

METODA ZA DOLOČANJE VPLIVOV NANODELCEV (TiO₂) NA CELICE IN TKIVA V STRUPENOSTNEM TESTU *IN VIVO*

ASSESSING THE EFFECTS OF NANOPARTICLES (TiO₂) ON CELLS AND TISSUES BY THE *IN VIVO* TOXICITY TEST

Damjana Drobne¹, Živa Pipan¹, Vladka Lešer¹, Janez Valant¹, Nina Gunde-Cimerman¹, Maja Remškar²

Prispelo: 2. 4. 2007 – Sprejeto: 20. 6. 2007

Izvorni znanstveni članek
UDK 539.2

Izvleček

Vsaka nova tehnologija prinaša mnoga tveganja. Z naraščanjem prisotnosti nanomaterialov v komercialnih proizvodih je nujno potrebno ovrednotiti ceno okolja in negativnih vplivov na organizme, pač glede na prednosti, ki jih prinašajo nanomateriali. Informacije o varnosti in možnem tveganju zaradi prisotnosti nanodelcev so nujno potrebne. Do danes je bilo narejenih le malo toksikoloških študij glede vpliva nanomaterialov. Proizvodnja, kjer so prisotni tudi nanomateriali, se razvija brez regulative na področju varnosti.

V naši raziskavi smo uporabili že obstoječi test za kovine in pesticide s kopenskimi raki enakonožci *Porcellio scaber* (*Isopoda*, *Crustacea*), ki smo ga priredili za nanodelce. Kopenski raki so primerni testni organizmi, saj lahko analiziramo biooznačevalce na različnih ravneh. Rod *Porcellio* je prilagojen na kopensko življenje in živi tudi v Sloveniji. Hrani se predvsem z odmrlim listjem, lubjem in lesom. V tej študiji smo analizirali le en biooznačevalce, ki je povezan z integriteto celične membrane. Uporabili smo uveljavljeni test z dvojnimi fluorescentnim barvanjem (barvanje z akridin oranžnim (*N,N,N',N'*-tetrametilakridin-3,6-diamin) in etidijevim bromidom (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijev bromid)). Značilnosti testiranih nanodelcev smo določali z visokoločljivostnim presevnim elektronskim mikroskopom (TEM). Ugotavljali smo učinke nanodelcev s pomočjo prehranjevalnega testa in ugotovili, da nanodelci vplivajo na integriteto membrane. Iz tega lahko sklepamo, da so tovrstni testi primerni tudi kot izhodišče za testiranje učinkov nanodelcev za nadaljnje raziskave. Nova spoznanja na področju medsebojnega vplivanja med nanodelci in biološkimi sistemi bodo pokazala, kakšni naj bodo učinkoviti testi strupenosti za nanodelce.

Ključne besede: titanov dioksid, nanodelci, biooznačevalci, mikroskopija

Original scientific article
UDC 539.2

Abstract

Every new technology poses new risks. With the increasing presence of nanomaterials in commercial products, a growing debate is emerging on whether the environmental and social costs of nanotechnology outweigh its many benefits. Information about the safety and potential hazards of nano-sized particles is urgently needed. To date, only a few studies have investigated the toxicological effects of nanomaterials, and no clear guidelines exist on how to quantify these effects. This study was undertaken to investigate nanoparticles using the test with the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (*Isopoda*, *Crustacea*) devised for soluble chemicals. Terrestrial isopods have been recognised as suitable organisms for (eco) toxicity studies. *Porcellio scaber* is well adapted to terrestrial life and lives also in Slovenia. Toxicity tests with terrestrial isopods are generally used to assess biomarkers at

¹Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

²Inštitut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana

Kontaktni naslov: e-pošta: ziva.pipan@bf.uni-lj.si

various levels of biological organisation. In the present study we analysed only one biomarker related to the integrity of the plasma membrane. We used fluorescent staining with acridine orange/ethidium bromide. Conventional transmission electron microscopy (TEM) was used to characterise the nanoparticles tested. We determined the effect of TiO₂ nanoparticles when consumed with food. The results showed that nanoparticles affected the integrity of plasma membrane. Conventional toxicity studies have thus proved to be a good starting point for assessing the effects of nanoparticles. Further studies of interaction between nanoparticles and biological systems will be needed to develop new and more suitable methods for toxicity testing.

Key words: titanium dioxide, nanoparticles, biomarkers, microscopy

Uvod

Proizvedeni nanodelci imajo edinstvene električne, termalne in mehanske lastnosti, ki jih koristno uporabljamo v komercialne, medicinske in okoljske namene (1). Lastnosti nanodelcev se bistveno razlikujejo od lastnosti večjih delcev. Teoretično je mogoče nanodelce izdelati iz skoraj vseh kemikalij, večina trenutno narejenih nanodelcev pa je iz prehodnih elementov, silicija, ogljika (nanocevice, fulereni) in kovinskih oksidov (cinkov oksid, titanov oksid). Ob proizvodnji nastajajo tudi različni nanodelci, ki so proizvedeni nenamensko: stranski produkt pri industrijski proizvodnji (mletje, varjenje, brušenje, gradbeništvo, tehnologije pršil), izgorevanje biomase in fosilnih goriv ter izpuh iz motorjev z notranjim izgorevanjem, še posebej dieselskih motorji. Različni nanodelci nastajajo tudi v naravi ob eroziji, izbruhu vulkanov in požarih (delci prsti, prah, pepel, katran). Najdemo jih tudi v živih organizmih vse od nastanka življenja (biogen magnetit, feritin in drugi). Naravni in tehnološko proizvedeni nanodelci se bistveno razlikujejo. Naravni so zelo razpršeni, kemijsko kompleksni in so v tekočini ali zraku, sintetizirani so manj razpršeni, imajo natančno določene lastnosti in so večinoma trdni (2).

Danes se nanodelci uporabljajo v številnih proizvodih, kot so kozmetika, hrana, pralna sredstva, zdravila, tekstil, zaščitne odbojne prevleke idr. Zaradi širitve nanotehnologije se bistveno povečuje izpostavljenost ljudi v poklicnem in življenjskem okolju, povečalo pa se je že tudi obremenjevanje okolja.

Trenutno informacij o tveganju za človeka in okolje zaradi izpostavitve nanodelcem skoraj ni. V zadnjem času se vse bolj pogosto vprašujejo o potencialni nevarnosti nanodelcev za človeka in okolje in to raziskujejo. Različne študije so pokazale, da prehajajo nanomateriali v telo po različnih poteh: preko dihal, prebavil in kože (3). Delci, veliki 70 nm, prodrejo v pljučne mešičke,

velikosti 50 nm prodrejo v celice, veliki 30 nm prodrejo v celično jedro, ni pa podatkov o potovanju delcev, ki so manjši kot 20 nm. Še vedno ne vemo natančno kam delci v organizmu gredo in kako se razporejajo v tkivih in celicah. Prav tako ne vemo, kako s svojo prisotnostjo vplivajo na delovanje celic, organov in celotnega organizma.

Titanov dioksid je uporaben predvsem kot beli pigment (za beljenje) in zaščita učinkovin pred svetlobo. Vse pogosteje ga uporabljajo v kozmetiki, kot so sončne kreme, pudri, senčila, v tekstilni industriji, farmaciji in drugod (zaščitne odbojne prevleke, razne barve in zaščitna premazna sredstva) (2).

Opredelitev problema

Povečanje razmerja med površino in volumnom delca povzroči povečanje površinske energije delca in s tem večjo biološko aktivnost. Interakcije nanodelcev s tekočinami, celicami in tkivi so najverjetneje drugačne od interakcij z večjimi delci iste kemijske zgradbe. Kvarni učinki nanodelcev najbrž nastanejo na različne načine. Strupenost nanodelcev je verjetno povezana s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, kot so velikost delca, oblika, aglomeracija, kristalna struktura, kemijska zgradba, velikost površine, kemijske lastnosti površine, naboj na površini in poroznost. Številna vprašanja o učinkih nanodelcev na organizme, ki so domnevno bistveno drugačni od učinkov velikih delcev, so spodbudila nastanek nove veje toksikologije – nanotoksikologijo (4).

Zaradi slabega poznavanja in razumevanja interakcij med nanodelci in proizvodi nanotehnologij se proizvodnja nanodelcev in nanomaterialov razvija povsem brez predpisov na področju varnosti za človeka in okolje.

V tem trenutku nujno potrebujemo enostavne in zanesljive metode preizkušanja, ki bodo omogočile hitro

in zanesljivo določanje interakcij med celico, tkivi in organizmom ter proizvodi nanotehnologij. Najverjetneje je smiselno, da se najprej ugotovi, ali so obstoječi testi strupenosti za druge kemikalije primerni tudi za nanodelce in nanomateriale.

Namen raziskave

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali povzročijo nanodelci TiO_2 poškodbe in spremembe plazmaleme žleznih celic. Zato smo kot odziv v testu strupenosti analizirali ravno integriteto plazmaleme. V *in vivo* testu s kopenskimi raki smo testne organizme hranili s hrano, ki smo ji dodali nanodelce titanovega dioksida (TiO_2). Za ta namen smo uporabili uveljavljeni test z dvojnimi fluorescentnim barvanjem (barvanje z akridin oranžnim in etidijevim bromidom), ki se pogosto uporablja za oceno stanja celic (5). Značilnost testiranih nanodelcev smo določali z visokoločljivostnim presevnim elektronskim mikroskopom (200kV, Jeol 2010F, TEM).

Materiali in metode

V naši študiji smo uporabili dobro poznan test strupenosti s kopenskimi raki enakonožci vrste *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) (Slika 1). Kopenski raki enakonožci so se izkazali kot ustrezen organizem v

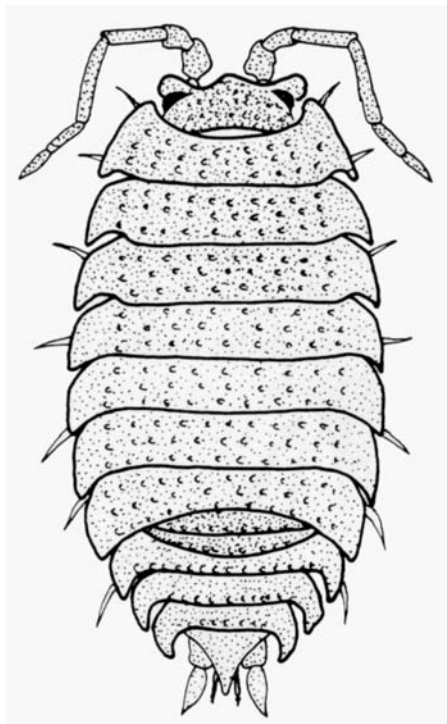
(eko)toksikoloških študijah (6). V testu strupenosti z raki enakonožci lahko analiziramo biooznačevalce na različnih ravneh biološke organizacije. V naši študiji predstavljamo analize le enega biooznačevalca. Kot biološki kazalec delovanja nanodelcev (biooznačevalec) smo analizirali integriteto celične membrane s fluorescentnim barvanjem akridin oranž in etidijev bromid. Metoda temelji na različnosti integritete membrane. Akridin oranž prehaja preko nepoškodovane in tudi preko poškodovane plazmaleme. Barvilo, ki se veže na dvojno vijajnico DNK, vidimo kot fluorescentno zeleno, ob vezavi na enojno RNK pa kot fluorescentno rdeče. Etidijev bromid prehaja le preko celic s poškodovano membrano, po vezavi na DNK ga vidimo kot fluorescentno rdeče (McGahon, 1995). Nepoškodovane in apoptotične celice imajo zeleno jedro (ni tako izrazito vidno, ker je že sama žleza pod fluorescenco zelene barve), celice s poškodovano membrano (nekrotične) pa imajo jedro obarvano rdeče do oranžno.

Za testiranje strupenosti smo uporabili titanove (TiO_2 , Sigma-Aldrich) nanodelce velikosti 15 nm. Naredili smo suspenzije nanodelcev v vodi in z njo namazali spodnjo stran posušenih listov leske (*Corylus avellana*). Poskusni pogoji so prikazani na Sliki 2. S tako pripravljenimi listi leske smo živali hranili 14 dni. Med poskusom smo analizirali tudi druge parametre, npr. težo živali, količino zaužite hrane, količino iztrebkov



Slika 1. Prikaz poskusnih pogojev. Petrijevke s čistimi (neonesnaženimi) listi (kontrola) in listi, na katerih je bil nanos nanodelcev $100 \mu\text{g/g TiO}_2$, v katerih so bile živali 14 dni.

Figure 1. Testing conditions. Petri dishes containing clean leaves (controls) and petris containing leaves covered with TiO_2 nanoparticles ($100 \mu\text{g/g}$), in which animals were kept for 14 days.



Slika 2. Shematski prikaz raka enakonožca *Porcellio scaber* (velikost živali 1 cm).
 Figure 2. Schematic of *Porcellio scaber* (1 cm in size).

(7). Kontrolne živali so bile prav tako 14 dni v petrijevkah, le da so imele samo liste leske brez suspenzije nanodelcev. Po koncu poskusa smo prebavne žleze nekaj živali testirali z metodo barvanje z akridin oranžnim in etidijevim bromidom, žleze drugih živali pa pripravili po standardnem postopku za pripravo vzorcev za elektronsko mikroskopijo (fiksiranje po fiksativu modificirani Karnovsky: 1 % glutaraldehyd, 0,4 % formaddehyd, 0,1M kakovilnatni pufer, sekundarna fiksacija z osmijevim tetroksidom, dehidracija in vklapanje v smolo Agar100) in pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom (Philips CM 100).

Rezultati

Preskus akridin oranž in etidijev bromid

Z barvanjem akridin oranž in etidijevim bromidom smo ugotovili razlike med skupino živali, hranjeno s TiO_2 in kontrolno skupino. Štirinajstdnevno hranjenje rakov enakonožcev s hrano, ki vsebuje $100 \mu\text{g/g TiO}_2$, ko živali pojedjo $5 \mu\text{g TiO}_2 / \text{g}$ sveže telesne teže / dan (Slika 2), vpliva na integriteto celične membrane. S poskusom z akridin oranžnim in etidijevim bromidom smo ugotovili, da se spremeni integriteta celične mem-

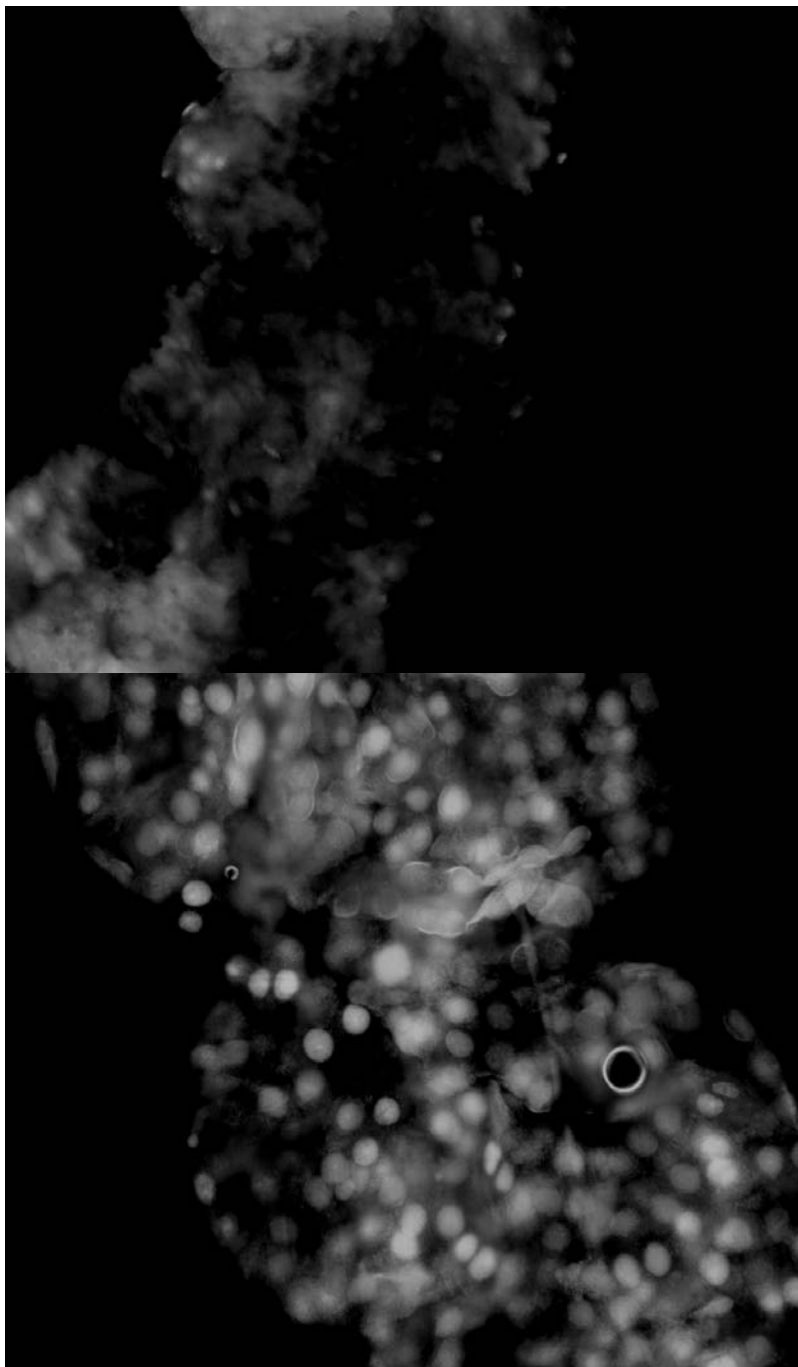
brane v celicah prebavnih žlez, če so živali jedle TiO_2 . Na sliki 3a so jedra obarvano zeleno, podobno kot žleza, kar nakazuje, da poškodb ni bilo. Na sliki 3b pa so zaradi destabilizirane membrane vidna rdeče do oranžno obarvana jedra (Slika 3a, b).

Opazovanje nanodelcev

Presevna elektronska mikroskopija (TEM) se je zaradi visokih povečav in ločljivosti tudi v naši študiji izkazala kot primerna za opazovanje velikosti in oblike nanodelcev, s katerimi smo živali hranili (Slika 4).

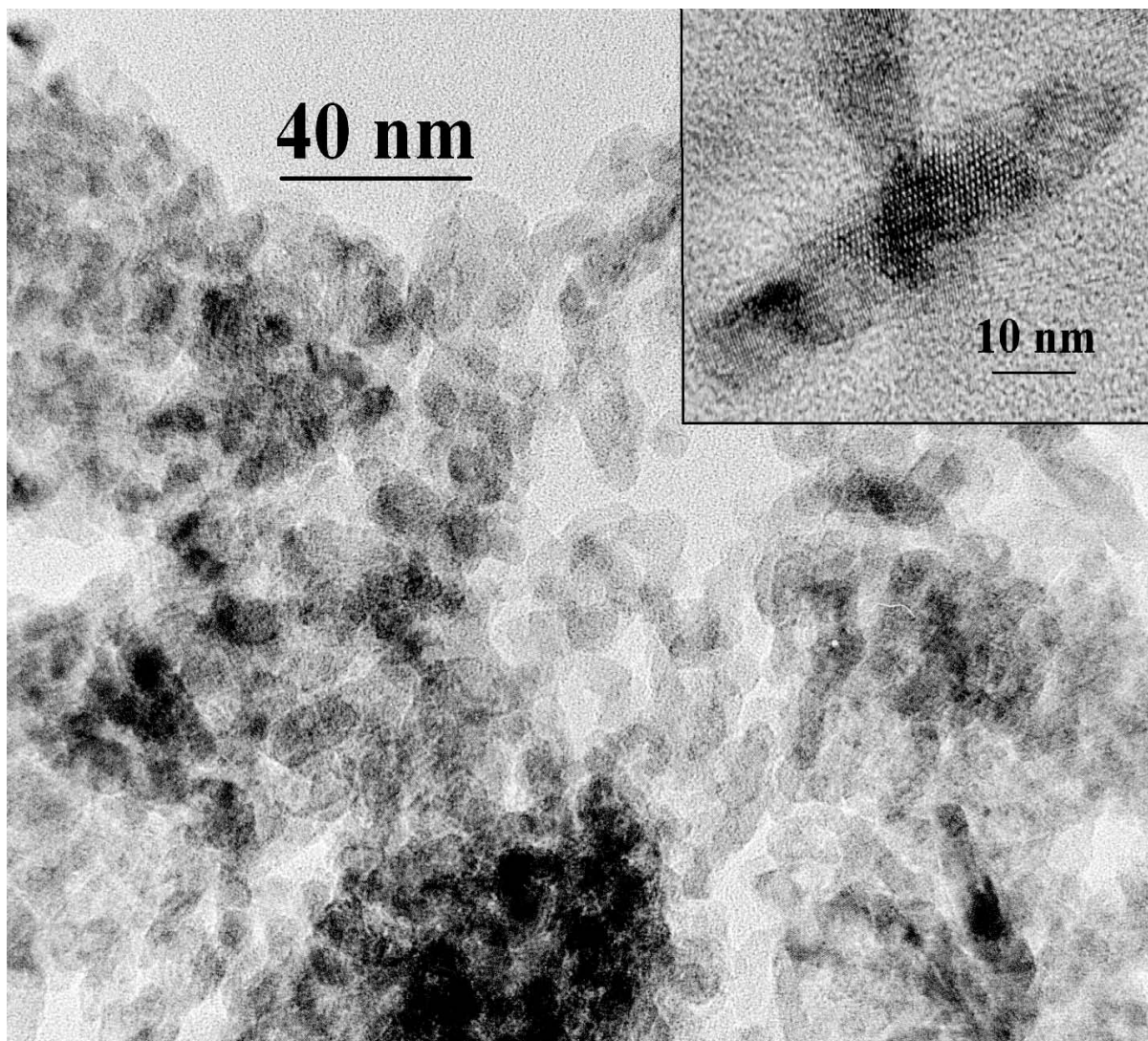
Razprava

In vivo strupenostni test s kopenskim rakom enakonožcem vrste *Porcellio scaber* se je izkazal primeren za analiziranje učinka 15 nm velikih nanodelcev TiO_2 , če je bil ta dodan hrani. Test je primeren, ker nam da različne tipe toksikoloških podatkov na različnih ravneh biološke organizacije. To pomeni, da hkrati spremljamo spremembe na celicah, tkivu in celotnem organizmu. Določimo koncentracije, ki imajo učinek za določen del populacije (ECx), in koncentracije, ki nimajo opaznega učinka (NOEC). Ti



Slika 3 a, b. Prebavna žleza raka enakonožca *Porcellio scaber*. Zgornja slika: Žleza kontrolne živali. Z AO/EB barvanjem se jedra kontrolne živali niso obarvala. Spodnja slika: Žleza živali, hranjene z nanodelci TiO_2 . Obarvana jedra z metodo AO/EB se vidijo kot enekomerno velike svetle pike. (povečava 400x, svetlobni mikroskop, Axio imager, Zeiss).

Figures 3 a and b. Digestive gland of *Porcellio scaber*. The upper figure shows the gland of the control animal : nuclei remained unstained. The lower figure shows the gland of the animal fed with TiO_2 nanoparticles. The AO/EB stained nuclei appear as bright points, equal in size (magnification x400, light microscope, Axio imager, Zeiss).



Slika 4. Presevna elektronska mikrografija nanodelcev TiO_2 povprečne velikosti 15 nm (merilo 40 nm in 10 nm), (200 keV, Jeol 2010 F, presevni elektronski mikroskop na poljsko emisijo).

Figure 4. Transmission electron micrography of 15-nm TiO_2 nanoparticles (scale 40 nm and 10 nm) (200 keV, Jeol 2010 F, field-emission transmission electron microscope).

podatki so ključnega pomena pri oceni potencialne nevarnosti različnih ksenobiotikov. Dobljeni rezultati predstavljajo izhodišče za oblikovanje testnega postopka za različne nanodelce.

Podatkov o dovoljenih/mejnih koncentracijah nanodelcev ni, zato so v tej fazi primerne primerjalne študije stopenosti nanodelcev in drugih kemikalij. Na ta način je mogoče umestiti potencialne učinke nanodelcev. Kopenski raki enakonožci so primeren organizem za tovrstne primerjalne študije iz več razlogov. Eden pomembnejših je ta, da že obstaja

veliko toksikoloških podatkov za druge kemikalije (kovine, pesticide), s katerimi je mogoče primerjati rezultate testov strupenosti nanodelcev in nanomaterialov in tako umestiti njihove potencialne kvarne učinke na seznam z drugimi nevarnimi kemikalijami. Pri nanodelcih in nanomaterialih pa še vedno ostaja odprto vprašanje, kako ugotoviti njihove značilnosti, ki so povezane z učinkom. Pri drugih kemikalijah je to brez dvoma koncentracija. Pri nanodelcih in nanomaterialih pa je med pomembnejšimi velikost.

Ob testiranju nanodelcev TiO_2 so ugotovili, da se z višanjem koncentracije zniža rast bakterij *E. coli* in *B. subtilis*. Koncentracija nanodelcev 5000 ppm je zmanjšala rast *E. coli* za 72 %. *B. subtilis* je bil bolj občutljiv, saj se je rast že pri koncentraciji 1000 ppm zmanjšala za 75 %, pri 2000 ppm pa za 99 % (10).

Nanodelce TiO_2 so dodali tudi vodi, v kateri je bila populacija *Daphnie magne*. LC50, kjer je bila smrtnost 50 %, je bila dosežena pri koncentraciji 5,5 ppm pri filtriranih nanodelcih. Ob soniciranju delcev je bila najvišja smrtnost pri koncentraciji 350 ppm (8).

Na podlagi naših rezultatov in podatkov iz literature zaključujemo, da so tradicionalne toksikološke študijske metode dobro izhodišče za testiranje učinkov nanodelcev. Toda zaradi njihovih edinstvenih lastnosti bodo potrebne nove metode za določanje mehanizmov delovanja in kvernih učinkov (9).

Perspektive

Zaradi zaščite okolja in zaščite človeka pred nanodelci je potrebno razviti različne tipe zanesljivih testov strupenosti. Poleg *in vitro* študij, ki pomagajo razvozlati osnovne mehanizme delovanja nanodelcev, pa so nujno potrebne tudi *in vivo* toksikološke študije na modelnih organizmih iz različnih okolij (vodno in kopensko), in na organizmih, ki sprejemajo nanodelce na različne načine (z vodo, hrano, dihanjem itd.) in na organizmih, ki so predstavniki različnih prehranjevalnih ravni (2).

Za izhodišče pri tovrstnih študijah je smiselno izbrati že uveljavljene teste strupenosti za vodotope kemikalije. Šele nadaljnje raziskave in nova spoznanja

na področju interakcij med nanodelci in biološkimi sistemi bodo pokazala, kakšni naj bodo učinkoviti testi strupenosti za nanodelce.

Literatura

1. Dreher KL. Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicol Sci* 2004; 77(1): 3-5.
2. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology. An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; 113 (7): 823-39.
3. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65(20): 1513-30.
4. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Born PJA. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 2004; 61(9): 727-8.
5. Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS, Guimaraes JE. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death - study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Anal Cell Pathol* 1999; 19(3-4): 139-51.
6. Drobne D. Terrestrial isopods - A good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ Toxicol Chem* 1997; 16(6): 1159-64.
7. Drobne D, Hopkin SP. The toxicity of zinc to terrestrial isopods in a standard laboratory test. *Ecotoxicol Environ Saf* 1995; 31(1): 1-6.
8. Lovern SB, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 2006; 25(4): 1132-37.
9. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311(5761): 622-7.
10. Admas LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO_2 , SiO_2 and ZnO water suspension). *Water Res* 2006; 40(19): 3527-32.