

Gibt es ein Risiko von Nanomaterialien aus dermatologischer Sicht?

Tilman Butz
Universität Leipzig

BfR Berlin-Marienfelde
10. November 2008

Übersicht

Risiko = Exposition x Gefahr

hier: Exposition von vitalem Gewebe

und zellulärer Respons auf Kontakt mit Nanopartikeln

- Nanopartikel
- Formulierungen
- Hautproben und topische Anwendung
- Methoden
 - Tape stripping
 - Franz Diffusionszelle

Übersicht Fortsetzung

- Mikroskopie:
 - Laser scanning microscopy
 - HRTEM
 - μ -PIXE/RBS/STIM
 - Autoradiographie
- Wechselwirkung von Nanopartikeln mit Hautzellen:
 - in vitro Respons
- Atomic Force Microscopy (AFM): in vivo Respons
- Zusammenfassung

Nanopartikel

- Größe
- Morphologie
- Kristallinität / Amorphizität / Porosität
- Coating
- Agglomeration/Aggregation
- UV-Absorption
- Photokatalytischer Effekt ?

Nanopartikel (Auswahl)

- Metalloxide:

TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , CeO_2

- Quantum Dots
- (Fullerene)

TiO₂ Nanopartikel

- P25 Degussa/Evonik

Plättchen, mittlerer Primärpartikeldurchmesser 21 nm, ungecoated

- Eusolex T-2000 Merck

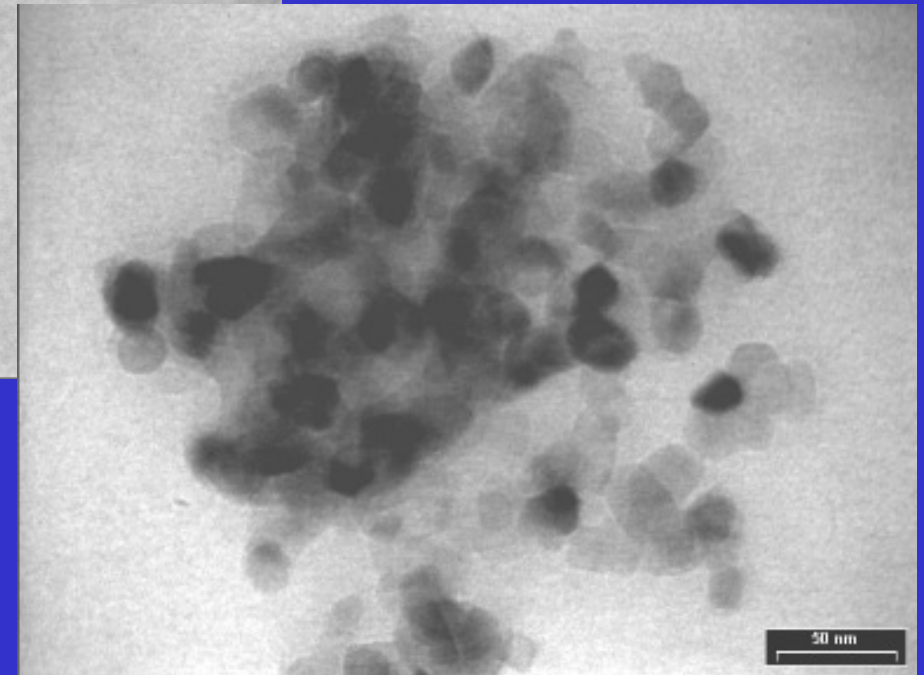
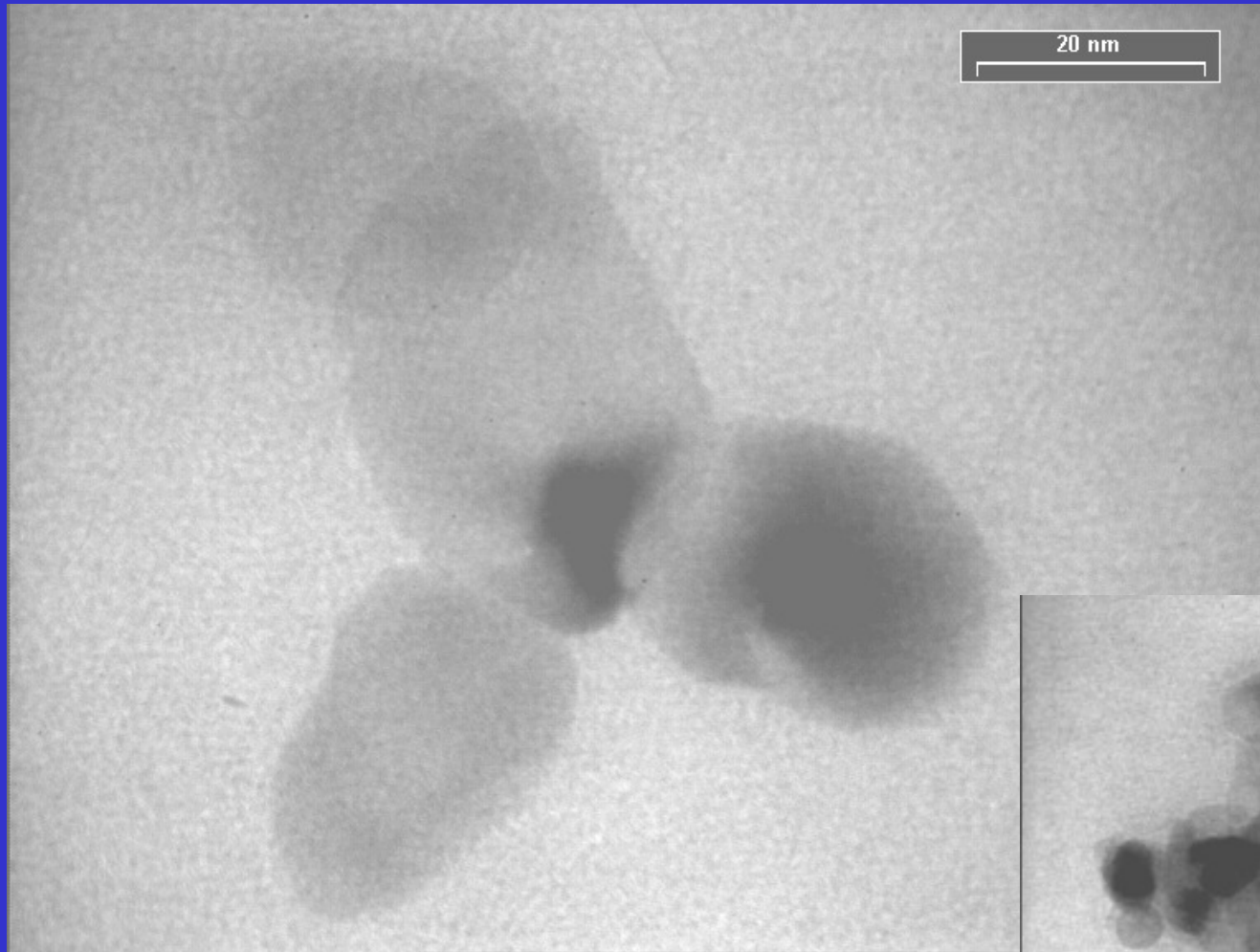
lanzettförmig, ca. 20 nm breit und ca. 100 nm lang, ge-coated

- Pigmentary grade, pharmaceutical grade Sigma

enthält auch eine ultrafeine Fraktion

- und viele andere ...

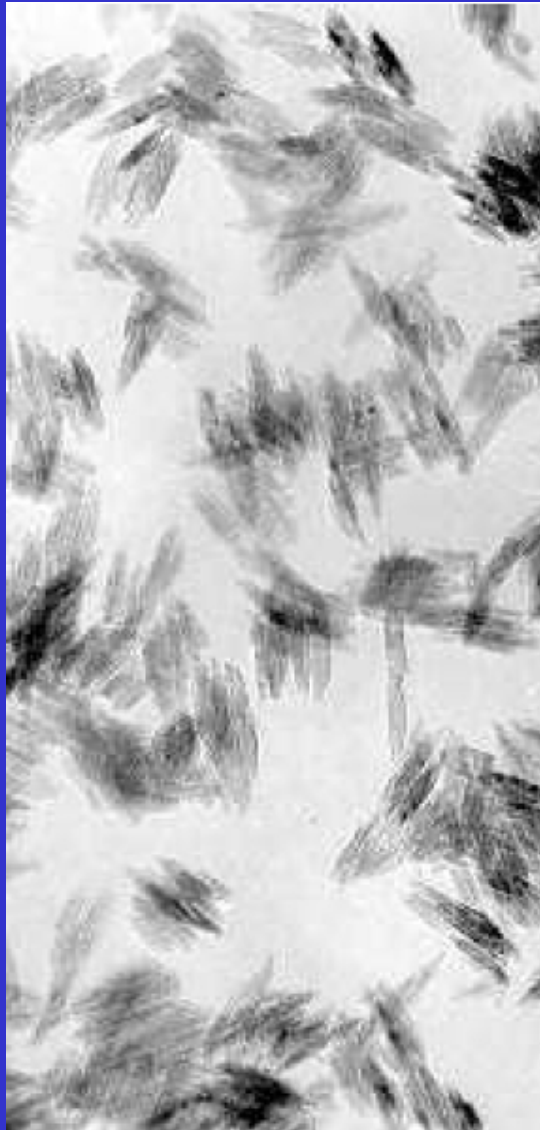
TEM von veraschter Eucerin Micropigment Lotion 25



Wagner, Uni Leipzig

Eusolex T-2000 MERCK

Primäre Partikel 20 nm
Modifikation: Rutil



Spezifikation:

TiO ₂ :	76.0 – 82.0 %
Al ₂ O ₃ :	8.0 – 11.0 %
SiO ₂ :	1.0 – 3.0 %
As:	≤ 0.0001 %
Hg:	≤ 0.0001 %
Pb:	≤ 0.001 %
Sb:	≤ 0.0002 %

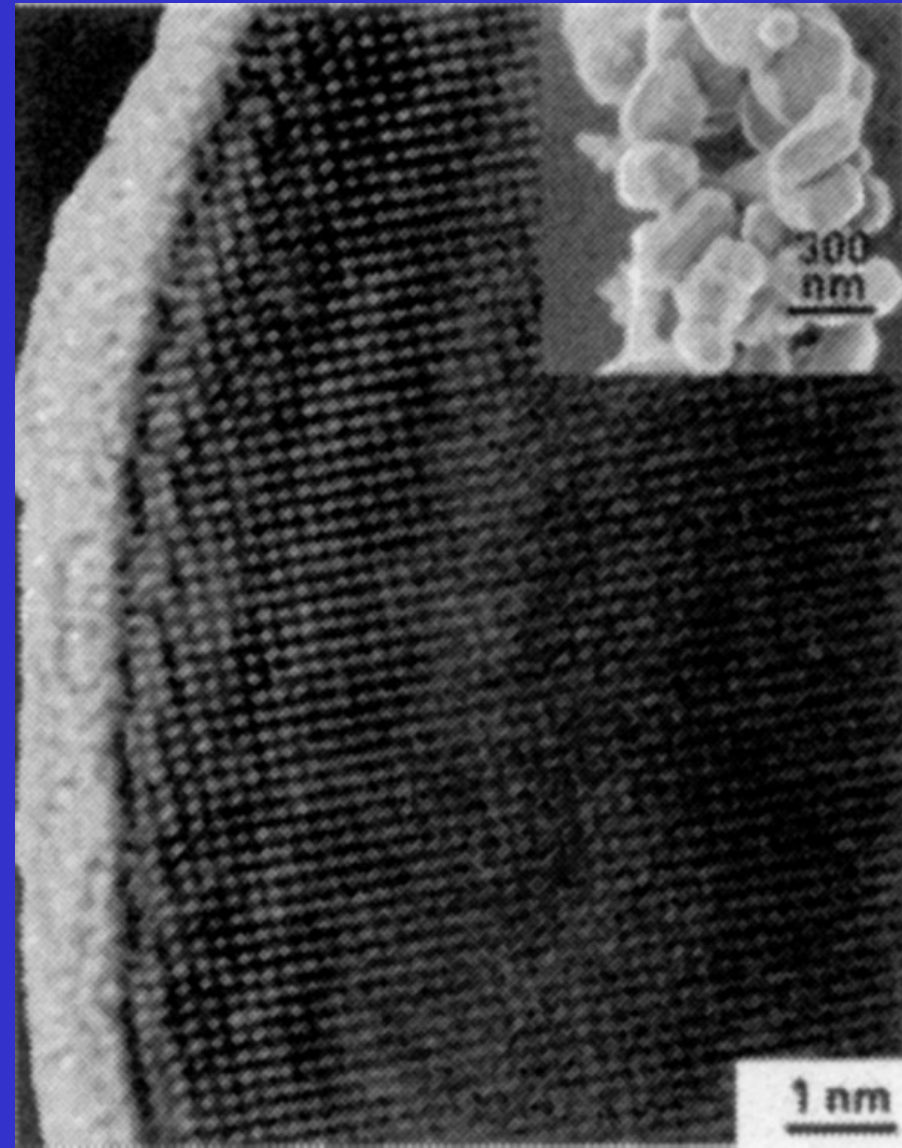
pH (10% Suspension):
5.5 – 7.5

mikrobiologischer Test:
< 100 KBE/g
keine pathogenen Keime

Keinen Staub einatmen!

Quelle: Merck-Prospekt

Kristallines TiO_2 ge-coated mit amorpher Silica-Schicht



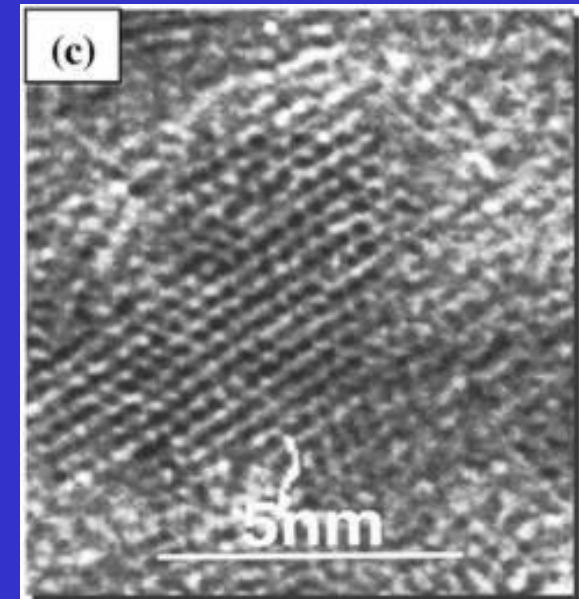
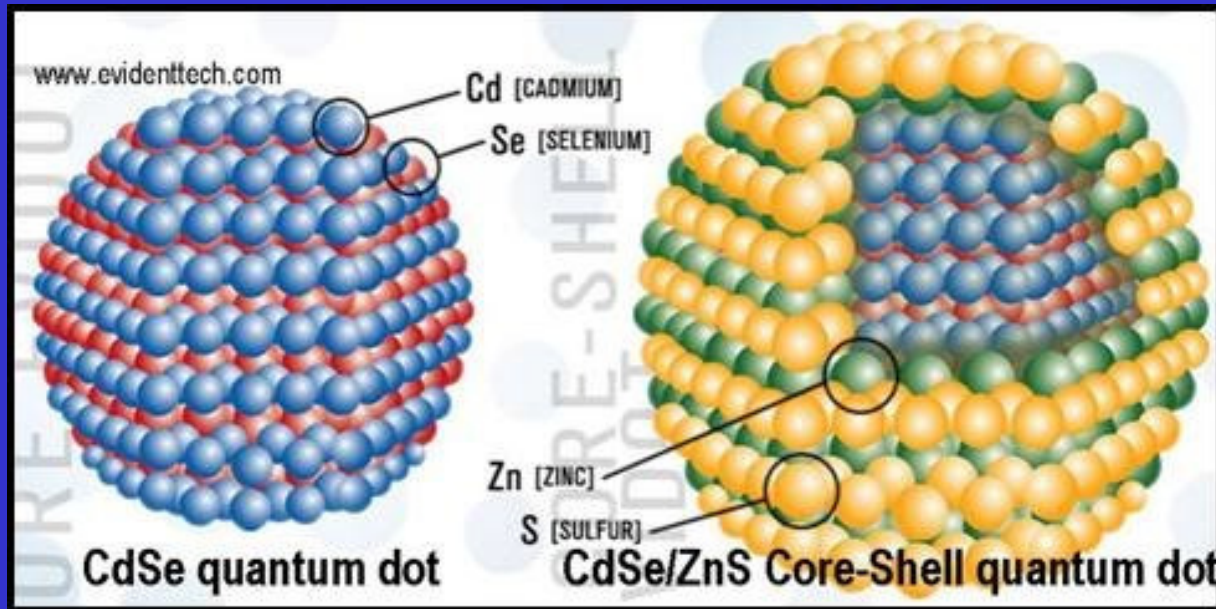
Aus:

Future Technologies Vol.54

Industrial application of nanomaterials –
chances and risks

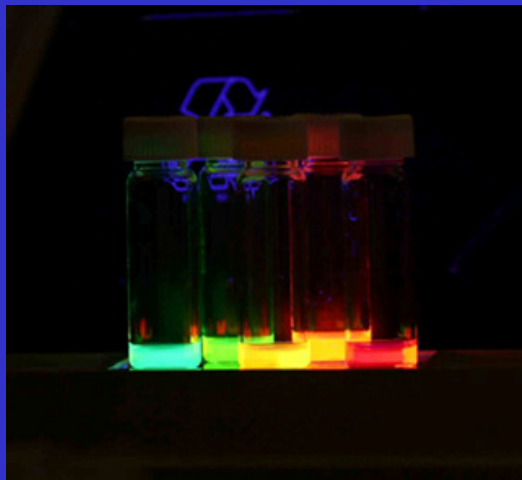
W. Luther (ed.)

Quantum dots



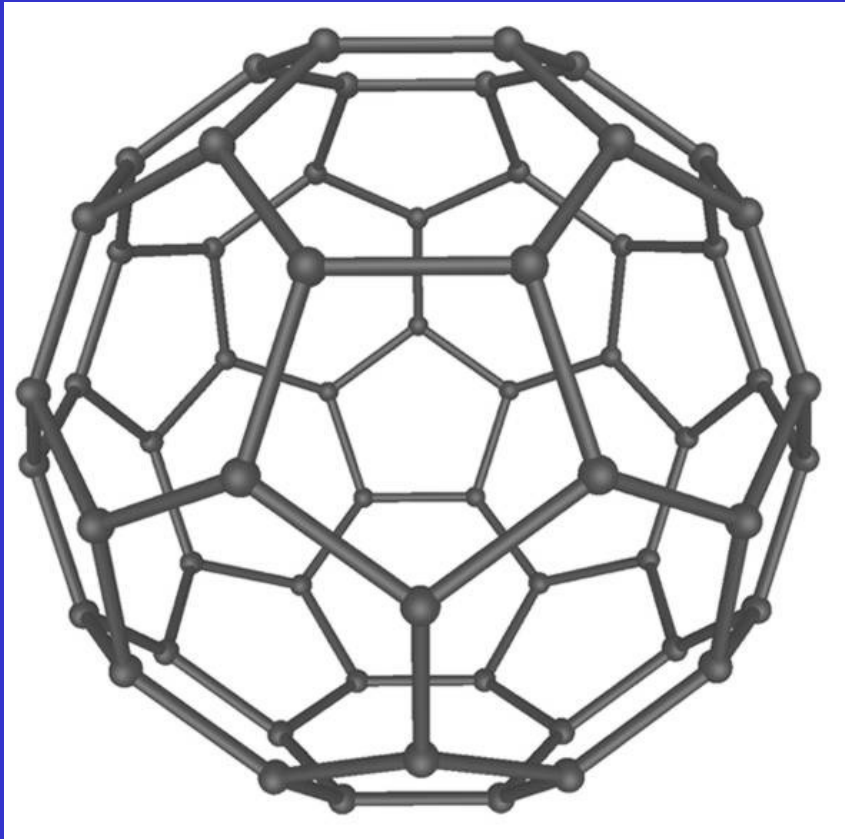
- Fluoreszenz Marker
- Farbe hängt von Größe ab

High Resolution
Transmission
Electron Microscopy

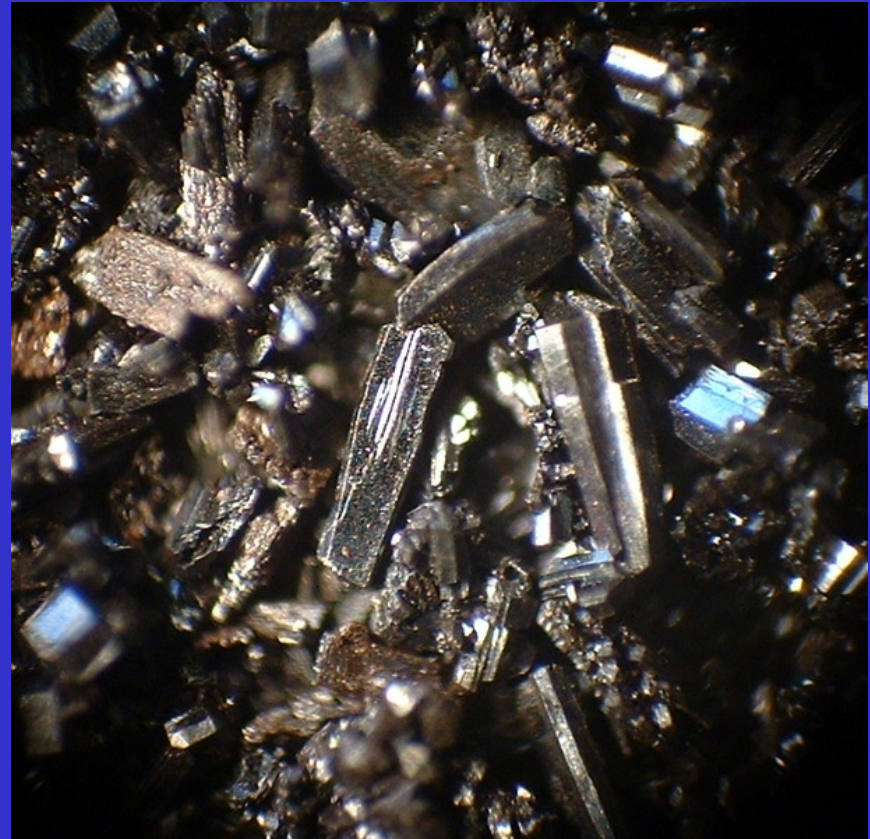


- Anwendungen z.B. in der Nano-Medizin

Kohlenstoff-Allotrop: Fullerene



C60 Molekül
Kein Nanopartikel!



kristalline Fullerene
Nanopartikel / Bulk

Tape Stripping

Topische
Anwendung:

2 ml/cm²

Expositionszeit:

0.5 -48 h

Entfernung von
überstehender
Formulierung

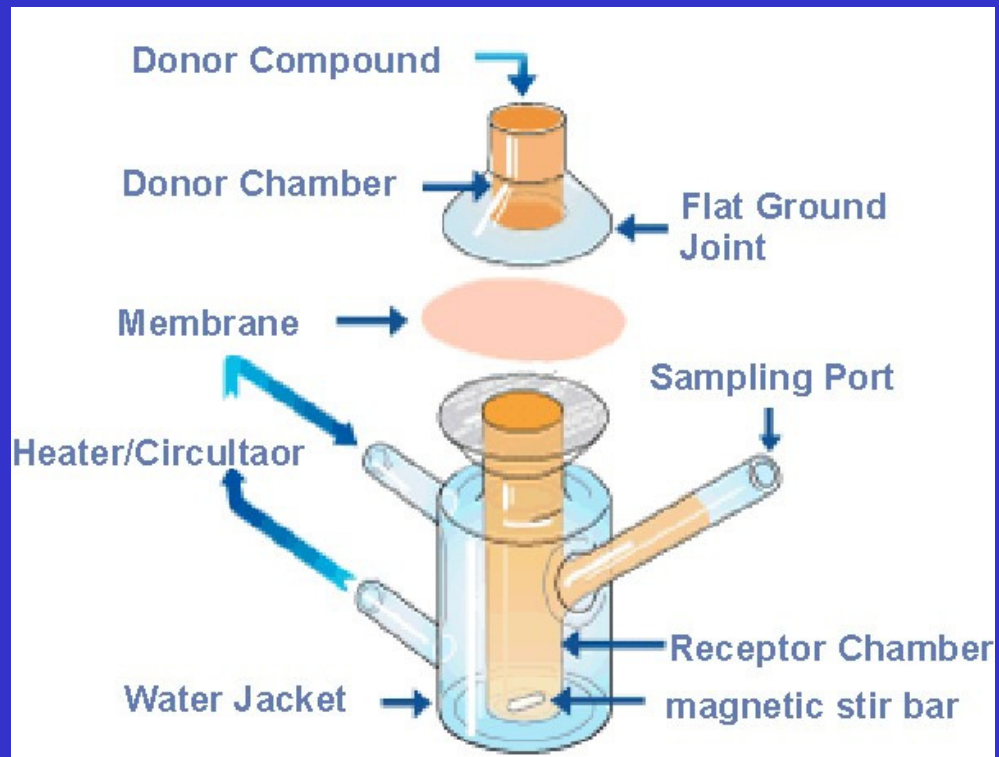
10-20 Tapes



Vor- und Nachteile von Tape Stripping

- Vorteil:
einfach
- Nachteile:
liefert keine Tiefenprofile, auch nicht bei
Quantifizierung der gestrippten Korneozyten
wegen Hautfalten und Haarfollikeln
liefert nur Information über die Hornhaut

Franz Diffusions-Zelle



aus: SES GmbH, Germany

Membran: ausgeschnittene Haut

Vor- und Nachteile der Franz-Diffusionszelle

- Vorteil:
Quantifizierung der Rezeptorflüssigkeit
- Nachteile:
liefert keine Information über Penetrationspfade
Ergebnis hängt von der Integrität der Hautmembran auf einer Nanometerskala ab
unterscheidet nicht zwischen Partikeln und Molekülen bei löslichen Partikeln

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

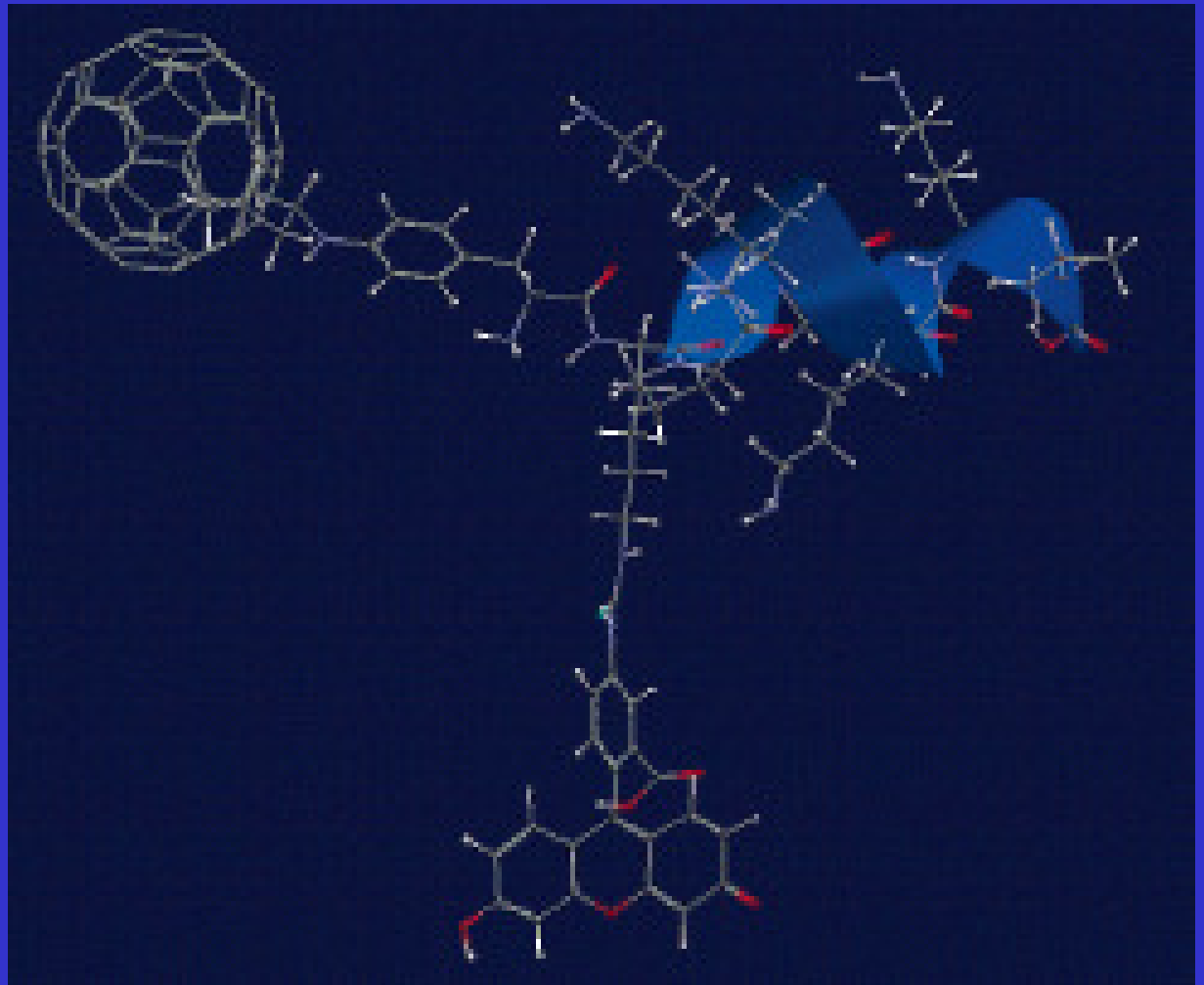
- Vorteile:
 - liefert 3D-Bilder
 - gute Tiefenauflösung mit zwei-Photonen Mikroskop
- Nachteil:
 - benötigt Fluoreszenz-Label (außer Quantum Dots)

Funktionalisierte Bucky-Balls

Fulleren-substituiertes
Phenylalanin Derivat
einer
Kernlokalisierungspeptid-
sequenz

Beispiel für Penetration:
Molekül ist klein genug
(1 nm).

J. G. Rouse et al. Nano
Letters 7(1)(2007)155



Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Quantum dots

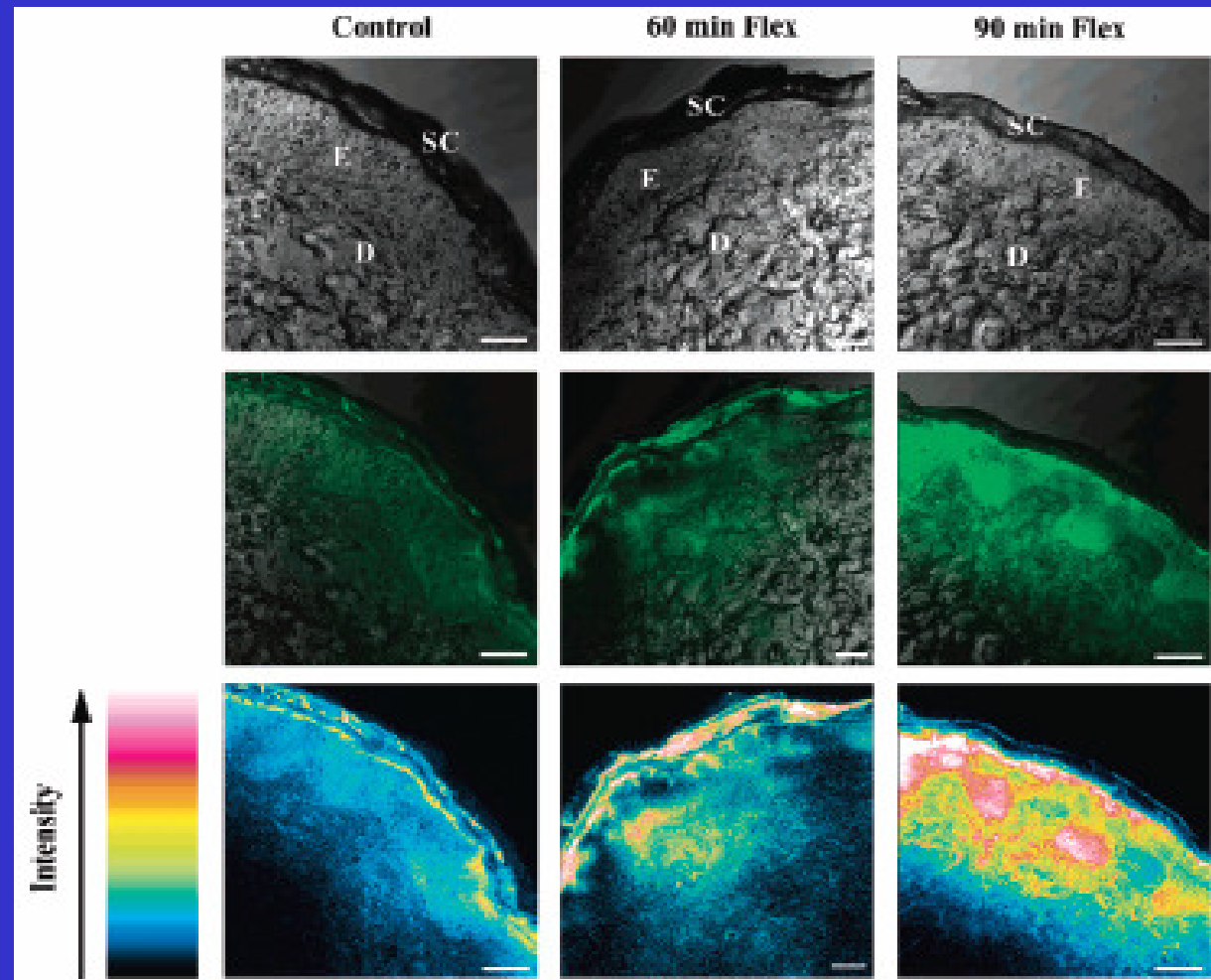
Flexed Skin

Confocal

Fluorescence

green

Confocal-DIC



Hochauflösende Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (HRTEM)

Vorteil:

visualisiert individuelle Partikel

mit EDX: Element-Zusammensetzung

Nachteile:

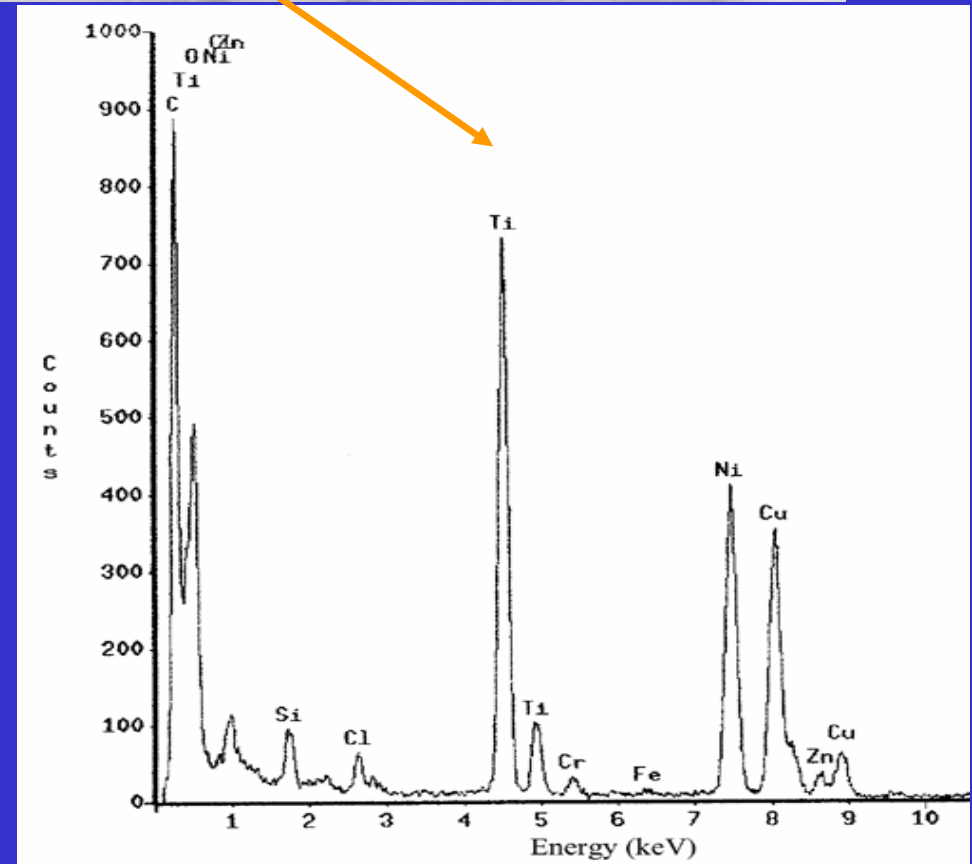
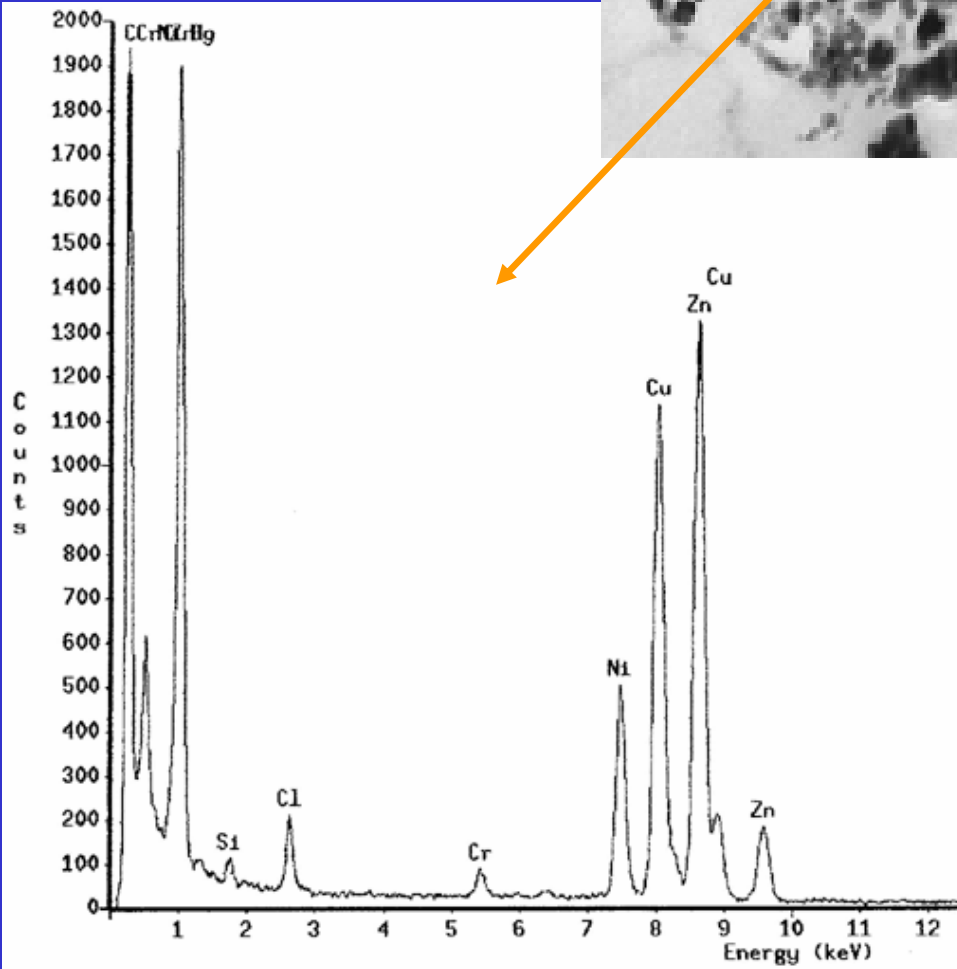
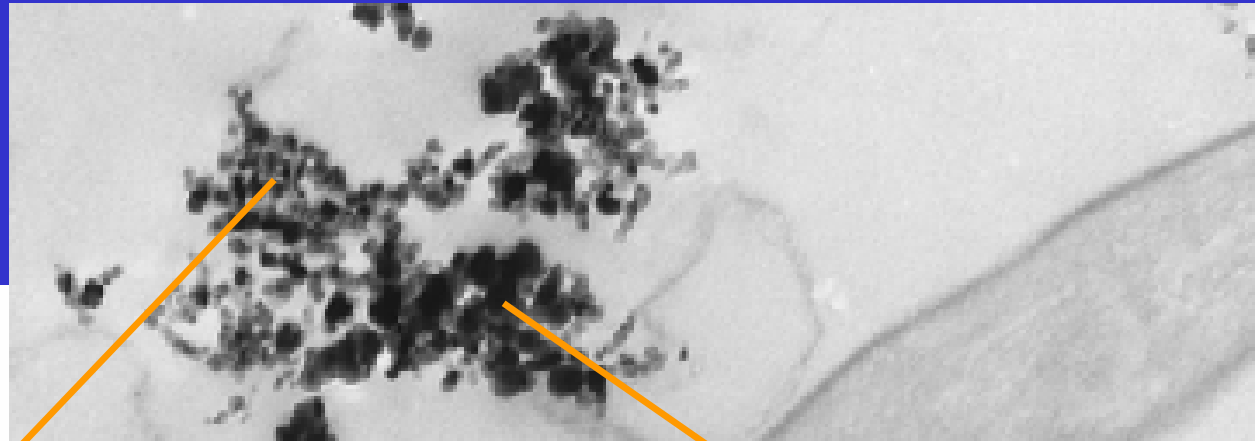
Benötigt ultra-dünne Querschnitte (60-100 nm)

Mehrere Präparationsschritte (Präparationsartefakte ?)

Eingeschränktes Gesichtsfeld (repräsentativ?)

TEM / Elektronen-Mikrosonde von Hautquerschnitt

Keine Gegenfärbung



Hautproben bei NANODERM

- Schweinehaut
- Gesunde Humanhaut von Freiwilligen
(beide Geschlechter, verschiedene Alter, kaukasisch, farbig)
- Humane Vorhaut transplantiert auf SCID-Maus
- Humane Haut-Explantate von Operationen
- Psoriatische Haut

Formulierungen 1

Dermatologische Formulierungen mit Eusolex T-2000

- | | | |
|----------------------|-------|-----------|
| 1. Eusolex T-2000 | 0.8 g | |
| Polyacrylatgel | | ad 16.0 g |
| 2. Eusolex T-2000 | 0.8 g | |
| Hydrophobes Basisgel | | ad 16.0 g |
| 3. Eusolex T-2000 | 0.8 g | |
| Isopropylmyristatgel | | ad 16.0 g |
| 4. Eusolex T-2000 | 1.0 g | |
| Microemulsion | | ad 20.0 g |

Formulierungen 2

Kommerziell erhältliche Produkte:

z.B.

- Eucerin Micropigment Creme 15
- Eucerin Micropigment Lotion 25
- Anthelios XP SPF60
- Avène 50

Schweinehaut-Biopsien

Kampagne	1.	2.	3.
Bereiche der Biopsien	Hals & Rücken	Innenseiten der Hinterbeine	Innenseiten der Hinterbeine
Vorbehandlung	Äthanol-Reinigung	nativ	<ul style="list-style-type: none">•nativ•Wasserspülung•Äthanol-Reinigung•tape stripped (10x)
Expositionszeit (Stunden)	8, 24, 48	0.25 – 2.25	0.3 – 2.75

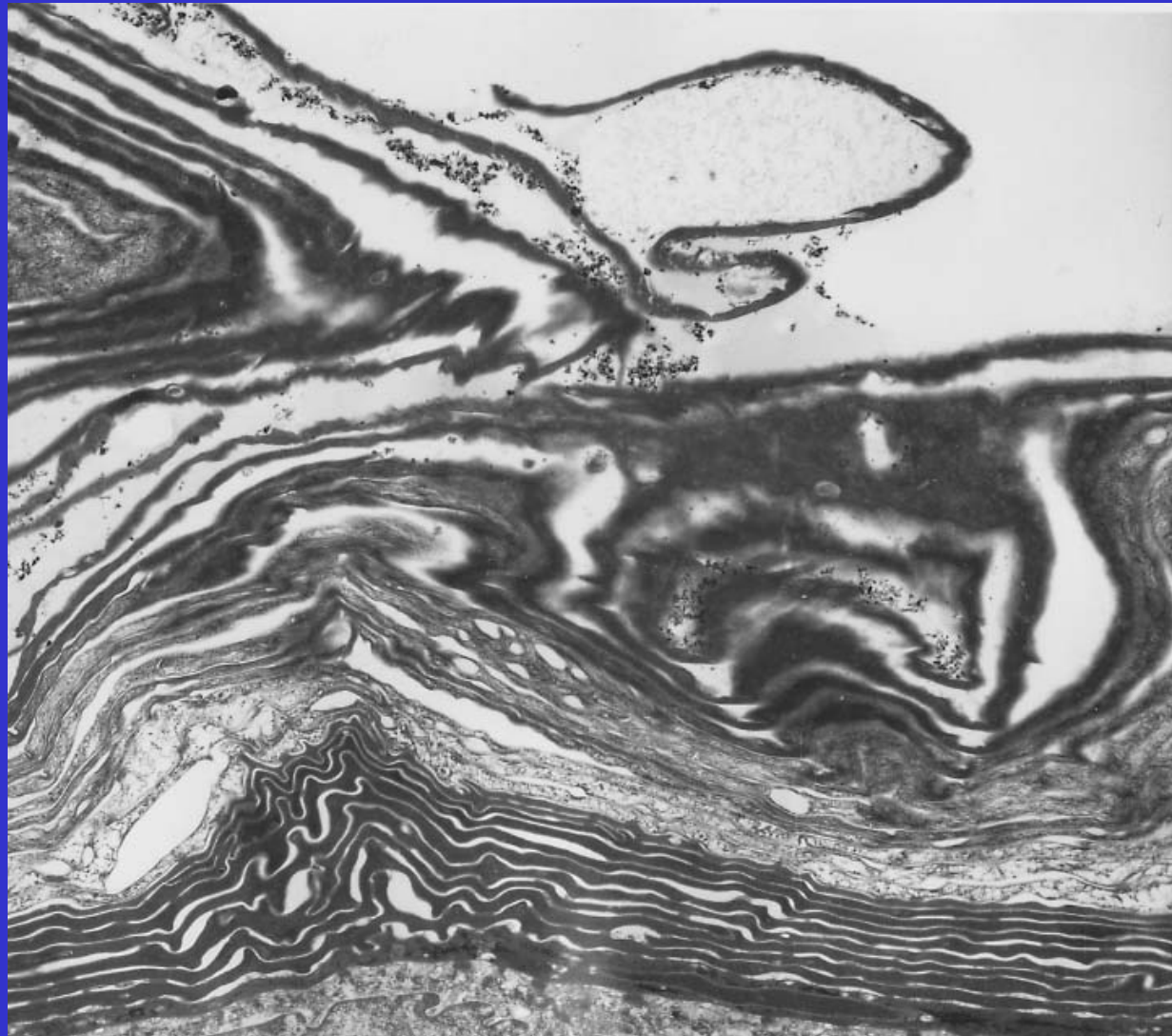


Bereiche der Biopsien:
Innenseiten der Hinterbeine



Stanzzylinder:
5 mm

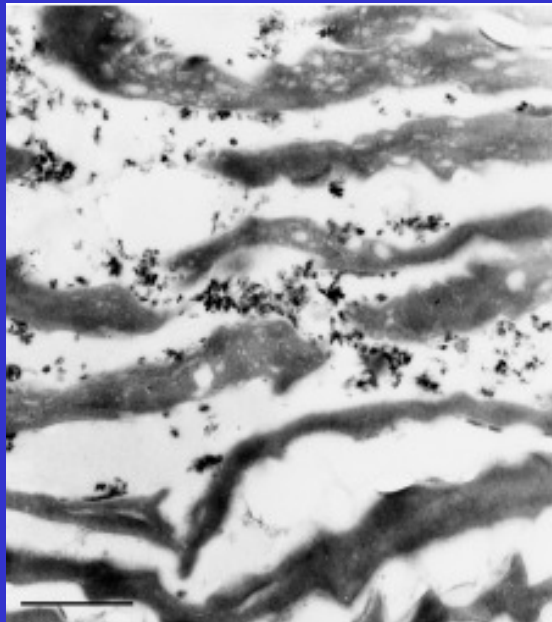
HRTEM 1



tiefe
Hautfalte

Querschnitt durch das *stratum corneum*

HRTEM-Bilder von Humanhaut- Querschnitten (Bordeaux)



TiO₂ im *stratum corneum*
disjunctum

s.c. disjunctum stripped

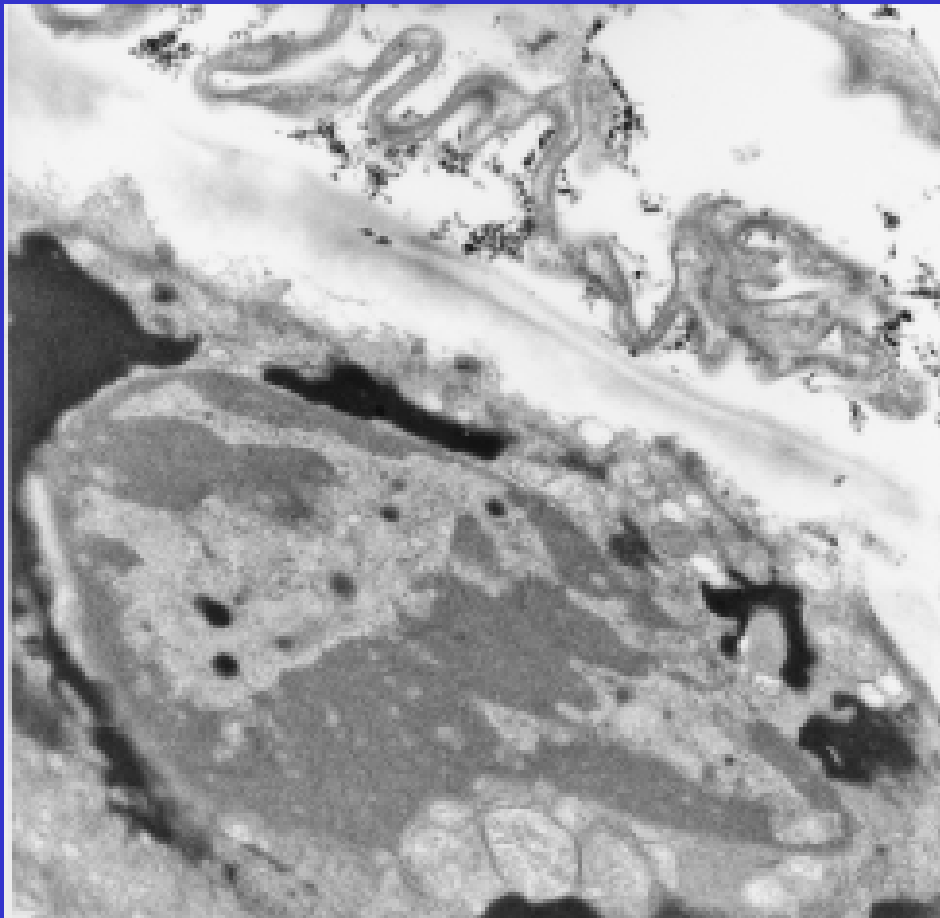


keine Penetration
in das *stratum*
corneum
compactum

Ähnliche Resultate für
weiblich/männlich, verschiedene Alter,
Kaukasier/Farbige

Expositionszeit spielt keine Rolle !

Humanhaut transplantiert auf SCID-Maus



Penetration bis zum *stratum lucidum*, nahe am *stratum granulosum* (vitalles Gewebe); allerdings war das *stratum corneum* außergewöhnlich dünn (3 Kerneozytenlagen)

Ionen-Mikroskopie: PIXE, RBS

Vorteile:

- einfache Probenpräparation
- liefert absolute Konzentrationen
- großes Gesichtsfeld plus Zoom-Option
- Präparationsartefakte können identifiziert werden

Nachteil:

- individuelle Nanopartikel werden nicht aufgelöst

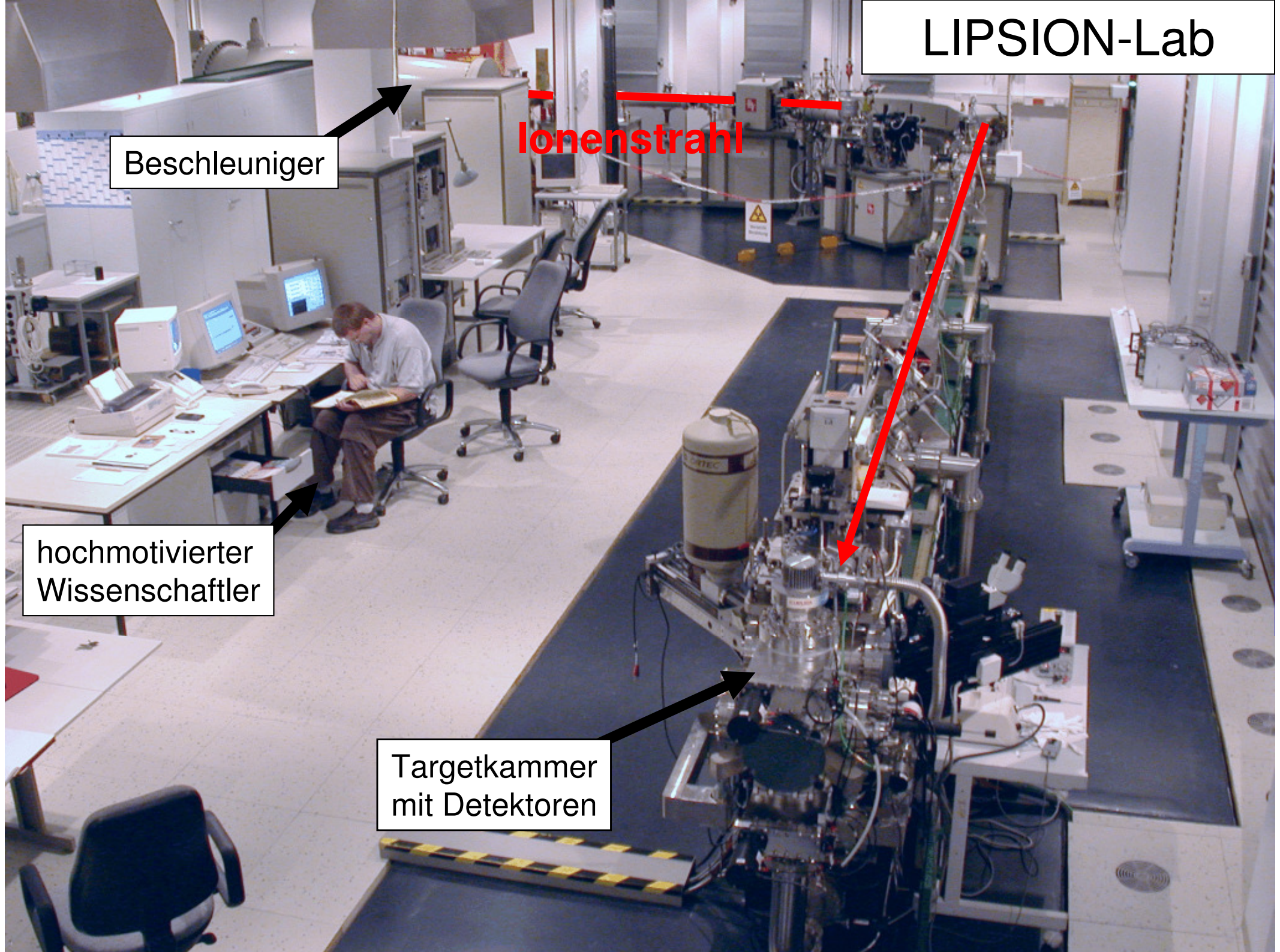
LIPSION-Lab

Beschleuniger

Ionenstrahl

hochmotivierter
Wissenschaftler

Targetkammer
mit Detektoren

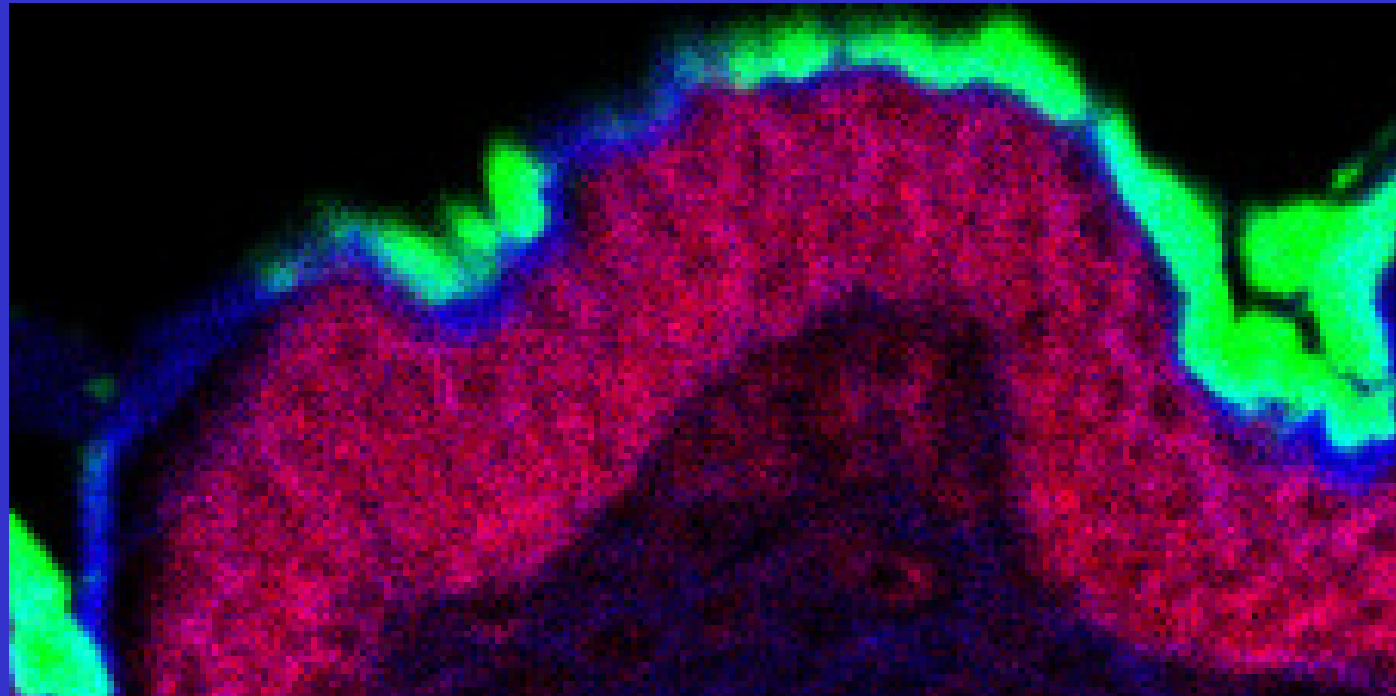


10 μm dicke Probe montiert auf Probenhalter



PIXE an Schweinehaut -Querschnitt

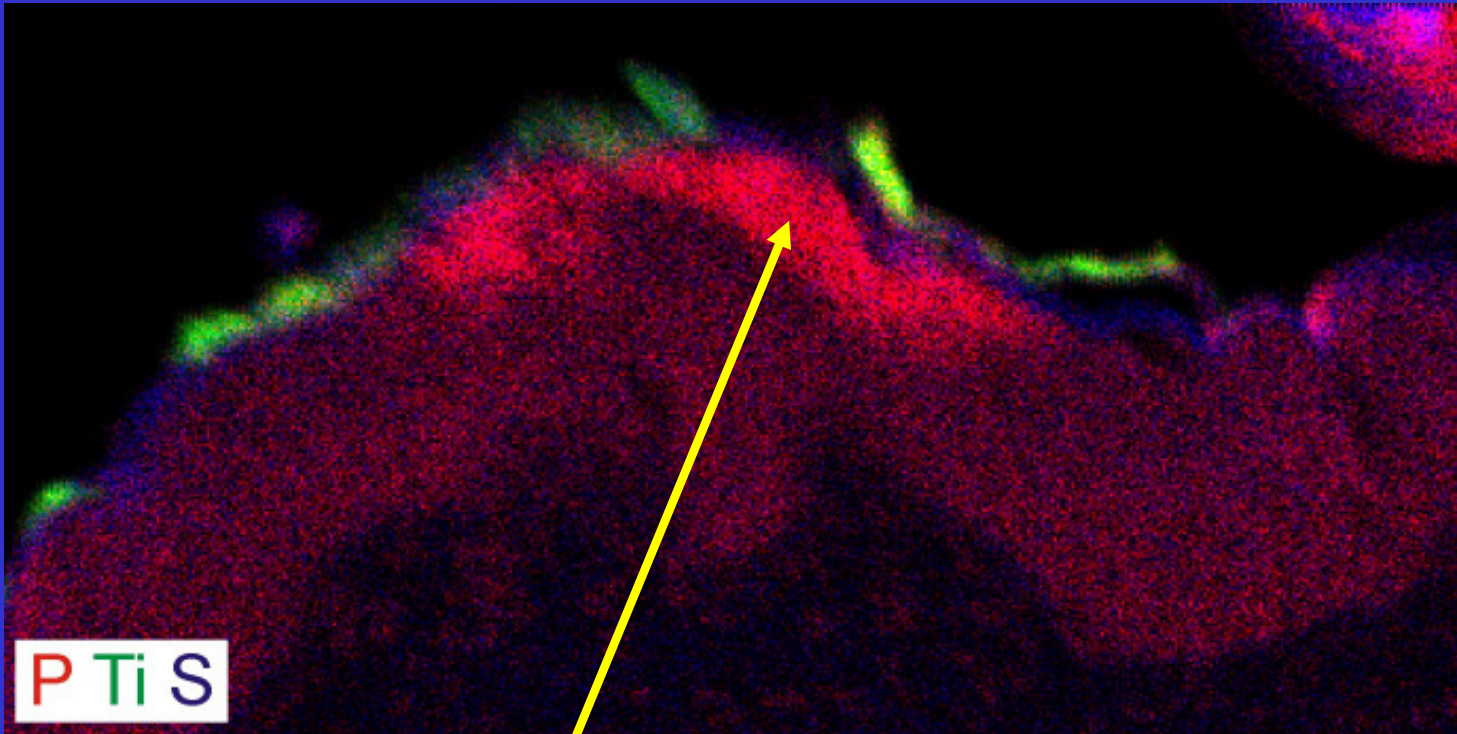
rot: P
blau: S
grün: Ti



Klare Abgrenzung der Strata ohne Einfärbung:

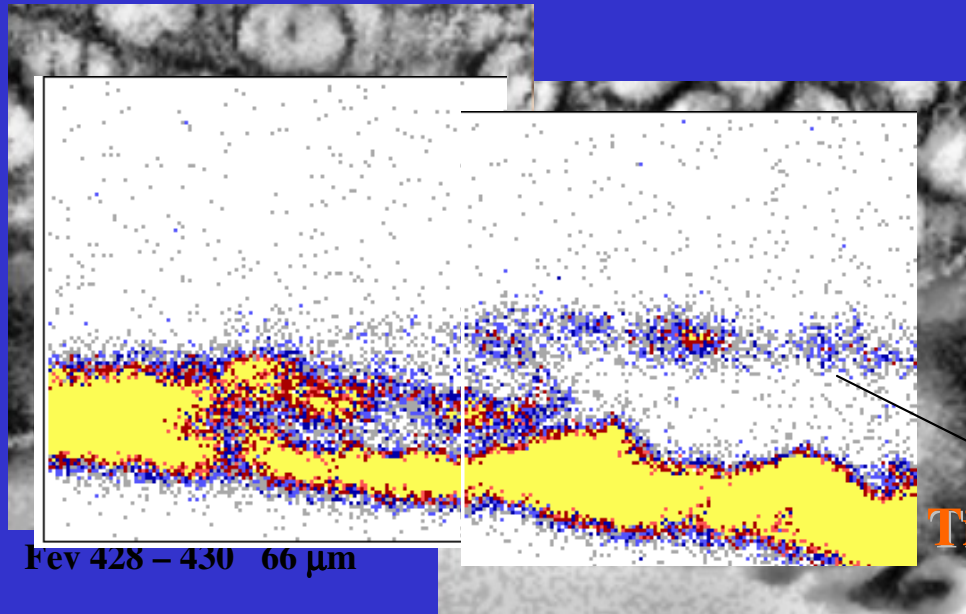
- *Stratum corneum*: schwefelreich
- *Stratum spinosum*: phosphorreich

Schnelle Transporter: Liposomenformulierung



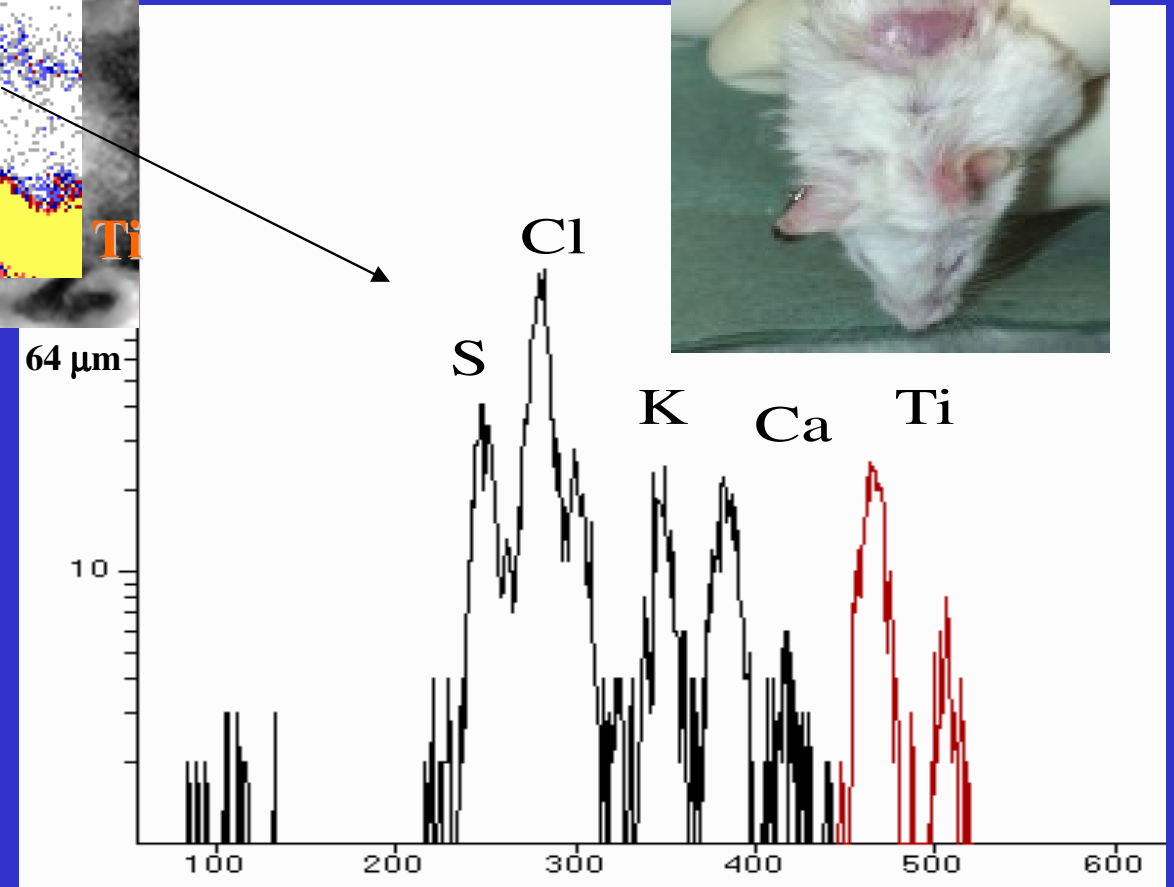
Hoher Phosphorgehalt wegen Liposomenpenetration

Humanhaut auf SCID-Maus



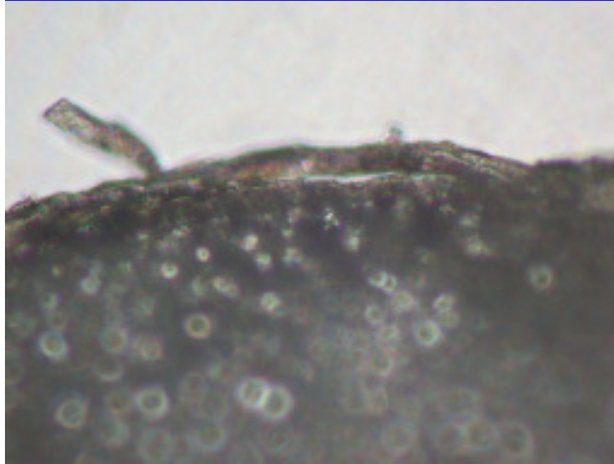
Signifikanter Ti-Gehalt im
stratum corneum compactum
und *stratum granulosum*

Bordeaux
Debrecen

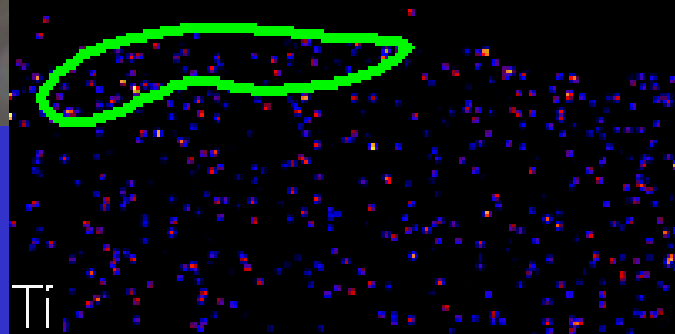
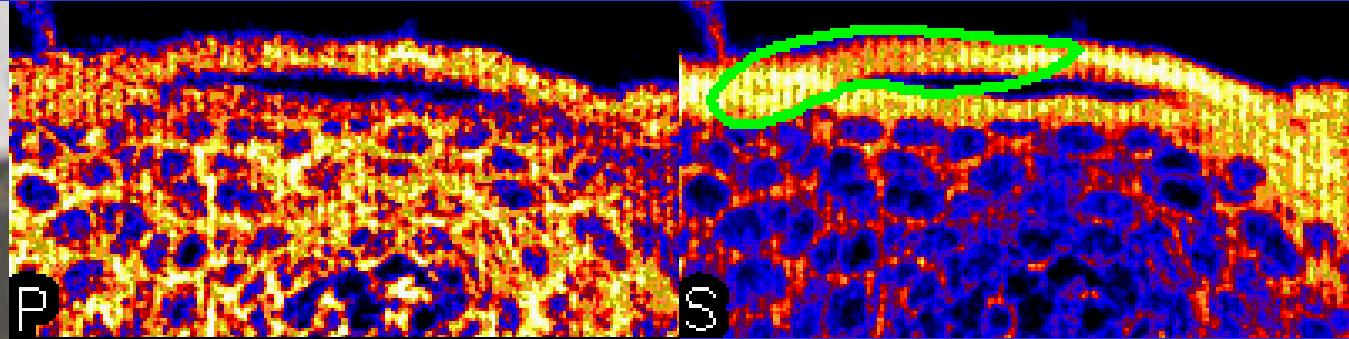


Psoriatische Haut

M38a1 map (200 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, 0.24 μC)



optisches Bild



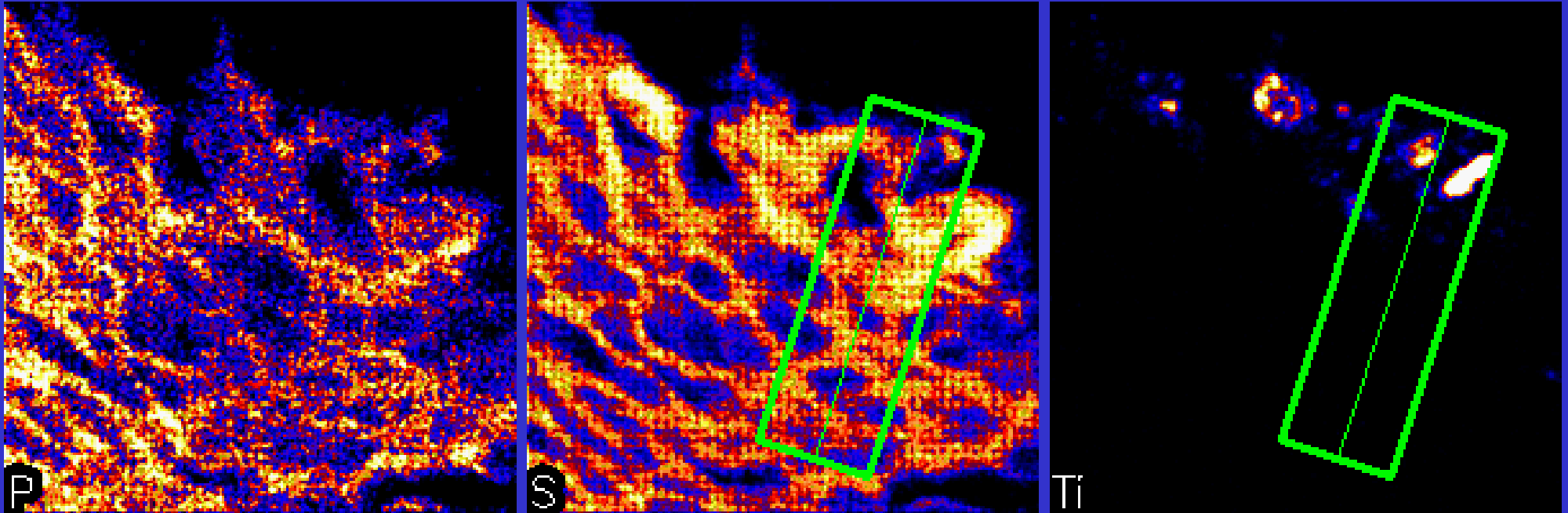
PIXE maps

In dem eingekreisten Bereich ist die Ti-Konzentration unter 8ppm
Es gibt eine klare Abgrenzung zwischen dem *stratum corneum* und dem *str. spinosum* im der S-map, nicht in der P-map (Hyperproliferation)

P	S	Cl	K	Ca	Ti
0,46%	1,15%	0,42%	0,21%	0,14%	<8 ppm

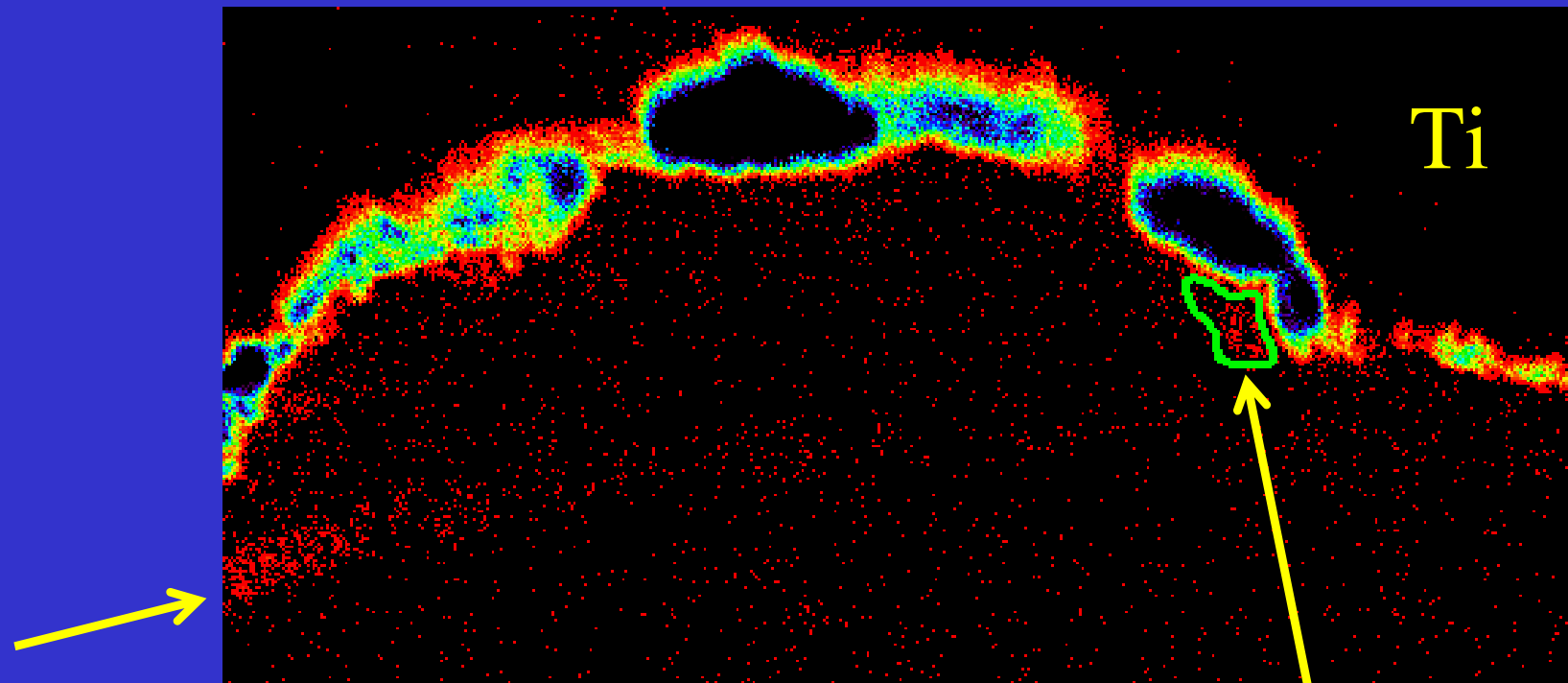
Psoriatische Haut

M37d12 map (100 μm \times 100 μm , 0.27 μC)



Ti ist hauptsächlich in den obersten 30 μm lokalisiert
Es gibt keine klare Grenze zwischen dem *stratum corneum* und dem *stratum spinosum*

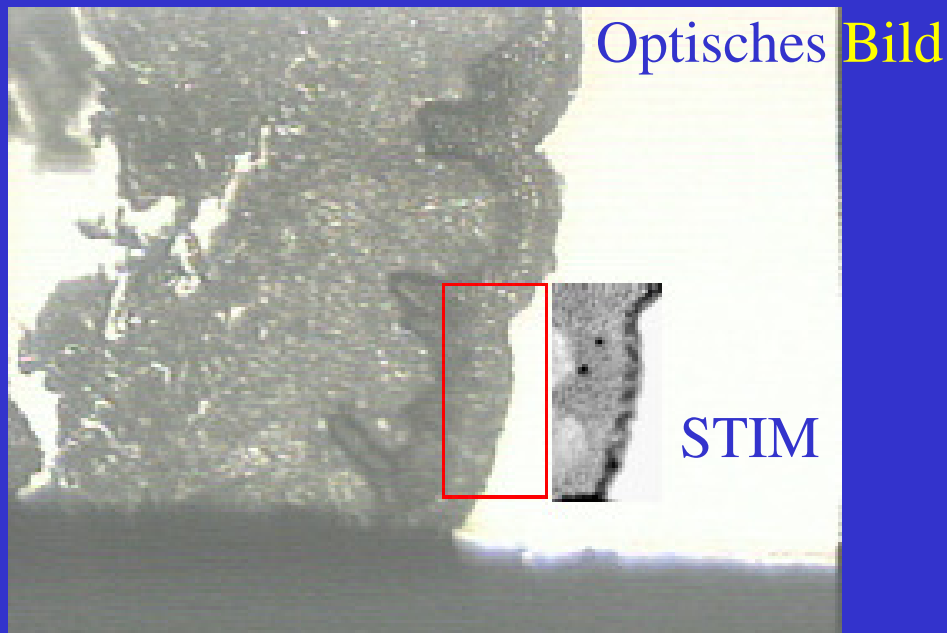
Kontamination oder Penetration ?



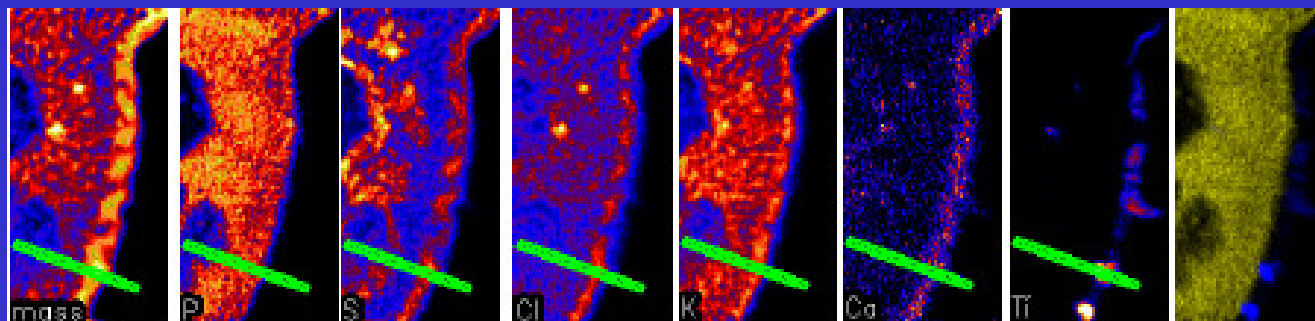
Schleifspur entlang der Schnittrichtung

Penetration?

Präparationsartefakte



Dunkle Spots im
optischen Bild
aufgrund von
abgelösten
Hornhaut-Partikeln



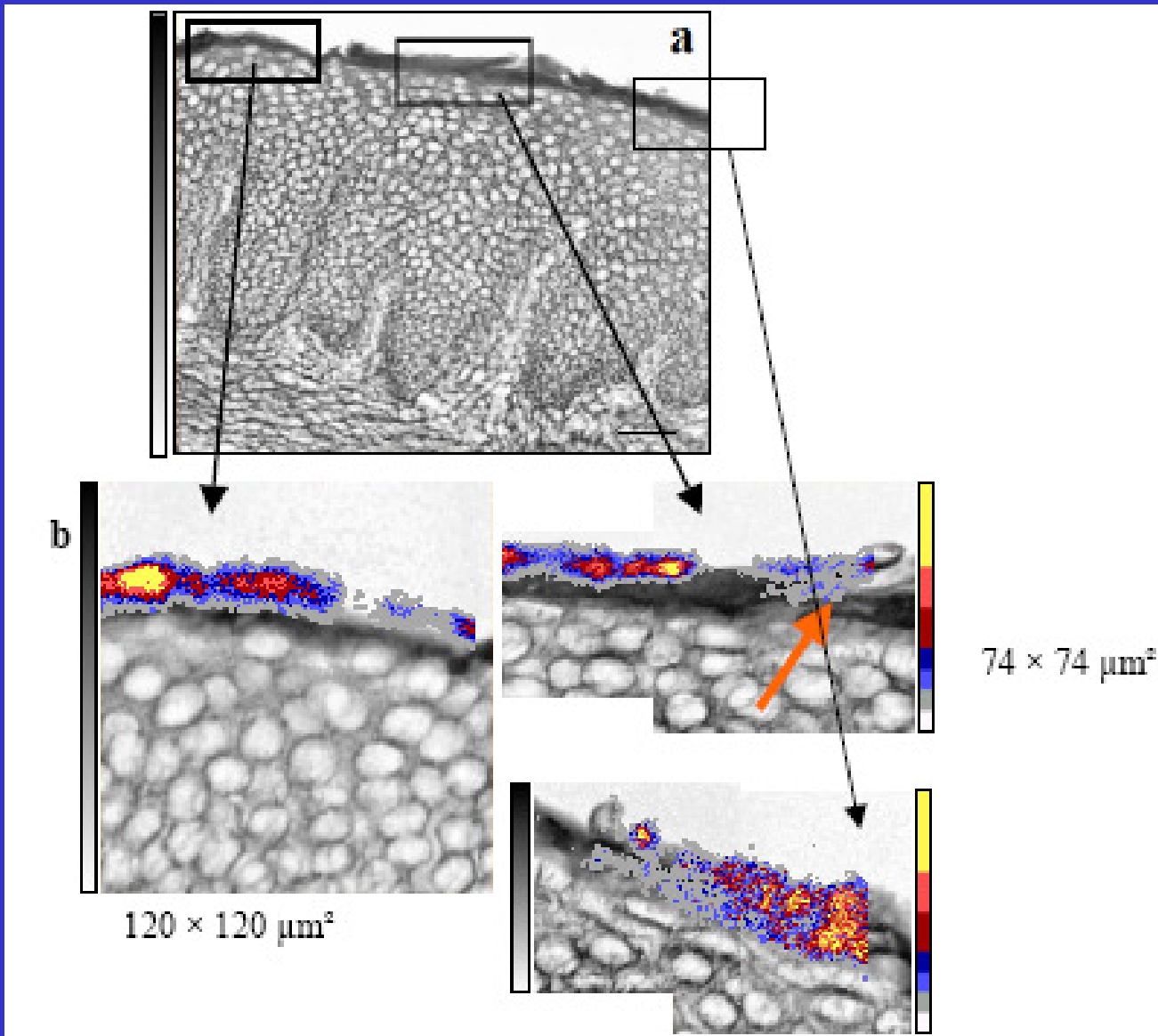
PIXE

Sind Mikroläsionen wichtig?

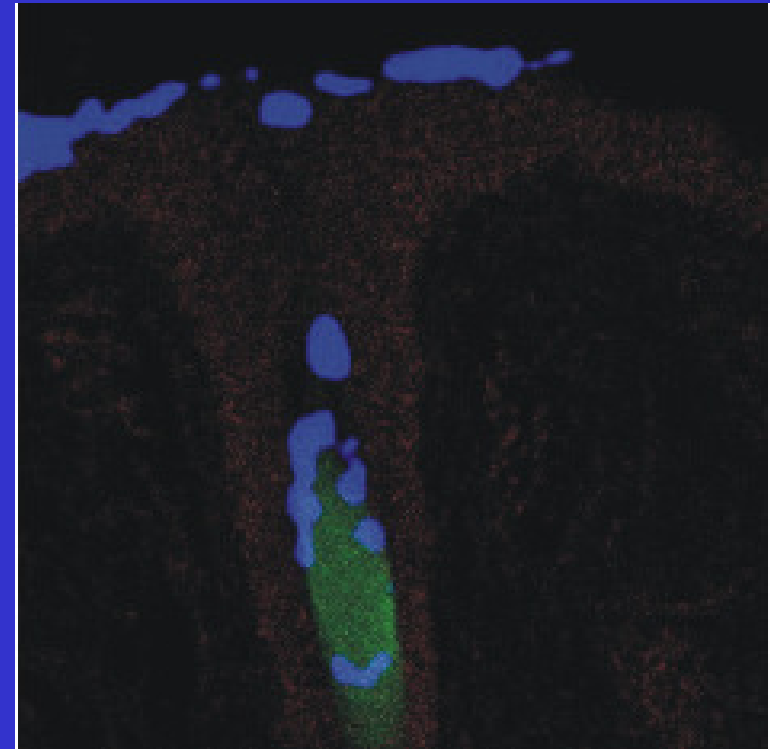
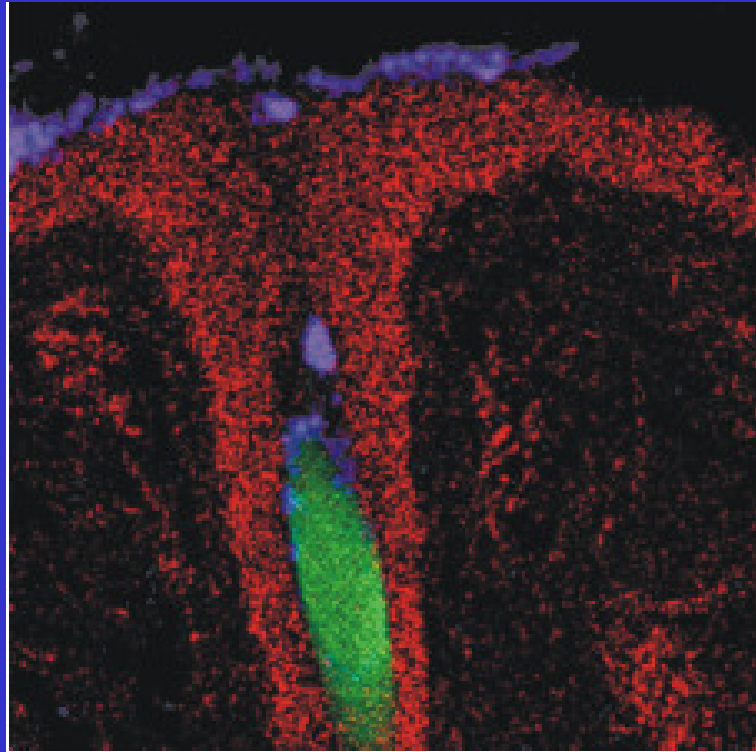
STIM and PIXE
Bilder

Anthelios SPF 60
24h/okklusiv

Penetration durch
das *stratum
corneum* kann mit
Mikroläsionen
assoziiert werden



Haar-Follikel



rot: P
grün: S
blau: Ti

400 μm x 400 μm

Penetration in vitales Gewebe?

Radioaktiv markiertes TiO_2 Autoradiographie mit Mikroemulsionen

Vorteile:

- ultrasensitiv

- individuelle Positronenspuren sind sichtbar

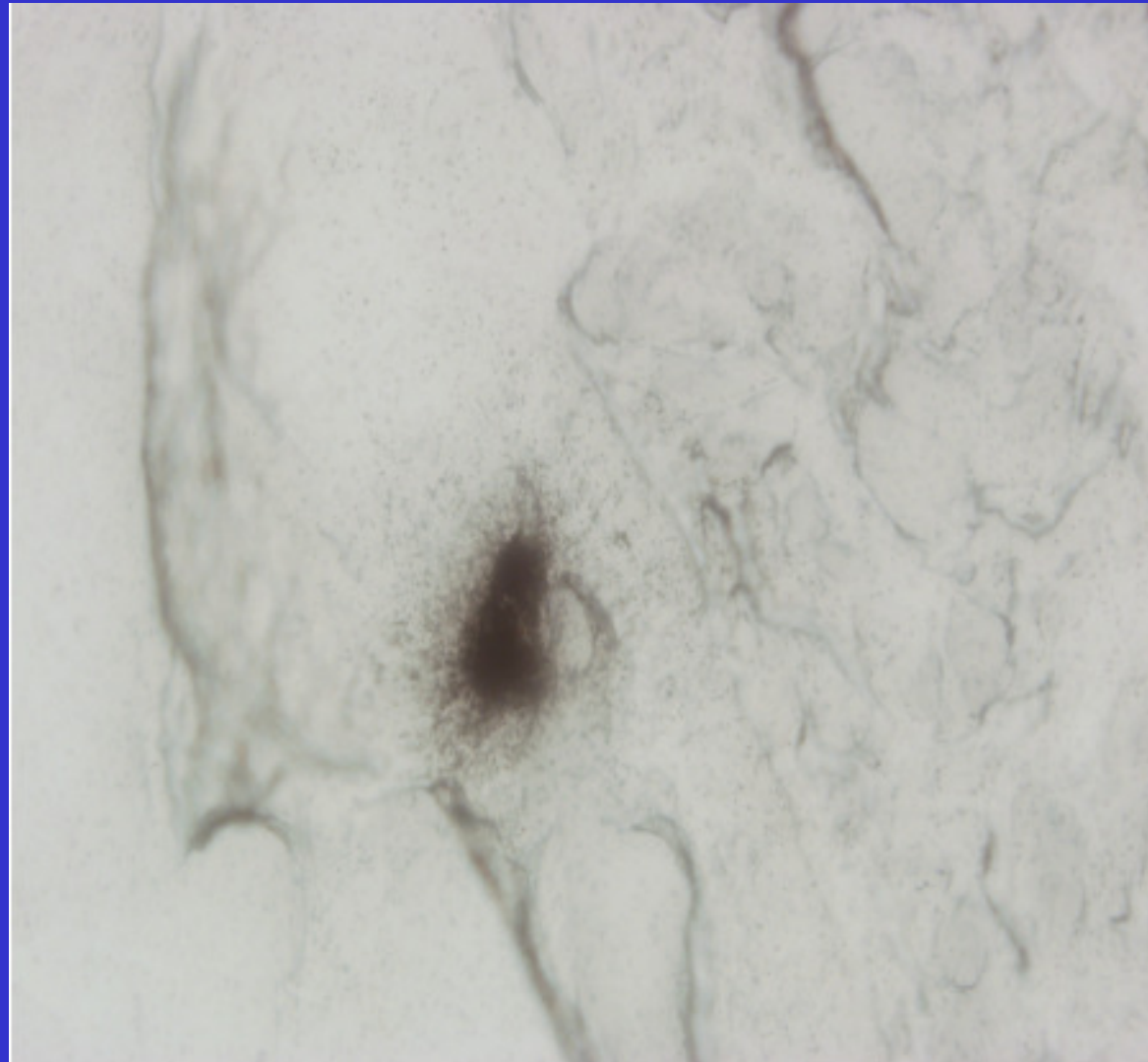
Nachteil:

- Kontaminationen sind schwierig zu vermeiden

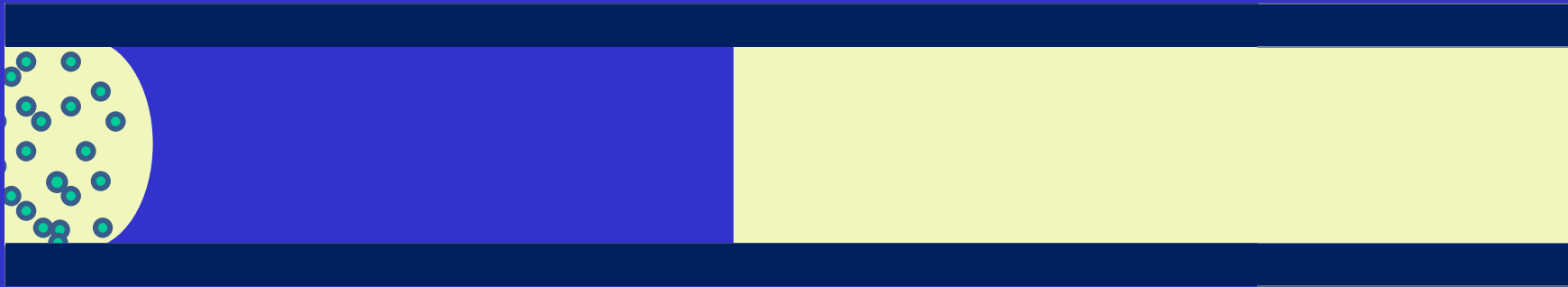
Autoradiographie mit Mikroemulsionen und ^{48}V -markiertem TiO_2

Hautfalte

individuelle
Positronen-
spuren sind
sichtbar



Transportmechanismus?



transient: mechanisches Einbringen

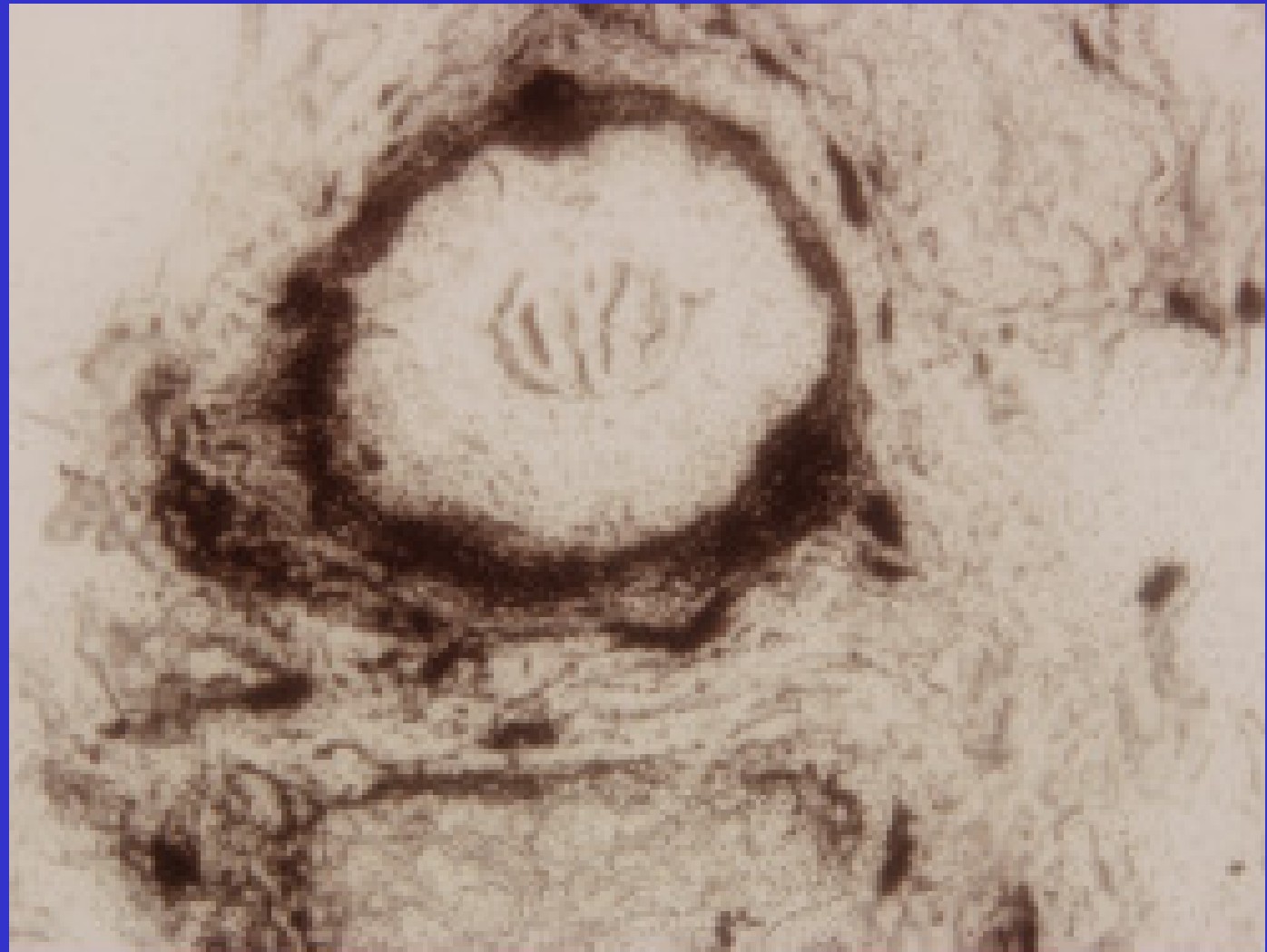
stationär: Diffusion ist zu langsam

in vitalem Gewebe: Macrophagen, Langerhanszellen

Autoradiographie mit Mikroemulsionen und ^{48}V -markiertem TiO_2

Haarfollikel
Transversal-
schnitt

Problem:
Kontaminationen

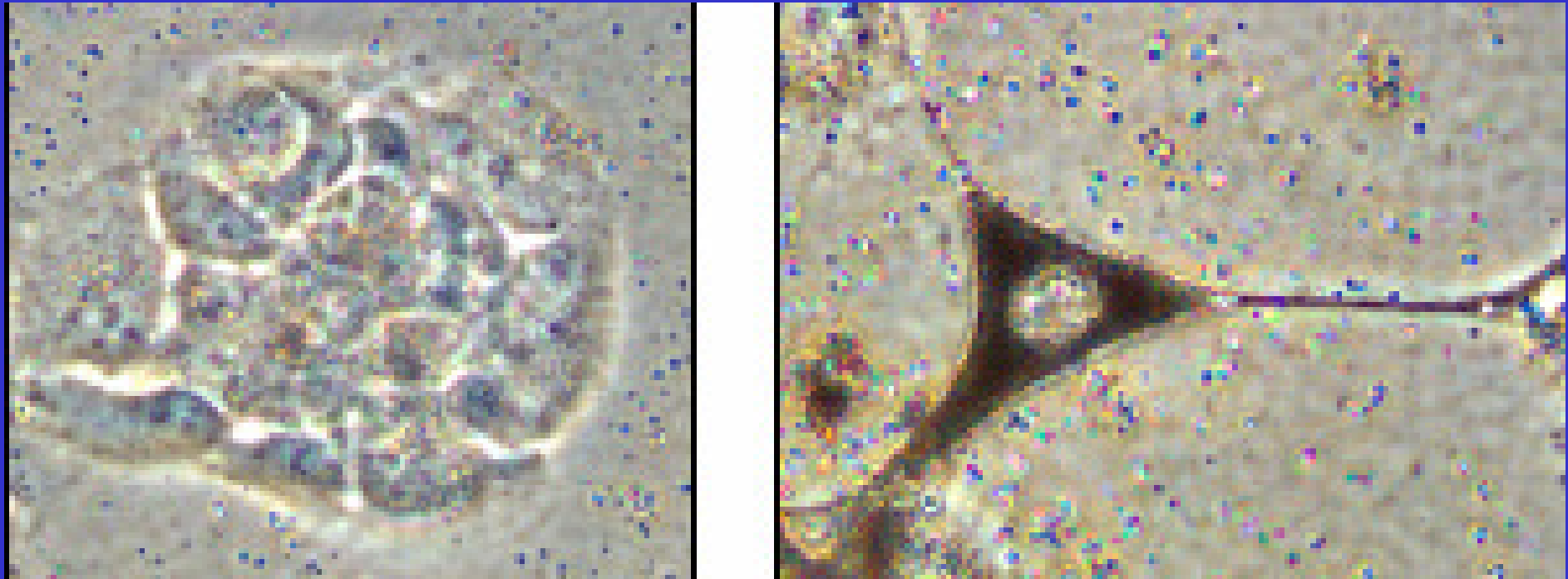


In-vitro / in-vivo Untersuchung des zellulären Respons auf TiO₂ Nanopartikel

Verschiedene Hautzellen mit immunohistochemischen Methoden / verschiedene Marker für verschiedene Endpunkte

Atomic Force Microscopy zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften von Zellen

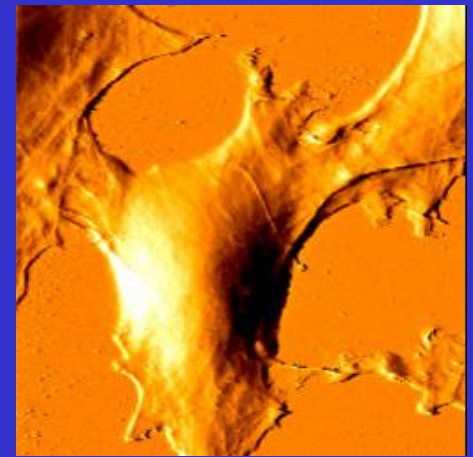
Internalisierung von TiO_2 in Zellen



Humanhautfibroblasten internalisieren Nanopartikel (rechts)
HaCaT Keratinozyten (links) nicht

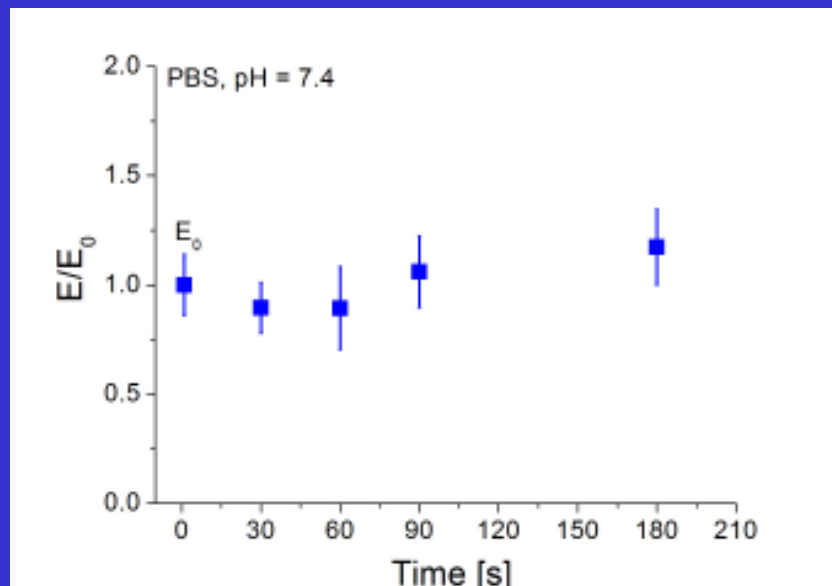
Veränderung der Elastizität von Humanfibroblasten unter UVB-Licht in Gegenwart von TiO_2 -Nanopartikeln

M. Lekka et al. Kraków

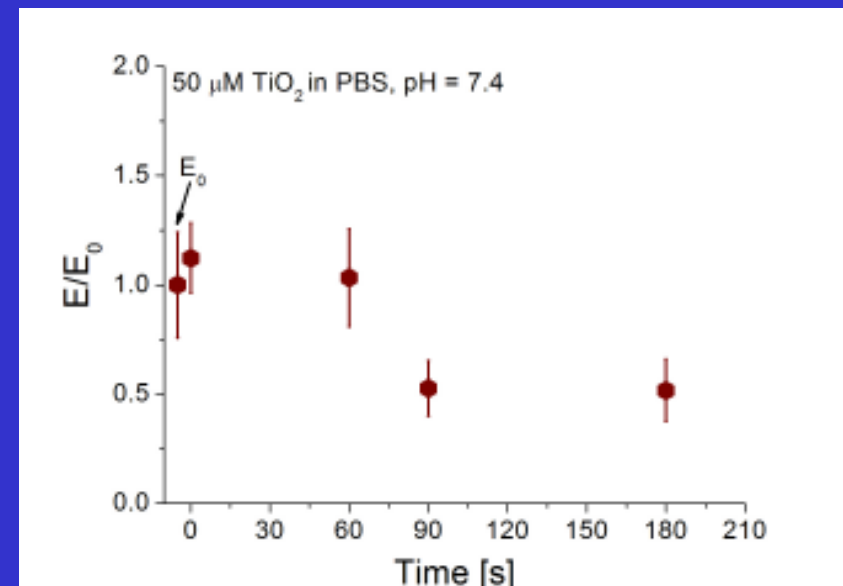


TiO_2 : ungecoated, 6 nm Durchmesser; Anatas
UVB: 250 nm-350 nm; $\sim 20 \text{ mW/cm}^2$

Relative Änderung der Zellelastizität

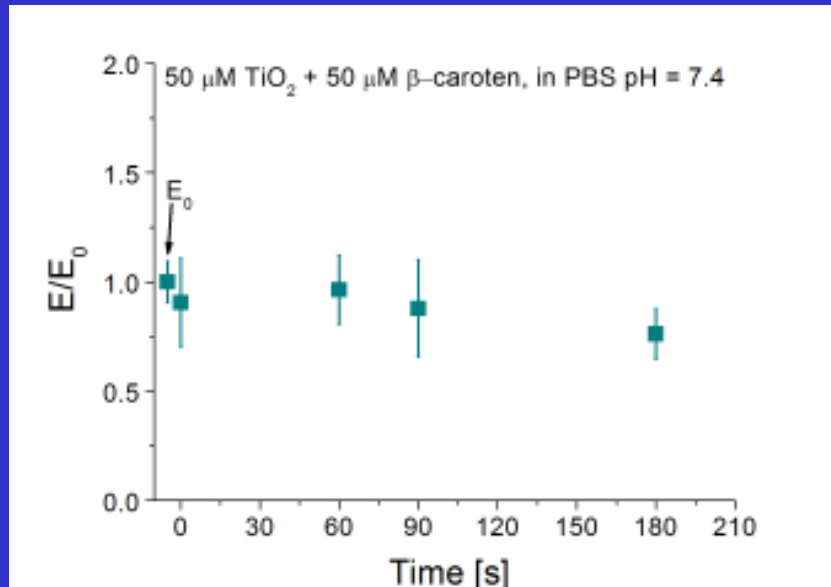
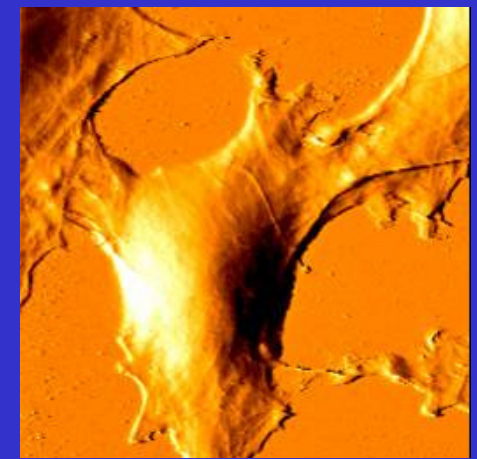


Nur UVB, kein TiO_2

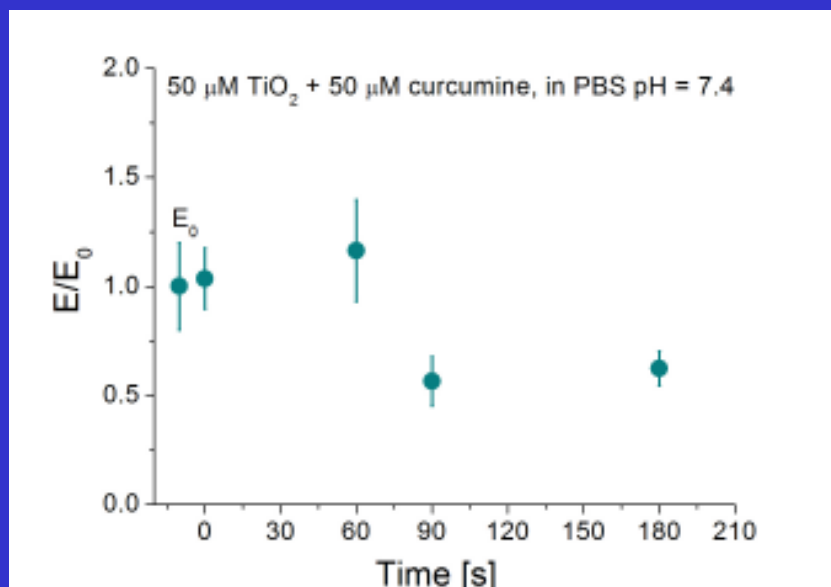


UVB in Gegenwart von TiO_2
Der erste Datenpunkt (E_0) ist die Kontrolle, d.h. kein TiO_2

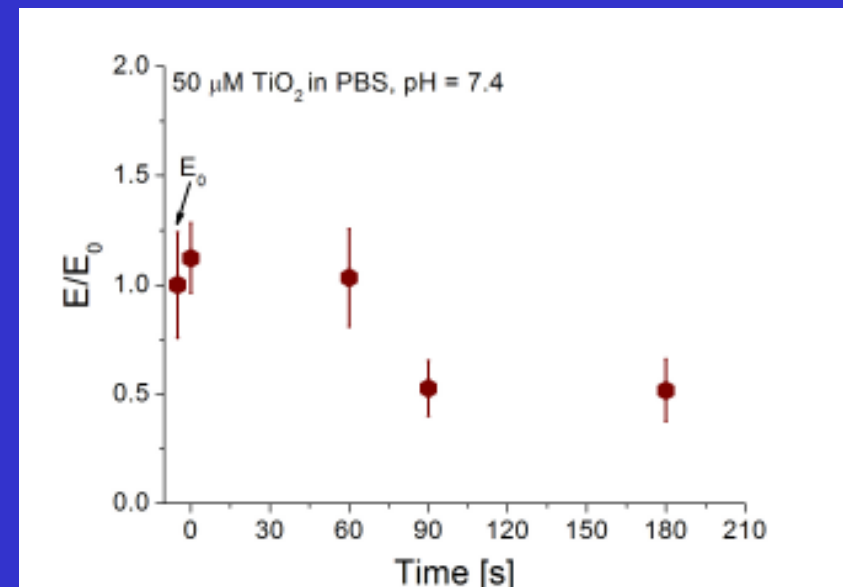
Der Effekt von Radikalfängern



UVB/ TiO_2 und β -Caroten



UVB/ TiO_2 und Curcumin



Nur UVB/ TiO_2 , keine Quencher

In allen Bildern ist der erste Datenpunkt (E_0) die Kontrolle, d.h. kein TiO_2

Zusammenfassung (TiO₂)

- Die Verteilung von TiO₂ ist sehr heterogen auf einer µm-Skala; Konsequenzen für den UV-Schutz?
- normalerweise ist die Penetration auf das *stratum corneum disjunctum* beschränkt
- sehr selten findet man Ti im *stratum spinosum*
- in fast allen Fällen können die Ti-Spots im *stratum spinosum* und in der Dermis als Kontaminationen identifiziert werden
- schnelle Transporter transportieren Nanopartikel nicht
- es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Formulierungen gefunden, auch nicht für verschiedene Expositionszeiten (keine Kinetik !)
- überraschenderweise spielt die Form der Partikel keine Rolle

Zusammenfassung (TiO₂)

- Es sieht so aus dass die TiO₂-Partikel mechanisch in die Hornhaut / Follikel / Falten eingebracht werden ohne diffusiven Transport
- Radiolabelling und Mikroemulsionen sind extrem empfindlich, mögliche Kontaminationen während des Mikrotom-Schneidens müssen vermieden werden
- Der zelluläre Respons ist verschieden für verschiedene Zellen, manche internalisieren Nanopartikel, andere nicht
- andere Endpunkte: [Ca²⁺]_i, Proliferation, Viabilität, Apoptose
- elastische Eigenschaften von Zellen ändern sich mit ungecoateten Nanopartikeln unter UV-Beleuchtung

Zusammenfassung (TiO₂ und andere Nanopartikel)

Keine Penetration:

TiO₂ (*Pflücker et al. 1999, 2001, NANODERM 2007*)

ZnO (*Cross et al. 2007*)

Penetration in vitales Gewebe:

TiO₂ (*Tan et al. 1996*)

Dextran Beads (nicht nano), flexed skin (*Tinkle et al. 2003*)

Fe-Nanopartikel (Fe₂O₃?) (*Baroli et al. 2007*)

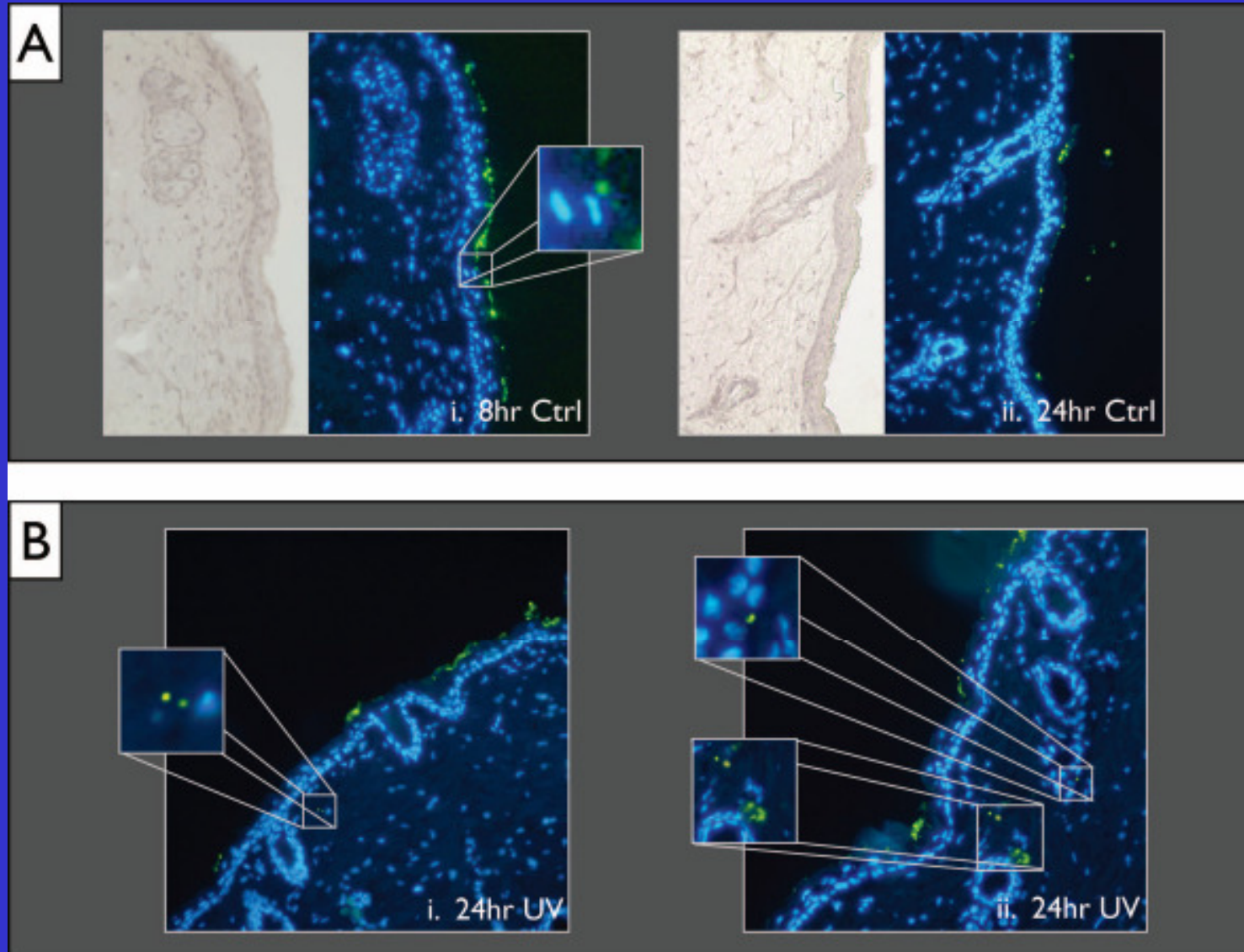
Quantum dots (*Ryman-Rasmussen et al. 2006*)

Funktionalisierte Fullerene, speziell flexed skin (*Rouse et al. 2007*)

QD's Sonnenbrand-geschädigte Maus-Haut (*Mortensen et al. 2008*)

Penetrationspfade ? Konzentrationsgradienten ?

Quantum Dots und UV-Licht



Mortensen et al. 2008

Wissenslücken

Penetrationsverhalten von Nanopartikeln mit 2-5 nm Primärpartikelgröße

Löslichkeit der Nanopartikel in Körperflüssigkeiten

Translokation von Nanopartikeln

Akkumulation von Nanopartikeln / Clearance?

Penetrationsverhalten bei Haut mit geschädigter Barriere
(z.B. atopische Haut, psoriatische Haut, Sonnenbrand-geschädigte Haut)

Einfluß von mechanischem Strecken und Stauchen der Haut auf das Penetrationsverhalten

Risiko ?

Exposition von vitalem Gewebe ?

Bei gesunder Haut: unterhalb der Nachweisgrenze (ca. 1 Partikel in $10 \mu\text{m}^3$)

Bei Haut mit gestörter Barrierefunktion ? Bei Mikroläsionen ?

Translokation ? Akkumulation ? Clearance ?

Gefahr ?

Was bedeutet der zelluläre Respons auf Kontakt mit Nanopartikeln ?

Risiko = Exposition x Gefahr

Zur Zeit schwer zu beantworten; bei gesunder Haut ist das Risiko eher klein wegen fehlender bzw. sehr kleiner Exposition.

Beim Sonnenschutz: kein Sonnenbrand bedeutet nicht, dass es keine UV-Exposition gibt wegen inhomogener Spreitung des UV-Filters!

Vielen Dank !

NANO
DERM

**Quality of Skin as a barrier
to ultra-fine particles**

www.uni-leipzig.de/~nanoderm downloads

A research project funded by the European Commission



Research and Technology
Development Programme



Quality of Life and Management
of Living Resources Programme
Key Action 4 - Environment & Health

Project ID:
QLK4-CT-2002-02678