

# Nanonoxen: Aufnahme, Transport und Toxizität von Nanoteilchen

J. M. Wörle-Knirsch, H. F. Krug, K. Kern, S. Diabaté, ITG

## Einleitung

Die Entwicklungen in der Nanotechnologie sind von einer schnell wachsenden Industrie zur Produktion von synthetischen Nanopartikeln (Größe: 1-100 nm) begleitet. Über die potentiellen Gesundheitsrisiken freigesetzter Nanopartikel während der Produktion, der Anwendung oder bei der Entsorgung ist jedoch bisher nur sehr wenig bekannt. Besser bekannt sind dagegen die Auswirkungen von ultrafeinen Partikeln in unserer Atemluft, die aus industriellen Verbrennungsprozessen, Verkehr und Heizungsanlagen stammen und die bei erhöhten Konzentrationen ein gesundheitliches Risiko darstellen [12]. Die Assoziation der Partikelkonzentration mit einer erhöhten Inzidenz von Atemwegserkrankungen (Asthma, Bronchitis), von Herz-Kreislaufkrankungen, sowie von erhöhter Mortalität insbesondere bei sehr jungen, älteren oder bereits erkrankten Menschen, wurde übereinstimmend in zahlreichen epidemiologischen Studien nachgewiesen [21, 23].

Obwohl seit einigen Jahren intensive Untersuchungen zu der Frage durchgeführt werden, welche Partikeleigenschaften die biologischen Wirkungen verursachen und durch welche biologischen Mechanismen die Partikelwirkungen erfolgen, gibt es noch keine einheitlichen Antworten dazu. Eine von mehreren Hypothesen ist, dass die kleineren Partikel toxischer sind als die größeren bei gleicher chemischer Zusammensetzung. Die Inhalation von feinen

und ultrafeinen Partikeln induziert in Menschen [19, 20] und Tieren [18] eine intensive inflammatorische Antwort, die durch die Produktion von pro-inflammatorischen Molekülen (Zytokine) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie durch Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus dem Blut in die Lungenbläschen charakterisiert ist. Diese Prozesse gehören zur Abwehrreaktion gegen fremdes Material oder Mikroorganismen und sind daher auf niedrigem Niveau ständig aktiv, ohne eine Entzündung auszulösen. Bei einer überschießenden Reaktion, z.B. bei starker Aktivierung der Entzündungszellen, die mit einer Freisetzung von ROS sowie lysosomaler Enzyme einhergeht, kann das Lungenepithel geschädigt werden. Wenn zu viele Partikel in die Zelle aufgenommen wurden, kann die Fähigkeit zur Abwehr von Krankheitserregern beeinträchtigt werden (Beispiel: Raucher).

Nach der Deposition der Partikel auf der Lungenoberfläche sind zwei Zelltypen direkt betroffen: Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen. Phagozytose von Partikeln ist eine der Hauptaufgaben der Makrophagen, jedoch auch Epithelzellen sind in der Lage, Partikel aufzunehmen, besonders ultrafeine Partikel. Ob diese Partikel durch das intakte Epithel auch zu tiefer gelegenen Zellschichten gelangen können, wird derzeit von unserer Arbeitsgruppe an einem 3D-Zellmodell erforscht.

## Umweltstäube und das 3D-Zellmodell

Bei In-vitro-Toxizitätsstudien wird meist nur ein Zelltyp exponiert, obwohl bekannt ist, dass Epithelzellen und Makrophagen zusammen die biologische Antwort koordinieren. Die Bedeutung der Interaktion zwischen Makrophagen und Epithelzellen wird in Studien deutlich, in denen gezeigt wurde, dass in Kokulturen aus humanen Lungenzellen (Epithelzellen und Makrophagen) durch Partikelexposition eine stärkere Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 erfolgt als in den jeweiligen Monokulturen. Ähnliche Resultate wurden von uns mit Kokulturen aus einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie und Lungenepithelzellen der Ratte nach Exposition mit Flugasche erhalten [6, 7, 24]. Durch Zusammenführung dieser Zelltypen in vitro (Abb. 1) könnte somit ein besseres Modell für die Verhältnisse in der Lunge geschaffen werden, das zu einer authentischen, biologischen Reaktion fähig ist.

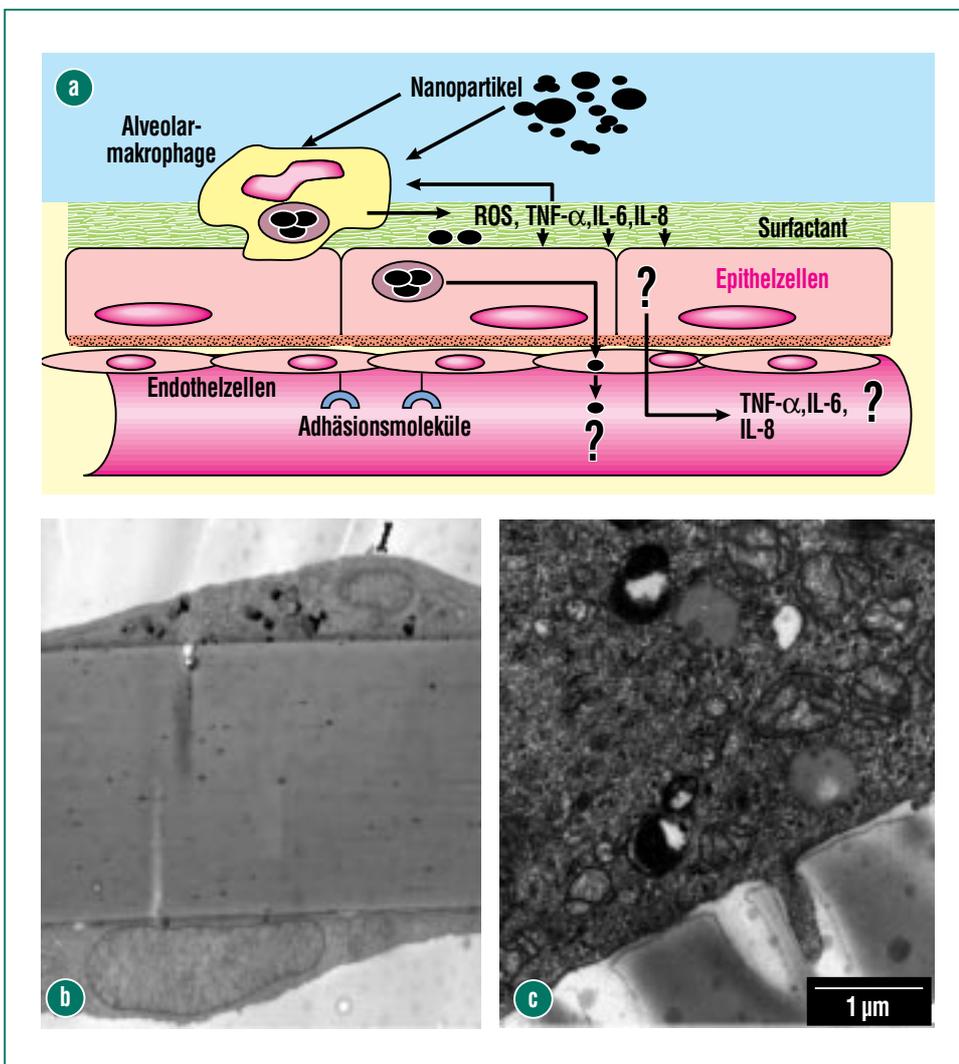
In Abb. 1 ist das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen an der Luft-Blut-Schranke der Lunge vereinfacht dargestellt. Alveolarmakrophagen erkennen fremde Partikel über unspezifische Rezeptoren, nehmen sie ins Zellinnere auf, bauen sie ab und setzen Zytokine, ROS und Lipide frei. Diese Mediatoren initiieren eine Entzündungsreaktion, indem sie die benachbarten Epithelzellen

und die Endothelzellen, welche die Blutgefäße auskleiden, zu einer verstärkten Zytokinfreisetzung stimulieren. In der Folge werden Entzündungszellen aus dem Blut angelockt, die einerseits helfen, dass fremde Partikel oder Mikroorganismen beseitigt werden, und dass durch die Entzündungsreaktion beschädigtes

Gewebe wieder repariert wird. Andererseits kann bei Überproduktion von Mediatoren auch gesundes Gewebe beschädigt und eine chronische Entzündung eingeleitet werden, aus der sich z.B. fibrotische Veränderungen, genotoxische (Tumorbildung) sowie lungenzerstörende Prozesse (Emphysem) ergeben können.

## Nanomaterialien und Nanopartikel

Die Natur hat Mittel und Wege gefunden, funktionelle Strukturen Atom für Atom aufzubauen (Bottom-up-Ansatz). Dabei werden bestehende Verbindungen (Nahrung) gespalten und zu Neuem verfügt, z.B. müssen wir schließlich keine Haare essen, damit ebensolche wachsen können. Vergleichbare körpereigene Proteinstrukturen, die als Flimmerepithel helfen, unsere Lunge zu säubern, können als Nanomaterialien oder Nanomaschinen (molecular motors) bezeichnet werden. In gleicher Weise können wir heutzutage Nanomaterialien herstellen, die jedoch keinen funktionellen Charakter (vgl. Maschinen) haben, sondern „lediglich“ aufgrund ihrer Größe von 1-100 nm besondere physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen. Die wichtigsten Parameter für Nanopartikel sind ihre Größe, die chemische Zusammensetzung und ihre Oberflächenbeschaffenheit. Nanopartikel aus Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) werden in den neuesten Sonnencremes eingesetzt, die uns damit allergikerfreundlich und lang anhaltend gegen Sonnenbrand schützen. Andere Nanomaterialien verändern Oberflächen so, dass sie nicht mehr beschlagen, nicht mehr verkratzen oder kein Licht reflektieren. Abb. 2 zeigt Beispiele solcher Teilchen [11]. Dabei kann ihre Beschaffenheit genauso mannigfaltig sein, wie deren Funktion. Die wohl kleinsten funktionalen Teilchen sind die Quantum dots (CdSe), kleinste Halbleiterkristalle, die mit einer Größe von bereits 1 nm nach UV-

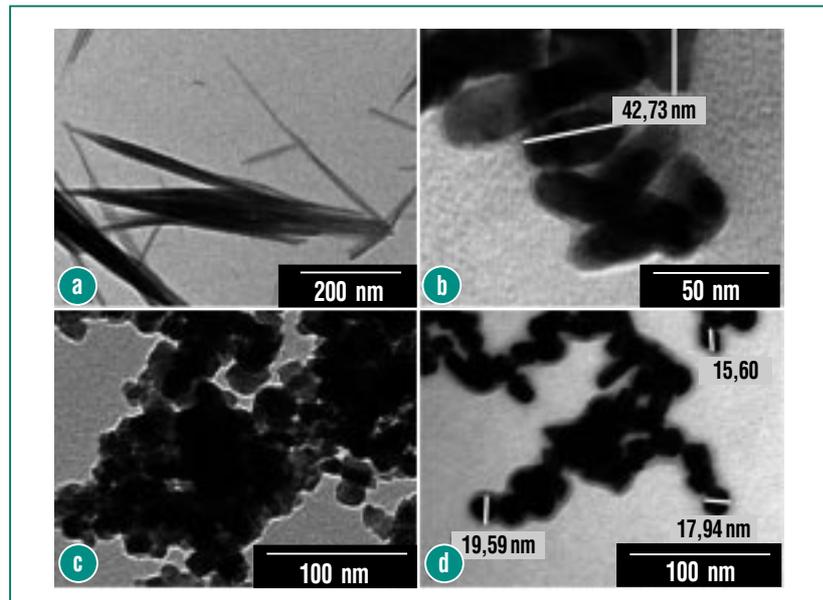


**Abb. 1: Dreidimensionales Zellmodell der Lunge. Schematischer Aufbau der Luft-Blut-Schranke einer Lunge (a) und die In-vitro-Variante, in der Epithelzellen (oben) und Endothelzellen (unten) durch eine synthetische Membran voneinander getrennt sind (b). In c) ist der Ausläufer einer Epithelzelle zu erkennen, der durch eine Membranpore Zellkontakt zur Endothelzelle auf der anderen Seite der Membran sucht.**

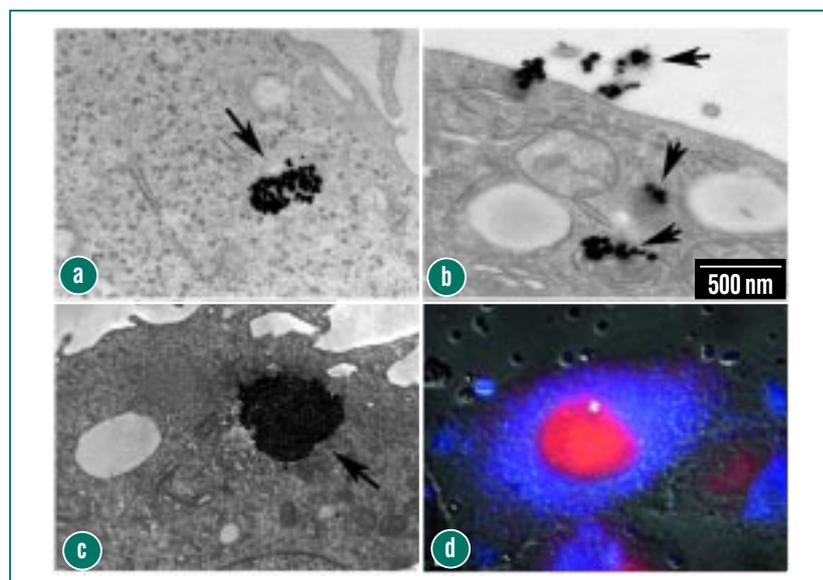
Anregung längerwelliges Licht emittieren. Damit können diese Teilchen als stabile Farbstoffe für biologische Markierungen verwendet werden. Andere funktionelle Teilchen sind die erwähnten 90 nm großen  $\text{TiO}_2$ -Partikel, die in Sonnencremes eingesetzt werden. Um ein Vielfaches größer ( $> 5000 \text{ nm}$ ) werden die gleichen Moleküle in Wandfarben als Pigmente verwendet (Tab. 1). Werden diese Titandioxidpartikel allerdings weiter verkleinert (20 nm), werden sie photokatalytisch aktiv. Das heißt, sie sind in der Lage, die Energie des Lichts zu verwenden, um andere Verbindungen zu spalten [5], dabei kann reaktiver Sauerstoff oder aktives Chlor ( $\text{Cl}_2$ ) entstehen [25]. Diese neuen Eigenschaften eröffnen für die Entwicklung neuer Produkte vielfältige Möglichkeiten, und Nanopartikel werden in vielen Anwendungen zu finden sein. Genauso überraschend wie die direkten Substanzeigenschaften kann sich aber möglicherweise auch ihr Verhalten in der Umwelt oder in lebenden Organismen verändern. Die große Herausforderung liegt darin, auch die möglichen unerwünschten Nebenwirkungen dieser neuen Technologie zu erforschen.

$> 5000 \text{ nm}$	Pigment in Wandfarben
50-100 nm	UV-Schutzpigment in Sonnencremes
10-19 nm	Photokatalytische Pigmente

**Tab. 1: Größe und Funktion ausgewählter Nanopartikel ( $\text{TiO}_2$ ).**



**Abb. 2: Elektronenmikroskopische Bilder von Nanopartikeln. Nanopartikel verschiedener chemischer Zusammensetzung und Größe. In a) Vanadiumoxid (Nanoröhren  $\text{V}_2\text{O}_5$ ), b) Zinkoxid ( $\text{ZnO}$ ), c) Hausmannit ( $\text{Mn}_3\text{O}_4$ ) und d) Palladium (Pd) [Partikelsynthese: C. Feldmann, Universität Karlsruhe].**



**Abb. 3: Lungenepithelzellen mit Nanopartikeln. Epithelzellen (A549) mit verschiedenen Nanopartikeln behandelt. Aufgenommene Partikel (Pfeile): a) Palladium, b) Haematit, c) Querschnitt durch ein Bündel Kohlenstoff-Nanoröhren (vgl. Abb. 4) und d) coumarinbeschichtete, fluoreszierende Keramikpartikel ( $\text{ZrO}_2$ ) im Zytosol (blau) und der Ethidiumbromid gefärbte Kern (rot) [Fluoreszierende Partikel: Dr. D. Szabo, IMF III].**

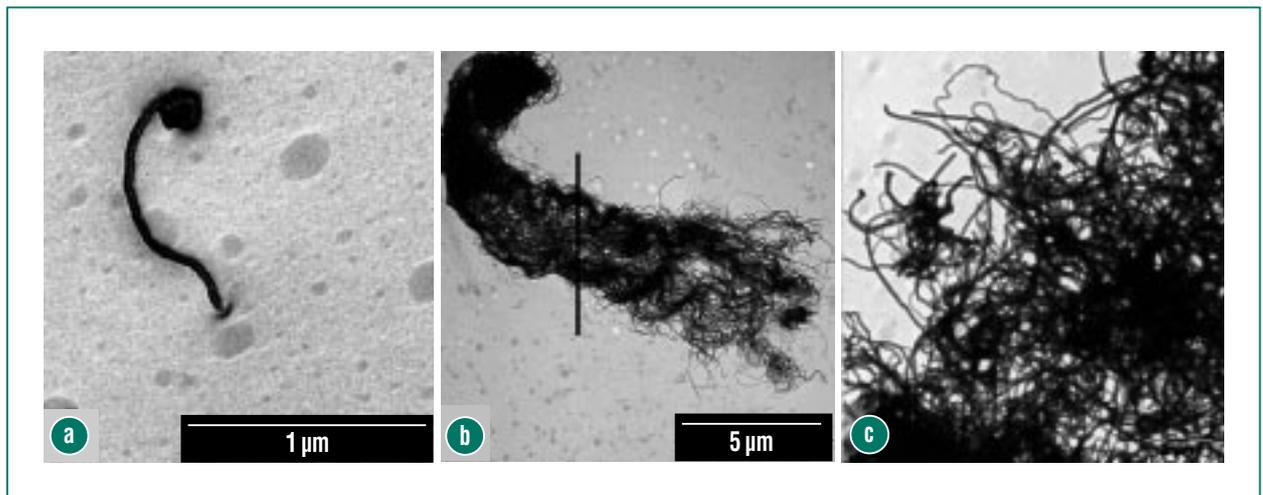
Die Aufnahme in Zellen kann einerseits passiv durch Diffusion, andererseits durch Rezeptoren oder Bindeprotein vermittelte Mechanismen erfolgen. Beide Wege werden von uns unter Zuhilfenahme von fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Techniken untersucht (Abb. 3). Dazu wurden fluoreszierende Nanopartikel oder fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt. Letztere gehen eine Bindung mit den am Transport beteiligten Proteinen ein und ermöglichen so eine optische Verfolgung. Kommen Nanopartikel mit Zellen in Kontakt, dann können sie an die in der Membran verankerten Proteine andocken und werden in die Zelle eingeschleust. Dort besteht die Gefahr, dass diese Teilchen sich in den Organellen der Zellen (z.B. Kern oder Mitochondrien) anreichern, und es zu schwerwiegenden Störungen und Schäden kommt. Abb. 3 zeigt einige Nanopartikel, die in Zellen des Lungenepithels aufgenommen worden

sind. Für mikrodimensionierte Partikel (Asbest, Quarzstaub) sind biologische Effekte beschrieben [3, 10], die durch Struktur und katalytische Eigenschaften zu oxidativem Stress bzw. Schäden im Erbgut führen und dadurch Krebs entstehen lassen. Wegen der bisherigen Erkenntnisse zur Wirkung von feinem Staub und der erhöhten Reaktivität der neuen Nanomaterialien besteht ein akuter Forschungsbedarf, um eine mögliche biologische Gefährdung durch diese Nanopartikel abzuklären [13].

### Toxikologische Untersuchungen von Nanopartikeln am Beispiel von Kohlenstoff-Nanoröhren

In der Nanotechnologie sind aktuell Kohlenstoff-Nanoröhren (CNT) für viele Entwicklungen von großem Interesse, und zwar wegen ihrer herausragenden Eigen-

schaften wie hoher Zugfestigkeit, großer Oberfläche, einzigartige elektronische Eigenschaften sowie ein hohes Potential für molekulare Adsorption. Die Produktion der CNTs wird in Zukunft stark zunehmen, jedoch weiß man bisher noch sehr wenig über potentielle Gesundheitseffekte, die durch Einatmen der kleinen Fasern bei der Herstellung oder bei der Verwendung auftreten können. Mit Durchmessern von 1-50 nm und einer Länge bis zu mehreren Mikrometern sind diese Partikel inhalierbar und können bis in die kleinsten Verästelungen der Lunge vordringen. Abb. 4 zeigt drei verschiedene kommerziell erhältliche Nanotubes, deren toxisches Potential kürzlich von uns durch In-vitro-Tests untersucht wurde, wobei ultrafeine Kohlenstoffpartikel (Carbon Black) und Quarzpartikel als Kontrolle verwendet wurden. Carbon Black wird in großen Mengen hergestellt und z.B. bei der Reifenherstellung eingesetzt.



**Abb. 4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Kohlenstoff-Nanoröhren. a): Einwandige Kohlenstoff-Nanoröhren (CNT), Außendurchmesser 1-2 nm, b): Mehrwandige CNT (Balken zeigt eine Schnittebene vgl. Abb.3), Außendurchmesser 10-20 nm, c): Mehrwandige CNT, Außendurchmesser 5-15 nm.**

Bei der Behandlung von Alveolar-makrophagen der Ratte mit den verschiedenen Partikeln zeigte sich bei gleicher Konzentration (50 µg/ml), dass die Vitalität der Zellen durch Nanoröhren stärker reduziert wird als durch Quarz, jedoch in gleichem Ausmaß wie durch Carbon Black. Nanoröhren führten auch zur Bildung von intrazellulären ROS. Beide Effekte zeigten sich am stärksten bei den einwandigen Nanoröhren [7]. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die immer gleiche Beobachtung in vielen Untersuchungen, dass die kleinen Partikel toxischer als die größeren sind.

In der Literatur wird beschrieben, dass inhalierte Kohlenstoffpartikel im Tierversuch mit Ratten zu beträchtlichen Lungenschäden führten, wobei das toxische Potential mit kleiner werdender Partikelgröße und größer werdender Partikeloberfläche stieg [8, 9]. Bei ersten Tierversuchen mit Kohlenstoff-Nanoröhren wurden die Partikel in Flüssigkeit suspendiert und in die Atemwege von Ratten instilliert [22]. Die höchste Konzentration von 5 mg einwandiger Nanoröhren pro Kilogramm Körpergewicht führte zu einer Mortalität von ca. 15% der exponierten Ratten. Die Ursache war allerdings eine Verstopfung der Hauptatemwege durch Partikel-Agglomerate und nicht die Toxizität der Partikel. Bei den Überlebenden wurde eine transiente Lungenentzündung sowie die Bildung von multifokalen Granulomata beobachtet. Ähnliche Ergebnisse erhielten Lam *et al.* [15] nach Experimenten mit drei Nanoröhren-Produkten, die sie in die Lungen von Mäusen instillierten.

### Chancen und Risiken von Nanopartikeln in therapeutischer Anwendung

Seit einigen Jahren werden Nanopartikel auch im Bereich der Molekularbiologie und der Medizin angewendet. Auch in diesen Bereichen konnten durch verschiedene Applikation von Nanopartikeln Fortschritte erzielt werden. Mit Hilfe der Partikel ist es z.B. gelungen, genetisches Material in Zellen einzubringen. So können mit DNA beladene Nanopartikel zur Impfung gegen Mikroorganismen wie *Toxoplasma gondii* eingesetzt werden [2]. Nanopartikel werden zur Pharmakotherapie verwendet, um Medikamente bei geringeren Nebenwirkungen gezielter an ihren Wirkort zu bringen. Solche Medikamente werden bei Meningitis, Hepatitis C, allergischem Asthma, zur Insulingabe oder bei Augenerkrankungen angewendet. Bei Erkrankungen am Auge werden Nanopartikel aus Chitosan als Vehikel für Medikamente benutzt. Chitosan ist ein Polysaccharid, das eine gute Bioadhäsion aufweist, permeabilitätssteigernd wirkt und wenig toxisch ist. Dadurch kann eine selektive und verlängerte Therapie an der Mukosa des Auges [1] erreicht werden. Auch zur Diagnose und zur Therapie von Tumorerkrankungen bieten Nanopartikel viele Möglichkeiten. So werden einige Medikamente zur Krebstherapie an Nanopartikel gekoppelt, um sich in Tumorzellen anzureichern. Wieder haben sich Chitosanpartikel als nützlich erwiesen. Doxorubizin, ein weit verbreitetes Medikament gegen Krebs, das die Synthese von Nukleinsäu-

ren in Krebszellen stört, hat eine verbesserte Wirksamkeit und geringere Nebenwirkungen, wenn es so verpackt wurde [16]. Die Diagnostik ist ein weiterer Bereich in dem Nanopartikel neue Dimensionen eröffnen. DNA-Fragmente, an welche Nanopartikel gekoppelt sind, werden hier als Detektoren verwendet [4]. Implantate werden mit Biokeramiken, die auf Aluminium basieren und 50-250 nm groß sind, beschichtet, um eine bessere Verträglichkeit im Körper zu erreichen [17]. Die möglichen Gefahren, die von einer medizinischen Anwendung der Nanopartikel ausgehen, sind bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar, da ihre Toxizität meist nicht untersucht wurde [14] und auf Grund der besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften nur schwer vorherzusagen sind.

### Danksagung

Bei BWPLUS (Baden-Württemberg Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung, BWB 20013), der DFG (CFN E1.3) und dem BfR (WK 1-1328-182) bedanken wir uns für die finanzielle Unterstützung unserer Studien.

## Literatur

- [1] M.J. Alonso, A. Sanchez, *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 1451-63 (2003)
- [2] M. Bivas-Benita, M. Laloup, S. Versteheyne, J. Dewit, J. De Braekeleer, E. Jongert, G. Borchard, *Int. J. Pharm.* 266, 17-27 (2003)
- [3] P.J. Borm, L. Tran, *Ann. Occup. Hyg.* 46, 25-32 (2002)
- [4] Y.W.C. Cao, R.C. Jin, C.A. Mirkin, *Science* 297, 1536-40 (2002)
- [5] G. Chen, G. Luo, X. Yang, Y. Sun, J. Wang, *Mater. Sci. Eng. A* 380, 320-25 (2004)
- [6] S. Diabaté, K. Völkel, R. Wottrich, *Nachrichten FZK* 34, 75-83 (2002)
- [7] S. Diabaté, K. Pulskamp, H.F. Krug, *Signal Transduction* 3-4, 116 (2004)
- [8] K.E. Driscoll, J.M. Carter, B.W. Howard, D.G. Hassenbein, W. Pepelko, R.B. Baggs, G. Oberdörster, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 372-80 (1996)
- [9] U. Heinrich, R. Fuhst, S. Rittinghausen, O. Creutzenberg, B. Bellmann, W. Koch, K. Levsen, *Inhal. Toxicol.* 7, 533-56 (1995)
- [10] M.C. Jaurand, *Environ. Health Perspect.* 105, 1073-84 (1997)
- [11] K. Kern, J.M. Wörle-Knirsch, H.F. Krug, *Signal Transduction* 3-4, 149 (2004)
- [12] W.G. Kreyling, M. Semmler, W. Möller, *J. Aerosol Med.* 17, 140-52 (2004)
- [13] H.F. Krug, *Nanopartikel: Gesundheitsrisiko, Therapiechance? Nachrichten aus der Chemie* 51, 1241-46 (2003)
- [14] H.F. Krug, K. Kern, J.M. Wörle-Knirsch, S. Diabaté, *internistische praxis* 44 im Druck (2004)
- [15] C.W. Lam, J.T. James, R. McCluskey, R.L. Hunter, *Toxicol. Sci.* 77, 126-34 (2004)
- [16] S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, A.N. Maitra, *J. Control. Rel.* 74, 317-23 (2001)
- [17] K. Morsi, H. Keshavan, S. Bal, *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 15, 191-97 (2004)
- [18] G. Oberdörster, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, 1-8 (2001)
- [19] S. Salvi, A. Blomberg, B. Rudell, F. Kelly, T. Sandström, S.T. Holgate, A. Frew, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 702-9 (1999)
- [20] S.S. Salvi, C. Nordenhall, A. Blomberg, B. Rudell, J. Pourazar, F.J. Kelly, S. Wilson, T. Sandström, S.T. Holgate, A.J. Frew, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 61, 550-57 (2000)
- [21] J.M. Samet, F. Dominici, F.C. Curriero, I. Coursac, S.L. Zeger, *New Engl. J. Med.* 343, 1742-49 (2000)
- [22] D.B. Warheit, B.R. Laurence, K.L. Reed, D.H. Roach, G.A. Reynolds, T.R. Webb, *Toxicol. Sci.* 77, 117-25 (2004)
- [23] H.E. Wichmann, C. Spix, T. Tuch, G. Wolke, A. Peters, J. Heinrich, W.G. Kreyling, J. Heyder, *Research Report (Health Effects Institut)* 5-86 (2000)
- [24] R. Wottrich, S. Diabaté, H.F. Krug, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 353-61 (2004)
- [25] M.V. Zanoni, J.J. Sene, H. Selcuk, M.A. Anderson, *Environ. Sci. Technol.* 38, 3203-08 (2004)