

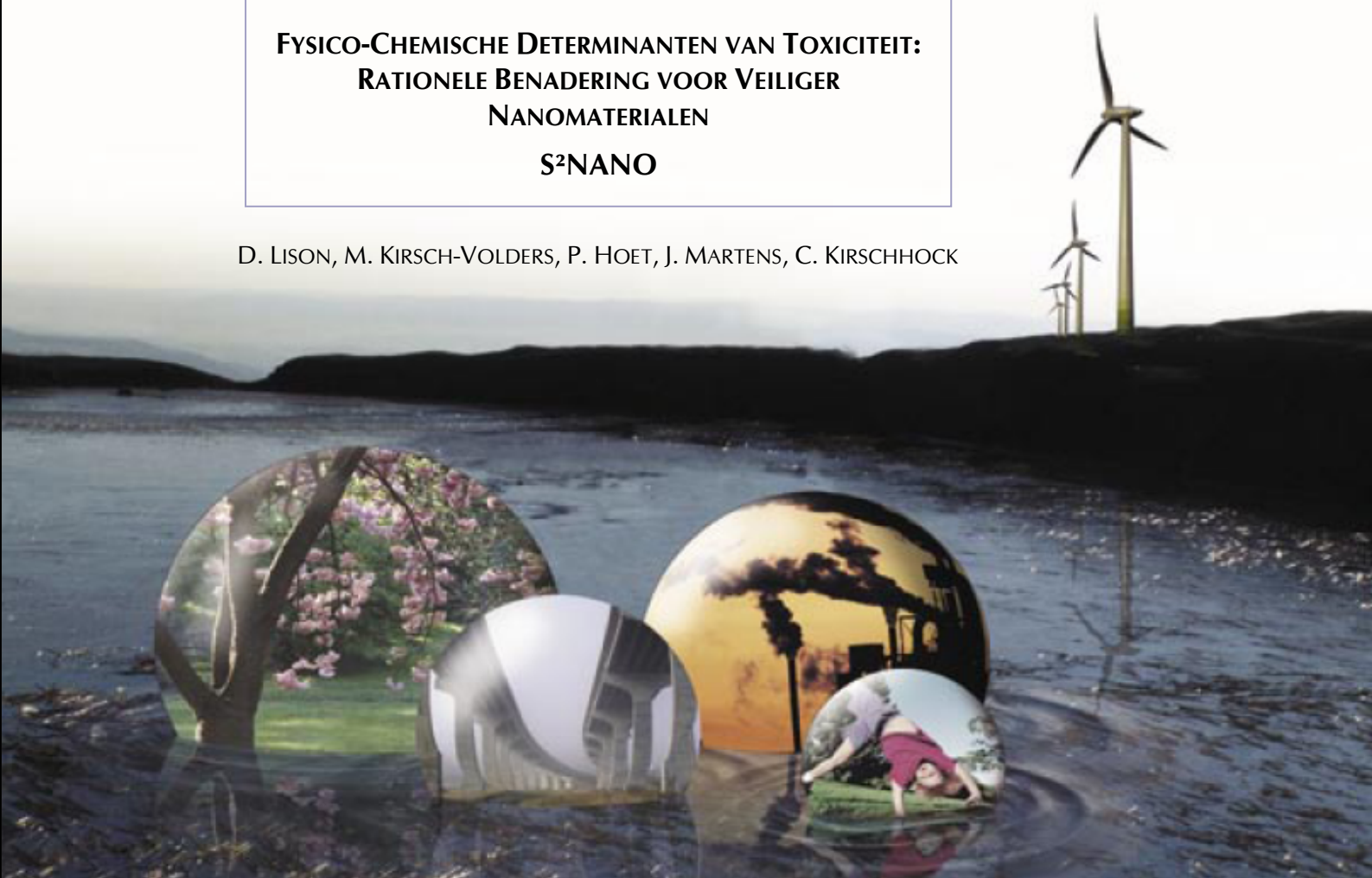
SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**FYSICO-CHEMISCHE DETERMINANTEN VAN TOXICITEIT:
RATIONELE BENADERING VOOR VEILIGER
NANOMATERIALEN
S²NANO**

D. LISON, M. KIRSCH-VOLDERS, P. HOET, J. MARTENS, C. KIRSCHHOEK



ENERGY

TRANSPORT AND MOBILITY

AGRO-FOOD

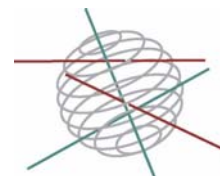
HEALTH AND ENVIRONMENT

CLIMATE

BIODIVERSITY

ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS

TRANSVERSAL ACTIONS



Gezondheid & Milieu



EINDVERSLAG FASE 1
SAMENVATTING

**FYSICO-CHEMISCHE DETERMINANTEN VAN TOXICITEIT:
RATIONELE BENADERING VOOR VEILIGER NANOMATERIALEN**

S²NANO

SD/HE/02A

Promotoren

D. LISON

Université Catholique de Louvain (UCL)
Industrial Toxicology and Occupational Medicine unit (TOXI)
Avenue Mounier, 53.02 - 1200 Brussels
dominique.lison@uclouvain.be

M. KIRSCH-VOLDERS

Vrije Universiteit Brussel (VUB)
Laboratory of Cell Genetics (CEGE)
Pleinlaan, 2 - 1050 Brussels
mkirschv@vub.ac.be

P. HOET

Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven)
Laboratory of Lung Toxicology (LUNG)
O&N I Herestraat 49 - bus 00706 - 3000 Leuven
peter.hoet@med.kuleuven.be

J. MARTENS – C. KIRSCHHOEK

Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven)
Centrum voor Oppervlaktechemie & Katalyse (COK)
Kasteelpark Arenberg 23 - bus 02461 - 3001 Heverlee
johan.martens@biw.kuleuven.be

Auteurs

D. Lison - UCL
M. Kirsch-Volders - VUB
P. Hoet – (KULeuven – LUNG)
J. Martens, C. Kirschhock - (KULeuven – COK)

Januari 2009



BELGIAN SCIENCE POLICY



Rue de la Science 8
Wetenschapsstraat 8
B-1000 Brussels
Belgium
Tel: +32 (0)2 238 34 11 – Fax: +32 (0)2 230 59 12
<http://www.belspo.be>

Contact person: Emmanuèle Bourgeois
+32 (0)2 238 34 94

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. The authors are responsible for the content.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference :

D. Lison, M. Kirsch-Volders, P. Hoet, J. Martens, C. Kirschhock. ***“Fysico-chemische determinanten van toxiciteit: rationele benadering voor veiliger nanomaterialen - S²NANO”***. Eindverslag Fase 1 Samenvatting. Brussel : Federaal Wetenschapsbeleid 2009 – 6 p. (Onderzoeksprogramma “Wetenschap voor een Duurzame Ontwikkeling”)

A. Context

Nanomaterialen komen tegenwoordig voor in bijna alle industriële takken en maken reeds deel uit van verschillende consumptiegoederen. De productie en verkoop van nanomaterialen zullen in de komende jaren nog toenemen. Tijdens deze activiteiten worden arbeiders, consumenten en de bevolking in het algemeen mogelijk blootgesteld aan deze nanomaterialen. De vraag van een mogelijke invloed op de gezondheid stelt zich dan ook. In feite kunnen de zelfde fysico-chemische eigenschappen, die nanomaterialen vanuit technologisch standpunt zo aantrekkelijk maken, een gevaar voor de volksgezondheid betekenen. Vooral door hun grote oppervlaktreactiviteit kunnen ze schade toebrengen aan biologische weefsels waarmee ze in contact komen. Een juiste beoordeling van de toxicologische eigenschappen van nanomaterialen is daarom dringend nodig. De beschikbare onderzoeksresultaten bevestigen de vrees voor nefaste effecten voor de gezondheid. Men weet op dit moment reeds dat nanomaterialen toxicologische effecten teweegbrengen in de luchtwegen en waarschijnlijk ook op het cardio-vasculair niveau en in het zenuwstelsel. Door de zeer grote verscheidenheid aan nanopartikels, die reeds bestaan en nog in ontwikkeling zijn, is de taak om de gevaren voor de gezondheid voor elk van deze substanties te bepalen immens. Het is waarschijnlijk zelfs een onmogelijke opdracht in vergelijking met de beschikbare middelen. Daarom is het nodig om een generische benadering te ontwikkelen, met name over de kennis van de eigenschappen van nanopartikels die hun toxicologische activiteit bepalen.

B. Doelstellingen

Het doel van het S²Nano project is meer inzicht te verkrijgen in de toxische effecten van nanopartikels. Hiervoor zullen de fysicochemische parameters, die gerelateerd zijn aan toxiciteit, geïdentificeerd worden.

Deze benadering draagt bij tot

- een beter begrip van de mechanismen die de interacties van nanomaterialen met cellen en biologische weefsels beïnvloeden
- een verbetering van de metrische benadering van nanopartikels, op basis van de belangrijkste parameters zoals de dosis (uitgedrukt in aantal partikels of oppervlak van partikels) of hun morfologie

Dit project zal een solide wetenschappelijke basis zijn voor de ontwikkeling van nanomaterialen op een duurzame manier. Daardoor zal het mogelijk zijn om wetenschappelijk gebaseerde aanbevelingen te doen naar regelgevers en naar de industrie toe voor het ontwerp en de productie van veiligere materialen. Dit project richt zich enkel op het aspect van de volksgezondheid en richt zich niet op het domein van ecotoxicologie.

Het experimenteel model dat gekozen werd voor het onderzoek betreft silica nanopartikels (SNP). Er zijn meerdere redenen voor deze keuze waaronder:

- De mogelijkheid om op een betrekkelijk gemakkelijke manier een groot gamma aan SNP te synthetiseren die telkens slechts in één eigenschap variëren
- De zuiverheid waarmee SNP kunnen gemaakt worden
- De onoplosbaarheid van SNP in fysiologisch milieu waardoor het effect van nanopartikels op zich kan bestudeerd worden. De impact van elementen of moleculen die zouden kunnen oplossen in een biologisch milieu kan hierdoor uitgesloten worden
- De partner die verantwoordelijk is voor de aanmaak van SNP beschikt over een grote ervaring met deze materialen

C. Besluiten

Tijdens de eerste twee jaren van het project (fase I), hebben de onderzoeksgroepen een multidisciplinaire benadering uitgewerkt door een intensieve dialoog tussen de biologen en chemici, die deel uitmaken van het netwerk. De strategieën die nodig waren om het onderzoek te doen slagen werden daarbij gedefinieerd: de SNP moeten met veel zorg gesynthetiseerd en opgezuiverd worden; verder moeten cellulaire modellen ontwikkeld worden om het effect van deze SNP te bestuderen.

Een unieke serie van 17 monodisperse SNP werd gesynthetiseerd, met variërende diameters, oppervlaktes en/of porositeiten van de nanopartikels (Tabel 1).

Vervolgens werd veel aandacht besteed aan de stabiliteit van de suspensies, om de nanopartikels in waterig milieu te kunnen bewaren zonder dat er aggregatie optreedt. Verder werd ook de stabiliteit van de nanopartikels in een cellulair milieu gegarandeerd. Bepaalde SNP werden volledig bereid in omstandigheden die de aanwezigheid van endotoxines uitsluiten. Dit werd gedaan om de impact van deze SNP op delicate immunologische processen, die zeer gevoelig zijn voor contaminatie met endotoxine, te bestuderen. Deze formulaties zijn zeer nauwkeurig gekarakteriseerd en dit werk maakt deel uit van een eerste wetenschappelijke publicatie (Thomassen *et al.* 2009)

Er werden verschillende modellen ontwikkeld om in vitro studies uit te voeren betreffende:

- de genotoxische effecten op een epitheliale pulmonaire menselijke cellijn
- het toxisch effect op een menselijke endotheliale cellijn en het effect op bloedklontering
- de activatie van een macrofaag cellijn en de productie van inflammatoire mediators

Alvorens cellulaire modellen te implementeren is het noodzakelijk om zich eerst te richten op dosimetrische problemen van nanopartikels. Er moet bekeken worden welke fractie van partikels de nominale dosis uitmaakt die biologisch actief is. Wij hebben kunnen aantonen dat de volledige nominale dosis (alle SNP aanwezig in het cultuurmilieu) meespeelt in de cytotoxische activiteit ten opzichte van drie cellijnen die in het model gebruikt werden. Deze gegevens werden het onderwerp van een tweede publicatie (Lison *et al.* 2008).

Alvorens nog complexere cellulaire fenomenen aan te snijden, hebben we de cytotoxische activiteit van SNP ten aanzien van de drie gebruikte cellijnen onderzocht. Daarbij is aan het licht gekomen dat de kleinste SNP het meest toxisch zijn, en het oppervlak van de partikels (eerder dan de massa aan partikels) blijkt een belangrijke parameter te zijn om nanopartikels te relateren aan toxiciteit. Deze gegevens werden verwerkt in een volgende publicatie (Napierska *et al.*, 2009). Aanvullende onderzoeken hebben getoond dat de fysico-chemische determinanten van de cytotoxiciteit variëren naargelang de bestudeerde cellijn. Het blijkt dat het weinig waarschijnlijk is dat slechts één eigenschap van de nanopartikels hun toxiciteit kan verklaren. Een bijzonder interessante waarneming slaat op de beschermende werking die de microporositeit van SNP blijkt te hebben op de macrofagecellijn. Voor andere cellijnen werd dit niet vastgesteld.

Om de genotoxische activiteit van SNP te bestuderen, is het noodzakelijk om een bepaald aantal criteria te hanteren die de kwaliteit en de geldigheid van de verworven resultaten kunnen garanderen. De bestaande literatuur werd kritisch bestudeerd teneinde de belangrijke aspecten aan te duiden die in rekening gebracht moeten worden bij nanogenotoxicologie. Dit werk werd het onderwerp van een wetenschappelijke publicatie (Gonzalez *et al.* 2008). Onder andere bleek dat een potentiële interactie van de nanopartikels met de toegepaste testen eerst moeten onderzocht worden. In deze context werd de interactie van de SNP met de glycosylase voor de comet assay en van de cytochalasine-B met partikelopname in de micronucleus test bestudeerd. De resultaten van beide genotoxiciteitsstudies duiden aan dat SNP clastogene en aneugene effecten induceren; deze effecten zijn het duidelijkst bij de kleinste SNP. De

verworven resultaten tijdens deze eerste fase suggereren dat de SNP interageren met de microtubuli in de cel.

D. Bijdrage van het project in een context van wetenschappelijke ondersteuning van een beleid gericht op duurzame ontwikkeling

Een vroegtijdige berekening van de mogelijke impacten van nanotechnologie op de omgeving en de volksgezondheid is onontbeerlijk om de duurzame ontwikkeling van deze nieuwe economische tak te garanderen. Zo kan een negatieve perceptie vermeden worden. In de geest van een duurzame ontwikkeling, hangt het aanvaarden van nieuwe nanomaterialen door het publiek in feite vooral af van de capaciteit om (eco)toxicologische aspecten te integreren vanaf de eerste stappen in de industriële ontwikkeling. Het project S²NANO maakt het mogelijk om te anticiperen op toxicologische problemen en bezit daardoor een grote socio-economische waarde.

E. Trefwoorden

Nanomaterialen – Nanopartikels – Nanotoxicologie - Nanogenotoxicologie

Tabel 1 : Stalen gemaakt in het kader van fase I van het project S²NANO

Staal	naam	type	structuur	concentratie (mg/ml)	Hydrodynamische diameter (DLS) in DMEM (nm)**	EM diameter (nm)	Berekend extern oppervlak (EM)*** (m ² /g)	BET oppervlak (m ² /g)	extern oppervlak alphas (m ² /g)	microporie volume alphas (µl/g)
S1	*	Stober	amorf	3,69	38,09	29,3	102			
S2	S-16	Stober	amorf	3,24	25	16,4	183	220	183	22
S3	S-19	Stober	amorf	2,54	26	19,4	155	139	145	34
S4	S-60	Stober	amorf	4,63	75	60,4	50	42,1	33	0
S5	S-74	Stober	amorf	44,66	104	74,5	40	167	57	71
S6	S-104	Stober	amorf	5,13	139	104	29	41,2	28	2
S7	S-335	Stober	amorf	3,96	566	335	9	16,4	8	3
HS	L-15	Ludox	amorf	124,36	22	14,7	204	255	179	0
LS	L-14	Ludox	amorf	134,39	22	13,8	217	275	196	0
SM	L-10*	Ludox	amorf	167,82	63	10,3	291	343	250	0
SM2	L-11	Ludox	amorf	44,48	21	11,0	273	241	179	0
F1	Lys-2	Lysine	amorf	11,12	12	2,1	1429	325	232	2
F2	Lys-26	Lysine	amorf	2,09	28	25,7	117	141	121	0
F3	Lys-34	Lysine	amorf	5,79	38	33,6	89	80	71	0
F4	Lys-36	Lysine	amorf	10,59	40	35,7	84	89,4	73	0
S10	S-25	Stober	amorf	1,09	30,39	18,1	166	279	206	3
S11	S-22	Stober	amorf	0,84	33,28	15,1	199	385	244	33
S12	S-28	Stober	amorf	3,32	36,61	16,7	179	422	261	40

* aggregaten ~90 nm

** : na 24 h

*** : perfect sferisch model