

A1 10429

RAPPORT FRA BESØK VED
MEDICAL RESEARCH COUNCIL
PNEUMOCONIOSIS UNIT, PENARTH, WALES
I PERIODEN 8. MARS - 4. APRIL 1981
AV

BJØRN GYLSETH
HD 858~~9~~81

ARBEIDSFORSKNINGSINSTITUTTENE
BIBLIOTEKET
Gydas vei 8
Postboks 8140 Oslo Dep. Oslo 1

INNHold

	SIDE
FORORD	
INNLEDNING	1
MRC PNEUMOCONIOSIS UNIT	3
CELLELINJER	6
PERITONEALE MUSEMAKROFAGER	7
V79 CHINESE HAMSTER LUNG CELLS	14
A549 HUMAN EPITHELIALE TYPE II-LIKE TUMORCELLER	18
ANALYSE AV FIBRE I LUNGEVEV	20
PREPARERING AV MEMBRANFILTRE FOR UNDERSØKELSE I SEM OG TEM	22
CARBON EVAPORATOR	23
PREPARERING AV CELLER FOR TEM/SEM	24
FRYSE-TØRRING AV BIOLOGISK MATERIALE	25
DYRESTALL	26

FORORD

Denne rapporten omfatter notater fra en tjenestereise/studietur til Medical Research Council (MRC), Pneumoconiosis Unit i Penarth, Wales. En del av notatene (oppskrifter, bruksanvisninger) er med hensikt gitt kokebok's form og er neppe av generell interesse. Rapporten må derfor leses med dette for øye.

Reisen/rapporten er muliggjort gjennom finansieringsbistand fra Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Forskningsråd, innvilgelse av permisjon med lønn fra Kommunal- og Arbeidsdepartementet/Yrkeshygienisk institutt, samt MRCs positive holdning til å ta imot besøkende, ta vel vare på dem samt være åpen for å dele sin forskning med andre. Undertegnede vil på grunnlag av dette takke NTNF for finansiell støtte. Kjeld Rimberg, sekretær i Arbeidsmiljøkomitéen takkes spesielt for positiv holdning til prosjektet. Instituttetsjef Tor Norseth takkes for aktivt arbeid for å klarere/finansiere reisen. Alle impliserte ved MRC takkes. I denne sammenheng nevnes spesielt Direktør P. Elmes, Dr. R. Davies, Dr. M. Chamberlain, Dr. R. Brown, Mr. D. Griffiths, Mr. J. Skidmore, Dr. V. Timbrell, Dr. N. Johnson, Dr. J.C. Wagner, Mr. D. Munday, Mr. R. Hill, Dr. M. Campell, Mrs. M. Wagner. Dr. Pooley ved Department of Mineral Exploitation, University College of Cardiff takkes for å ha utført mineralanalyser.

INNLEDNING

Medical Research Council, Pneumoconiosis Unit i Penarth har lang erfaring når det gjelder forskning vedrørende støvrelaterte lungesykdommer. De senere års behov for kort-tids screening tester av støv har initiert utvikling av cellekulturer spesielt egnet for dette formålet, og instituttet har for tiden 3 forskjellige kulturer for dette formål. For øvrig har instituttet lang erfaring innen lungepatologi, lungerøntgen, aerosolgenerering/inhalasjonstoksikologi, elektronmikroskopi og biostatistikk. Enheten samarbeider med University College i Cardiff, Department of Mineral exploitation innen området karakterisering og analyse av mineraler. Interessen har i de senere år konsentrert seg om fiberformige mineraler som asbest, glassfibre, steinull, sepiolitt, wollastonitt, tobermoritt, taconitt, attapulgitt, halloysitt, zeolitt, diatomejord, kaolin, talk etc.

Ved Yrkeshygienisk institutt er det de senere år utbygd kompetanse innen områdene støvgenerering/karakterisering og analyse av fibre og metallaerosoler. Behovet for ytterligere kompetanse, nye impulser samt innføring av korttids screening studier initierte denne studiereisen til MRC. For undertegnede var formålene følgende:

I. Lære de fysikalsk/kjemiske aspekter ved dyrking av cellekulturene ved MRC. Bruke disse kulturene for testing av medbrakte støvprøver.

II. Studere de elektronmikroskopiske teknikker som benyttes for analyse av mineralsk støv og biologiske tynnsnitt.

III. Fullføre metodeutviklingen for fibre i humant lungevev, dels ved egen analyse av medbrakte prøver, dels ved intralaboratoriekalibrering.

IV. Skaffe seg generell informasjon om langtidseksponering av rotter for støv (støvgenerering/karakterisering, behandling/oppstalling av rotter, etc.).

MRC - PNEUMOCONIOSIS UNIT

Instituttet har ca. 40 ansatte totalt. Avdelinger som patologi, fysiologi, radiologi, støvfysikk, dyrestall, cellelab eksisterer bare i navnet. Instituttet er strukturert i grupper som i noen tilfeller arbeider svært nært sammen, i andre tilfeller mere separat. Instituttet har selvsagt samarbeid med en rekke eksterne institusjoner. Det har et stort og anerkjent navn i verdensmålestokk. Om ikke antall publikasjoner kan virke overveldende, er originalitet og kvalitet desto mere utpreget.

I det følgende vil det bli gitt en kort oversikt over de prosjekter som for øyeblikket løper ved instituttet:

I. Fiberformig støv.

- a) Asbest (forekomst av asbestrelaterte sykdommer).
 - a₁) Sammenligning av krysotil og krokidolitt vedrørende toksisitet. MRC mener at krysotil kan brukes forsvarlig innenfor visse områder. Studier (epidemiologi) foregår i krysotilgruvene i Havelock i Swaziland.
 - a₂) Studium av dose-respons forholdet for asbestose i en asbesttekstilfabrikk.
 - a₃) Follow-up studie av asbestoser godkjent av MRC
 - a₄) Mortalitet blant arbeidere i en asbestproduktfabrikk i London som omfatter lungekreft og mesoteliom.
 - a₅) Friksjonsmaterialer. Mortalitätsstudie av arbeidere i en fabrikk som produserer bremseklosser som inneholder krysotil.
 - a₆) Plymouth dockyard survey. Immunologiske tester av høyeksponerte arbeidere.
- b) Dyreforsøk
 - b₁) Patologi-utvikling av et standard system for diagnose og gradering av asbestose basert på forsøk på rotter.

b₂) Eksperimentelle studier med forskjellige modeller - intraperitoneal inokulasjon, intrapleural injeksjon.

c) In vitro forsøk

c₁) 3 cellelinjer benyttes. Disse beskrives i detalj andre steder i denne rapporten

c₂) Testing av andre mineraler på markedet. Ikke kommersielle asbesttyper, MMMF, zeolitter, fiberformige leirer, tremolitt.

EKS. Injeksjon av fine glassfibre gir mesoteliom hos rotter, grovere fibre gjør det ikke. (fibre må være lengre enn 10 μ m og tynnere enn 1.6 μ m). Andre typer fibre gir andre dimensjoner. Inhalasjonsforsøk med glassull, rockwool, viser at de produserer lite fibrose etter 18 mnd overlevelse. Tumorfrekvensen sammenlignet med fine glassfibre er lav.

c₃) Zeolitter. Det er påvist endemisk forekomst av mesoteliom i noen landsbyer i Tyrkia. Bergartene inneholder zeolitt av vulkansk opprinnelse. Erionitt er en fiberholdig zeolitt som forekommer i små mengder i steiner de bygger hus etc. av. Fibre i den generelle luften kan omtrent ikke påvises. Steinprøver fra Tyrkia, relativt rik på fibre, er malt opp og gitt ved inhalasjon til rotter. Tumores opptrer hos disse rottene etter allerede 7 mnd. Intrapleural inokulasjon av fiberrik amerikansk erionitt gir signifikant insidens av mesoteliom. In vitro tester viser høy grad av cytotoxicitet - av de forskjellige typene erionitt, mordenitt etc.

c₄) Fiberformige leirer

Attapulgitt, sepiolitt, merschaum (vermikulitt) og palygorskitt undersøkes både in vitro og in vivo forsøk.

d) Blandet isometrisk støv

d₁) Coal miner pneumoconiosis fysiologi (lungefunksjon), patologi, kaplans syndrom.

- e) Slate workers pneumoconiosis. Epidemiologi, patologi, fysiologi. Slate = skifer som inneholder kvarts, aluminiumsilikat + endel andre mineraler.
- f) Kaolin workers pneumoconiosis (china clay). Patologi, dyreforsøk. In vitro tester har allerede vist at kaolin er meget cytotoxisk mot makrofager.
- g) Eksperimentelt
- g₁) Indusering av lymphom hos rotter ved intrapleural injeksjon av kvarts.

II. Specific hazards

- a) Organisk støv
 - b) Byssinose
 - c) Farmers lung
 - d) Humidifier fever
 - e) Organiske støv i matproduksjon (grain handlers)
 - f) Animal handlers allergy
 - g) Plastic polymer dust
 - h) Animal studies
- PVC-støv-intrapleural inoculasjon. Human patologi

III. Radiologi

Human fysiologi (lungefunksjon)

IV. Aerosolfysikk

- a) Størrelsesfordeling (TEM)
- b) Dyrefysiologi (lungeperfusjon)
- c) Lysbrytende metoder (Laser etc.).

V. Elektronmikroskopi

- a) Frigjøring av lamellære legemer fra Type II celler
- b) Endocrine celler i lungene
- c) Effekt av fibre på peritoneale makrofager hos mus og rotter
- d) Ekstraksjonsteknikker av fibre fra vev.

CELLELINJER

I. Peritoneale makrofager fra mus. Frigivelse av enzymene laktatdehydrogenase (LDH) og β -glucuronidase har vist seg å være et brukbart mål for en støvtypes fibrogene egenskaper.

II. Chinese hamster lunge celler (V 79-4). % overlevelse av cellene ved forskjellige dosenivåer gir et mål for cytotoxicitet.

III. Humane alveolære epiteliale type II lunge tumor celler (A549). Dannelse av kjempeceller ved tilsetning av støv gir et mål for evnen til å produsere svulster hos dyr idet det er god korrelasjon mellom in vivo og in vitro forsøk.


PERITONEALE MUSEMAKROFAGER

Når peritoneale (eller andre) makrofager fra mus (PMM) utsettes for støv i kultures frigjøres under visse omstendigheter enzymer. Mengden av enzymene som frigjøres er et mål for toksisiteten til støvet som benyttes. Når PMM utsettes for støv er det spesielt det cytoplasmatiske enzym LDH (lactic acid dehydrogenase) og det lysosomale β -GLU (β -glucuronidase) som kan påvises. Evnen til å skille ut disse enzymene synes å ha sammenheng med støvets fibrogene egenskaper og ved MRC benyttes denne metoden for å evaluere støvtypers potensielle fibrogene egenskaper.

22-27 gram female mus type Swiss TO benyttes for utvasking av makrofager (M). Musene anesteseres til død i eter/eksikator. Alt utstyr til bruk steriliseres enten på forhånd i autoklav eller med 70% ethanol fra sprayflaske før operasjon. Hender og mus desinfiseres. Musa festes med sprøytespisser til en korkplate og snittes i buken uten at det går hull på den indre bukhinnen. Musa flås slik at mesteparten av skinnet (unntatt rygg) er av. 3 ml av medium M199 injiseres forsiktig inn i bukhulen. M199 inneholder heparin, antibiotika + en rekke andre stoffer og fås kjøpt kommersielt som pulver. Etter injeksjon av M199 blandes det hele rundt inne i bukhulen, bukhinnen skjæres over og M-ekstraktet tømmes via trakt over i en flaske. Flasken og trakten har på forhånd fått et silikonbelegg for at M ikke skal hefte seg til glassveggene. Flasken og trakten som er autoklavert, holdes nedkjølt i is/vann blanding i et kar. Dette hindrer at M fester seg til glassveggene. Etter at cellene er høstet, bestemmes konsentrasjonen av M lysmikroskopisk ved telling av bestemte volum i tellekammere ved relativt lav forstørrelse. Normalt oppnås $2-3 \times 10^6$ celler/ml. Denne stamløsningen fortynnes med M199 i 10% new born calf serum til $0,6 \times 10^6$ celler/ml som er den normale utgangskonsentrasjonen. Ved telling av cellene tilsettes en spesiell farge som ødelegger erythrocyttene.

2 ml av suspensjon av M + M199 + 10% newborn calf serum pipetteres med automat pipette i en rekke plastpetri-skåler egnet for dette (12 brønner i hvert sett) og settes i inkubator ved 37°C - 5% CO₂ - 95% luft i 1 - 2 timer for at M skal feste seg til plastveggene. Kalveserumet er behandlet på forhånd ved inaktivering i 30 minutter ved 56°C. Deretter syrebehandling i 2N HCl ved pH = 3.5 i isotont saltvann i 2 timer ved romtemperatur. Serumet justeres til pH = 7.4 med 2N NaOH i isotont saltvann og filtersteriliseres (denne prosedyren ødelegger α-macroglobuliner som inhiberer proteinaser)

Ref: Gordon, Werb and Cohn. Methods for detection of macrophage activity/secretory enzymes. In vitro methods in cell-mediated & tumour immunity: Bloom, B.R., David J.R., 1976. Academic Press.

Etter inkubasjonen, slik at cellene har fått tid til å feste seg, kan polymorfe celler vaskes av. Dette gjøres ved å tømme av overskudd av medium og deretter skylle 2 x med 2 ml fosfatbufferet saline (Dulbecco A) ved pH = 7.4. PBS kan kjøpes som tabletter OXOID code BR14a. Deretter tilsettes 2 ml M199 med 10% serum. Hver brønn skal nå inneholde ca. 1.2×10^6 celler hvorav omtrent 2/3 er M. dvs. 0.8×10^6 celler/brønn. Tilstrekkelig antall brønner settes nå til inkubering i 24h ved 37°C og 5% CO₂. I løpet av denne perioden dør polymorfe celler og en ender opp med en 93% ren M-kultur. Når kulturene har stått over natten kan en se at cellene har festet seg og antatt forskjellige former  Runde celler forekommer også, dette er M som ikke har festet seg. Vanligvis testes hver støvtype ved 3-4 konsentrasjoner avhengig av toxicitet. (10-60 µg/ml) Magnetitt, rutil brukes som inert teststøv. Krokidolitt og DQ12 som positiv test (referanse). 4 paralleller kjøres for hver konsentrasjon, dvs. 16 brønner for hver støvtype.

Støvtypene som ble testet ved forsøkene var:

- 1) Magnetitt
 - 2) DQ12
 - 3) Krokidolitt
 - 4) Taconitt
 - 5) Amorf SiO_2
 - 6) Pumice stone
- } Tatt med fra Norge
- 7) DQ12 behandlet med forskjellige konsentrasjoner av hydrolysert FeCl_3 (partikkelstørrelse 20 - 30 nm.).
 - 8) DQ12 behandlet med en positivt ladet polymer.

Støvkonsentrasjonen som tilsettes er avhengig av antall celler i kulturene. I dette tilfellet er konsentrasjonen tilpasset 1.2×10^6 M. Inkubasjonstiden er viktig. For lang inkubering medfører at enzymene ødelegges.

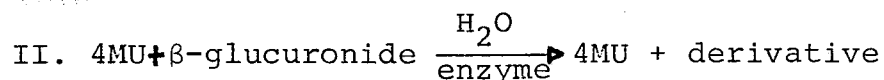
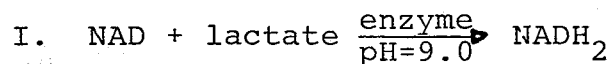
Etter 24 timers inkubering tilsettes 2 ml støv i PBS. Støvet og glass er på forhånd autoklavert. Denne suspensjonen behandles i ultralydbad noen sekunder og pipetteres ut i medium + serum slik at en får forskjellige konsentrasjoner. Støvsuspensjonene tempereres til 37°C i et vannbad før de tilsettes M-kulturene. 2 ml av de forskjellige konsentrasjonene tilsettes cellekulturbrønnene etter at gammel kultur er tømt av og det hele settes i inkubator i 18h.

Makrofager deler seg svært langsomt så det er ikke problemer med øking av antall celler i M-kulturene i løpet av den tiden eksperimentene pågår.

Behandling av M etter inkubering med støv (18h)

Etter inkubering med støv ble kulturene undersøkt i lysmikroskop. En kunne på denne måten få en grov oversikt over støvets aktivitet overfor makrofager. Ved tilsetning av magnetitt kunne en se støvpartiklene i makrofagene - få makrofager var døde. Når en derimot gikk over til de mere toksiske støvtypene som kvarts (både amorf og krystallinsk) kunne en ved de høye konsentrasjonene påvise nesten komplett celledød.

Innholdet av LDH og β -GLU analyseres både i medium (avgitt fra cellene) og i cellene. Følgende kjemiske reaksjoner er involvert for å få fluorescerende derivater av enzymene.



Detaljer i prosedyrene er beskrevet i referansene:

- 1) Morgenstern et al. Automated Determination of NAD-Coupled Enzymes. Determination of Lactic Dehydrogenase. Anal. Biochem 13 (1965) 149-161.
- 2) Morgan et al. Continuous flow fluorimetric assay of lysosomal enzymes. Med. Lab. Sci. 35 (1978) 335-341.

Reaksjonene kan i enkelhet forklares slik: Substrater av det fluorescerende stoffet dialyseres mot mediet som inneholder enzymene; med resultat at det fluorescerende stoffet dannes og kan detekteres med en fluorescensdetektor. Ved MRC ble det p.g.a. antallet prøver benyttet en Technicon Autoanalyser koblet til et Perkin-Elmer 3000 fluorescensspektrofotometer. Det ble benyttet timer med alarm, Technicon vannbad for å holde

temperaturen på 37.5°C og en technicon proportioning pump (Gradko) til proporsjonering av løsning, luftbobler, vasking etc.

Alt dialyseutstyr var fra Altec Lab. Supplies & Systems LTD Mill Lane Industrial Estate, Alton, Hampshire GU34 2PL, UK. Tel: Alton 82604 - 83052

Etter 18 timers inkubering ble mediet suget av med plastpipetter og over i små sentrifugeglass. Mediet sentrifugeres ved 2000rpm i 10 min for at støvpartikler skal sette seg før analysen. Cellebrønnene tilsettes saline + 0.1% bovint serum albumine (Bovine-albumine Fraction V, No A-4503 Sigma Chemical Company). En silikonisert gummi-kork benyttes til å ødelegge cellene ved å gni korken mot bunnen en 4-5 ganger. Etter at cellene er revet opp og enzymene i løsning, pipetteres dette over i sentrifugeglass og sentrifugeres som ovenfor og begge kjøres deretter på Autoanalyser. LDH er ikke stabilt og må derfor kjøres først. β -GLU er stabilt og kan stå til dagen etterpå før analysen foretas. Summen av LDH og β -GLU i lysat + celler er uttrykk for total enzymmengde. Mengde enzymer avgitt til lysatet i forhold til total mengde er et mål for støvets cytotoxicitet.

Utstyr

Kun engangsutstyr benyttes produsert for in vitro forsøk. Utstyr som er relativt rimelig og nøyaktig nok. 6 og 9 cm petriskåler i plast kan brukes til en rekke formål. Plastic petri dishes Everett Sterile Products, Miteham, Surrey. Falcon sterile pipettes 1,10 ml serological.

Sterilin, Teddington Middlesex TW 11 8QZ, England har utstyr for in vitro tests.

Linbro Scientific, Inc. Subsidiary of Flow Lab. inc.
Hamden, Conn., USA. (multiwell plate with cover
2 x 2.4 x 1.7 cm Cat. no. 76-053-05.).

Pastette transfer engangspipetter

NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)

NADH₂ (reduced nicotineamide adenine dinucleotide).

Varmeinaktivering av serum

1. Makrofager skal ha heatinactivated and acid-washed newborn foetal calf serum (10%).
2. V79-4 skal normalt ha heatinactivated foetal calf eller bovine serum (15%), men tåler også non-inactivated serum.
3. A549 skal ha 10% heatinactivated foetal calf (bovine) serum.

I tilfelle 2 og 3 settes serumflasken i vannbad ved 60°C i 45 minutter. Dette vil gi 56° i serum i ca. 30 minutter. I tilfelle 1 settes serumflasken ved 60° i vannbad og temperaturen kontrolleres med termometer til 56° i 30 minutter. Deretter kjøles serumet ned til romtemperatur hvor pH justeres til 3.5 med 2N HCl. Serumet henses i 2 timer ved pH = 3.5. Deretter justeres pH tilbake til 7.4 med 2N NaOH og serumet steriliseres gjennom 3, 1.5, 0.45 og 0.2 µm Nucleporefiltre. Serumet settes deretter i inkubator over natten. Dersom grumset serum fås, er det ikke sterilt og må kastes.

Foetal Calf (Bovine) Serum Gibco Europe LTD
P.O. Box 35, Paisley, Scotland.

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Vanligvis kjøpes ferdige tabletter (Dulbecco's A, Oxoid) av dette, hvor 1 tablett løses i 100ml destillert vann

og steriliseres. Hvis ikke kan løsningen lages av følgende salter:

0.8 g/l NaCl
0.2 g/l KCl
1.15 g/l Na₂HPO₄
0.2 g/l KH₂PO₄
pH = 7.0 - 7.4

Farging av makrofager

0.15 toluidine blue
1 ml acetic acid
0.5 ml Zaponin
100 ml vann

M199 (modified)

with Earle's salts
with glutamine
without sodiumbicarbonate
Cat. no. 10-201-24 (IF-04ID)
Flow Laboratories

Silikonering

Hopkin & Williams Repelcote, water repellent 2% demethyl-chlorosilane in 1,1,1-trichlorethane.

V79-4 CHINESE HAMSTER LUNG CELLS

Litt: Chu & Malling (1968). Mammalian Cell Genetics II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells in vitro. Proc. Natn. Acad. Sci (USA) 61, 1306.

Dagen før eksperimentene (med støv) starter dyrkes celler i subkulturer. I en cellekultur på 10^7 celler fordelt på 75cm^2 i cellekulturflasker, hvor cellene er festet til plastbunnen, pipetteres gammelt medium av og cellene vaskes forsiktig 3x med PBS og deretter tilsettes 10 ml Trypsin-EDTA (0.025% Trypsin + 0.02% EDTA in PBS). Denne suspensjonen settes til inkubering ved 37° i 10 minutter. Etter innkubering nøytraliseres trypsinet med 10 ml medium til totalt 20 ml. Cellene sentrifugeres ned i konede sentrifugeglass av samme type som standard urinflasker. Mediet pipetteres/tømmes av og cellepelletten resuspenderes i friskt medium ved at mediet suges opp og ned av pipetten 5-6x.

Når cellene vaskes med PBS må en ikke spyle direkte mot veggen hvor cellene sitter, idet dette vil slå løs cellene i suspensjon. EDTA tilsettes for å chelatere Mg og Ca som igjen medfører at cellene løsner fra plastveggen. Trypsin virker på tilsvarende måte (reduserer cellenes evne til å feste seg).

Flasker tilsatt 10-15 ml medium tilsettes nå et visst antall celler fra cellesuspensjonen (I vårt tilfelle $1\text{ ml} = 2 \times 10^6$ celler) som inkuberes ved 5% CO_2 over natten. Det tar vanligvis 2 timer før cellene fester seg, deretter er vekstraten ca. dobling i løpet av 12 timer. 15 ml CO_2 ble tilsatt flaskene før cellesuspensjonen ble tilsatt.

Tips - forsiktighetsregler

Når cellene er festet - ikke spyl mot cellelaget. Ikke oppbevar celler i saline mere enn 10 minutter. Rist

suspensjonene forsiktig etter inkubering. De opprinnelige celleflaskene tilsettes medium og inkuberes igjen. Dette i tilfellet en har fått kontaminering, så kan nye celler dyrkes fra disse.

Celler telles i et modifisert Fuchs-Rosenthal tellekammer $0.2 \text{ mm} \times 1 \times 1 = 0.2 \text{ mm}^3$. Dersom cellene klumper seg sammen i aggregater (ved telling) er dette uakseptabelt og nye må dyrkes. Kolonier over 2×10^7 celler er heller ikke akseptabelt.

Cellene kan dyrkes videre i enkle petriskåler av plast (60mm dia) eller multiwell plates (4 x 1.7 x 6 cm). Som medium benyttes Eagles minimum essential medium (MEM) (MEM-Gibco-Bioconsult) + 15% foetal + 2 mmol L-Glutamine (tilsette) Calf Serum + antibiotica (penicillin + streptomycin). Hvis soppdannelse forekommer kan gentamycin anvendes. Alt utstyr som benyttes (engangs (plast) eller flergangs (glass)) er sterilisert. Trypsin holdes nedfrosset ellers destrueres det. En koloni defineres som en "celleflekk" med mer enn 50 celler. V79-4 beveger seg lite under mitose og danner derfor kolonier. A 549 flyter rundt og danner av den grunn ikke kolonier. V79-4 må derfor ikke utsettes for bevegelse etter at de er satt til inkubering ellers dannes nye kolonier.

Plating av V79-4

Cellene trypsineres av, sentrifugeres, resuspenderes og telles. De blandes deretter i den riktige konsentrasjon, tilsettes støv og pipetteres ut på plater. Platene inkuberes i 4 dager etter dette. Den riktige konsentrasjonen var i vårt tilfelle 50 celler/ml. Platene ble tilsatt 5 ml = 250 celler. Ikke ryst platene slik at en får turbulens i det dette vil gi ansamling av celler i midten av platen og koloniene vil flyte mere eller mindre sammen.

Trypsin - EDTA

1 l PBS tilsettes trypsin som kjøpes frosset (blandes til 0.025% trypsin + 0.02% EDTA). Kjøpes ferdig nedfrosset, blandes 1:100 og fryses.

Farging/fixering av V79-4

Mediet tømmes av i f.eks. stericol hospital desinfec-tant. NB. Unngå å bruke hypochloritt her idet blanding (ved feil) av hypochloritt og formalin kan gi biskloro-metyl eter som er carcinogent. Deretter tilsettes 5 ml 10% formaldehyd i salint vann fra dispenser, etter fiksering i minimum 10 minutter tømmes formaldehyd av og 1% methylenblått i vann tilsettes (5 ml) hver plate. Fargingen skal skje minst i 10 minutter, deretter vaskes fargen av ved 3 skyllinger i kaldt rennende vann og 1 i lunkent vann (kar) og platene tørkes før telling. Koloniene kan telles manuelt med øynene (unøyaktig) eller mikroskopisk eller i automatisk kolonicounter (meget rask). Kontrollene settes = 100% survival og survival ved de andre konsentrasjonene regnes i forhold til kontrollene og dose/responskurve kan settes opp. Middelerdi, standardavvik og 95% konfidensgrenser beregnes for hver av konsentrasjonene.

Eksempel - forsøk

Testing av støvtyper 1. CaSi og Taconitt.

Krokidolitt brukes som positiv kontroll. Ingen tilsetning brukes som negativ kontroll. Testes med konsentrasjoner 5, 10, 20, 40, 75 og 100 $\mu\text{g/ml}$. 4 paralleller for hver konsentrasjon, 2 sett à 4 stk. kontroller - tilsvarer det hele 104 plater à 5 ml. Volumet med medium + celler må minst være 520 ml. Utgangspunktet = 600 ml. Startantall av celler = 10^7 celler som tryptiniseres av, tilsettes (10 ml) i 10 ml friskt medium i universal glass, sentrifugeres ved 1000 x i 10 minutter og cellepelletten suspenderes i 10 ml medium. dvs. konsentrasjon = 1×10^6

celler/ml. Denne suspensjonen fortynnes med medium 1:10 dvs. 1×10^5 celler/ml. 0.3 ml dvs. 3×10^4 celler tilsettes 600 ml medium. Dette blandes godt og fordeles med 20 ml hver via automatdispenser som på forhånd er sterilisert, i universalglass. 20 ml celler og medium for hver konsentrasjon. På forhånd er 5 - 20 mg (avhengig av konsentrasjon som skal benyttes) støv innveid i universalglass som tåler autoklaving. Glassene merkes, korkes og autoklaveres i vanlig trykkoker i 15 minutter. Deretter tilsettes medium til støvet slik at støvkonsentrasjonen blir ca. 2 mg/ml, og støvet ultralydbehandles i bad i 1 - 2 min. Dvs. inneveid 10 mg krok. tilsettes 5 ml medium. For konsentrasjonene 5, 10, 20, 40, 75 og 100 $\mu\text{g/ml}$ tilsettes nå henholdsvis 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.75, og 1 ml av støv. Støvblandingen rystes godt for pipettering slik at ikke sedimentering forekommer, støv/medium pipetteres over i celle/medium. Det hele blandes godt og 4 paralleller á 5 ml pipetteres i platesett på 4 x 4. Ett kontrollsett prepareres i begynnelsen av forsøket og et annet ved slutten av forsøket, Det er meget viktig at kontrollsettet og hele serien kjøres så raskt som mulig på samme dag for å unngå systematiske forskjeller (feil) mellom parallellene og med hensyn til kontrollene. Etter inkubering i 4 dager fikseres og farges cellekoloniene.

A 549 - HUMAN EPITELIALE TYPE II - LIKE TUMORCELLER

Ref.: Lieber et al. (1976). A Continuous Tumor-cell Line from a Human Lung Carcinoma with Properties of Type II Alveolar Epithelial Cells. Int J Cancer 17,62. Cellene dyrkes fra subkulturer. Disse cellene tåler mere enn de øvrige og kan behandles noe røffere. Ved tilsetning av støv til cellekulturene dannes "giant cells" under proliferering. Cellene dobler seg i løpet av 18 timer, men tiden økes under påvirkning av toksiske støvtyper. Som medium for A 549 benyttes DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium til satt 10% heatinactivated foetal calf serum (Heatinactivated at 56°C i 30 min.). Cellene holdes under en 10% CO₂ atmosfære for å holde riktig pH. Flaskene som benyttes for kulturer er 75 mm² for dyrking med støv tilstede. Normalt benyttes 100 og 200 µg støv/ml celleduspensjon eller medium. Etter dyrking i subkulturer tømmes gammelt medium av og cellene vaskes med PBS 3 x før trypsin tilsettes og de inkuberes i 10 minutter. Etter at cellene har løstnet, er suspensjonen grågrumset og det hele tømmes over i sentrifugeglass og sentrifugeres i 5 minutter ved 1000x. Før sentrifugeringen tilsettes noen ml medium for å ødelegge trypsinet. Trypsin/medium tømmes av og cellepelletten dispergeres i friskt medium igjen ved å pumpe med pipetten 5 - 6 ganger ned i glasset. Celleduspensjonen kan nå benyttes til en hvilken som helst fortynning. I vårt tilfelle fortynnet til 500 ml suspensjon. Deretter ble hver flaske tilsatt 5 ml celleduspensjon + støv tilsvarende 100 og 200 µg/ml.

A 549 har 56 kromosomer. Den kan subdyrkes 20 - 40 x, helst ikke mer. En rekke støvtyper ble undersøkt, deriblant støv fra Syd-Varanger.

Telling/analyse av A 549

Etter innkubering med støv i 4 dager tømmes mediet av og cellene vaskes 3 ganger med PBS. Deretter tilsettes 4 ml trypsin og cellene settes 10 minutter i inkubator.

Etter innkubering rystes suspensjonen og tømmes over i sentrifugerør og sentrifugeres i 5 minutter ved 2000x. Trypsinet tømmes av og cellepelletten resuspenderes ved å pumpe cellene ut og inn av en sprøyte med 0.1 ml PBS. Celler fra sprøyte tilsettes et modifisert Fuchs Rosenthal tellekammer og minst 200 celler fotografieres for hver prøve. Film fremkalles og kopieres på 30 x 40 cm papir. Cellene måles ut fra dette papiret.

Lagring av V79-4 og A 549

Celler dyrket i subkulturer kan benyttes til dette. 10^6 celler/ml er ideell konsentrasjon for dette formålet. 1 ml cellesuspensjon tilsettes sterile glassampuller (Celler + medium + kalveserum). Deretter tilsettes 0.1 ml DMSO (grad 1, steril) forsiktig ved å tilsette ca. 0.03 ml i 3 batcher og rysting mellom hver batch. Deretter korkes ampullen og en venter 20 minutter for at DMSO skal trenge inn i cellene (ikke så veldig viktig). Flasken merkes med tape som tåler L-N₂. Celletype, dato etc. angis. Dybden måles i L-N₂ tank og cellene skal nå kjøles ned med hastighet 1 - 2°C/min. Dette gjøres ved å la cellesuspensjonen henge 10 - 15 cm under toppen av L-N₂ - dewaren i 2 timer. Deretter senkes cellesuspensjonen helt ned i L-N₂. Levetiden under L-N₂ er uendelig. Fryseboks ved -80°C kan også brukes. Ampullen med celler isoleres i dette tilfellet i en 3 - 5 cm tykk isoporboks og settes direkte i fryseren. 20% glycerol kan brukes som frysemedium istedenfor DMSO. Levetiden i fryseboks er betydelig kortere enn i L-N₂.

ANALYSE AV FIBRE I LUNGEVEV

Vevsbiter tørkes ved 100°C i 2 - 3 timer, kuttet delvis opp og veies inn 20 - 40 mg. Vevet has i reagensrør og tilsettes 2 ml 7N KOH og settes i et vannbad 100° i 4 timer. Etter endt reaksjon tilsettes destillert vann (10 - 20 ml) og løsningen sentrifugeres ved 3800 rpm i 20 min, vaskingen foretas 4 ganger. Hver gang pipetteres supernatanten av så nær som 5 mm nær bunnen. Siste gang tørkes den siste 0.5 - 1 ml med bunnfall inn i varmeskap og rørene som nå har et sort bunnfall settes i en Dri Block DB4 ved 350° og oksygen ledes over natten over. Et hvitt bunnfall oppnås som tilsettes destillert vann og homogeniseres i ultralydbad i 5 minutter. Deler av løsningen eller hele løsningen filtreres på 0.1 eller 0.05 µm Millipore 25 mm filtere. Hele filterne kullbelegges og biter klippes ut og legges over Au-gridder med 150 mesh hullstørrelse. Dette er på forhånd plassert i petriskåler med polyuretansvamp trukket full med aceton. Filteret løses ut av acetonen og gridden kan tas ut og analyseres i TEM. Fibrene analyseres (telles) på foto ved 4000x. Normalt oppnås 0 - 100 fibre/plate og 0 - 12 bilder tas pr. preparat.

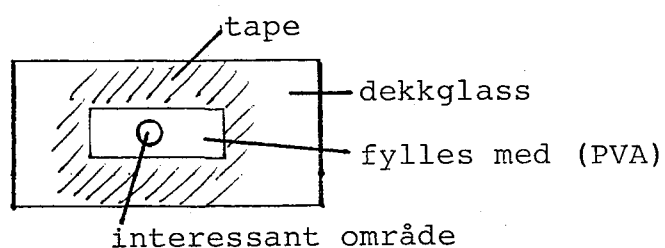
Merknader

Filtrerte løsninger brukes ikke? Tap av fibre ved gjentatt vasking/sentrifugering? Hva skjer med asbestlegemene? Sentrifugering av fibre gjennom væskeoverganger er vanskelig?

Analyse av tynnsnitt for fibre

Ved snitting (snittykkelse = 6 µm) av lunger for histopatologi tas alltid minst 2 snitt hvorav ett beholdes ufarget. Dersom patologen oppdager interessante områder, f.eks. granulomer, tas det ufargede snittet og foraskes i 2 timer ved 400°C. Det interessante området skjæres ut med en diamantkniv (snitt ca. 3mm i diameter). 10% poly-

vinylalkohol løst i varmt destillert vann dryppes i en form rundt snittet laget av tape



PVA tørkes i varmeskap over natten ($60 - 70^{\circ}$). PVA-filmen strippest av og snittedelen følger med. Den avstrippede delen snus og kullbelegges, deretter løses PVA-filmen ved å senke det hele ned i kokende destillert vann. Au-gridd føres under snittet (kullfilmen holder det sammen) og løfter det opp. Snittet tørkes og er klar for TEM-analyse.

Merknader

Hva skjer ved 400° temperatur ved foraskning? Tapes fibre ved vaskeprosedyrene?

PREPARERING AV MEMBRANFILTRE FOR UNDERSØKELSE I SEM OG TEM

Støv i suspensjon, homogenisert i ultralybad, filtreres enten gjennom 0.05 eller 0.1 μm porestørrelse, 25 mm diameter Millipore filtere eller 0.22 μm porestørrelse 25 mm diameter Nucleporefiltere. Hele filteret eller deler av det festes med 2 - 3 tape-biter f.eks. til et vanlig papirfilter i en plast petriskål eller tilsvarende. Filterbitene belegges med carbon til de har fått passende gråtone. Etter endt carbonbelegging skjæres en bit litt større enn en 3 mm TEM-grid. Den videre prosedyre for fjerning av Milliporefiltere med aceton er beskrevet foran. Når det gjelder Nuclepore, tas en petriskål og et mikroskop-objektglass legges i bunnen på dette. Kloroform helles i petriskålen slik at menisken trekkes over objektglasset. Filterbiten legges på objektglasset med kullaget vendt opp. Filteret løses nå ut. En mikroskopgrid (150 mesh) (Au, Cu) tas med en fin pinsett og stikkes under kullfilterskiktet som flyter omkring. Pass på slik at skiktet ikke brettes eller blir skrukkete. Når hele gridden er dekket løftes skiktet opp på gridden. Overskudd av kull/filter vil brettes under gridden ved hevingen. Dette skrapes forsiktig bort med en skalpel. Gridden med kull/filterrest dyppes forsiktig i et begerglass med ren kloroform og holdes deretter med undersiden mot et trekkpapir. Gjenta vaskesprosedyren 2 - 3 ganger. Gridden skal nå være klar for kjøring i TEM. Dersom bakgrunnen blir for mørk i TEM, er ikke alt filteret vasket bort.

Merknader

Nucleporefilteret synes å krympe når det blir lagt i kloroform? Dermed endres totalt areal. Tapes fibre ved kloroformbehandlingen og vaskingen? Metoden gir muligheter for karakterisering av fibre med TEM/EDS.

Telling av fibre i TEM

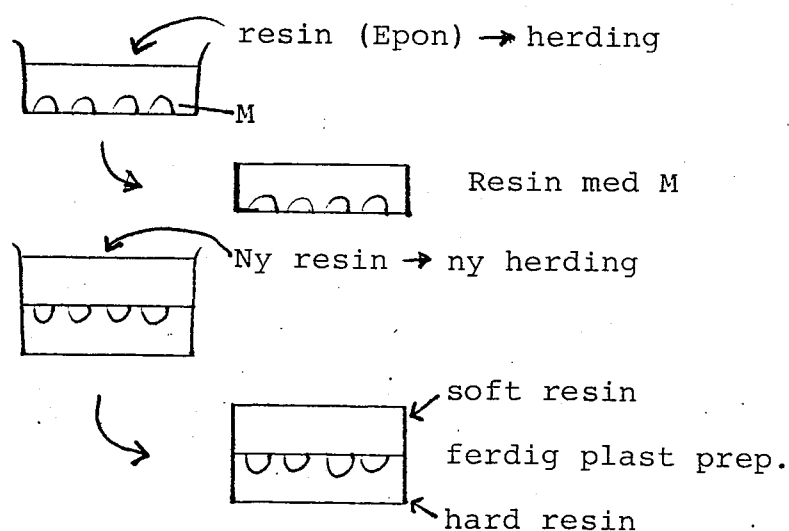
Når antall og størrelse av fibre evalueres i TEM benyttes følgende metode. Representative deler av TEM-griddene fotograferes på standard plater ved 2500 eller 4500x forstørrelse. Antall fibre/partikler avgjør hvor mange forskjellige plater som skal tas. For størrelse (lengde og diameter) benyttes opptil 500 partikler. Partiklene telles/måles ved at platen 2500/4500x forstørres opp til ca. 20 000x i en vanlig fotoforstørrelsesoppsats.

CARBON EVAPORATOR

Kullpådamperen som benyttes er meget rask. Den opererer ved et trykk på 10^{-4} torr 4 - 5 raske (2 sek) glødinge av kullstavene benyttes. Et homogent kullskikt oppnås med denne metoden. Kullskiktet er sterkt nok til å bære fibre, eller de sees som replica i TEM. Det brukes ikke Formvar-support på griddene.

PREPARERING AV CELLER FOR UNDERSØKELSE I SEM AND TEM

Peritoneale makrofager kjøres gjennom samme system som for enzymanalysene med unntak av at inkubering med støv skjer i mye mindre begre. I dette tilfellet benyttes plastpropper ca 1 cm i diameter og 5 mm høyde. M fester seg til bunnen av disse proppene. Etter innkubering kan kantene i proppen skjæres av og hele plastplaten fikseres eller fixative kan helles i proppene og kjøres gjennom normal prosedyre for SEM med dehydrering og critical point drying eller freeze-drying. Gullbelegges og deretter undersøkes direkte i SEM. For TEM kan cellene etter fiksering og tørking støpes i plast ved at epon fylles i korken og det hele herdes. Etter herding kan plastkorken fjernes. Plasten bør ikke snittes fra bunnen av idet makrofagene her har kun en orientering. Derfor tas plastbit med makrofager og en ny plast støpes mot den gamle og det hele skjæres på tvers



Epon med makrofager er nå herdet to ganger og derfor noe hardere enn soft resin. Ved snitting bør derfor kniven alltid gå fra soft → hard resin.

Referanse: Johnson et al. J. of microscopy 122 (1981) in press.

FRYSE-TØRRING AV BIOLOGISK MATERIALE

Ved MRC benyttes frysetørring istedenfor kritisk punkt tørking av biologisk materiale for elektronmikroskopi. Etter tradisjonell fiksering (glutaraldehyd + Osmium-tetraoksyd) vaskes buffer av i destillert vann og overskudd trekkes av med trekkpapiir. Et lite beger (metall) kjøles ned med flytende nitrogen(L-N₂) i en vanlig termos og freon tilsettes dette metallbegeret til det er nesten fullt. Etter at vannet er tørket av has prøven (i dette tilfellet celler som hadde festet seg til bunnen av plastkorker) i flytende freon i 1 min. og settes deretter i frysetørkeren som på forhånd er gjort klar (Edwards freeze drier). Frysetørkeren pumpes ned til 10⁻³ torr (temp. bør ikke overskride -55°C) og lar det hele stå minst 3 timer. Ved tykkere vevsbiter må opptil 24 timers evakuering benyttes. Etter frysetørring belegges preparatet med f.eks. gull og undersøkes i elektronmikroskop.

DYRESTALL

Det ble gitt en kort instruksjon i behandling av forsøksdyr, og det kan kort summeres som følger. Alle dyrerom er under overtrykk og luften filtreres/kondisjonerer. Alle som oppholder seg (de som har tillatelse) i dyrestallene tar på seg utstyr (masker, munnbind, støvler, frakk) før de går inn. Hender og føtter desinfiseres før man går inn. Maten er sterilisert i reaktor på forhånd og pakket i triple plastsekker. Alt annet utstyr steriliseres i autoklav før det benyttes. Burene består av gitter både i vegger, tak og gulv og et spesialbrett med papir under samler opp feces og urin + overskudd av mat. Rottene avles ved instituttet og kvaliteten kontrolleres regelmessig ved forskjellige tester. MRC har eget rankingsystem for SPF-kvalitetsrotter.

I selve eksponeringsrommet har en 9 kammere som nå utsettes for forskjellige fiberstøvtyper. Forekomst av støv/fibre i luften i rommet kontrolleres ukentlig ved målinger utenfor. Konsentrasjonen i kammerne måles med horizontal elutriator. Til generering av støv benyttes enten Wright Dust feeder for isometrisk støv eller Timbrell Dust Generator for fiberformige støvtyper.