

UNDERSØKELSE AV FIBROSE-
FREMKALLENDE VIRKNING AV
POLYVINYLKLOORIDSTØV (P-10)
I ROTTELUNGER.

av

Niels Eirik Nertun

Axel Wannag

HD: 733/770119

Avdeling: Medisinsk avdeling
Ansvarshavende: Axel Wannag, reservelege

UNDERSØKELSE AV FIBROSE-
FREMKALLENDE VIRKNING AV
POLYVINYLKLOORIDSTØV (P-10)
I ROTTELUNGER.

av

Niels Eirik Nertun

Axel Wannag

HD: 733/770119

Avdeling: Medisinsk avdeling
Ansvarshavende: Axel Wannag, reservelege

I. Bakgrunn.

De fleste (produsent, bruker, tilsynsmyndighet) har hittil antatt at det er liten helserisiko ved bruk av PVC støv. Imidlertid har dyrestudier (Popow 1969) vist at PVC støv gir opphav til skade i rottelunger. Det kom betennelsesreaksjoner og ødeleggelse av lungeblæreveggene (emfysem). Det er dog vanskelig å avgjøre om disse reaksjonene ble utløst bare av PVC støvet eller om skaden også skyldes bakterier og virus-vekst i lungene.

Hos mennesker som har vært utsatt for PVC støv er det funnet lettere forandringer (forandring i det bronchovaskulære bildet og økt ventilasjon i hvile) (Vertkin og Mamentov 1970) og spredt, lett fibrose (arvevannelse) med mindre områder med betennescellereaksjon (granulomer) (Szende et al 1970).

Hittil har det vært forholdsvis få studier av reaksjonen i lunger på PVC støv og vi har derfor et mangelfullt kjennskap til denne. Yrkeshygienisk institutt besluttet derfor at en skulle undersøke PVC i de dyreeksperimentene instituttet bruker for å studere lungefibroseeffekten av forskjellig støv.

Høsten 1975 mottok Yrkeshygienisk institutt PVC (P10) støv fra pall nr. 5136, Norsk Hydro, Herøya.

Opplysninger om P10 støvet:

Molekylvekt Mn:	50.000
Partikkelstørrelse	0.1-0.5 mikron
Flyktige stoffer i %:	3
VCM-innhold i ppm:	< 5
Total innhold av hjelpestoffer i %	ca 2

Undersøkelsen er blitt støttet økonomisk av Norsk Hydro. Vi takker for den hjelpen vi har fått.

II Metoder.

Jon Glømme (1967) og Åke Swensson (1971) har studert den fibrosefremkallende effekten av kvartsstøv i rottelunger. Den undersøkelsesmetoden Glømme og Swensson brukte i disse forsøkene er siden blitt brukt for å undersøke fibrosefremkallende effekt av en rekke andre støvtyper. Noen av disse støvtypene viste ikke fibrosefremkallende effekt, mens andre gav fibrosedannelse i rottelungene i varierende grad. Imidlertid finnes det også støvtyper som gir opphav til en reaksjon i rottelunger som er forskjellig fra den fibrosereaksjonen som fremkalles av f.eks. kvarts (Nertun og Wannag 1976). Lungeskader av slikt støv, har en annen årsak (en annen mekanisme) enn de lungeskadene som kommer på grunn av kvarts. Derfor kan lungeskadene av slikt støv ikke studeres skikkelig i en undersøkelse som spesielt er rettet mot å oppdage fibrosereaksjoner av den typen som kvarts gir. Dette er en klar begrensning av undersøkelsesmetoden til Glømme og Swensson.

Deres undersøkelsesmetode går ut på at rotter får sprøytet støvholdig væske ned i lungene. Støvet er oppslemmet i fysiologisk saltvann (0,9% NaCl). Etter 1,2,4 og 8 måneder blir lungene undersøkt. Graden av lungeforandringer blir vurdert etter lungenes vekt og etter bildet av lungevevet i mikroskop. Rottelungene som er blitt sprøytet med støv-blanding, blir sammenlignet med lungene til rotter som er sprøytet med rent fysiologisk saltvann (kontrolldyr).

Vurdering av lungevekten.

Glømme og Swensson har vist at lungevekten gir et meget godt bilde av størrelsen av den reaksjonen som har funnet sted i en lunge.

Imidlertid er det ikke bare støv som kan være årsak til at en lunge øker i vekt. Andre forhold f.eks. lungebetendelse, sammenfalling av en lungelapp (atelektase) o.a. kan også øke lungevekten. Slike lunger må utelukkes når en skal sammenligne lungevekten hos forsøksdyrene med lungevekten hos kontrolldyrene.

Vurdering av det mikroskopiske lungebildet.

Selv om lungevekten gir et godt bilde av størrelsen av reaksjonen i rottelungen, gir den ingen opplysning om hvilken type reaksjon som er kommet i lungene. Denne må vurderes ut fra det bildet lungevevet viser i mikroskop (det mikroskopiske bildet). For å studere forandringer av cellene i lungevevet, ble snitt fra lungen farvet med hematoxylin-eosin. For å studere forandringer av de retikulære fibrillene ble snittene farget etter Bielschowsky's fargemetode.

Graderingen av lungevevsforandringene ble gjort etter Glømmes skala som går fra 0 til 6.

Grad 0: Normal lunge.

Grad 1: Mengden av phagocytter ("spisende" celler) i lungen er økt. Noen av disse cellene er i alveolsepta (lungeblæreveggen), men de fleste ligger i alveollumen (lungeblærehulrommet), alene eller sammen med andre. De kan fylle hele alveollumen. Det er ikke fibroblaster (celler som kan danne fibrocytter), fibrocytter (celler som danner fibriller) eller fibriller (tynne bindevevs-tråder). Den vanlige strukturen av alveolene er ikke ødelagt.

Grad 2: Ansamlingene av phagocytter er blitt større og tettere. En celledsamling kan fylle flere alveoler. Det er enkelte fibroblaster og fibrocytter blant phagocyttene. Det er fibriller i celledsamlingene, men fibrillenettet er ganske sparsomt og løst. Det kan også være en viss økning av fibrillemengden i alveolsepta.

Grad 3: Mengden av phagocytter er minket, mens antallet fibroblaster og fibrocytter er økt. Disse kan helt dominere cellebildet. Den normale strukturen av alveolen er vanskelig å skjelne, eller den kan ha gått tapt, der celledsamlingen er tett. Det er mange fibriller, men nettverket er ennå nokså løst.

Grad 4: Fibrocytter og fibroblaster dominerer i cellebildet, det er få phagocytter tilbake. Celledsamlingene er ganske store. Fibrillene kan være fine og danne tette nettverk, eller grovere og danne løsere nettverk.

Grad 5: I de tidligere cellesamlingene (knutene) er celledetallet i midten av knutene gått tilbake. Fibrillenettverket er kraftig og tett, med mange store bånd av fibriller.

Grad 6: Knutene er blitt cellefattige, spesielt i midten hvor cellene kan være helt borte. Fibrillenettverket er utviklet videre. De store bånd av fibriller dominerer i bildet.

En lunge kan samtidig ha forandringer av forskjellige grader. Lungen blir da gradert svarende til den alvorligste forandringen, dersom denne finnes som minst 1/5 av alle forandringene.

Behandling av PVC før innsprøyting i rottelunge.

PVC-støvet (Norvinyl P 10) som ble brukt til forsøket ble tatt fra pall 5136 ved Norsk Hydro, Herøya.

Støvpartiklene hadde diameter 0,1-0,5 μm .

400 mg PVC-støv (P 10) ble blandet med 10 ml fys. saltvann (0,9% NaCl). Blandingen ble ultralydbehandlet i 2 min. og deretter holdt i bevegelse med en magnetrører. Hver time ble det tatt prøve av blandingen som ble undersøkt i mikroskop.

PVC-støvpartiklene holdt seg hele tiden fritt svevende.

De viste ingen tegn på å klumpe seg sammen (aggregere).

Rotter.

Det ble brukt 4 grupper hun-rotter, hver med 30 like gamle dyr. Alle dyrene i en gruppe gikk sammen i et felles bur med fri adgang til vann og mat (Rasmussens kost). Når dyrene i en gruppe var mellom 5 og 6 måneder gamle, ble de operert. Halvparten fikk 1 ml fysiologisk saltvann med 40 mg PVC (P 10) støv sprøytet ned i lungene. Den andre halvparten (kontrollene) fikk sprøytet ned 1 ml fysiologisk saltvann. Deretter gikk hele gruppen igjen i samme bur til den ble undersøkt. Ved undersøkelsen ble alle dyrene i en gruppe drept. Dette skjedde 1, 2, 4 og 8 måneder etter støvinnsprøytingen.

Statistikk.

Wilcoxon-Mann-Whitney-testen er brukt. Det ble valgt et signifikans nivå på 5%. De funne ensidige signifikansnivåer (α) er oppgitt.

III. Resultat.

Forandringene i rottelungen sett i mikroskop.

Graderingen av forandringene i lungene er vist i tabell 1. Allerede en måned etter innsprøytingen har de fleste rottene fått forandringer av grad 1 eller 2 (gjennomsnitt 1,4). Disse holder seg uforandret inntil 8 måneder etter innsprøytingen. Det kommer altså ingen utvikling av lungereaksjonen mot mer alvorlige forandringer, men reaksjonen går heller ikke tilbake mot den normale lunge.

Vekten av rottelungen.

Den mediane lungevekten (et gjennomsnittsmål for lungevektene) og konfidensintervallet for den mediane lungevekten med 95% konfidens-koeffisient (området hvor vi ut fra målingene er 95% sikre på at den mediane lungevekten befinner seg) er vist i tabell 2.

Forskjellen i lungevektene mellom kontrollgruppene skyldes sannsynligvis en normal aldersutvikling hos rottene. Rottene reagerer på P 10 og får øket lungevekt. Det er en sikker forskjell på lungevektene hos rotter som har fått P 10 og kontrollrottene 1, 2 og 4 måneder etter innsprøytingen, (1 månedsgruppene, $\alpha'=0,020$, 2 månedersgruppene $\alpha'=0,000$, 4 månedersgruppene $\alpha'=0,000$). Forskjellen er størst etter 4 måneder. Deretter avtar imidlertid den mediane lungevekten hos P 10 dyrene og den blir faktisk lik den mediane lungevekten for kontrolldyrene, 8 måneder etter innsprøytingen ($\alpha'=0,477$). Imidlertid er spredningen (range) av lungevektene på dette tidspunkt større blant P10 dyrene enn blant kontrolldyrene (tabell 3). Selv om den mediane lungevekten hos P 10 dyrene avtar fra 4 til 8 måneder etter innsprøytingen blir forskjellen i lungevektene ikke sikker ($\alpha'=0,192$). Dette skyldes spredningen av

lungevektene, spesielt hos deeldste dyrene.

IV. Diskusjon.

Glømme (1967) undersøkte reaksjonen på titaniumdioxyd, glassull, jernsilikat, olivin og kvarts i rottelunger. Han fant at lungene reagerte minst på titaniumdioxyd, deretter kom glassull, jernsilikat og olivin, mens det ble full utvikling av lungefibrose når kvarts ble sprøytet inn. Glømme konkluderer at støv av titaniumdioxyd og glassull nærmest ikke har fibrosefremkallende egenskaper i lungene. Støv av jernsilikat og olivin gir moderate reaksjoner, men kan sannsynligvis bli årsak til fibroseutvikling i lungene, dersom et individ blir belastet med store mengder støv under uheldige omstendigheter.

PVC (P 10) støv gir opphav til en reaksjon hvor det bare blir lette forandringer i det mikroskopiske bildet av rottelungen (tabell 1 og 4). Disse forandringene holder seg imidlertid, selv 8 måneder etter innsprøytingen. Slike forandringer som består over lengere tid (uten å utvikle seg mot alvorligere former, men også uten å gå tilbake), kommer som reaksjon på enkelte andre støvtyper også (olivin, nefelinsyenitt (tabell 4)).

Lungevekten hos P 10 rottene øker de fire første månedene etter innsprøytingen, (tabell 2 og 5, fig. 1). Deretter fortsetter lungevekten å øke i enkelte dyr, mens den hos andre dyr avtar (tabell 3).

Vi vet ikke om den lungevektøkningen enkelte dyr får fra 4 til 8 måneder etter innsprøytingen, skyldes P 10 støvet, - eller om det er vektøkning på grunn av alderen som tilsvarer den vi kan se hos enkelte kontroll dyr.

Vi kjenner heller ikke årsaken til at lungevekten avtar til normale verdier hos endel rotter fra 4 til 8 måneder etter P 10 innsprøytingen.

Reaksjonene i rottelungen på grunn av kvarts (Glømme 1967, Swensson 1971), titaniumdioxid, glassull, jernsilikat, olivin (Glømme 1967) og silikatet "Hellvik-Splitt" (Wannag 1975) viser samsvar mellom lungevektøkningen og graden av forandringer av lungebildet i mikroskopet. (Dette er vist for kvarts og olivin i tabell 4 og 5). Et slikt samsvar finner en ikke for PVC (P 10) og heller ikke for nefelinsyenitt (Nertun og Wannag 1976).

Etter P 10 og nefelinsyenittinnsprøyting øker vekten av rottelungene de 4 første månedene mens det mikroskopiske bildet i lungen er omtrent uforandret (omkring grad 1,4 for P 10 og omkring grad 2 for nefelinsyenitt (tabell 4 og 5, fig. 1). Hvorfor P 10 gir opphav til øket lungevekt uten at det mikroskopiske bildet av lungevevet viser en tilsvarende utvikling, vet vi ikke.

Det synes å være store variasjoner i lungereaksjonen fra dyr til dyr etter P 10 innsprøyting. Hos noen dyr synes lungene å øke i vekt hele observasjonstiden, hos andre dyr øker lungevekten til å begynne med for deretter å avta. Enkelte rotter som har fått P 10 har samme lungevekt som kontrolldyrene 8 måneder etter innsprøytingen. Vi vet ikke grunnen til at reaksjonen er forskjellig fra rotte til rotte. Heller ikke vet vi om den økningen av lungevekten som noen dyr får, har betydning for funksjonen av lungen.

Reaksjonen i rottelungene som har fått P 10 (og nefelinsyenitt), er forskjellig fra den reaksjonen som kommer etter kvarts, olivin, og "Hellvik-Splitt". Det er derfor sannsynlig at P 10 (og nefelinsyenitt) er skadelig for lungen på en annen måte (ved en annen mekanisme) enn disse stoffene. Videre studier av reaksjonen i lungen etter PVC påvirkning må derfor skje med andre metoder enn dem som spesielt er laget for å studere den fibrosereaksjonen som blir utløst av kvarts.

V. Konklusjon.

PVC (P 10) støv utløser en reaksjon når det blir sprøytet ned i rottelunger. De fire første månedene etter innsprøytingen øker lungene i vekt. Deretter blir utviklingen forskjellig fra dyr til dyr. Noen fortsetter å øke lungevekten, mens lungevekten hos andre avtar. Medianverdiene (en gjennomsnittsverdi) for lungevekten, er faktisk den samme hos de dyrene som har fått P 10 støv, som hos kontroldyrene 8 måneder etter støvinnsprøytingen.

I lungebildet, slik det sees i mikroskop, kommer det økning av macrophager ("spisende" forsvarsceller), men ingen utvikling av fibroseknuter (arrvevdannelse). Dette bildet holder seg uforandret i 8 måneder etter P 10 innsprøytingen.

Reaksjonen etter P 10 viser altså ikke samsvar mellom forandringene i lungevektene og forandringene i de mikroskopiske lungebildene. Tilsvarende reaksjon er tidligere sett ved nefelinsyenittpåvirkning (Nertun og Wannag 76). Lungereaksjonen etter P 10 og nefelinsyenitt adskiller seg derfor fra reaksjonene etter kvarts (Glømme 1967, Swensson 1971), titaniumdioxid, glassull, jernsilikat, olivin (Glømme 1967) og silikatet "Hellvik-Splitt" (Wannag 1975) hvor en finner samsvar mellom lungevekforandring og forandring av det mikroskopiske lungebildet. Det er derfor sannsynlig at P 10 er skadelig for lungen på en annen måte (ved en annen mekanisme) enn kvarts. Videre studier av reaksjonen i lungen ved PVC påvirkning må derfor foregå med andre metoder enn dem som er utviklet for spesielt å studere fibrosereaksjonen av kvarts.

Dersom PVC (P 10) reagerer i menneskelunger på samme måte som i rottelunger, vil mennesker som blir utsatt for P 10 kunne få en reaksjon i lungene som vil gi økt vekt av lungene. Hvilke mengder P 10 støv som skal til for å utløse en reaksjon i menneskelungen vet vi ikke. Vi vet heller ikke om mennesker som blir utsatt for P 10 støv vil ha like store individuelle forskjeller i lungevektøkningen som rottene. Hvorvidt P 10 kan gi andre reaksjoner i menneskelungen enn vektøkning og celleinnvandring av macrophager er foreløpig ukjent.

TABELL 1

Det mikroskopiske bildet av reaksjonen i lungene hos rotter som har fått 40 mg PVC (P 10) eller fysiologisk saltvann (kontroll) sprøytet ned i lungene.

Gruppe	Antall dyr	Gradering av lungereaksjonen			Gjennomsnitt
		0	1	2	
1 måned kontroll	11	10	1	0	0.1
1 måned PVC (P 10)	16	2	7	7	1.3
2 måned kontroll	17	8	9	0	0.5
2 måned PVC (P 10)	16	0	9	7	1.4
4 måned kontroll	12	11	1	0	0.1
4 måned PVC (P 10)	12	1	5	6	1.4
8 måned kontroll	14	13	1	0	0.1
8 måned PVC (P 10)	7	1	2	4	1.4

TABELL 2

Vekten av lungene hos rotter som har fått 40 mg PVC (P10) eller fysiologisk saltvann (kontroll) sprøytet ned i lungene.

Gruppe	Antall dyr	Medianverdi i gram	Konfidensintervall for medianverdien
1 måned kontroll	11	1.63	1.41-1.96
1 måned PVC (P10)	16	1.94	1.61-2.13
2 måned kontroll	17	1.62	1.48-1.76
2 måned PVC (P10)	16	2.11	1.88-2.59
4 måned kontroll	12	1.64	1.48-1.95
4 måned PVC (P10)	12	2.63	2.37-3.39
8 måned kontroll	14	2.02	1.88-2.76
8 måned PVC (P10)	7	2.00	1.52-5.54

+ Konfidensintervallet er gitt med 95% konfidens koeffisient.

TABELL 3

Sammenstilling av lungevektene hos rotter 8 måneder etter innsprøyting av PVC (P 10) eller fysiologisk saltvann (kontroll).

KONTROLL	PVC (P 10)
4.10	5.54 ⁺
	3.71
3.41	
	2.94
2.76	
2.68	
2.31	
2.11	
2.07	
2.00	2.00
1.97	
1.91	1.91
1.89	
1.88	
	1.87
1.82	
1.69	
	1.52

+ Vektene er i gram.

TABELL 4

Sammenligning av Glømme's resultater for rotter som har fått olivin og kvarts og resultatene for rotter som har fått nefelinsynitt, PVC (P10) og fysiologisk saltvann (kontroll).

Den gjennomsnittlige gradering av det mikroskopiske lungebildet.

Måned etter innsprøytning	Kontroll	Olivin	Nefelin-syenitt	PVC (P10)	Kvarts
1	0.1	1.4 ⁺ og 2.0 ⁺	1.7	1.3	2.2 ⁺ og 2.2 ⁺
2	0.5	1.5 og 2.0	2.0	1.4	2.6 og 2.6
4	0.1	1.2 og 1.8	2.2	1.4	4.0 og 5.0
8	0.1	1.0 og 2.0	1.6	1.2	5.0 og 6.0

+ Hver kolonne representerer én forsøksserie.

TABELL 5

Sammenligning av Glømme's resultater for rotter som har fått olivin og kvarts og resultatene for rotter som har fått nefelinsyenitt, PVC (P10) og fysiologisk saltvann (kontroll).

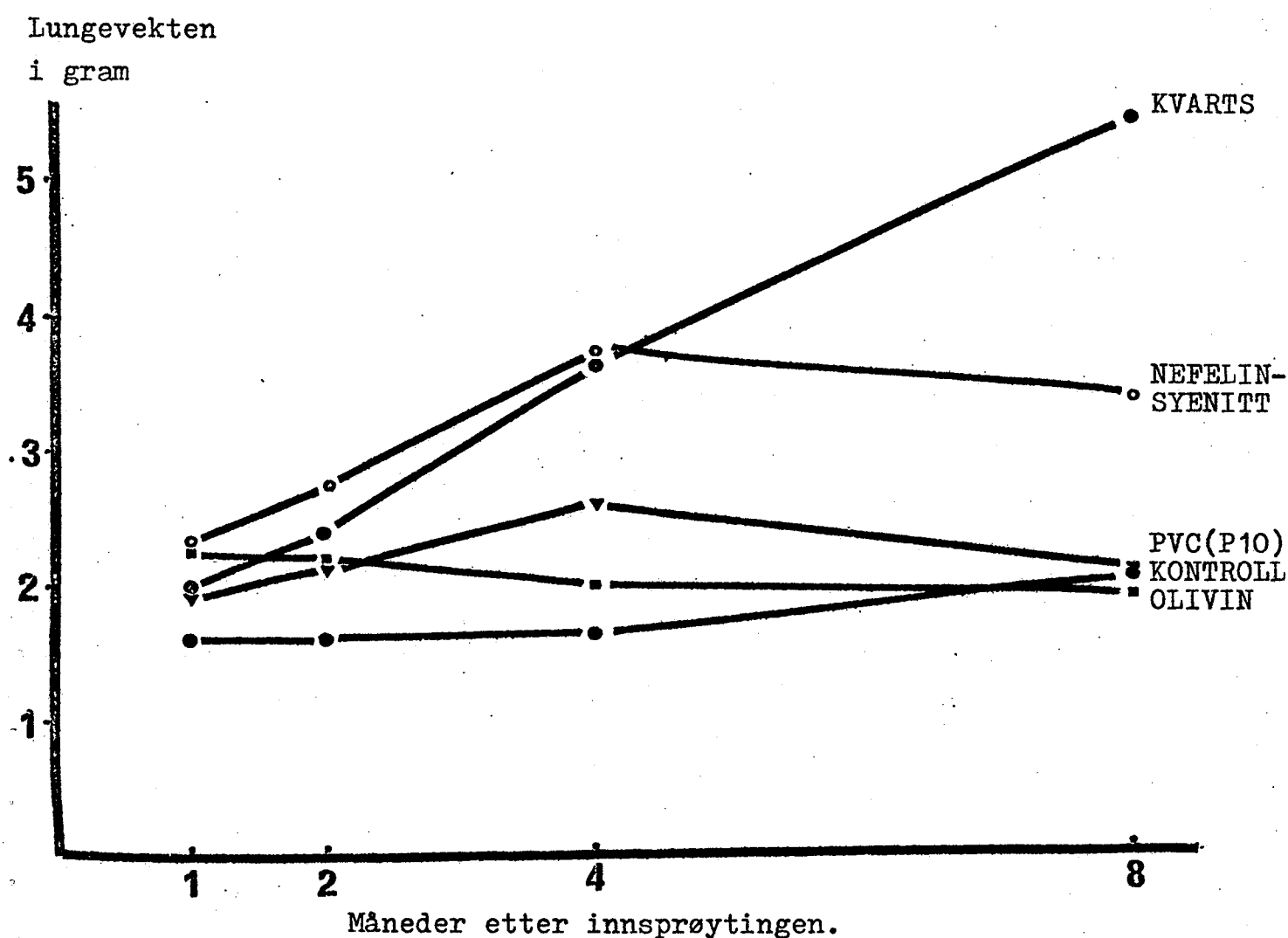
Vektforandringer.

Måned etter innsprøyting	Kontroll Medianverdi	Olivin Middelvei	Nefelinsyenitt Medianverdi	PVC (P10) Medianverdi	Kvarts Middelvei
1	1.63	2.27	2.32	1.94	2.01
2	1.62	2.20	2.76	2.11	2.38
4	1.64	2.01	3.72	2.63	3.66
8	2.02	1.91	3.36	2.00	5.37

+ Alle verdiene er angitt i gram.

Da lungevektene for olivin og kvarts er gitt som middelvei og lungevektene for kontroll, PVC (P10) og nefelinsyenitt gitt som medianverdi, kan ikke lungevektene sammenlignes. Det vi kan sammenligne er hvordan lungevektene utvikler seg fra måned til måned når vi gir forskjellig støvtyper.

Fig 1: Sammenligning av lungevekten hos rotter som har fått kvarts,nefelinsyenitt,olivin,PVC(P10) og fysiologisk saltvann (kontroll) sprøytet inn i lungene.



Kvarts og olivinpåvirkningen av lungene er fra publikasjon til Glømme (1967). Det er middelerdiene for lungevektene som er angitt for kvarts og olivin. For lungene med nefelinsyenitt, PVC og kontrollene er det medianverdiene som er angitt. Lungevektene kan derfor ikke sammenlignes direkte. Det er utviklingen av lungevektene som kan sammenlignes.

Referanser.

- Glømme, J.: "Evaluation of the relative fibrogenetic tendency of mineral particles in animal experiments". Universitetsforlaget, Oslo - Bergen - Tromsø, (1967).
- Nertun, N.E. og Wannag, A.: "Undersøkelser av den fibrosefremkallende virkning av nefelinsyenitt. Yrkeshygienisk institutt, Oslo. HD 723/760615, (1976).
- Popow, J.: "Influence of Polyvinyl Chloride (P.C.V.) dust on the rat respiratory system". Roczniki Akademii Medycznej im Juliana Marchlewskiego W. Białymstoku. sup. 24, 5-48, (1969).
- Swensson, Å.: "Experimental evaluation of the fibrogenetic power of mineral dusts". Studia Laboris & Salutis. 10, 86-97, (1971).
- Szende, B., Lapis, K., Nemes, A. og Pinter, A.: "Pneumoconiosis caused by the inhalation of polyvinylchloride dust". Medna Law. 61, 8-9, 433-436, (1970).
- Vertkin, I og Mamentov, R.: "On the state of the bronchopulmonary system in workers engaged in the manufacture of articles made of polyvinylchloride. Gig. Tr. prof. Zabol. 14, 29-32, (1970).
- Wannag A.: "Undersøkelse av fibrosefremkallende virkning av silikatet "Hellvik-Splitt" i rottelunger. Yrkeshygienisk institutt, Oslo. HD 652, (1975).