

# Mechanismen der biologischen und toxischen Wirkungen von Nanopartikeln

S. Diabaté, C. Weiss, ITG

## Einleitung

Nanopartikel sind feste Stoffe unterschiedlicher chemischer Verbindungen oder Elemente, wie z. B. Metalloxide oder reiner Kohlenstoff mit nanoskaligen Abmessungen (< 100 nm in mindestens einer Dimension), die in der Regel schwer wasserlöslich sind (siehe auch [1]). Wenn sie als Nebenprodukte von Verbrennungen, wie z. B. bei Dieselmotoren oder beim Holzkohlegrill in die Umwelt gelangen, bezeichnet man sie als ultrafeine Partikel (UFP). Zusammen mit den größeren Agglomeraten bis 10 µm (PM<sub>10</sub>) sind sie als „Feinstaub“ in die Schlagzeilen geraten, weil die Inhalation von erhöhten Konzentrationen in der Atemluft zu Gesundheitsproblemen führen kann [2]. Aufgrund epidemiologischer und toxikologischer Studien zu den Wirkmechanismen von UFPs wurden Grenzwerte für die Exposition abgeleitet, die beispielsweise durch Reduktion der Feinstaubgenerierung mittels Fahrverbote in belasteten Regionen sowie durch Einführung von Filtertechniken erreicht werden sollen. Neben der ungewollten Erzeugung und Freisetzung von Nanopartikeln nimmt in Zukunft im Zuge der Nanotechnologie die Produktion von neu entwickelten Nanopartikeln mit den unterschiedlichsten chemischen Zusammensetzungen und Formen zu und in deren Folge steigt auch die Exposition des Menschen sowie der belebten Umwelt gegenüber diesen neuen Materialien. Um mögliche Risiken für am Arbeitsplatz exponierte Personen und Verbraucher als auch für die Umwelt abzuschätzen und letztendlich zu vermeiden, sind

Kenntnisse der Mechanismen der biologischen Wirkung sowie der Partikeleigenschaften, die diese Wirkung verursachen, erforderlich.

## Nanopartikel: Vorkommen, Aufnahme- wege und Verteilung im Organismus

Nanopartikel kommen auch in natürlicher Form in der belebten und unbelebten Umwelt vor. So liegen Mineralien in der Erdoberfläche wie beispielsweise Silikate bis zu 50 % als Nanopartikel (sogenannte Nanomineralien) in agglomerierter Form vor [3]. Ebenso führen natürliche Verbrennungsprozesse wie Waldbrände zum Entstehen von Nanopartikeln. Seit Beginn der biologischen Entwicklung sind Zellen Ziele von Viren, deren Abmessungen im Nanometerbereich liegen und somit als biologische Nanopartikel betrachtet werden können. In Folge dieser schon immer vorhandenen Konfrontation haben Lebewesen Strategien zum Umgang mit Nanopartikeln entwickelt, um mögliche schädliche Wirkungen zu verhindern. Erst nach Überwinden oder Überfordern dieser Verteidigungs- bzw. Entgiftungsmechanismen kommt es zu Schädigungen des Zielorganismus. Ob die vom Menschen neu erzeugten Nanopartikel vergleichbare biologische Reaktionen hervorrufen wie die in der Natur vorkommenden Nanopartikel oder aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften völlig unbekannte Wirkungen besitzen, ist bisher unbekannt und Gegenstand unserer Untersuchungen.

Die Grenzflächen des menschlichen Körpers mit der Umwelt sind gleichzeitig die Hauptaufnahmewege von Fremdstoffen. Diese werden somit im Wesentlichen über die Atemwege, die Haut und den Ernährungstrakt (Speiseröhre, Magen und Darm) aufgenommen. Zusätzlich nehmen wir Medikamente und Diagnosemittel auch unter Umgehung der natürlichen Barrieren z. B. durch Injektion in die Blutbahn oder andere Zielgewebe auf. Prinzipiell sind sämtliche genannten Aufnahmewege für Nanopartikel relevant, da deren Vorkommen nicht nur auf die Umweltluft beschränkt ist, sondern sie auch im Zuge von verunreinigten oder gewollt veränderten Lebensmitteln sowie in der medizinischen Anwendung vom Menschen aufgenommen werden.

Neben der Aufnahmekategorie von Fremdstoffen bestimmt deren Verteilung in der Zelle und im Organismus deren Wirkungen. Im Gegensatz zu Arzneimitteln, die häufig durch passive Diffusion unspezifisch ins Gewebe eindringen, werden größere Partikel nur kontrolliert von spezialisierten „Fresszellen“ (Makrophagen, Granulozyten) aufgenommen, um sie nach außen zu transportieren. Da Partikel im Unterschied zu löslichen Fremdstoffen nicht durch Stoffwechselwege in vom Körper ausscheidbare Substanzen umgewandelt werden können, sind der genannte zelluläre Abtransport sowie der direkte Transport durch Flimmerepithelien (kleine Härchen an der Oberfläche von Organgrenzflächen) die einzige Möglichkeit zur Entgiftung. Eine wesentlich neue Eigenschaft von nanoskaligen im Vergleich zu größeren Partikeln könnte deren

Verteilung in der Zelle bzw. Organismus sein, da diese ähnlich den löslichen Fremdstoffen auch durch passive und somit unkontrollierte Diffusion aufgenommen werden. Deshalb könnten Nanopartikel an jedem Ort in der Zelle oder des Organismus ihre möglicherweise toxischen Wirkungen entfalten [4, 5].

### Biologische und toxische Wirkmechanismen von Nanopartikeln

Umweltmedizinische und tierexperimentelle Studien belegen toxische Wirkungen von Partikeln (z. B. Feinstaub) vor allem in der Lunge, die ausgehend von Entzündungsreaktionen zu Atemwegs-, Herz-Kreislaufkrankungen sowie einem erhöhten Lungenkrebsrisiko beitragen [6]. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die kleineren Partikel (UFP) deutlich stärkere Effekte auslösten als die größeren.

Synthetische Nanopartikel sind ebenso in der Lage, Entzündungsreaktionen auszulösen und somit ist es wahrscheinlich, dass bei entsprechender Exposition ähnliche gesundheitsschädliche Konsequenzen wie für größere Partikel beschrieben zu erwarten sind.

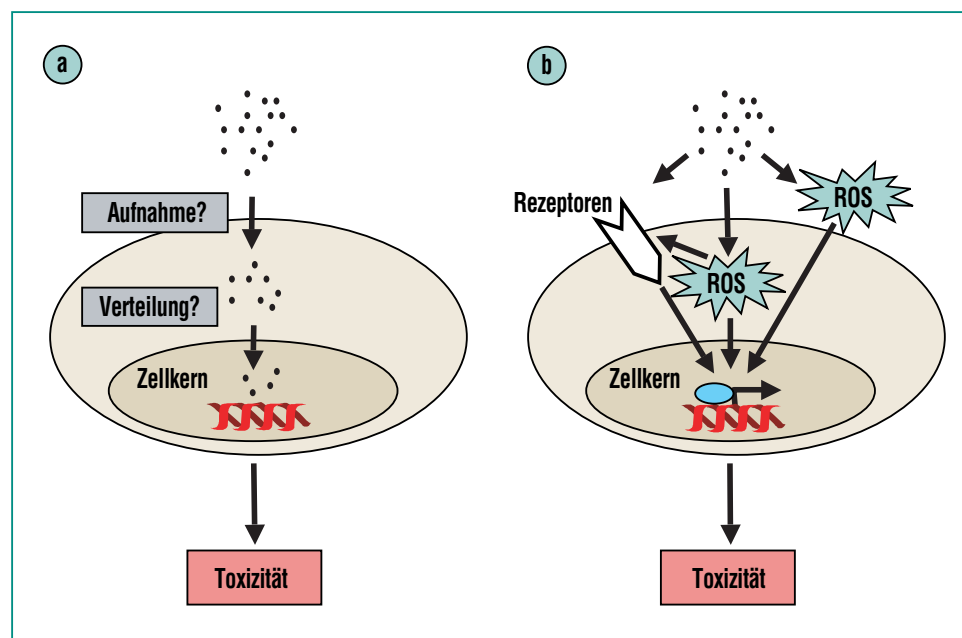
Ob Nanopartikel zusätzliche toxische Eigenschaften besitzen, ist Gegenstand aktueller Studien. Hierzu muss sowohl die Partikelgröße als auch die chemische Zusammensetzung betrachtet werden. Das vergrößerte Oberflächen-Volumen-Verhältnis sowie bei gleicher Masse die erhöhte Zahl und somit Oberfläche von Nanopar-

tikeln im Vergleich zu Mikropartikeln könnte dazu beitragen, dass chemische Reaktionen an Partikeloberflächen toxische Intermediate wie reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Dies wäre eine mögliche Erklärung, dass die relativ größere Oberfläche von Nanopartikeln eine erhöhte Toxizität bewirken kann.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt scheint die Verteilung in der Zelle und im Organismus zu sein, da Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe leichter in Zellen eindringen, andere Zellkompartimente erreichen (Abb. 1 a) und über die Lunge ins Blutsystem gelangen und somit prinzipiell im ganzen Körper wirken könnten [4].

### Nanotoxikologie – nur eine Radikal-Theorie?

Hauptaufnahmeweg von luftgetragenen Nanopartikeln ist die Inhalation. Nanopartikel dringen im Gegensatz zu größeren Partikeln tiefer in die Lunge ein und werden in den Lungenbläschen (Alveolarbereich) mit hoher Effizienz deponiert [7]. Die Wände der Lungenbläschen sind mit einer oberflächenaktiven Flüssigkeitsschicht (Surfactant) ausgekleidet, d. h. der erste Kontakt von Partikeln findet mit dieser Flüssigkeit statt. Wenn eine feste Oberfläche in eine wässrige Umgebung eingebracht wird, bilden sich dabei an der Ober-

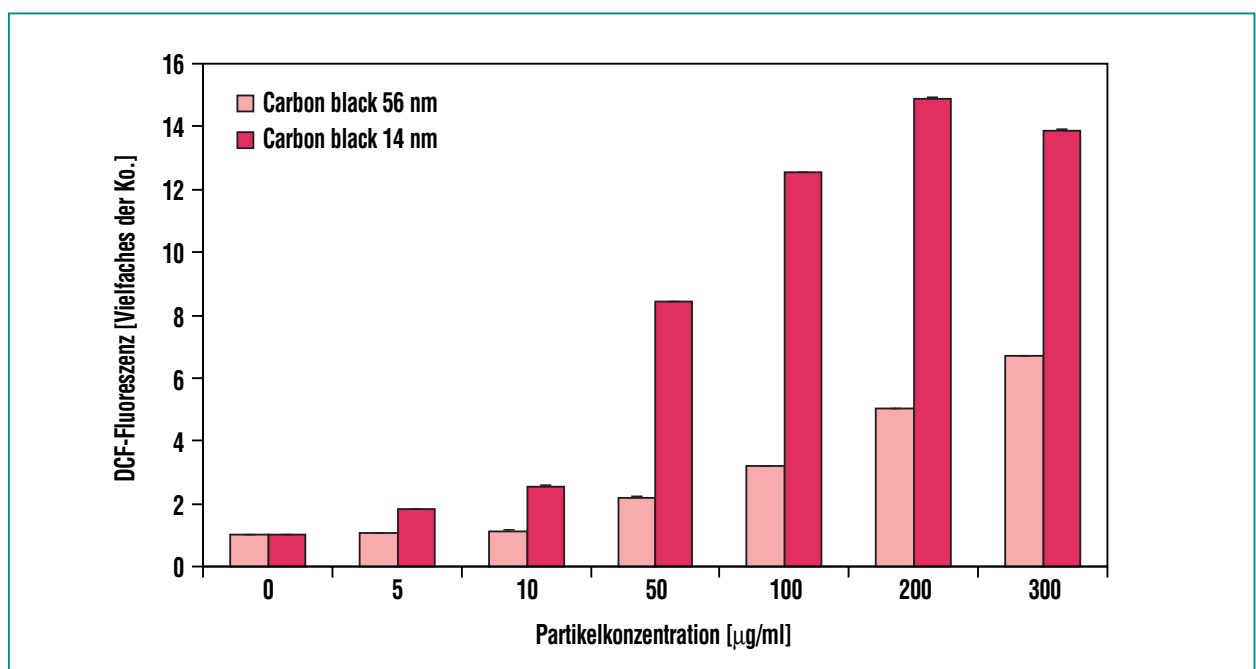


**Abb. 1: Zelluläre Partikelwirkungen. (A) Aufnahme und Verteilung von Partikeln.** Nanopartikel können im Vergleich zu größeren Partikeln andere Zellkompartimente (Mitochondrien, Zellkern) erreichen, wodurch grundsätzlich andere biologische und möglicherweise toxische Wirkungen auftreten können. **(B) Partikel können außerhalb von Zellen ROS generieren und/oder mit zellulären Rezeptoren interagieren.** In Zellen aufgenommene Partikel können ebenfalls ROS generieren. Nach Überschreiten einer kritischen Dosis sind die antioxidativen Entgiftungsmechanismen überfordert und es können toxische Wirkungen beobachtet werden.

fläche von metallischen Oxiden oder Mineralien Hydroxylgruppen, z. B. Si-OH und Ti-OH-Gruppen an der Oberfläche von SiO<sub>2</sub>- und TiO<sub>2</sub>-Partikeln. Selbst an der Oberfläche von Partikeln aus reinem Kohlenstoff können sich sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen (CO, CHO oder COOH) bilden. Das bedeutet, alle Oberflächen von Partikeln tragen in wässriger Suspension einige sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen [8]. Je kleiner die Partikel, umso größer ist ihre Oberfläche und damit die Zahl der funktionellen Gruppen. Bei einigen Partikelsorten kann diese Eigenschaft bereits in zellfreien Systemen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bzw. -radikalen (ROS, reactive oxygen species) wie z. B. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder das reaktive Hydroxylradikal ( $\cdot$ OH) führen (Abb. 2).

Trotz der großen Vielfalt der chemischen Zusammensetzung von Partikeln scheint sich ein gemeinsamer biologischer Mechanismus abzuzeichnen, der für die biologischen und toxischen Wirkungen verantwortlich ist – die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Bisher ist unklar, wie ROS durch Nanopartikel im Organismus induziert werden. Mögliche Quellen sind Reaktionen direkt an der Partikeloberfläche sowie enzymatische Vorgänge innerhalb von Zellen, die durch Partikel stimuliert werden und somit indirekt mehr ROS erzeugen. Ebenso unbekannt ist, an welchem Zielort, d. h. innerhalb oder außerhalb der Zelle, Nanopartikel ROS erzeugen, um Wirkungen zu entfalten (Abb. 1 b). Genaue Kenntnisse zur ROS-Entstehung bieten einen Ansatz, um Partikeleigenschaften oder zell-

luläre Faktoren zu beeinflussen, wodurch schädliche Effekte reduziert bzw. verhindert werden könnten. Erst durch Klärung von toxischen Wirkmechanismen kann eine erfolgreiche Therapie gegen Vergiftungserscheinungen entwickelt werden. Ein bekanntes Beispiel ist die mitunter tödlich verlaufende Vergiftung, hervorgerufen durch überdosiertes Paracetamol, ein häufig verwendetes Fieber- und Schmerzmedikament. Hierbei wird durch frühzeitige Gabe von N-Acetylcystein (ACC) (auch als Schleimlöser aus der Apotheke bekannt) die Anreicherung toxischer Abbauprodukte des Paracetamols verhindert, wodurch die weitere Vergiftung verhindert und therapiert wird. Bis zu einem gewissen Grad kann die Zelle durch eigene antioxidative Mechanismen, z. B. dem Glutathion-



**Abb. 2:** Bildung von ROS durch Carbon Black Nanopartikel im zellfreien System. In Anwesenheit von kleineren Partikeln (Primärpartikel 14 nm) wird nicht-fluoreszierendes Dichlor-Dihydro-Fluoreszein (H<sub>2</sub>DCF) stärker zu der fluoreszierenden Substanz Dichlor-Fluoreszein (DCF) oxidiert als mit größeren Partikeln (Primärpartikel 56 nm).

system, oxidativem Stress gegensteuern. Wenn die oxidativen Prozesse jedoch überwiegen, reagiert die Zelle mit der Aktivierung intrazellulärer Signalwege mit dem Ziel, die antioxidative Kapazität zu erhöhen. Hierbei spielen redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, AP-1 oder Nrf2, eine entscheidende Rolle. Nach Aktivierung wandern diese in den Zellkern und erhöhen die Expression von Genen, die für antioxidative Proteine kodieren. Die genannten Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 sind möglicherweise ebenso an den durch Nanopartikel erzeugten Entzündungsreaktionen beteiligt. Als Folge von zu starkem oxidativem Stress können biologische Moleküle wie Proteine und Lipide modifiziert werden, was ihre Funktion beeinflusst und zum Zelltod führen kann. Längerfristige Konsequenzen ergeben sich aus oxidativer Schädigung der DNS (Genotoxizität), welche zur Zellentartung und Tumorentstehung beitragen. In welchem Umfang Nanopartikel genotoxisch sind, ist eine der momentan vorrangig diskutierten Fragen.

Obwohl die Hypothese, dass Nanopartikel ihre Effekte durch die anfängliche ROS-Produktion bewirken, durch einige Befunde gestützt wird [9], sind andere Wirkmechanismen denkbar. So werden an der Zellmembran befindliche Rezeptoren, die externe Signale ins Zellinnere weiterleiten, durch Nanopartikel aktiviert [10]. Die zugrunde liegenden Aktivierungsmechanismen sind bisher nicht verstanden und könnten auf der einen Seite wiederum durch ROS-Wirkungen erklärbar sein oder aber durch andere Prinzipien

wie beispielsweise einer direkten durch Partikelbindung induzierten Konformationsänderung des Rezeptorproteins verursacht werden (Abb. 1 b). Nanopartikel sind, im Gegensatz zu Mikropartikeln, in der Größenordnung von Viren, für welche die Zelle verschiedene Signalwege besitzt, um sich zu verteidigen. Diese so genannten „Gefahr-Rezeptoren“ könnten ebenso auf Nanopartikel reagieren und zu deren biologischen Wirkungen beitragen. In wieweit ROS-unabhängige Effekte zur Nanopartikeltoxikologie beitragen, kann durch Verhinderung der ROS-Produktion und anschließender Analyse der verbleibenden Reaktionen überprüft werden. Zusätzliche Ansätze, die beispielsweise alle Veränderungen in der Genexpression einer Zelle oder einem Modellorganismus detektieren, erlauben eine unvoreingenommene Untersuchung und führen hoffentlich zu einem umfassenderen Verständnis der Nanopartikelwirkungen. Außer mechanistischen Studien sind in der Toxikologie Dosis-Wirkungsbeziehungen grundlegend, um möglicherweise Grenzwerte am Arbeitsplatz und in der Umwelt festzulegen („Was ist das giftigste, alle Ding sind giftig, und nichts ohne giftig. Allein die Dosis macht, das ein Ding kein giftig ist.“ Paracelsus, 16. Jh.). Dafür werden sensitive Messverfahren zur Quantifizierung von Nanopartikeln in Aerosolen benötigt. Weiterhin ist die Etablierung von Sensoren zur Messung der Nanopartikeldeposition notwendig, um Expositionen und mögliche toxische Wirkungen direkt vor Ort besser abschätzen zu können. Grundlegende Vorarbeiten zur Erreichung dieses Ziels wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tech-

nische Chemie, Bereich Thermische Abfallbehandlung (ITC-TAB) durch definierte Exposition von humanen Lungenepithelzellen mit Modellstäuben und Analyse von Entzündungsparametern geleistet [11].

## Zusammenfassung und Ausblick

Um mögliche schädliche Wirkungen von Nanopartikeln für den Menschen und die Umwelt rechtzeitig zu erkennen, abzuschätzen und zu verhindern, ist das Verständnis ihrer biologischen und toxischen Wirkungen Voraussetzung. Ausgehend von Untersuchungen an größeren Partikeln fokussiert sich die toxikologische Forschung momentan auf die Entstehung von reaktiven Zwischenstufen wie beispielsweise reaktiven Sauerstoffspezies als Hauptursache der Nanopartikelwirkungen. Außer der Erzeugung von Radikalen sind andere bisher wenig verstandene neue Wirkungen von Nanopartikeln denkbar, die sich aus ihrer im Vergleich zu größeren Partikeln anderen Verteilung in der Zelle und Organismus sowie anderer physikalisch-chemischen Eigenschaften ergeben könnten. Die Identifizierung kritischer Partikeleigenschaften, die für toxische aber nicht für die gewünschten Wirkungen verantwortlich sind, ermöglicht es eventuell Nanopartikel ohne oder mit stark reduzierten Nebenwirkungen zu erzeugen. Ähnlich wie für größere Partikel sollte die Aufklärung der Wirkmechanismen sowie der Dosis-Wirkungsbeziehungen von Nanopartikeln die Grundlage für die Etablierung von Grenzwerten zur Exposition am Arbeitsplatz und in der Umwelt ermöglichen.

## Literatur

- [1] J.M. Wörle-Knirsch, H.F. Krug, K. Kern, S. Diabaté, *Forschungszentrum Karlsruhe – Nachrichten* 37 (2005) 83–88
- [2] A. Kappos, P. Bruckmann, T. Eikmann, N. Englert, U. Heinrich, P. Höpfe, E. Koch, N. Metz, K. Rauchfuss, P. Rombout, J. Schabronath, V. Schulz-Klemp, M.F. Spallek, H.E. Wichmann, W. Kreyling, G.H.M. Krause, *Umweltmed. Forsch. Prax.* 8 (2003) 257–278
- [3] P.G. Weidler, R. Nüesch, *Forschungszentrum Karlsruhe – Nachrichten* 37 (2005) 74–78
- [4] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 823–839
- [5] M. Geiser, B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schurch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, H. Im, V.J. Heyder, P. Gehr, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 1555–1560
- [6] H. Schulz, V. Harder, A. Ibaldo-Mulli, A. Khandoga, W. Koenig, F. Krombach, R. Radykewicz, A. Stampfl, B. Thorand, A. Peters, *J. Aerosol Med.* 18 (2005) 1–22
- [7] W.G. Kreyling, M. Semmler, W. Möller, *J. Aerosol Med.* 17 (2004) 140–152
- [8] A.J. Ghio, M.D. Cohen, *Inhal. Toxicol.* 17 (2005) 709–716
- [9] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, *Science* 311 (2006) 622–627
- [10] U. Sydlik, K. Bierhals, M. Soufi, J. Abel, R.P. Schins, K. Unfried, *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 291 (2006) L72–L733
- [11] S. Mülhopt, H.R. Paur, S. Diabaté, H.F. Krug, *Advanced Environmental Monitoring in press* (2007)