

Zytotoxizität synthetischer Silica-Nanopartikel und deren Einfluss auf den zellulären Redoxstatus von humanen Kolonkarzinomzellen

Helge Gehrke^a, Anne Frühmesser^b, und Doris Marko^a

^a Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien, 1090 Wien, Österreich

^b Institut für Angewandte Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie, 76128 Karlsruhe, Deutschland

Nanostrukturierte Silicapartikel (SiO_2) finden aufgrund ihrer einzigartigen chemischen und physikalischen Eigenschaften weit verbreiteten Einsatz in den unterschiedlichsten Bereichen der Industrie. Da Silica-Nanopartikel (SiO_2 -NP) bisher als lediglich gering toxisch eingestuft wurden, sind verstärkt Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie und Biomedizin untersucht worden, darunter im Bereich der Krebstherapie, der Gen- bzw. DNA-Behandlung sowie des gezielten Medikamententransports. Darüber hinaus kommen SiO_2 -NP auch immer öfter in Produkten des täglichen Bedarfs, wie Kosmetika, Lacken oder Lebensmitteln, zum Einsatz^[1,2]. Als lebensmitteltechnologische Hilfsstoffe werden sie bspw. als Rieselhilfen in Gewürzen und Salz eingesetzt oder finden in neuartigen Verpackungsmaterialien als Diffusionsbarriere für Gas (sog. „Nanocomposites“) Verwendung und sorgen so für eine verbesserte und verlängerte Produkthaltbarkeit. Mit zunehmendem Einsatz der Nanotechnologie im Bereich der Nahrungsmittelindustrie und in Produkten des täglichen Bedarfs kommt der Konsument neuerdings immer häufiger in direkten Kontakt mit den verschiedensten SiO_2 -NP-Preparationen^[2]. Bisherige Untersuchungen zur Toxizität von SiO_2 -NP konzentrierten sich hauptsächlich auf den Respirationstrakt, wohingegen nur wenig über das toxische Potential der Partikel auf den Gastrointestinaltrakt (GIT) nach oraler Aufnahme bekannt ist. Im Fokus unserer Untersuchungen lagen daher die zelluläre Aufnahme der SiO_2 -NP, mögliche zytotoxische Eigenschaften, die Beeinflussung des zellulären Redoxstatus sowie die Auswirkungen auf die Integrität der DNA. Hierfür wurde die humanen

Kolonkarzinomzellen HT29 als *in-vitro* Modellsystem für humane Epithelzellen des GIT gewählt. Ein weiterer Schwerpunkt der Studie lag auf der Bewertung der toxikologischen Effekte in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Hierzu wurden drei, kommerziell erhältliche, amorphe, Silicapartikel unterschiedlichen Primärpartikeldurchmessers untersucht, die vom Hersteller ausdrücklich für den Einsatz im lebensmitteltechnologischen Bereich ausgewiesen werden. Die Primärpartikeldurchmesser waren dabei vom Hersteller mit 12 nm und 40 nm (Aerosil 200 V, Aerosil Ox50, Evonik Industries) sowie 200 nm (Angström Sphere, Fibre Optic Centre Inc.) angegeben. Die Partikel wurden in einen Konzentrationsbereich von 0,03 – 156,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ untersucht.

Die Partikeleigenschaften, wie Größe, Form und Kristallinität wurden durch Aufnahmen in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bestimmt, während das Agglomerationsverhalten in flüssigen Medien mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt wurde. Die zelluläre Aufnahme der Partikel wurde durch transmissionstrasterelektronenmikroskopische (STEM) Aufnahmen untersucht. Zytotoxische Effekte der SiO_2 -NP wurden durch eine Kombination aus drei verschiedenen Assays bestimmt, die es erlauben, Einflüsse auf das Zellwachstum (Sulforhodamin-B assay), Auswirkungen auf die mitochondrielle Aktivität (WST-1 Assay) sowie die Integrität der Zellmembran (Laktatdehydrogenase Assay (LDH)) zu beobachten und dazwischen zu unterscheiden. Wie bereits in mehreren Studien zur toxikologischen Auswirkung von Partikeln im Respirationstrakt gezeigt werden konnte, ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oft mit dem toxischen Potential der NP verbunden^[3,4]. Aus diesem Grund wurde die Wirkungen der SiO_2 -NP auf den zellulären Redoxstatus untersucht. Bei der Abwehr einer Vielzahl von zellulären Elektrophilen, darunter auch ROS, spielt körpereigenes zelluläres Glutathion in seiner reduzierten Form (GSH) eine entscheidende Rolle. Daher kann der zelluläre GSH-Gehalt für eine Aussage über dem intrazellulären Redoxstatus herangezogen werden. Des Weiteren wurde die direkte Entstehung von intrazellulären ROS durch die Partikel mittels des Dichloroflourescein Assays (DCF) bestimmt. Die Auswirkungen auf die Integrität der DNA wurden mittels der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) untersucht. Zur Erfassung möglicher oxidativer Schäden der DNA wurde eine Modifikation des klassischen alkalischen Comet Assays durchgeführt, bei der die

isolierte DNA mit dem bakteriellen DNA-Reparaturenzym *Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase* (Fpg) nachinkubiert wurde. Hierbei werden sog. fpg sensitive sites erfasst, welche in der Regel mit dem Gehalt an oxidierten DNA Basen korrelieren, und können daher als Marker für eine oxidative Schädigung herangezogen werden.

Mittels STEM konnte anhand von den 12 nm NP exemplarisch die Aufnahme großer Mengen SiO₂-Partikel in HT29 Zellen gezeigt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Partikel im Zytosol sowie in membranumschlossenen Vesikeln vorliegen, jedoch nicht in den Zellkern oder in die Mitochondrien eindringen. Die aufgenommenen Partikel liegen dabei nicht als Primärpartikel, sondern hauptsächlich in Form von bis zu 350 nm großen Agglomeraten bzw. Aggregaten vor. Im SRB Assay konnte ein Proliferationsstimulus der HT29 Zellen durch SiO₂-NP auf gezeigt werden. Dieser Wachstumsanstieg war konzentrations-, zeit-, und größenabhängig, wobei der stärkste Stimulus durch die 12 nm Partikel verursacht wurde. Damit im Einklang steht die geringe zytotoxische Wirkung der Partikel im LDH-Assay, wenn mit gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Änderungen der Inkubationsbedingungen dahingehend, dass der FKS Gehalt im Medium von 10 % auf 1 % reduziert wurde, führten zu einer konzentrations- und größenabhängige Zytotoxizität der untersuchten Partikel. Hierbei kam es durch die 12 nm Partikel in der höchsten Konzentration von 156,3 µg/cm² zu einem Verlust der Membranintegrität von bis zu 30 %. Die Unterschiede in der Zytotoxizität beruhen möglicherweise auf einer Einhüllung der Partikel durch Serumproteine, wodurch die Zellen vermutlich vor weiteren adversen Effekten geschützt werden. Die Entstehung von ROS durch SiO₂-NP konnte für keine der untersuchten Nanopartikel über den gesamten Konzentrationsbereich, weder nach 1 h noch nach 3 h nachgewiesen werden. Dennoch konnte eine Beeinflussung des Redoxstatus in Form eines veränderten Gesamtglutathiongehaltes (tGSH) beobachtet werden. Während es nach einer Inkubationszeit von 3 h zu keiner signifikanten Änderung kam, konnte nach 24 h eine deutliche Zunahme des zellulären (tGSH) gemessen werden. Hierbei zeigte sich ein größenabhängiger Effekt, bei dem die kleinsten Partikel (12 nm) den deutlichsten Anstieg auf bis zu ~160% in der höchsten Konzentration verursachten. Eine mögliche Schädigung der DNA-Integrität wurde mittels des alkalischen Comet Assays untersucht. Es konnte über den gesamten Konzentrationsbereich für keine der untersuchten Partikelproben ein DNA-

strangbrechendes Potential, weder nach 3 h noch nach 24 h Inkubation, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Tatsache, dass im Zellkern keine Partikel detektiert werden konnten, die direkt mit der DNA interferieren und so zu Strangbrüchen hätten führen können. Zusätzlich dazu, wurde die DNA durch die Behandlung mit dem Enzym Fpg auf eine oxidative Schädigung hin untersucht. Jedoch konnten auch hier, weder nach 3 h noch nach 24 h Inkubationszeit, fpg-sensitive sites in Form von zusätzlichen Strangbrüchen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass keine oxidative Schädigung der DNA vorlag. Auch hier steht das Ergebnis in Einklang mit dem des DCF-Assays, welches keine Entstehung von intrazellulären ROS zeigte, die zu einer oxidativen DNA Schädigung hätten führen können. Des Weiteren müsste bei einer Anwesenheit von ROS der intrazelluläre tGSH-Spiegel nach einer Kurzzeitinkubation absinken, was jedoch ebenfalls nicht beobachtet werden konnte. Aufgrund dessen scheint der Beitrag von ROS zum toxischen Potential von SiO₂-NP keine oder allenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SiO₂-NP von HT29 Zellen in großem Ausmaß aufgenommen und im Zytosol sowie in membranumschlossenen Vesikeln gespeichert werden. Es konnte gezeigt werden, dass SiO₂-NP in Abhängigkeit von Konzentration, Inkubationszeit und Partikelgröße die Proliferation von HT29 Zellen stimulieren. In Übereinstimmung damit zeigten die Partikel unter gleichen Inkubationsbedingungen keine Zytotoxizität. Bei Änderung der Inkubationsbedingungen dahingehend, dass mit serumarmen Medium (1% FKS) inkubiert wurde, konnte eine konzentrations- und größenabhängige Zytotoxizität der Partikel beobachtet werden. Des Weiteren führten die untersuchten Partikel zu einer Steigerung des zellulären tGSH Gehalts, was möglicherweise auf eine erhöhte Biosynthese und damit auf eine Interaktion der Partikel mit zellulären Elementen zurückzuführen ist. Da es keine Anzeichen für die Entstehung von ROS gab, konnte weder die Veränderung im Redoxstatus noch die Zytotoxizität darauf zurückgeführt werden. Die getesteten Partikel zeigten keinerlei DNA-strangbrechendes Potential und darüber hinaus keine Anzeichen für eine oxidativen Schädigung der DNA.

References :

-
- [1] Lin W., et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, 217, 252.
 - [2] Chaudry Q., et al., *Food Additives & Contaminants, Part A.* **2008**, 25, 241.
 - [3] Unfried K., *Nanotoxicol.* **2007**, 1(1):52.
 - [4] Donaldson K., et al., *Part Fibre Toxicol* **2005** 2:10