter om subkultivering av celler og det praktiske arbeide med cellekulturer omtalt i 3.2.2 og 3.2.3.

Medium: Dulbeccos modified medium + 10% varmeaktivert føtalt kalveserum.

Cellene: Doblingstid 18 timer, lengre ved støvtilsetning, kan danne kjempeceller, dvs. diameter $>25 \mu$.

CO₂: 10%.

Inkubasjonstid: 4 døgn.

Støvet: Autoklaveres, ultralydbehandles. kons. 4 mg/ml. Tilsettes cellekulturene i konsentrasjoner 100 μ g/ml og 200 μ g/ml. (\pm 10% avvik)

Fremgangsmåte: I stor kulturflaske (75 cm²) med konfluens. Kan gi celler nok til prøvetesting av støv i 40 små (25 cm²) ^{α} Etter trypsinering tilsettes litt medium og cellene sentrifugeres i 5 min. (ikke mer fordi de er så store) ved 1000 x. Resuspenderes i medium og 5 ml tilsettes i ønsket fortykning til småkulturflasker som deretter tilsettes støvet. 2 paralleller for hvert støv.

α : Optimal for støvtesting, er 1/16.

Avlesning: Etter fire dager vaskes (3 x PBS) trypsineres (4 ml), hvoretter cellene inkuberes i 10 min. Overføres sentrifugeglass og sentrifugeres i

5 min. N/2000 x. Cellepelleten resuspenderes med 0,1 ml PBS og dråper av dette avfotograferes umiddelbart mens det er i suspensjon i et modifisert Fuchs-Rosenthal tellekammer. Minimum 200 celler/bilde. Cellenes diameter måles deretter og settes opp i histogram.

Testen baserer seg på at carcinogene fibre stimulerer til dannelse av kjempeceller. Ca. 70-80 støvtyper er prøvet og det er nå god korrelasjon mellom in vivo og in vitro forsøk vedrørende carcinogen effekt av lange og tynne fibre. Testen er mer spesifikk enn V79-4. SiO₂ i dette systemet er inert. Cellene i denne linjen gror ikke i Petriskåler.

4. HISTOPATOLOGISK LABORATORIUM

(Patolog: C.J. Wagner. Sjefstekniker; Dennis Munday)

4.1. Praktisk arbeidsgang

Dette er et rent forskningslaboratorium uten rutineoppgaver. Det tar seg av materialet fra dyreinhalasjonsstudiene, men også fra tilsendt materiale eller overbrakt materiale fra Llandough Hospital, Pathological department (head: Dr. Seals). Det er forskjellige farger på plastbrikettene for humant- og dyremateriale slik at de lagrede parafinblokker lett kan adskilles. Teknikerne gjør autopsiene på dyrene og noterer makroskopiske funn. Disse noteres på kort i to eksemplarer hvorav det ene følger preparatet. mens det andre lagres sentralt. Det er kontinuerlig ansvar for materialet slik at den tekniker som utfører autopsien også framfører de histologiske snitt, ser på dem og går eventulet tilbake for å ta ut mer vev slik at materialet er klart for diagnoseering av patolog (Dr. Wagner) og eventuelt fiber-analyse. Diagnoser og kommentarer påføres kortet som så overføres til det sentrale kort. Kortet inneholder opplysninger om type materiale og preparater, f.eks. dyreeksperimenter, humant materiale, innsendte snitt, materiale etc. Det føres et kartotek med fortløpende registreringsnummer for alle typer preparater.

4.2 Storsnitt (2 x 2 inches)

I laboratoriet lages vanlige histologiske snitt, monterte snitt (storsnitt = 2 x 2 inches) i diasrammer og papirmonterte snitt av hele lungeskiver. Standardfarger er H + E, VanGiessan og Gordon-Sweets som reticulinsølvimpregnering. Papirminterte snitt er ufargede.

Storsnittene framføres i maskin med følgende bad:

1. Formalin:	tid variabel
2. --	--
3. 70% alkohol:	3 timer
4. 90% --	--
5. abs. --	--
6. " --	--
7. " --	--
8. toluene:	--
9. --	--
10. parafin:	--
11. --	--
12. --	inntil 12 timer i vakuum

Hele prosedyren tar inntil 2 døgn pga. store vevsmengder. Ca. 5 snitt får plass om gangen. Vevet støpes i små pappesker og snittes av praktiske grunner på sleidemikrotom. De monteres i glassrammer som er tynne og preparatet lar seg lett undersøke i mikroskop.

4.3 Engangskniver

Laboratoriet bruker engangskniver til mikrotomer. Disse monteres i knivholder og hoder for ca. 150 snitt. Deres erfaring er at dette er en rimelig investering og billig forbruk.

4.4 Vakuumbehandling av lungevev

For lungevev er det ved laboratoriet innlagt en vakuumprosedyre etter parafinering. Vevene tas ut av parafinbadet og settes i en spesiell Tissue-Tek vakuumbeholder. Luften suges ut til trykk -15 inches Hg i 1½ time for snitt fra rottelunger og ca. 3 timer for snitt fra humane lunger. Hensikten er å fylle luftlommer med parafin der hvor dette har sviktet i parafineringsmaskinen.

4.5 Vevsmateriale fra dyr til histologisk undersøkelse

Fra rottene tas det to parafin blokker til rutineundersøkelse av lungene:

1 fra venstre lunge: et snitt parallellt med hovedbrankus

1 fra høyre lunge, fordelt på materiale både fra a) overlapp og b) underlapp

Når dyr dør spontant eller avlives med ether pga. lidelse, blir autopsi utført straks, også på helligdager. Dyrene vates i vann slik at pelsen ikke gir fra seg hår til indre deler under autopsien. Rutinesnitt fra lever, milt og nyre i en blokk og lungesnittene som nevnt over. Lungene fixeres ved intratrakeal instillasjon av 10% formalin med 20 cc sprøyte: jevnt trykk. Ingen mer presis trykkmåling under fiksjon. Trakea knyttes ikke for etter formalin-fikseringen.

Etter fikseringen i ca. ett døgn skjæres lungelappene av og snitt som ovenfor anført lages.

Etter utskjæring fikseres alt materialet i varmesmeltede plastposer og intet kastes (Akkumulert materiale fra instituttets opprettelse ligger i esker en "provisorisk" brakke utenfor instituttet).

4.6 Papirmonterte storsnitt av lungevev (Whole lung section technique).

Denne metoden har vært brukt til framstilling av hele snitt gjennom lungevev for vurdering av pneumoconioser; Bruksområdene har vært for dokumentasjon av pneumoconioser og til demonstrasjonsformål. I framtiden burde den brukes mer til kvantitering av lungeforandringer. I korthet går

metoden ut på å fryse ned gelatininnleiret lungevev i form av ca. 2 cm tynne hele lungesnitt, hvoretter det skjæres snittykkelser på 300-400 μm med en spesiell stor mikrotom. Snittene overføres til papir.

Ref.: Gough, J. et al. (1949) J. Roy. micro. Soc. 69, 231.
Gough, J. et al. (1960) Rec. advances in Path. Ed. c.v. Harrison. 7th ed. p. 80. London Churchill
Silverton, R.E. Progress in Medical Laboratory Science Techniques. 2nd ed. by F.J. Baker, p. 167. Butterworth, London.

5. DYREAVDELINGEN (leder Mr. Hill)

Dyreavdelingen avler rotter selv og forsyner instituttet med dyr til langtidsforsøk innen yrkesbetingede lunge-sykdommer. Hovedgruppene av dyreforsøk er:

- 1) Langtidsinhalasjonsstudier
- 2) Intrapleurale injeksjonsstudier
- 3) Transplantasjonsstudier av malignt mesoteliom

Effektene som undersøkes er svulster og fibroseutvikling i lungene.

Problemene med langtidseksponering av dyr og infeksjonsrisiko er velkjent. Dyreavdelingen hadde for noen år siden en kraftig infeksjon slik at dyrene måtte avlives og nye ble innkjøpt. Det brukes nå rotter til inhalasjonsforsøk. Dr. Wagner ble klar over at ikke alle leverandører hadde rotter med lunger uten infeksjon. hvorfor dyr fra alle potensielle selgere ble undersøkt ved MRC pneumoconiosis unit uten av Dr. Wagner fant lungene tilfredsstillende for å drive langtidsforsøk. Jeg fikk selv anledning til å gjennomgå disse lungesnittene fra rotter, avlet av forskjellige engelske leverandører av SPF rotter. Hovedgruppene av sykelige forandringer i disse kontrolldyrene var:

1. økt mengde interstitielle mononukleære celler flekkvis fordelt i lungeparenkymet.
2. cystiske oppklaringer (emfysem)
3. mer og mindre utbredt og uttalte lymfoide aggregater langs bronkiene. Disse var i områder uttalte slik at de presset på bronkialepitelet med avflatning og forandring til konvex kurve inn i lumen av bronkiene. Det var ikke purulente bronkiale betennelsesreaksjoner.

I forbindelse med en stor undersøkelse som er igang om man made mineral fibres, fikk MRC pneumoconiosis unit importert 600 Fischer 344 rotter (SPF) fra USA og avler selv de dyrene de trenger fra disse, som er de samme som brukes i National Institute og Environmental Health Sciences og Research Triangel i North Carolina i forbindelse med en parallell studie. Som motytelse har MRC pneumoconiosis unit hjulpet disse med å organisere inhalasjonsforsøkene og de er blitt enige om å bruke de samme kontrollstøvtyper.

Det foreligger nå snitt fra kontrolldyrene etter 12 måneders eksponering og videre 18 måneders overlevelse. De snittene som jeg undersøkte viste ingen tegn til lungeinfeksjon. Instituttet setter nå mye inn på å holde rottene frie for utilsiktede infeksjoner. Dyreavdelingen ligger i den ene enden av instituttet. Det er delt inn i 3 atskilte avdelinger. Det er jorder og skog omkring. De har vært plaget av ville rotter som tiltrekkes av bl.a. en søppeldyngge ikke langt unna. De mange villkatter holdt disse unna dyreavdelingene, men problemet har oppstått på nytt etter at lokale helsemyndigheter avlivet villkattene omkring sykehuset/instituttet. Den dagen jeg ble vist rundt var det jakt på en stor rotte som hadde kommet seg inn. Det er sperrer til knehøyde i gangene for å forhindre at rottene kan "gå rett inn". Lokalene er gamle men godt vedlikeholdt.

En avdeling inneholder 500 dyr. De to andre ca. 1000 dyr hver. Det avles i alle avdelinger. Den minste inneholder en spesiell SPF stamme som undersøkes m.h.t. svulster i

det lymfoide system. En inneholder dyr som undersøkes m.h.t. transplantasjon av maligne mesoteliomer. Og den siste har inhalasjonskamre som er i bruk for studier av mineralsk støv.

Inhalasjonsforsøkene kjøres med 36 døgn i hvert kammer. 4 dyr tas ut etter 4 mnd. for å kontrollere støveksponering. Eksponeringstid er 12 mnd. Det inngår 36 dyr i hvert eksperiment og samtidig en positiv og en negativ kontroll med 36 dyr i hver gruppe. De forsøker å gjøre flere forsøk med de samme kontrolldyrene.

Intrapleural injeksjonsteknikk

Det brukes 1 ml sprøyte. Støvkonsentrasjonen er 50 mg/ml fysiologisk saltvann. 0,4 ml (20 mg) brukes for hver injeksjon. Dyret anesteseres kortvarig med ether. Et manometer er koblet til sprøytespissen (21") som settes intrapleuralt på høyre side ved 2. mamille (midtveis mellom sternum og processus ensiformis). Injeksjonssprøyten er koblet til manometerslangen med en T-kran. Når spissen kommer inn i torakshulen og T-kranen er åpnet mot manometeret vil denne indikere svingninger synkrone med respirasjonen. T-kranen stilles om og støvprøven injiseres.

6. HISTOLOGISK GRADERING AV HUMAN ASBESTOSE

Kvantitative målinger av histopatologiske forandringer har vært vanskelig å gjennomføre p.g.a. stor variasjon i forandringene innenfor det totale lungevev. Noen få snitt fra lungene vil derfor neppe være representative for hele lungene. Ved MRC Pneumoconiosis Unit ble graden av fibrose vurdert og sammenlignet med standardsnitt. Inndelingen ble opprinnelig foreslått av Wagner og Seal og har vunnet anerkjennelse blant patologer som arbeider med lungefibroseproblematikk. Det er likevel endel revisjonsforslag. Metoden vil fortsatt være subjektiv og baserer seg på en histopatologisk vurdering av tre lungesnitt.

1. apex overlapp
2. apex underlapp
3. basis underlapp

Følgende inndeling ble brukt:

Lett fibrose: lungefibrose som sikkert skyldes asbest kan være tilstede i noen, men ikke alle snittene.

Moderat og uttalt fibrose: tilstede i alle snittene, og mengden avgjør hvorvidt den er moderat eller uttalt. Disse gradene kan også være dominert av cystiske partier og kalles da moderat cystisk eller uttalt cystisk.

Wagner hevder at denne graderingen også kan brukes på fibroser av annen årsak enn asbest.

7. PATOLOGISK ANATOMISK DIAGNOSTIKK AV MALIGNT MESOTELIOM

Det er dokumentert sammenheng mellom tidligere asbesteksponering og senere utvikling av malignt mesoteliom. Histologiske snitt av kasus diagnostisert som mesoteliom i Norge og hvor der også forelå resultater av asbestfibertellingen av forasket lungevev, ble gjennomført med Dr. Wagner for sammenligning av diagnosene ved denne svulsttypen. Det utarbeides en egen utredning om histopatologisk diagnostikk av malignt mesoteliom.

8. ULTRASTRUKTURELL LUNGEATOMOLOGI OG BRUK AV ELEKTRO- MIKROSKOPI VED BIOLOGISKE FORSØK MED MINERALSK STØV

I humant materiale ble det brukt ultrastrukturell diagnostikk for å sikre identifikasjon av svulstene og for å påvise mineralsk støv i celler og vev.

I dyreeksperimentene ble svulstene også elektronmikroskopert i den grad de hadde kapasitet.

Det var gjort studier over sekresjonsmønsteret av surfactant fra pneumocytter type III, hvor det syntes å være stor sekresjonsaktivitet om natten. Undersøkelser var igang på de samme celler for å kartlegge en eventuell betydning av oppklaringsfenomener i cytoplasmaet i forhold til lungefibre.

En teknikk var under utvikling for å spesialfarge pneumocytter for lysmikroskopi. Det var også gjort studier på neuroendokrine celler i luftveiene og deres forhold til lungefibrose.

Celler fra kulturer ble undersøkt spesielt med hensyn på opptak av støv i makrofager. Ved seriesnitting av snittene ble det påvist kommunikasjon mellom lysosomer og det ytre miljø, via ikke fullstendig fagocyterte fibre, hvor den ene enden var beliggende inne i lysosomene og den andre utenfor cytoplasmamembranen.

Det er som tidligere anført - påvist selektiv frigjøring av lysosomale enzymer fra makrofager. Studier var også igang på hvilke effekter fibrene hadde på lysosomale membran og den mer nøyaktige lokalisasjonen av effektene.