

VIRKNINGEN AV STØV FRA BERGARTEN  
ANORTHOSITT I ROTTELUNGER

Delrapport II: Biologisk effekt av anorthositt i rottelunger

Retensjon av anorthositt i rottelunger ved eksponering i støvkammer

av

Axel Wannag, Niels Nertun, Bjørn Gylseth og  
Vidar Skaug <sup>x)</sup>

HD 788/010679

Rapport: Yrkeshygienisk rapport nr. HD 788/100679

Avdeling: Yrkeshygienisk institutt:

Forskning og utredning, Teknisk.

Ullevål sykehus: Patologisk-anatomisk  
laboratorium <sup>x)</sup>

Ansvarshavende: Lege Axel Wannag, Yrkeshygienisk institutt

Stikkord: Anorthositt, lungeretensjon,  
biologisk effekt

Innhold	Side
I INNLEDNING	1
II METODER	1
III RESULTAT OG DISKUSJON	7
IV KONKLUSJON	10
V TABELLER OG FIGURER	12 - 17
VI REFERANSER	18

## I. INNLEDNING

Jordskorpen består av omkring 95 % silikater hvorav ca. 60 % tilhører feltspatgruppen. En del av disse feltspatene inneholder store mengder aluminium og er et mulig råstoff for framstilling av aluminiumoksyd. I tillegg til denne kan felspatbergartene ofte inneholde sjeldne metaller som kan være av økonomisk interesse. På grunn av mulig kommersiell utnyttelse av en bergart (anorthositt) av denne type i Norge, har en ønsket å utrede de yrkeshygieniske og yrkesmedisinske konsekvenser ved eksponering for anorthosittstøv.

Undersøkelsen er lagt opp som en modellstudie der en ønsker å studere virkningen av anorthosittstøv på rottelunger. Prosjektet er et samarbeidsprosjekt mellom patologisk-anatomisk laboratorium ved Ullevål sykehus og Yrkeshygienisk institutt. Det vil omfatte en karakterisering av støvet, eksponering av rottene ved direkte innsprøyting av støvet i luftveiene og eksponering i støvkammer. Både retensjon, fordeling av støv i lungene og lungenes reaksjon på støvet vil bli studert.

Denne rapporten (delrapport II) omhandler vurderingen av

- avleiringen (retensjonen) av anorthosittstøv i lungene hos rotter i støvkammer.
- virkningen (biologisk effekt) av anorthosittstøv i rottelunger, både når støvet pustes inn (inhaleres) og når det sprøytes (injiseres) ned i lungene.

## 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 fibrose-dannelse i rottelungene i varierende grad.

Undersøkelsesmetoden til Glømme og Swensson går ut på at rotter får sprøytet støv oppslemmet i fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl) ned i lungene. Etter 1, 2, 4 og 8 måneder blir lungene undersøkt. Graden av lungeforandringer blir vurdert etter lungenes vekt, lungenes utseende og fasthet og etter bildet av lungevevet i mikroskop. Rottelungene som er blitt sprøytet med støvblanding, blir sammenliknet med lungene til rotter som er sprøytet med rent fysiologisk saltvann (kontroll-dyr).

#### Vurdering av lungene utseende og fasthet, det makroskopiske lungebildet.

Forandringene blir gradert fra A til E. Normalen lunger har grad 0.

Grad A: Lungene har vanlig størrelse, men kan synke sammen litt senere enn vanlig når brysthulen åpnes. Lungevevet føles normalt når en tar på det - uten knuter.

Grad B: Lungene har vanlig størrelse, men synker sammen senere enn normalt når brysthulen åpnes. De sammenfalte lungene kan være større enn normalt. Lungevevet føles litt tettere og fastere når en tar på det - uten knuter.

Grad C: Lungene er større enn normalt etter at de er falt sammen. En kjenner små knuter i lungevevet når en tar på det.

Grad D: Lungene er forstørret. En kjenner større knuter i lungevevet når en tar på det, men knutene er vel avgrensede.

Grad E: Lungene er forstørret og har store sammenhengende faste partier i seg.

Vurdering av lungevekten.

Glømme og Swensson har vist at lungevekten gir et meget godt bilde av omfanget av fibrosereaksjonen som er kommet i en lunge.

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

Vurdering av lungene i mikroskop (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 bilde lungevevet viser i mikroskop (det mikroskopiske bildet). For å studere forandringer av cellene i lungevevet, ble snitt fra lungene farget med hematoxylin-eosin. Graderingen av lungevevsforandringene ble gjort etter Glømmes skala som går fra 0 til 6.

Grad 0: Normal lunge.

Grad 1: Mengden phagocytter ("spisende" celler) i lungene er økt. Noen av disse cellene er i alvedsepta (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 bindevevstråder). Den vanlige strukturen av alveolene er ikke ødelagt.

- Grad 2: Ansamlingene av fagocytter er blitt større og tettere. En cellesamling kan fylle flere alveoler. Det er enkelte fibroblaster og fibrocytter blant fagocyttene. Det er fibriller i cellesamlingene, men fibrillenettet er ganske sparsomt og løst. Det kan også være en viss økning av fibrillemengden i alveolsepta.
- Grad 3: Mengden av fagocytter er minket, mens antallet fibroblaster er økt. Disse kan helt dominere cellebildet. Den normale strukturen av alveolene er vanskelig å skjelne, eller den kan ha gått tapt, der cellesamlingen er tett. Det er mange fibriller, men nettverket er ennå nokså løst.
- Grad 4: Fibrocytter og fibroblaster dominerer i cellebildet, det er få fagocytter tilbake. Cellesamlingene 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 celletallet 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 anorthosittstøvet før innsprøyting i rottelungen.

Anorthositt ble knust til støv ved laboratoriet på Elkem-Spigerverket a/s, Fiskaa Verk Kristiansand S. For karakterisering ble støvpartiklene delt i størrelsesklasser etter ekvivalentdiameteren. 99,3% av partiklene hadde ekvivalentdiameter  $< 5 \mu\text{m}$ . Vekten av støvet i de forskjellige størrelsesklassene var omtrent den samme. Partiklene med ekvivalentdiameter  $< 5 \mu\text{m}$  utgjorde 48% av totalvekten. (Delrapport I, HD 748/231177).

400 mg anorthosittstøv 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 en prøve av blandingen som ble undersøkt i mikroskop. Anorthosittstøvpartiklene holdt seg hele tiden fritt svevende. De viste ingen tegn på å klumpe seg sammen (aggregere).

## Støvkammer eksponering av rotter.

En metode å utsette rotter for støv på er å la dyrene selv puste inn støvholdig luft i et støvkammer. Støvkammeret som er beskrevet av Langård et al (1978) ble benyttet. Det anorthosittstøvet som kunne fanges opp på filter (millipore AAWP 03700, Casella pumpe) i støvkammeret - og som godt representerer det støvet rottene puster ned i lungene, - adskilte seg noe fra utgangsstøvet. 99,8 % av partiklene var  $< 5 \mu\text{m}$  i størrelse, og tilsammen svarte partiklene  $< 5 \mu\text{m}$  for 80 % av vekten av støvet. (Delrapport I, HD 748/231177).

Det var kontinuerlig måling av støvmengden i kammeret. (Millipore AAWP 03700 filter, Casella pumpe). Fig. 1 viser den daglige støvmengden de 14 dagene rottene ble eksponert.

## Beregning av den støvmengden hver rotte pustet inn.

Den gjennomsnittlige støvmengde i kammeret ble regnet ut etter støvmålinger.

$\sum$  Støvmengde x eksponeringstid for denne støvmengde  
 hele eksponeringstiden

Lungeventilasjonen til rotten ble regnet ut etter Adolph: (1949)  $120 \times \text{kroppsvekt i gram}^{0,74} = \text{ventilasjonen ml/time}$ . Lungeventilasjon x gjennomsnittlig støvmengde x eksponeringstid gir støvmengden som rotten pustet inn.

#### Måling av mengde anorthositt i rottelungen.

Bestemmelse av mengde uorganisk materiale i rottelunger kan gjøres på flere måter. Vanligst er

- totaloppløsning av lungene i syreblanding med etterfølgende elementbestemmelse (som Si ved kvarts og feltspat og Cr ved kromateksponering osv )
- forasking og vektbestemmelse av asken (gravimetrisk metode).

Normalt er mengden uorganiske salter (klorider, fosfater etc. i rottelunger  $5,95 \% \pm \text{SD } 0,1$ ) av lungens tørrvekt målt med foraskingsmetoden. Denne verdi kan brukes som korreksjon ved undersøkelsen av lungen som inneholder anorthositt. Foraskingsmetoden gir en rimelig nøyaktighet (anslagsvis  $\pm 10$  vekt %) og er rask å utføre. Den er derfor å foretrekke fremfor syreoppslutningsmetoden for bestemmelse av mengde anorthositt i rottelunger.

Rottelungen ble tørket i 2 døgn ved  $70^{\circ} \text{C}$  og tørrvekten registrert. Deretter ble lungen forasket i lavtemperaturforaskingsovn. Foraskingen var komplett. Asken ble vasket med saltsyre (HCl 1 N) og vekten av askeresten ble registrert. Ved sammenlikning med normale lunger ble anorthosittmengden i lungen bestemt.

#### Rotter.

Til undersøkelsen med Glømme-Svensson metoden ble det brukt 4 grupper hun-rotter fra dyrestallen ved Yrkes-



hygienisk institutt. Alle dyrene i en gruppe gikk sammen i et felles bur med fri adgang til vann og mat (Rasmussens kost). Halvparten fikk 1 ml fysiologisk saltvann med 40 mg anorthosittstøv 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 avlivet. Dette skjedde 1, 2, 4 og 8 måneder etter støvinnsprøytingen.

Til undersøkelse med støvkammermetoden ble det brukt 4 grupper hunrotter fra dyrestallen ved Yrkeshygienisk institutt, hver med 10 2-måneders gamle dyr. Dyrene fra alle gruppene gikk samtidig i støvkammeret. Deretter ble gruppene delt og hver gruppe gikk i sitt bur til de ble undersøkt etter 1, 2, 4, 8 måneder, regnet fra 1.dag med støveksposering.

(Et dyr i 8 måneder-gruppen døde kort etter eksponeringen og utgikk av undersøkelsen).

#### Statistikk:

Wilcoxon-Mann-Whitney testen er brukt. Signifikansnivå 5 % .

### III RESULTAT OG DISKUSJON.

#### Mengde anorthosittstøv i lungene.

Mengden anorthosittstøv i rottelunger ble undersøkt umiddelbart etterat rottene ble tatt ut av støvkammeret (4 dyr) - en måned etter start av støveksposeringen (dvs. 14 dager etter avslutningen av eksponeringen) (5 dyr) - og 4 måneder etter start av støveksposeringen (5 dyr) fig. 2. I løpet av de 14 dagene støvkammereksponeringen varte, pustet rottene inn ca. 60 mg støv < 5  $\mu$ m (60-65 mg). Ca. 9 mg (8,1-9,9 mg) ble funnet i lungene da eksponeringen ble avsluttet. Av det støvet som kan komme helt ut i lungeblærene (respirabelt støv

< 5  $\mu$ m) var ca. 15 % "blitt igjen" (retinert) i lungene. 14 dager etter avslutningen av eksponeringen var anorthosittmengden i lungene sunket til ca. 5,8 mg (2,0-6,0 mg) ca. 10 % av den mengden dyrene pustet inn. Denne mengden ser ut til å bli værende lenge i lungene.

Anderledes hos de dyrene som har fått anorthosittstøvet sprøytet ned i lungene. Disse dyrene har svært forskjellige mengder anorthosittstøv i lungene, både 1 måned etter innsprøytingen (4 dyr) <sup>og</sup> etter 4 måneder (5 dyr) fig. 2. Den gjennomsnittlige støvmengden i lungene synes å minke noe fra 1 - 4 måneder etter innsprøytingen, men vurderingen er usikker pga. den store forskjellen fra rotte til rotte.

Glømmes arbeid (1967) viser at innsprøyting i lungene gir nokså varierende kvartsstøvmengder i lungene, selv om forskjellen fra dyr til dyr er mindre enn den vi finner for anorthosittstøv. Dette kan komme av at Glømme har hatt en bedre teknikk med innsprøytingen - eller at rottene lettere klarer å fjerne anorthosittstøv enn kvartsstøv fra lungene. Imidlertid viser de dyrene som har pustet inn anorthositt at ca. 10 % av støvet blir liggende i lungene over lang tid. Det er derfor vanskelig å forklare de lave anorthosittmengdene i lungene hos enkelte av rottene som har fått sprøytet anorthositt inn.

#### Vurdering av lungene.

##### Utseende og fasthet, det makroskopiske lungebildet.

Graderingen av lungene er vist i tabell 1.

Det synes som lungene med anorthosittstøv har forandret seg noe mer enn kontroll-lungene etter 4 og 8 måneder.

##### Vekten av lungene.

Vekten av lungene er vist i fig. 3. Direkte sammenlikning

av vekten av lungene kan imidlertid bli villedende om dyrene er av forskjellig størrelse. Sammenlikning av lungenes vekt som % av dyrenes kroppsvekt (relativ lungevekt) fjerner denne usikkerheten. De relative lungevektene er vist i fig. 4. Bortsett fra lungene hos dyrene som har fått anorthositt sprøytet inn (1 måned etter innsprøytingen) er det ingen statistisk sikker vektforskjell mellom lungene som inneholder anorthositt og kontroll-lungene.

Glømme (1967) undersøkte reaksjonen på titaniumdioksyd, glassull, jernsilikat, olivin og kvarts i rottelunger. Han fant at lungene reagerte minst på titaniumdioksyd, deretter kom glassull, jernsilikat og olivin, mens det ble full utvikling av lungefibrose når kvarts ble sprøytet inn. Glømme konkluderer at støv av titanium-oksyd 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. Sammenlikning mellom kvarts, olivin og anorthositt er vist i tabell 2. Sammenliknet med kontrollgruppen reagerer lungene mindre på anorthositt enn på olivi-

#### Undersøkelse av lungen i mikroskop (det mikroskopiske lungebildet).

Nesten alle lungene - også kontroll-lungene - viste bilde som lungebetennelse (kronisk pneumoni og broncho-pneumoni). Det var derfor umulig å gradere lungene for det lettere fibroseforandringene. Det ble ikke sett større knuteaktige forandringer tilsvarende dem kvarts gir.

Da alle våre rotter hadde lungebetennelse, må resultatene av anorthosittpåvirkningen vurderes ut fra dette. Hvor vidt anorthositt i friske lunger vil gi ennu mindre reaksjoner enn dem som ble sett i denne undersøkelsen, vet vi ikke.

#### IV KONKLUSJON.

Bedømt mot kontroll-lungene gir anorthositt en mindre vektøkning enn olivin. Det ble heller ikke sett fibroseknutedannelser som dem kvarts gir. Vi kan derfor være fristet til å anta at anorthositt har mindre fibrosefremkallende egenskap enn olivin. Imidlertid kan den forskjellen vi har sett mellom anorthositt og olivin også skyldes mengde støv. Samme mengde olivin som anorthositt ble sprøytet ned i lungene, men dersom Glømme hadde en bedre teknikk med innsprøytingen - eller om lungene lettere renser seg for anorthositt enn olivin - kan anorthositt-lungene ha inneholdt mindre støvmengde enn de olivinlungene vi sammenlikner med. Graden av reaksjon i lungene er som kjent ikke bare avhengig av egenskapen til det støvet som er i lungen, men også av støvmengden.

Bedømt ut fra de rottene som har pustet inn anorthositt synes ca. 10 % av det støvet som kan komme helt ut i lungeblærene (respirabelt støv  $< 5 \mu\text{m}$ ) å bli liggende i lungen i lang tid. Det er derfor mulig at mengden anorthosittstøv kan bygge seg opp i lungen om lungen stadig puster innluft som inneholder anorthosittstøv.

Vår undersøkelse ble utført med dyr som viste seg å ha lungebetennelse. Vi vet at annet støv (nefelinsyenitt) har gitt kraftig vektøkning i lunger med betennelse - en vektøkning som ikke kommer om lungene er friske. Da vekten av lungene som inneholder anorthositt ikke er vesentlig forskjellig fra kontroll-lungene, er det sannsynlig at reaksjonen på anorthositt i friske lunger ville bli den samme eller mildere, men dette vet vi ikke sikkert.

Vi vet fra tidligere at menneskelunger og rottelunger reagerer nokså likt på forskjellige typer støv. Til tross for at rottene i denne undersøkelsen hadde lungebetennelse - er det mest sansynlig at anorthosittstøv gir liten fare for fibroseutvikling hos

mennesket dersom arbeidsplassen har vanlig yrkeshygienisk standard med mindre enn 10 mg støv pr m<sup>3</sup> luft.

Tabell 1: Vurderingen av lungenes utseende og fasthet, det makroskopiske lungebildet, hos rotter som har fått fysiologisk saltvann (kontroll) eller 40 mg anorthosittstøv sprøytet ned i lungene, og hos rotter som har pustet inn ca. 60 mg anorthosittstøv < 5  $\mu\text{m}$  i løpet av 14 dager.

Undersøkt etter	Gruppe	Antall dyr med grad:		
		A	B	C
1 måned	Anorthositt sprøytet inn	8	5	0
	Anorthositt pustet inn	5	5	0
	Kontroll	11	4	0
2 måneder	Anorthositt sprøytet inn	4	6	0
	Anorthositt pustet inn	6	4	0
	Kontroll	10	4	0
4 måneder	Anorthositt sprøytet inn	6	8	0
	Anorthositt pustet inn	4	6	0
	Kontroll	9	3	1
8 måneder	Anorthositt sprøytet inn	5	8	1
	Anorthositt pustet inn	1	6	2
	Kontroll	7	7	0

Tabell 2: Sammenligning av lungvektene (middelverdier) hos rotter som har fått olivin og kvarts (Glømmes resultater) og hos rotter som har fått anorthositt.

Måned etter inn-sprøyting	Kontroll for olivin og kvarts	Olivin	Kvarts	Anorthositt sprøytet inn	Anorthositt pustet inn	Kontroll for anorthositt
1 mnd.	1.32	2.27	2.01	1.95	1.86	1.61
2 mnd.	1.37	2.20	2.38	1.86	1.94	1.72
4 mnd.	1.39	2.01	3.66	2.48	2.51	2.04
8 mnd.	1.52	1.91	5.37	3.41	2.97	2.96

Lungevektene for de forskjellige støvtypene kan ikke sammenlignes direkte.  
Det som kan sammenlignes er hvordan lungvektene utvikler seg fra måned til måned.

Mengde  
anorthosittstøv  
mg/m<sup>3</sup>

Fig 1 Mengde anorthosittstøv i støvkommer pr. døgn

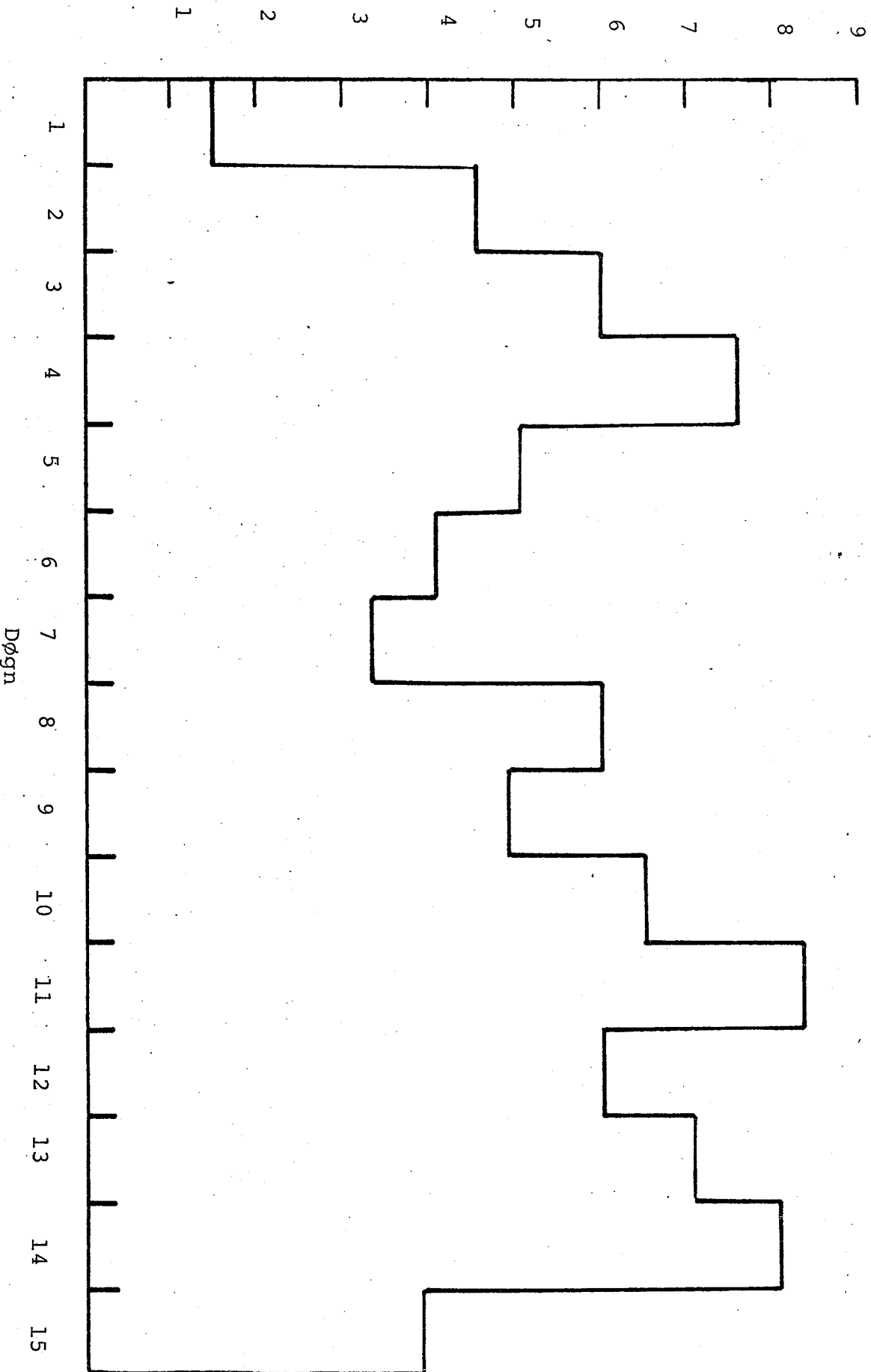
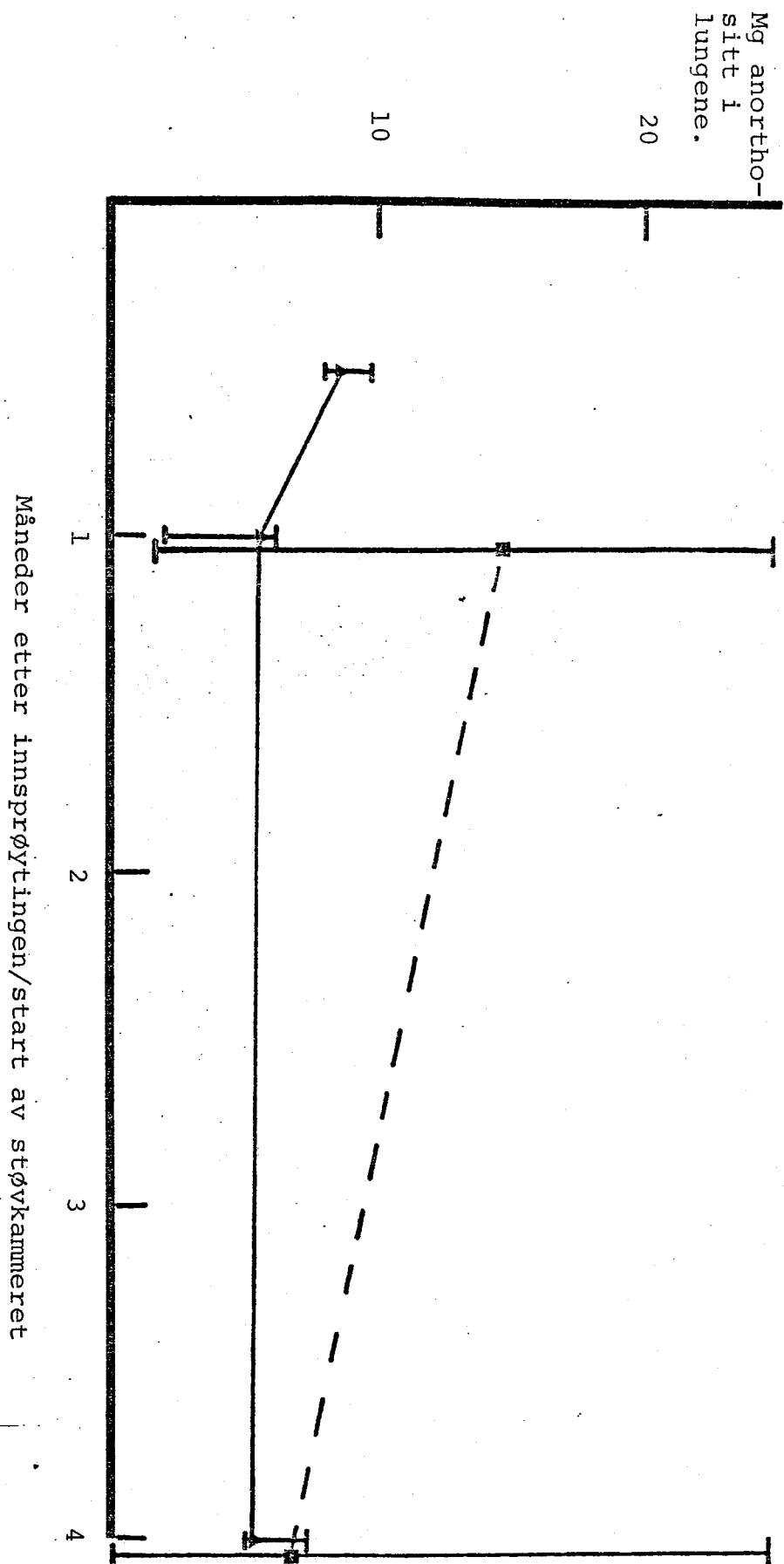




Fig. 2

Mengde anorthositstøv i lungene hos rotter som har fått sprøytet 40 mg anorthositstøv ned i lungene (■) og hos rotter som har pustet inn ca. 60 mg anorthositstøv (<math>< 5 \mu\text{m}</math>) i løpet av 15 dager (▲). Medianverdi (n = 4 og 5)



Lungevekt i gram

Fig. 3 Vekten av lungene hos rotter som har fått sprøytet 40 mg anorthosittstøv (■) eller fysiologisk saltvann (kontroller) (●) ned i lungene og hos rotter som har pustet inn ca 60 mg anorthosittstøv (< 5  $\mu\text{m}$ ) (▲) i løpet av 15 dager. Median og konfidensintervall for median,  $\approx$  95 % konfidens koeffisient.

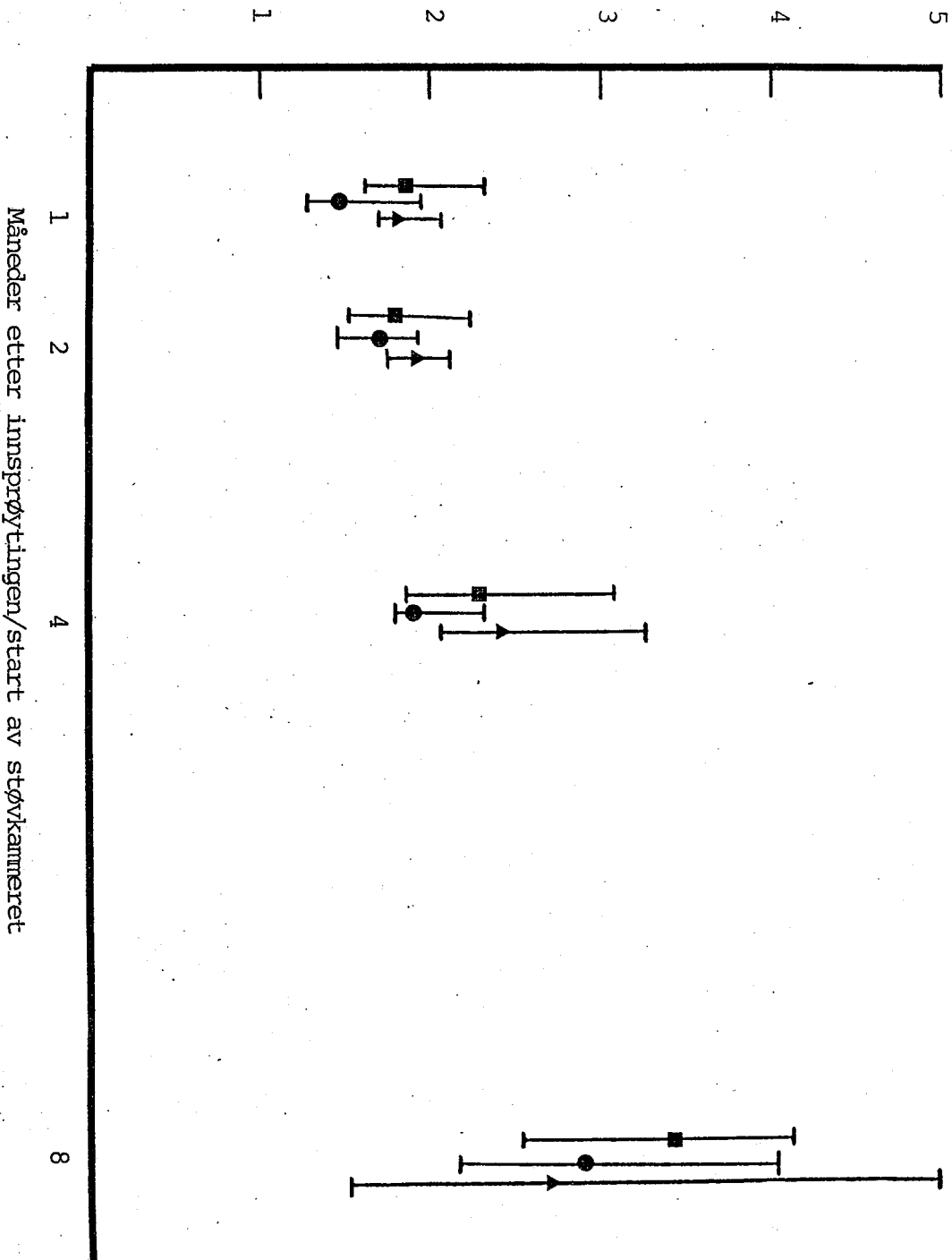
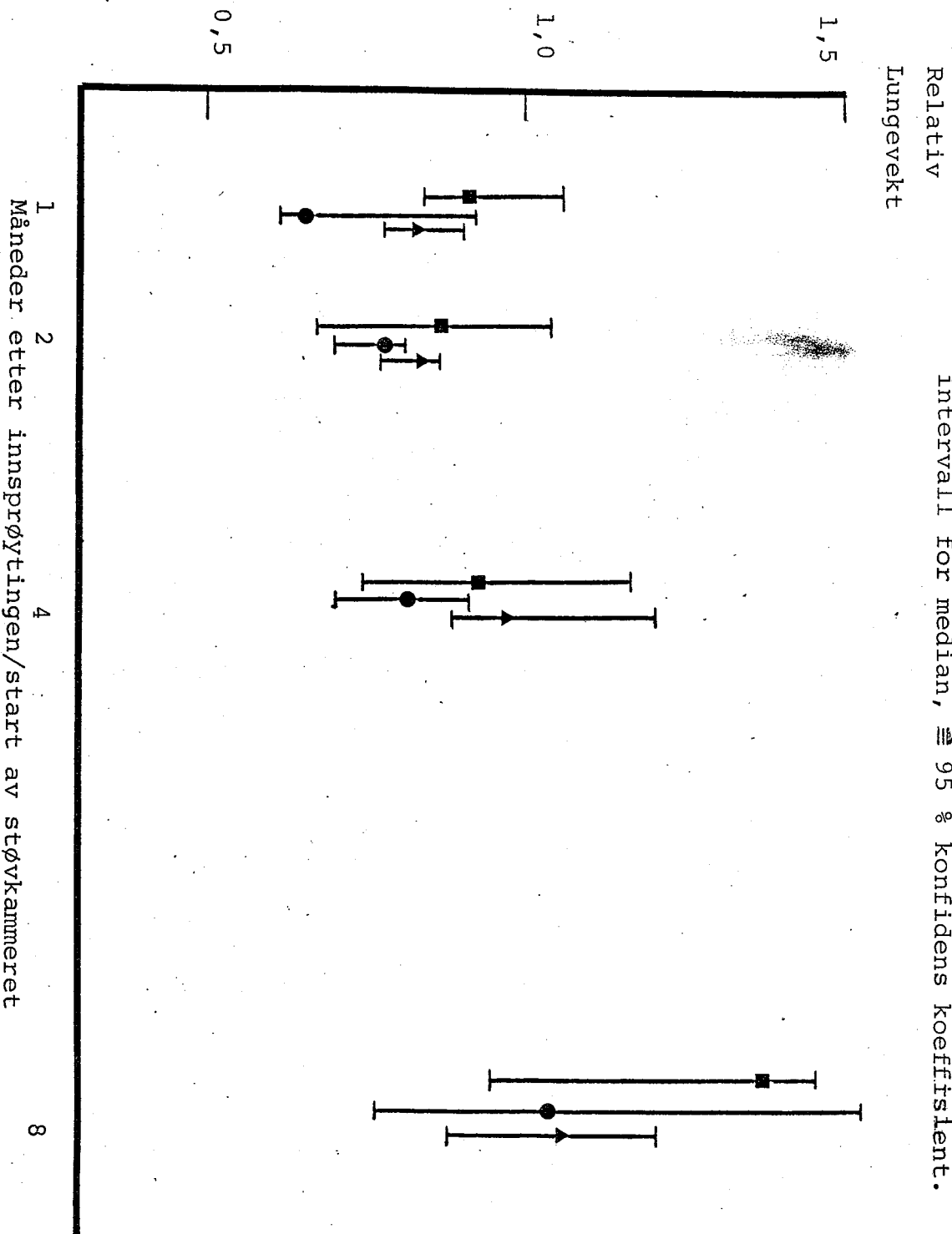


Fig. 4 Relativ vekt av lungene hos rotter (lungens vekt/rottens kroppsvekt) som har fått sprøytet 40 mg anorthositstøv (■) eller fysiologisk saltvann (kontroller) (●) ned i lungene og hos rotter som har pustet inn ca. 60 mg anorthositstøv ( $\leq 5 \mu\text{m}$ ) (▲) i løpet av 15 dager. Median og konfidensintervall for median,  $\cong$  95 % konfidens koeffisient.



## VI. REFERANSER

- Adolph, E.F.: Quantitative relations in the physiological constitutions of Mammals. *Science*, (1971) 109, 579-585.
- Glømme, J.: Evaluation of the relative fibrogenetic tendency of mineral particles in animal experiments. Universitetsforlaget, Oslo-Bergen-Tromsø (1967).
- Gylseth, B.: Virkningen av støv fra bergarten anorthositt i rottelunger. Delrapport I: Karakterisering av anorthositt. Yrkeshygienisk institutt, Oslo, Norway, (1977) HD 748/231177.
- Langård, S., Gundersen, N., Tsalev, D.L. and Gylseth, B.: Whole blood chromium level and chromium excretion in the rat after zinc chromate inhalation. *Acta pharmacol. et toxicol.* (1978) 42, 142-149.
- Swensson, Å.: Experimental evaluation of the fibrogenetic power of mineral dusts. *Studia Laboris & Salutis.* (1971) 10, 86-97.

---