

Arbeidsforskningsinstituttene

Arbeidsfysiologisk institutt - Arbeidspsykologisk institutt - Muskelfysiologisk institutt
Yrkeshygienisk institutt

Kontoradresse: Gydas vei 8, tlf. 02/46 68 50
Postadresse: Pb. 8149 Dep Oslo 1

Tittel:

In Vitro og In Vivo toksisitet av kalsiumsilikater

Forfatter(e): Vidar Skaug

Prosjektansvarlig: Tor Norseth, Bjørn Gylseth og Vidar Skaug

Prosjektmedarbeidere: Bjørn Gylseth, Elin Thornér, Anne Græthe Myrann,
Grete Edholm, Anne-Lise Nordhagen, Liv Overaa,
Rune Hansen.

Utgiver (institutt): Yrkeshygienisk Institutt

Dato: okt. 1985 Antall sider: 12

ISSN:

0800-3777

Serie:

HD 918 Internt notat

Sammendrag:

Syntetiske og naturlige kalsiumsilikater er undersøkt m.h.t. mineralogi og biologiske effekter. Rapporten er et sammendrag av prosjektresultater oppnådd etter tre års NTNF finansiering.

Stikkord: Kalsiumsilikater
in vivo in vitro
biologiske effekter
toksisitet.

Key words: Calciumsilicates
in vivo in vitro
Biological effects
toxicity.

IN VITRO OG IN VIVO TOKSISITET AV KALSIUMSILIKATER

SLUTTRAPPORT TIL NTN

AMK PROSJEKT: NTN-NR. 310.122217

VIDAR SKAUG

YRKESHYGIENISK INSTITUTT

UNDERSØKELSE AV IN VITRO OG IN VIVO TOKSISITET AV KALSIIUM-SILIKATER

1. GENERELL INNLEDNING OG BAKGRUNN

Kalsiumsilikater (CaSi) er en gruppe mineraler som tilføres markedet i økende grad som erstatningsmateriale for asbest. Det tok lang tid å avdekke/erkjenne sammenhengen mellom asbest eksposisjon og sykdom. Erfaringen med asbest har ført til stor forskningsaktivitet når det gjelder mulige helseeffekter av syntetiske mineralfibre. CaSi kan også forekomme som fiberformet materiale. Andre CaSi-varianter har tidligere ikke vært studert i særlig grad, bl.a. fordi mistanken om helsefare har vært liten, i forhold til andre mineraler som asbest og kvarts.

Det naturlig forekommende CaSi, wollastonite, brytes i åpne brudd, først og fremst i USA og Finland. De naturlige reserverne er små i forhold til asbest på verdensbasis. Syntetisk CaSi produseres derfor i økende grad, bl.a. i Norden.

2. PROBLEMSTILLING

CaSi er i dag i bruk i mange norske virksomheter, bl.a. som rørisolasjon på oljeinnstallasjonene i Nordsjøen, som varmebestandige isolasjonsplater, fyllmasse, m.m. Det utvikles støv ved bruk (kapping, riving) og spørsmål om helsefare på lang sikt, eller ved langvarig eksponering har vært reist. Oppmerksomheten har spesielt vært rettet mot de fiberformige materialene, på grunn av analogi med asbest.

Prosjektet har derfor som mål å studere biologiske virkninger av CaSi i laboratorieforsøk på kort og lengre sikt. Informasjon om toksiske effekter og mekanismer samlet på denne måten er av betydning for vurdering av helseeffekter ved human eksponering. Prosjektet ble startet vel vitende om begrensninger ved ekstrapolering til humane forhold.

3. FORSØKSOPPLEGG OG SAMMENDRAG AV RESULTATER

3.1 Opprinnelse og karakterisering av kalsiumsilikater

I eksperimentene ble brukt CaSi av følgende opprinnelse: To naturlig forekommende (wollastonite) fra Finland og USA, to syntetiske fra svensk produsent og en syntetisk av svensk opprinnelse i bruk på norsk oljeinstallasjon i Nordsjøen.

Det ble brukt respirable partikkelstørrelser fra alle støvprøvene. De ble tillaget ved oppsamling fra støvskyer laget i lukket kammer. Følgende karakterisering ble utført:

1) Partikkelstørrelsesfordeling av CaSi med fiberformige partikler (de to naturlige og en syntetisk), ved hjelp av scanning elektronmikroskop, 2) Bestemmelse av kvartsinnhold ved røntgen-diffraksjon og infrarød spektroskopi, 3) Total overflatebestemmelse (spesifikk overflate).

3.2 Akutt toksisk effekt av CaSi på røde blodceller

Det er tidligere av flere hevdet at den membranskadelige effekten av mineraler på røde blodlegemer i reagensrøret, bedømt ved frigjøring av hemoglobin (hemolyse-test), er en indikator på lungefibroseeffekt hos dyr og mennesker ved eksposisjon for det aktuelle mineral. Selv om dette ikke er almenyldig for alle mineraler, er røde blodceller en lett tilgjengelig modell for studie av interaksjon mellom mineraler og biologiske membraner. Ved vurderingen av akutteffekten er det viktig å være klar over at disse celledmembranene er forskjellig i oppbygning fra makrofagmembraner. Mineralpåvirkning av makrofager er som kjent av betydning for arrvevsdannelse ved støvlungesykdom. Interaksjon mellom membranen og støv er også av sentral betydning for eventuell lunge- og brysthinne-kreftutvikling p.g.a. mineralstøv.

Vi utviklet et hemolysetestsystem hvor effekten av CaSi ble sammenlignet med de sterkt hemolytiske støvtypene hvitasbest (krysotil) og kvarts, samt mineralstøvet rutil (TiO_2), som er uten effekt på biologiske membraner.

Hemolysen er høyere for syntetisk CaSi i forhold til de to wollestonite-prøvene, økende med økende støvkonsentrasjon. Hemolyse synes relatert til spesifikk overflate og tid i ultralydbehandling før tilsetning til cellene. Fiberformige CaSi viste ikke spesielle aktiviteter i forhold til de ikke fiberformige. CaSi i løsning opp til 16 dager taper hemolytisk aktivitet samtidig som krystallstrukturen brytes ned og kalsium ble målt i økende konsentrasjoner i løsningsmediet.

3.2.1 Mekanismestudier for CaSi-indusert hemolyse

Røde blodceller (RBC) kan skades ved lipoperoxydering sekundært til dannelse av frie radikaler selv om RBC normalt er utstyrt med flere beskyttende enzymsystemer for å forhindre dette.

Et testsystem for studium av innvirkning av frie radikaler på hemolysen ble satt opp. Hemmere av de beskyttende enzymsystemer ble tilsatt RBC i forbindelse med hemolyseundersøkelse av et utvalgt CaSi. Lipoperoxydering ble bedømt ved bestemmelse av et endeprodukt (malondialdehyd) i hemolysevæske. Resultatene tyder på at frie radikaler er involvert siden hemming av et enzym (Superoxyd dismutase) fører til økt hemolyse for både CaSi og kvarts. Metoden for bestemmelse av lipoperoxydering er vanskelig gjennomførbar og vanskelig å vurdere på grunn av små utslag. Malondialdehyd ble ikke påvist etter reaksjon mellom CaSi og RBC. Denne reaksjonen vil bli etterprøvet i samarbeid med Dr. Sylvia Gabor (Romania), som har arbeidet med lignende systemer).

Tilsetning av zink ($ZnCl_2$) i små konsentrasjoner til systemet førte til hemolysebeskyttelse og krom ($CrCl_3$) reduserte hemolysen betydelig. Disse resultatene er diskutert i forhold til bl.a. den manglende beskyttelse av det thiol reaktive stoffet penicillamin disulfid og sammenlignet med effekt på kvarts og asbest.

Den samme metoden ble etter dette også benyttet for undersøkelse av hemolytisk aktivitet av kobber og vanadium.

3.3 Effekt av CaSi på makrofager i cellekultur

Effektstudier av mineraler på celler i korttidskultur (noen timer - dager) har bidratt med verdifull informasjon for forståelse av mineralstøvsykdommer. Makrofager står sentralt ved mekanismestudier av mineralstøvinduserte lungesykdommer. Det er både en styrke og svakhet ved studier av isolerte celler i kultur at informasjon om samspillet mellom flere celletyper ikke oppnås, slik forholdene er in vivo.

Vi ønsket informasjon om CaSi-indusert membranskade på makrofager i kultur og benyttet av praktiske grunner makrofager fra bukhole hos mus for disse sammenlignende studiene. Systemet ble satt opp med nødvendige kontroller og bestemmelse av frigjorte enzymer fra cellekulturen etter ett døgns inkubasjon. Celledød ble også vurdert. En av silikatene viste tydelig toksisk effekt på cellene ved økt frigjøring av cellenes intracellulære enzym lactat dehydrogenase. Denne effekten og den manglende celletoksiske effekt av de to CaSi med 10% kvartsinnhold er vurdert i lys av analysemetoder for kvarts og i forhold til fiberstruktur (tilstede hos CaSi som var toksisk).

Frigjøring av enzym (β -glucoronidase) fra cellenes lysosomer ble funnet forhøyet uten ledsagende celledød for begge wolastonite-prøvene. Det kan være et ledsagerfenomen ved stimulering av makrofager som et ledd i betennelsesreaksjonen. Disse mineralene kan derfor på dette grunnlag ikke frakjennes biologisk aktivitet og derved mulig skadeeffekt (lungefibrose) på lang sikt in vivo.

En annen metode for vurdering av cytotoxicitet ble vurdert. RBC ble inkubert med Cr^{51} og frigjort Cr^{51} er derved et mål på celledød/skade. Et uoverkommelig problem var binding av det frigjorte Cr^{51} til mineralene og resterende celle delvis uten at disse kunne adskilles. Metoden ble derfor forlatt.

3.4 Studier av CaSi-innvirkning på suspensjonskulturer av leverceller

Isolerte leverceller er godt studert og brukt i en rekke toksisitetsstudier. Vi ønsket derfor å undersøke toksisk effekt av CaSi på leverceller i en modell svarende til hemolyseundersøkelsen, med studium av celledød og frigjøring av LDH (lactat dehydrogenase) som endepunkt, og deretter utrede mekanismer for eventuelle effekter. Levercellene var svært resistente mot CaSi etter to timer i suspensjonskultur med støvkonsentrasjoner mange ganger høyere enn i tilsvarende systemer for røde blodlegemer og makrofager fra mus. Selv krysofasbest var ikke påfallende akutt toksisk i høye konsentrasjoner, selv om elektronmikroskopisk undersøkelse viste opptak av fibrene. Modellen var derfor uegnet for videre studier.

3.5 Eksponering for CaSi i dyreforsøk

Dyreforsøk ble utført for å få bedre informasjon om mulige effekter på lungevev (arrvevsdannelse) og i brysthulen (svulstutvikling).

3.5.1 Effekter etter 3 og 7 måneders eksponering med spesiell vekt på histopatologiske lungeforandringer og mineralstøvkinetikk

Eksponering av forsøksrotter ved innsprøyting av støv via hovedluftrøret ble utført for alle støvtypene og sammenlignet med effektene av glimmer, kvarts og asbest. Det ble utført full obduksjon med spesiell vekt på sammenligning av lungevevsreaksjoner i de forskjellige CaSi-grupper ved 3 og 7 mnd. Lungevev ble videre preparert og oppsluttet for bestemmelse av element kalsium og element silisium på de to tidspunkter, ved hjelp av induktiv koplet plasma atomemisjonspektrofotometri (ICP-AES).

Et histopatologisk klassifikasjonssystem ble utarbeidet for å vurdere 1) fordelingen av støvet i lungevevet ved denne administrasjonsmåten, 2) grad og utbredelse av støvknuter, 3) grad og utbredelse av arrvev omkring luftrør og i selve lungevevet og 4) mindre karakteristiske lungevevsreaksjoner som kunne tenkes å være støvindusert. Klassifikasjonssystemet ga maksimal score for kvarts ved henholdsvis 3 og 7 måneder, mens kontrolldyrene ikke viste tegn på forandringer. Mistanken om infeksjon tidlig i forsøket kunne derved avkrefte. Vurderingen av lungevevsreaksjon ble utført blindt.

I dette systemet var det minst reaksjon i lungevevet hos gruppene som ble tilført de to wollastonittprøvene, mens vevsreaksjonen var noe større for de syntetiske silikatene. Det var et høyere antall hvite blodlegemer i perifert blod i kvartsgruppen på 7 mnd. enn for de andre støvtypene på samme tidspunkt. For kvarts var det også lavest gjennomsnittsvekt i gruppen, mens det ikke var forskjeller for de andre. Kvartsgruppene hadde videre den største gjennomsnittlige absolutte og relative lungevekt i forhold til kroppsvekt. Alle CaSi unntatt 1 hadde høyere relativ lungevekt i forhold til kontrollen. Rangeringen av lungevektene var ikke overensstemmende med graden av fibrose for syntetiske i forhold til naturlige CaSi. Flere tidligere undersøkelser har vist parallell økning mellom lungevåtvekt og lungens innhold av kollagen bedømt ved biokjemisk metode (bestemmelse av hydroxyprolin). Når så ikke synes å være åpenbart i den foreliggende undersøkelse, kan det skyldes at andre lungevevsreaksjoner enn bare kollagen er økt (f.eks. mengden av intrapulmonalt lymfoid vev, alveolar lipoproteinose, interstielt/intraalveolart ødem, varierende blodfylde osv.). Det er videre forskjell mellom CaSi med hensyn til vevsreaksjon innen den enkelte funksjonelle lungeenhet (acinus) og dens tilførende luftrørgren (terminale bronkiol og den korte respiratoriske bronkiol med overgang til alveoleganger).

Lungevev ble også undersøkt i scanning elektronmikroskop med mikrorøntgenanalyse og registrering av element silisium. Det synes åpenbart at CaSi løser seg i lungevevet etter 3 måneder og mer etter 7 måneder, med overgang til ikke-krystallinsk

silikaholdig materiale, varierende i grad for de forskjellige silikatene. Det var ingen påfallende forskjell i organvekter og det er heller ingen påfallende forandringer i andre organer enn lungene.

Analyse av elementinnhold i lungevev vil bli gjentatt p.g.a. mislykket tidligere prøvepreparering. Detaljene i den patologisk anatomisk bedømming er under statistisk bearbeidelse.

3.5.2 Studium av svulstdannelse etter innsprøyting av CaSi, nikkelsalter og asbest i brysthulen hos rotter

Fiberformige mineraler med spesielle dimensjoner fører til høy lokal svulstdannelse etter innsprøyting i brysthulen (intrapleural injeksjon). Vi ønsket å vurdere CaSi m.h.p. slik effekt siden tre av de fem prøvene inneholder fibre. Som positiv kontroll ble valgt asbest og samtidig ble nikkelsubsulfid og nikkeloxyd undersøkt til sammenligning, spesielt m.h.t. latenstid og klassifikasjon av histologisk type ved eventuell opptreden av svulster lokalt.

Det ble ikke påvist lokale svulster etter injeksjon av CaSi i motsetning til asbest og nikkelforbindelsene. En foreløpig konklusjon er at de aktuelle CaSi ikke har egenskaper som forårsaker lokale brysthinesvulster slik som en rekke andre fiberformige mineraler. Mange dyr ble avlivet med nyrebetennelse. Svulster i andre organer ble observert spredt i alle gruppene, uten systematiske funn. Histopatologisk kontrollundersøkelse av forsøksdyrene vil bli gjort før publikasjon.

4. SAMMENDRAG

Med midler fra NTNF og Yrkeshygienisk institutt er det utført forsøk med 5 forskjellige kalsiumsilikater for å skaffe informasjon om biologiske effekter. Undersøkelsen er en toksisi-

tetsutredning hvor in vivo og in vitro undersøkelse vurdert tilsammen gir grunnlag for følgende praktiske vurderinger:

1. Kalsiumsilikater er en gruppe mineraler som omfatter naturlige og syntetiske varianter. De varierer noe i sammensetning og partikkelform avhengig av produksjonsmåte, utvinningssted etc.
2. Biologiske effekter varierer for de forskjellige CaSi. Langtidsvirkningene i dyreforsøk tyder på at enkelte har fibrosefremkallende effekt i rottelunger. Den er svak sammenlignet med kvarts, men sterkere enn for det inaktive støvet TiO_2 .
3. CaSi administrert til brysthulen hos rotter har ikke ført til utvikling av lokale svulster, forenlig med at risikoen for utvikling av den karakteristiske mineralfibersvulst (malignt mesoteliom) hos mennesker er svært lav eller ikke til stede.
4. Mineralene løses i stor grad opp ved lengre tids opphold i lungene. Amorf silisiumdioksyd kan derved være årsaksfaktor for den observerte lungefibrose i dyreforsøkene.
5. Det er ingen samlet overensstemmelse mellom resultatene fra in vivo og in vitro undersøkelsene, selv om enkeltresultater av in vitro studiene passer med resultatene fra dyreundersøkelsen.
6. Til tross for metodenes begrensninger tyder resultatene på at gruppen CaSi skal kunne brukes i arbeidslivet uten spesiell risiko for støvlungesykdom dersom støveksponeringen holdes lav. Funn av lett arrvevsreaksjon omkring perifere luftrørgrener hos forsøksdyr i noen av CaSi, er likevel forenlig med lungeobservasjoner hos finske gruvearbeidere (obstruktive lungeforandringer).

Den endelige vurdering av in vitro resultatene i forhold til in vivo resultatene avventer sluttbearbeidelse av resultatene fra dyreforsøkene og mekanismestudiene for hemolyse.

5. INFORMASJON

Resultatene vil bli publisert i norske og internasjonale tidsskrifter. Brukere og regulerende myndigheter vil bli informert.

6. RESULTATOPPFØLGING OG VIDERE PERSPEKTIVER

Prosjektet har ført til samarbeid med professor M. Degre ved SIFF om betydningen av CaSi for induksjon av interferon i cellekulturer, på bakgrunn av en observasjon om at CaSi skulle ha en slik effekt. Resultatene i våre forsøk er usikre og vil foreløpig ikke bli fulgt opp.

En forsøksrekke er videre gjennomført i samarbeide med Dr. Barbara Hemmingsen ved Flymedisinsk institutt, Oslo/University of San Diego, USA, basert på en første observasjon om at en av våre CaSi har evne til å forårsake gassdannelse i vann ved rask dekompresjon i spesielle trykkamre. Tilsvarende undersøkelser er nå utført med vår makrofagkulturmetode. Samarbeidet fortsetter p.g.a. møtende interesser for henholdsvis dekompresjons sykdommer og mineralstøv i lungene.

Nyere arbeider tyder på at en av CaSi har evne til å forsinke reparasjon av skade på arvematerialet i leverceller i kultur når disse har vært utsatt for både et genotoksisk stoff og CaSi. Vi vil ved Yrkeshygienisk institutt følge opp dette arbeidet ved å studere tilsvarende effekter på bronkialepitelceller i kultur (instituttssamarbeid med dr.philos. Aage Haugen).

7. PERSONELL

Ingeniørstillingen tilknyttet prosjektet har vært besatt av Liv Overaae, senere av Rune Hansen.

Følgende personer har videre bidratt i arbeidet:

Forsker, cand.med. Vidar Skaug

Ingeniør Elin Thornér

" Anne Grethe Myrann

" Grete Edholm

" Anne Lise Nordhagen

Forskningsleder, dr.philos. Bjørn Gylseth.

8. RAPPORTER OG PUBLIKASJONER

Følgende arbeider og rapporter er publisert i perioden frem til i dag:

1. Vidar Skaug og Bjørn Gylseth. Kalsiumsilikat - erstatningsstoff for asbest? Vern og Velferd, 8 (1981) 8-9.
2. Vidar Skaug og Bjørn Gylseth. The hemolytic activity of 5 different calcium silicates. Environmental Health Perspectives, 51 (1983) 195-203.
3. Vidar Skaug, Reginald Davies and Bjørn Gylseth. In vitro macrophage cytotoxicity of 5 calcium silicates. British Journal of Industrial Medicine, 41 (1984) 116-121.
4. Vidar Skaug, Elin Thornér, Anne Grethe Myrann og Bjørn Gylseth. Eksperimentelle lungeeffekter av et syntetisk kalsiumsilikat. metodebeskrivelse og foreløpige resultater. Nordisk yrkeshygienisk møte, Stockholm 1983.
5. Laurak, S., Martinsen, I., Skaug, V. og Thomassen, Y. Bestemmelse av sporelementer i humant lungevev ved bruk av sekvensielt ICP-AES. 33. Nordiske yrkeshygieniske møte, oktober 1984. Resymésamling s. 169.
6. Skaug, V., Gylseth, B.: Lung tissue respons to a synthetic calciumsilicate, an experimental and histopathological evaluation. XXI International Congress on Occupational Health. In Book of abstracts, Ed. I.E. Eustace, p. 634, 1984.
7. Skaug, V., Gylseth, B., Reiss, ALP., Norseth, T.: Tumor induction in rats after intrapleural injection of nickel subsulphide and nickel oxide. Annals of Clinical Laboratory Science 14 (1984) 5-400.
8. Skaug, V., Thornér, E., Gylseth, B., Reiss, ALP., Norseth, T.: Svulstutvikling i brysthulen hos rotter etter intrapleural injeksjon av nikkelforbindelser og asbest. 33. Nordiske Yrkeshygienikermøte, oktober 1984. Resymésamling s. 172.
9. Aaseth, J., Skaug, V., Alexander, J.: Hemolytic activity of copper as influenced by chelating agents, albumine and chromium. Acta Pharmacologica et Toxicologica, 54 (1984) 304-310.
10. Hansen, T.V., Aaseth, J., Skaug, V.: Hemolytic activity of vanadium sulfate and sodium vanadate. Loen 1985. Proceedings from Int. Congress on Trace Elements.

Følgende arbeider er under bearbeidelse for publikasjon:

1. In Vivo effekter av kalsiumsilikater. Resultater av dyre-eksperimentelle undersøkelser for påvisning av lungevevsreaksjon og brysthinesvulster.
2. Mekanismestudier for CaSi-indusert hemolyse.
3. Effekt av dekompresjon på kulturer av makrofager tilsatt tobermorite.