

# 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
  - $\mu$ -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:

$\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CeO}_2$

- Quantum Dots
- (Fullerene)

# TiO<sub>2</sub> 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

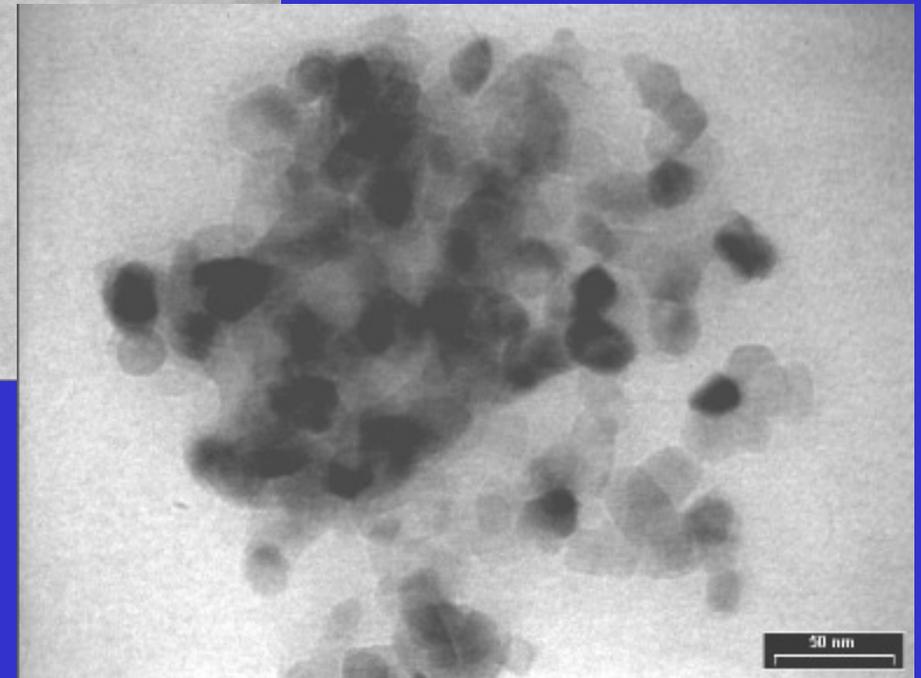
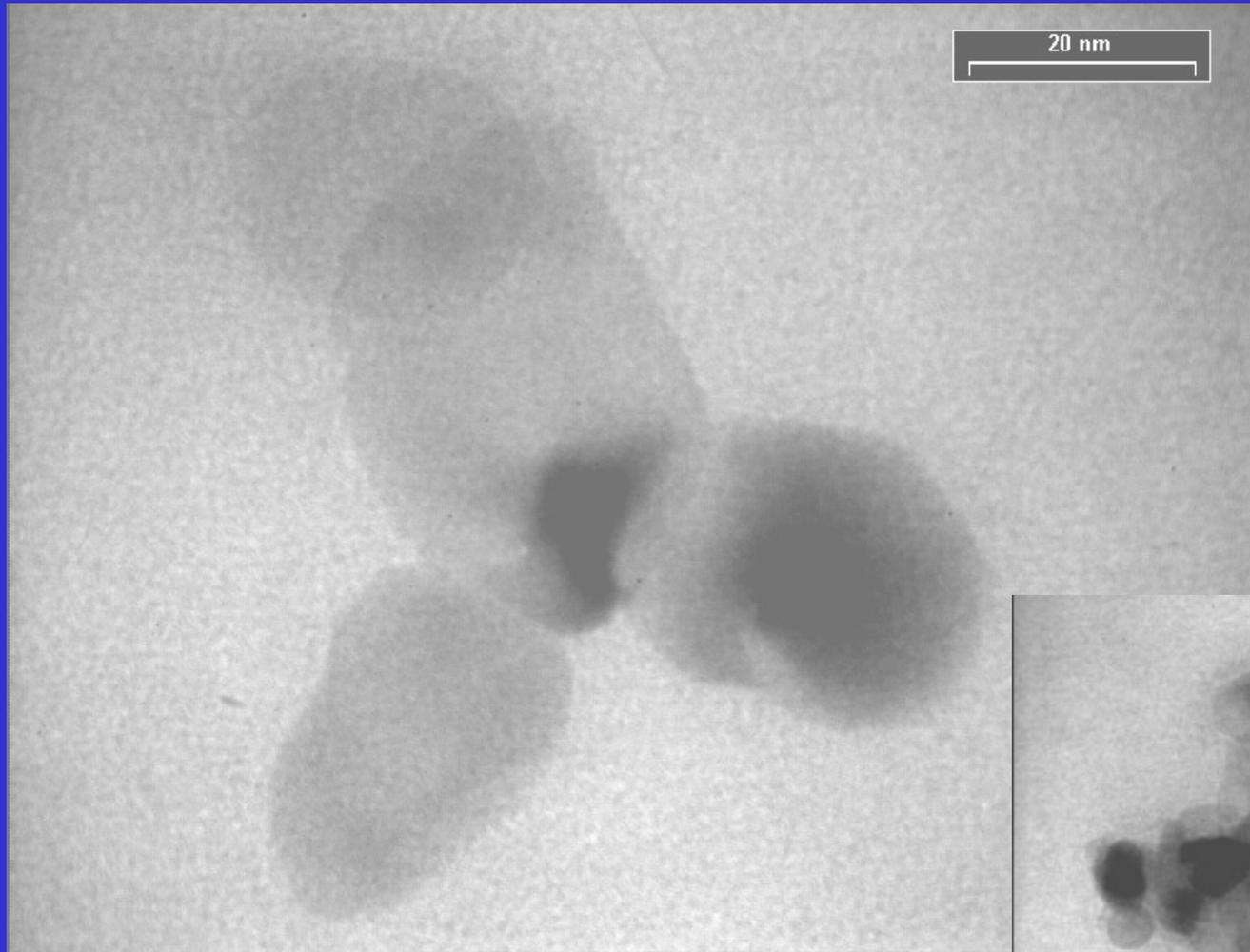
- Pigmentary grade, pharmaceutical grade Sigma

enthält auch eine ultrafeine Fraktion

- und viele andere ...

# TEM von veraschter Eucerin Micropigment Lotion 25

---

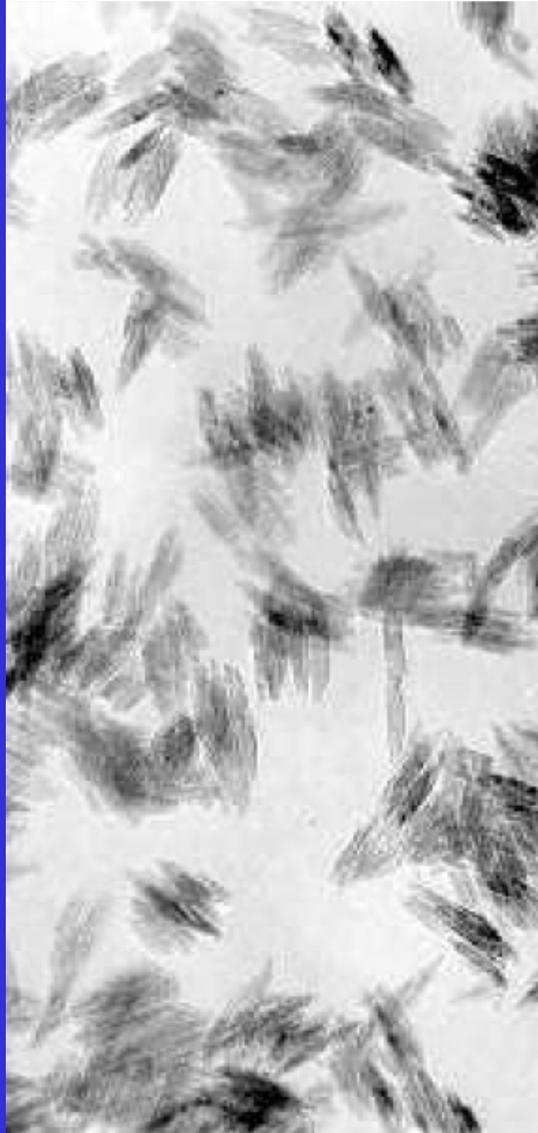


Wagner, Uni Leipzig

# Eusolex T-2000 MERCK

---

Primäre Partikel 20 nm  
Modifikation: Rutil



## Spezifikation:

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

pH (10% Suspension):  
5.5 – 7.5

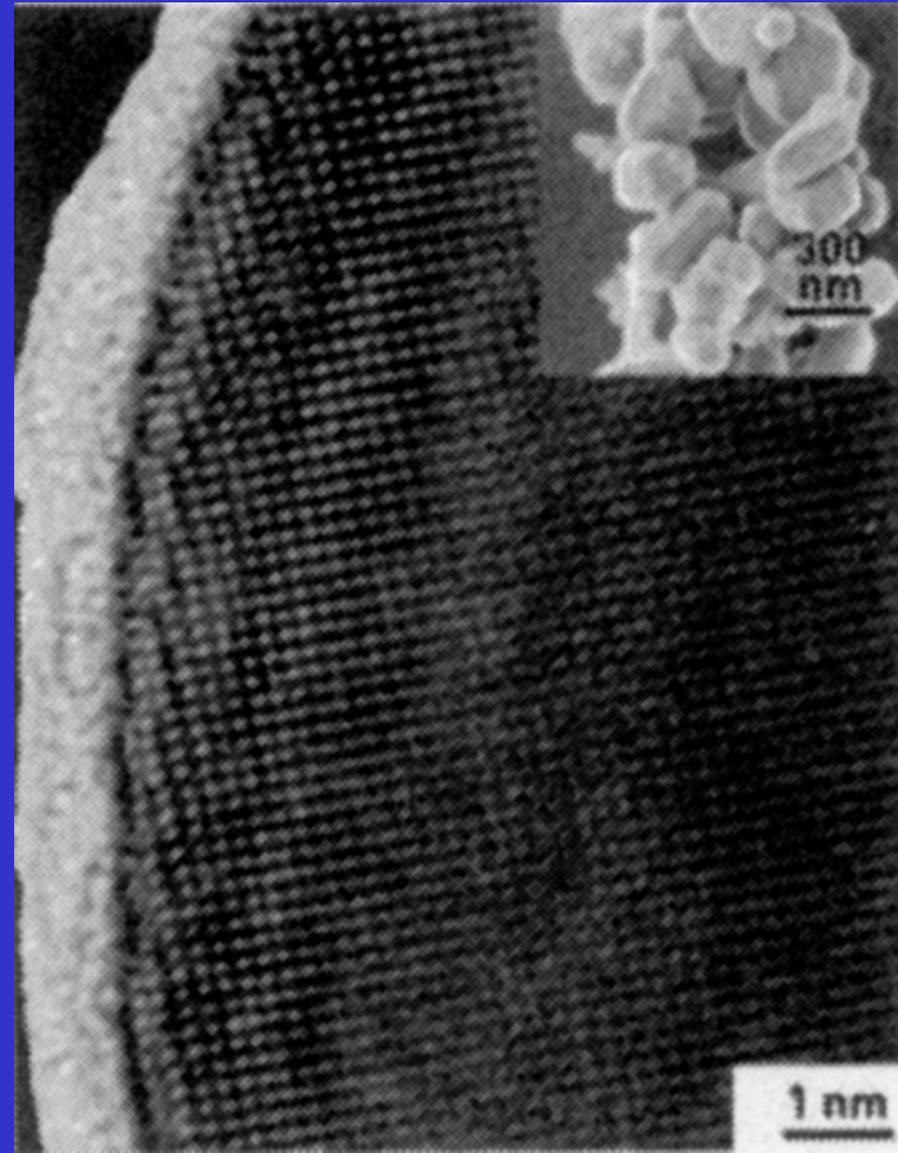
mikrobiologischer Test:  
< 100 KBE/g  
keine pathogenen Keime

**Keinen Staub einatmen!**

Quelle: Merck-Prospekt

# Kristallines $\text{TiO}_2$ ge-coated mit amorpher Silica-Schicht

---



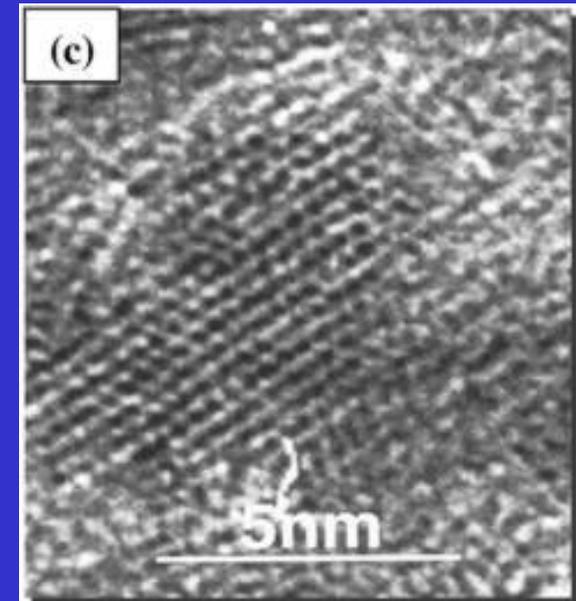
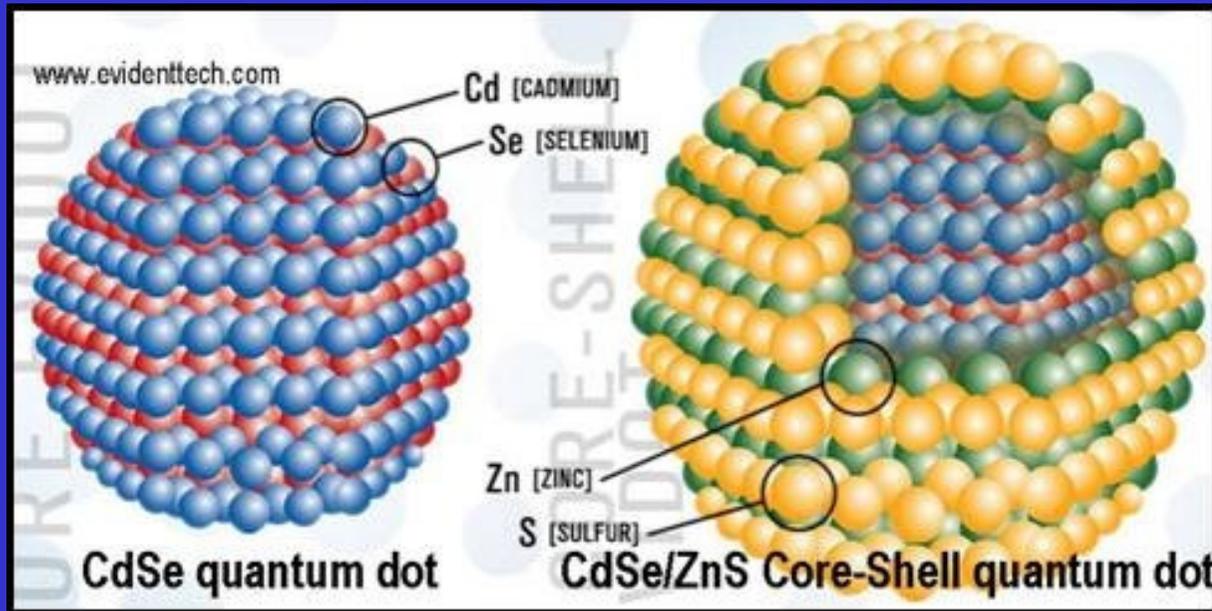
Aus:

Future Technologies Vol.54

Industrial application of nanomaterials –  
chances and risks

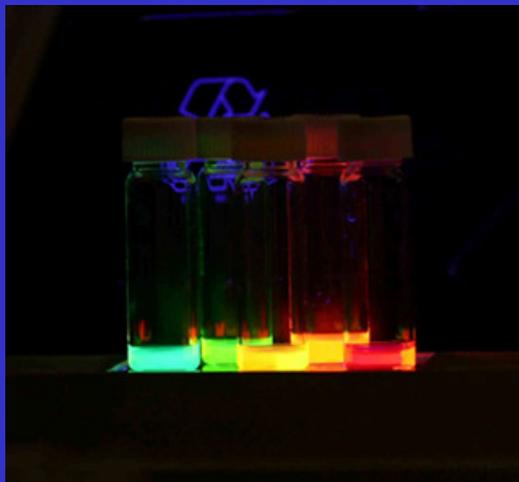
W. Luther (ed.)

# Quantum dots



- Fluoreszenz Marker
- Farbe hängt von Größe ab

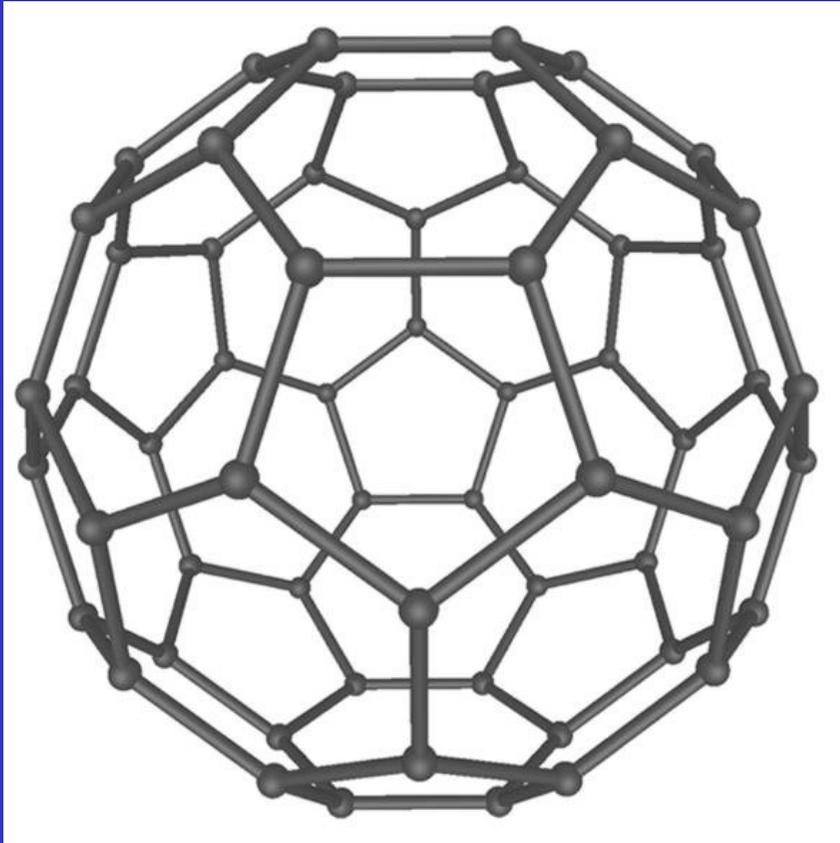
High Resolution  
Transmission  
Electron Microscopy



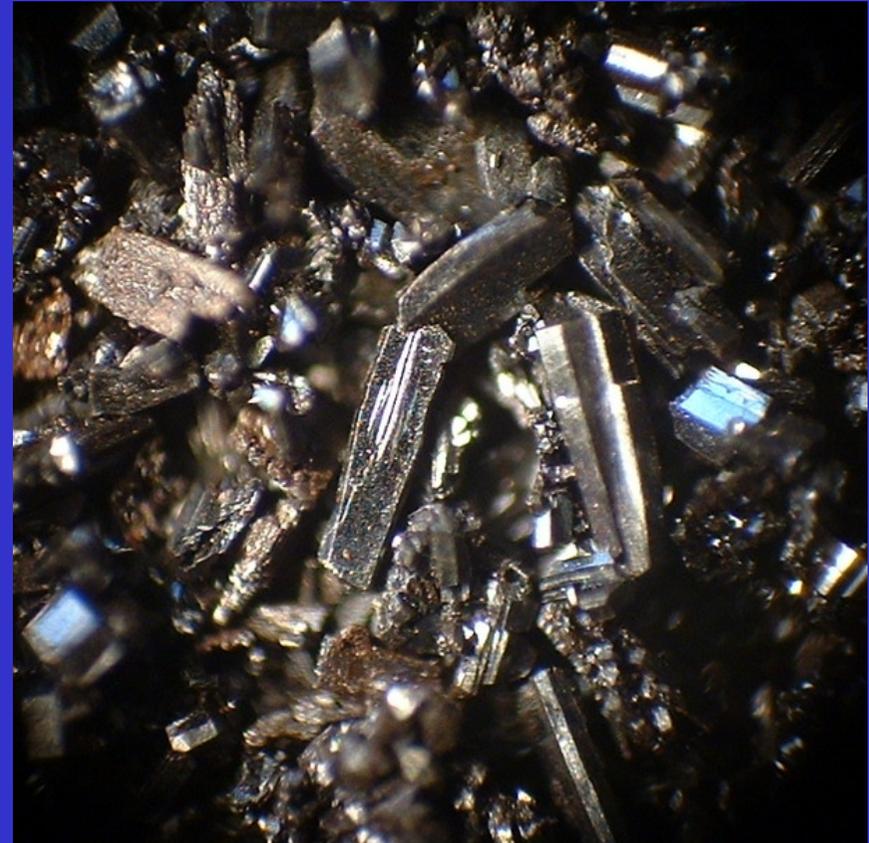
- Anwendungen z.B. in der Nano-Medizin

# Kohlenstoff-Allotrop: Fullerene

---



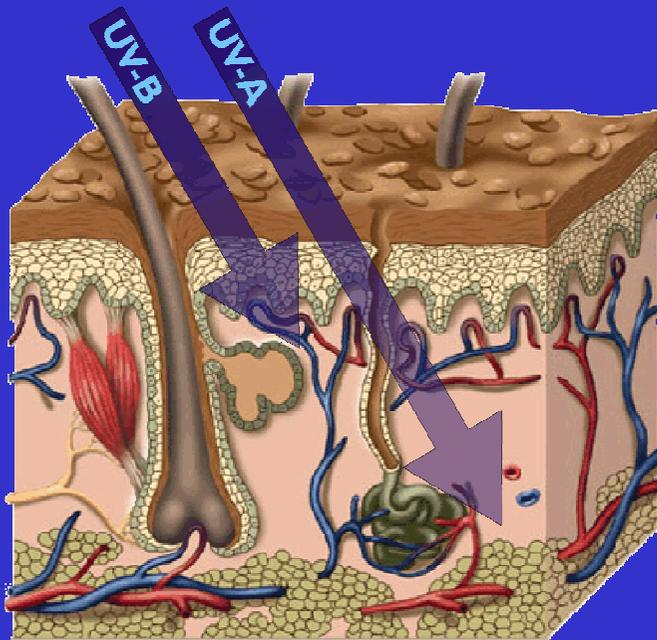
C60 Molekül  
Kein Nanopartikel!



kristalline Fullerene  
Nanopartikel / Bulk

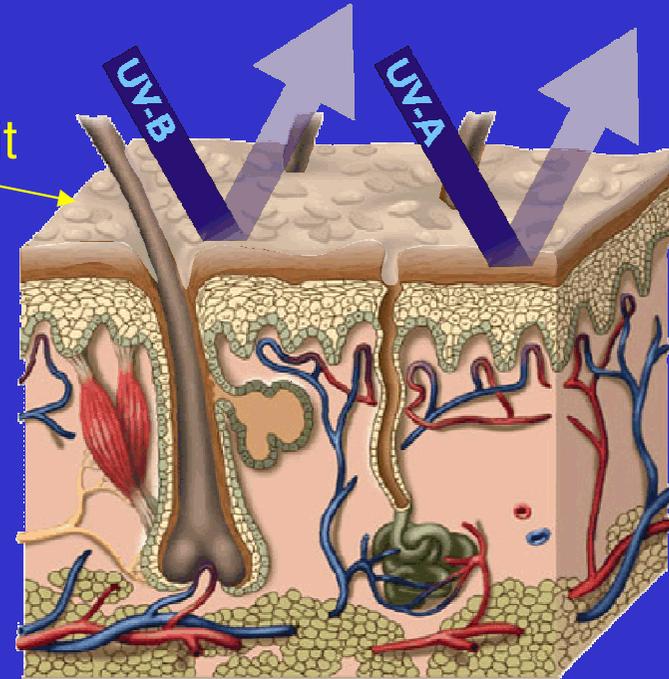
# Wirkung von $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln in Sonnenschutzmitteln

Ungeschützte Haut



Streuung und Absorption von UV-Strahlung

Sonnencreme mit Nanopartikeln



# Tape Stripping

---

Topische  
Anwendung:

2 ml/cm<sup>2</sup>

Expositionszeit:

0.5 -48 h

Entfernung von  
überstehender  
Formulierung

10-20 Tapes

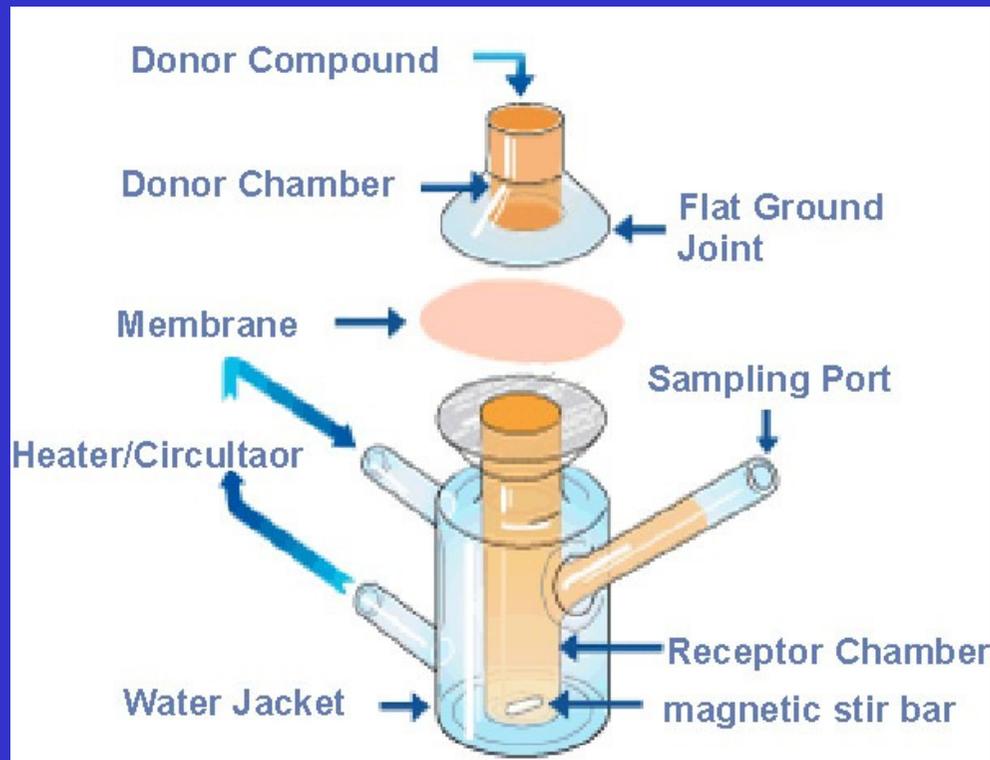


# Vor- und Nachteile von Tape Stripping

---

- 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)

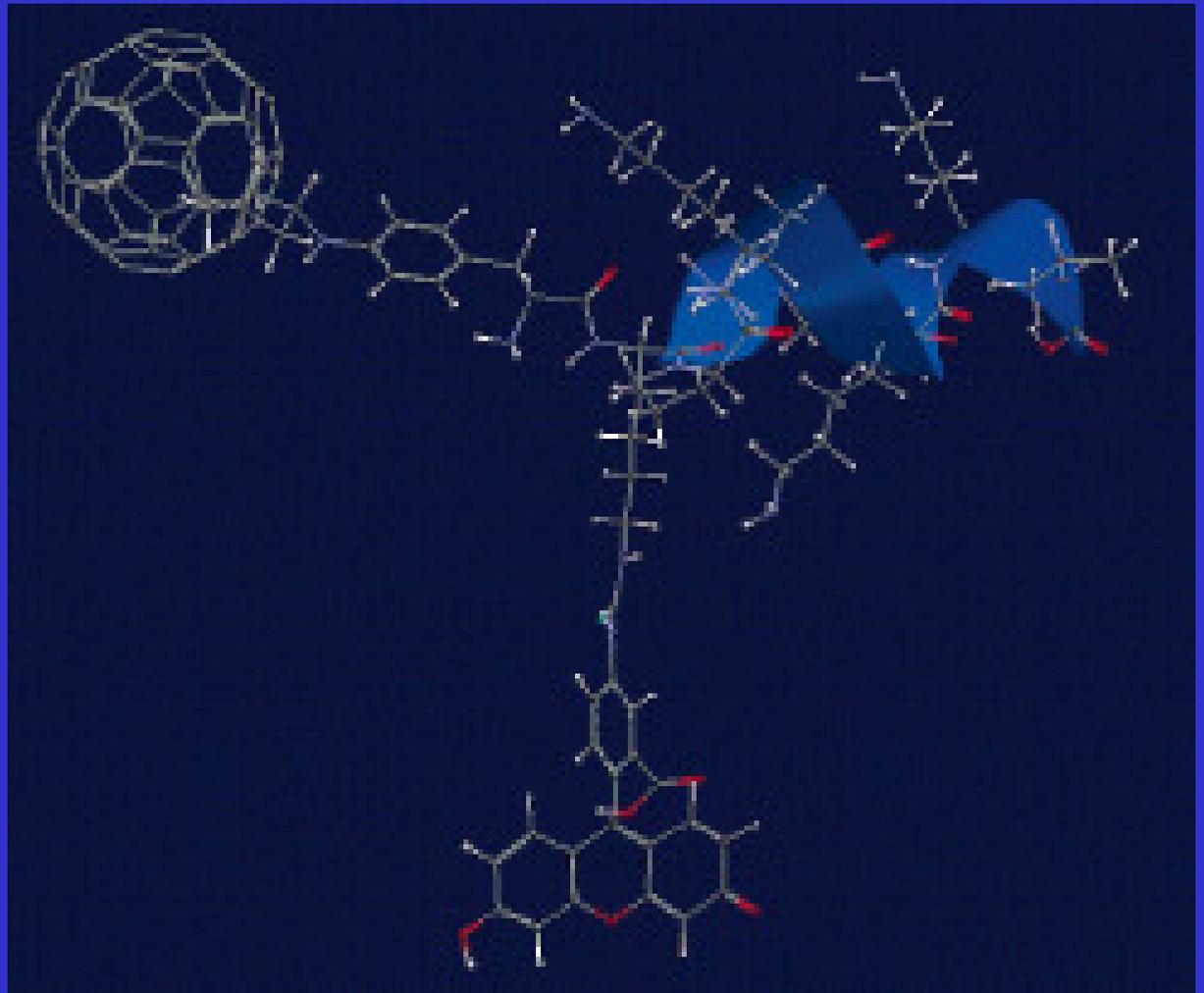
# Funktionalisierte Bucky-Balls

---

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

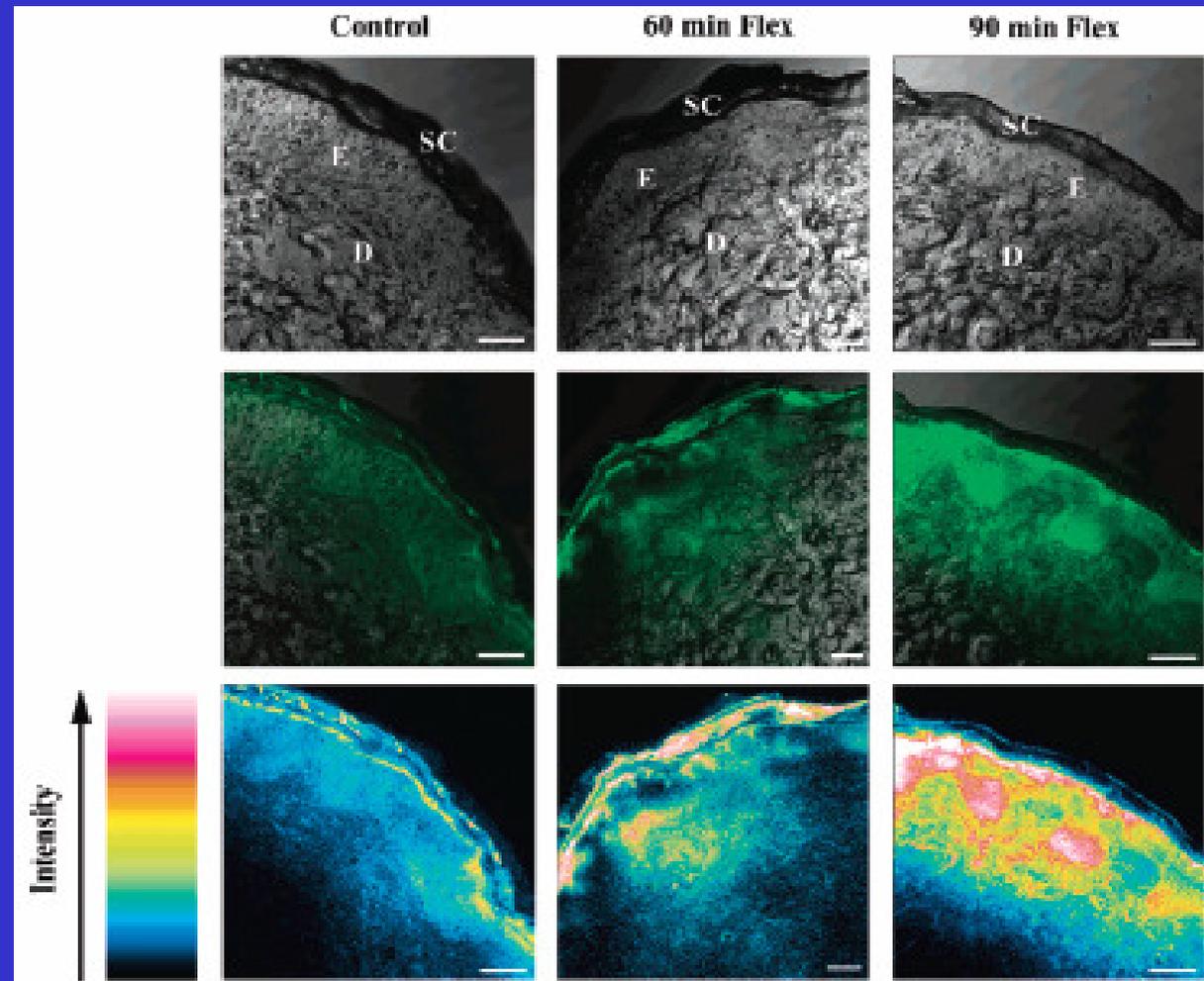
Flexed Skin

Confocal

Fluorescence

green

Confocal-DIC



# Hochauflösende Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (HRTEM)

---

## Vorteil:

visualisiert individuelle Partikel

mit EDX: Element-Zusammensetzung

## Nachteile:

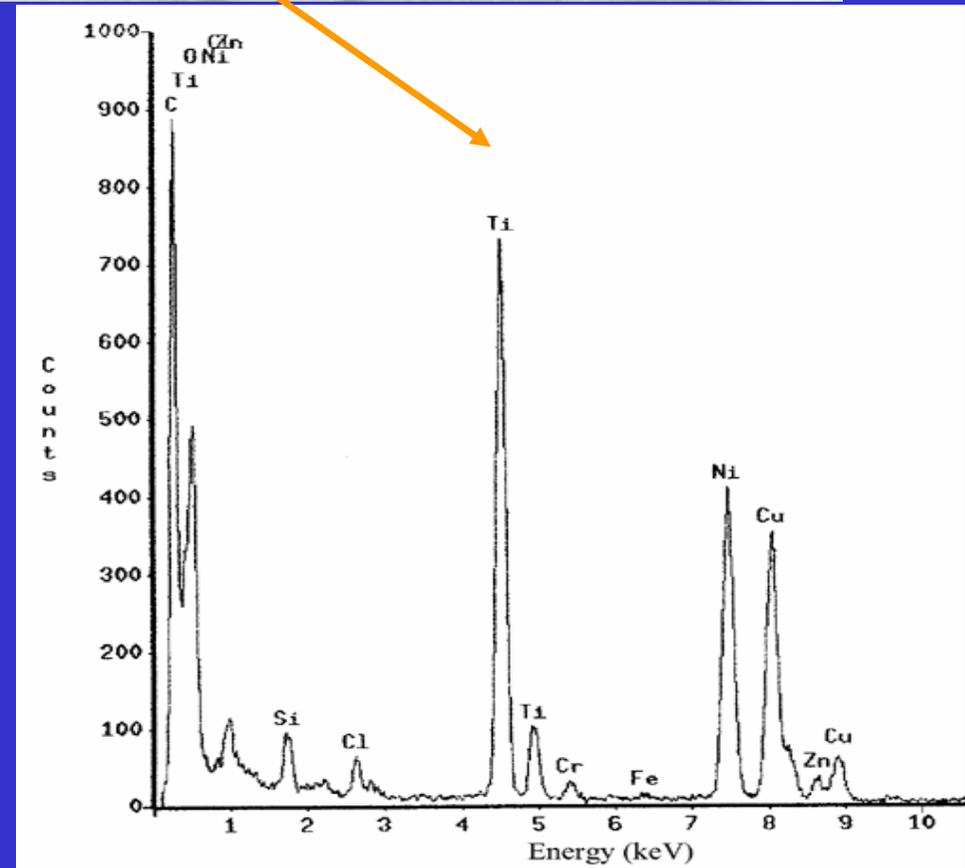
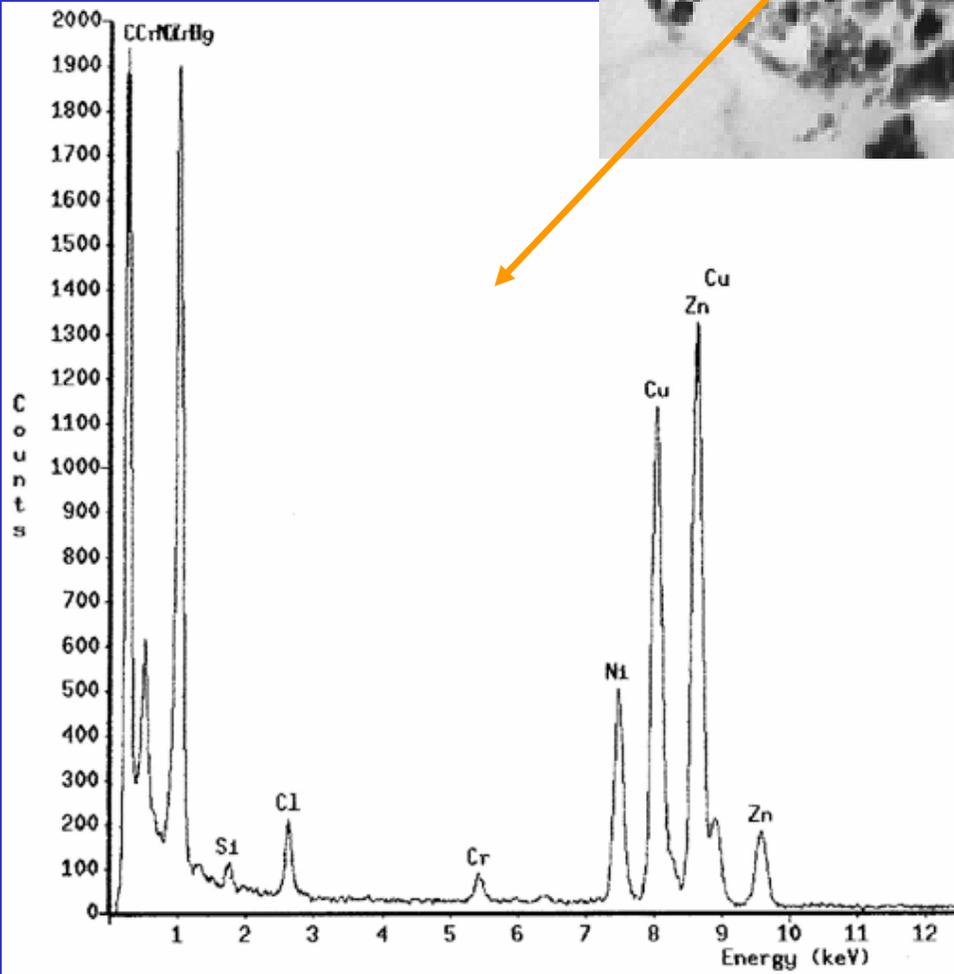
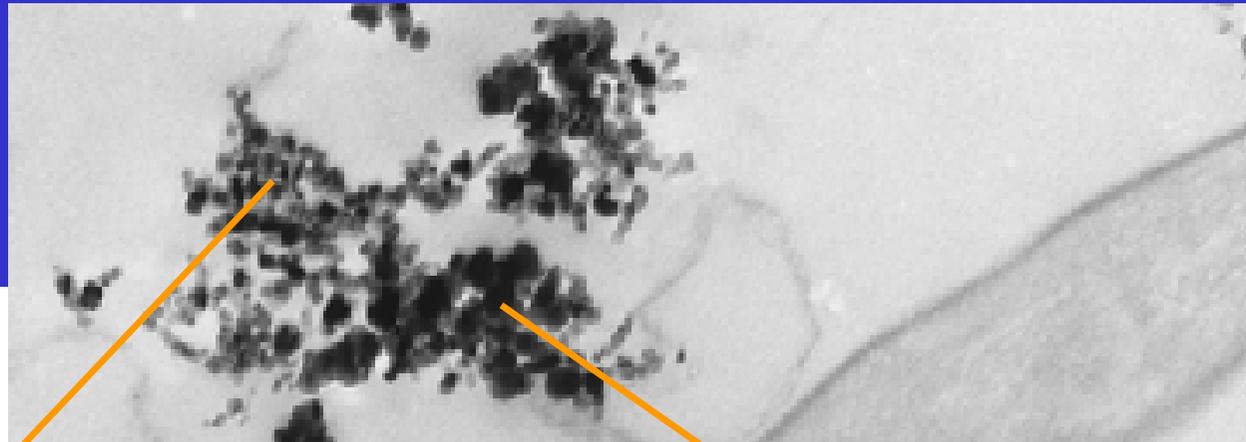
Benötigt ultra-dünne Querschnitte (60-100 nm)

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"><li>•nativ</li><li>•Wasserspülung</li><li>•Äthanol-Reinigung</li><li>•tape stripped (10x)</li></ul>
Expositionszeit (Stunden)	8, 24, 48	0.25 – 2.25	0.3 – 2.75



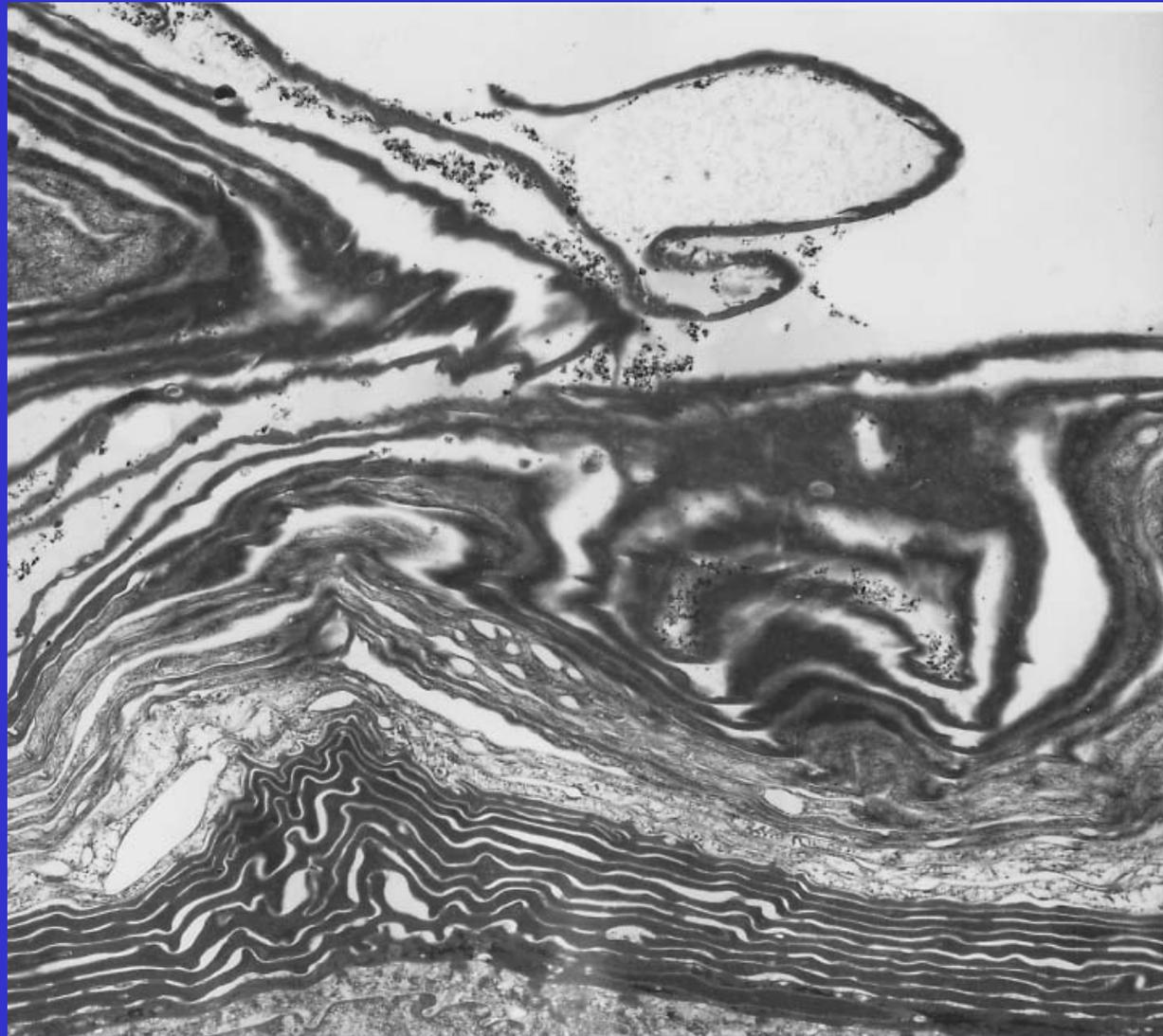
**Bereiche der Biopsien:**  
Innenseiten der Hinterbeine



**Stanzzylinder:**  
5 mm

# HRTEM 1

---

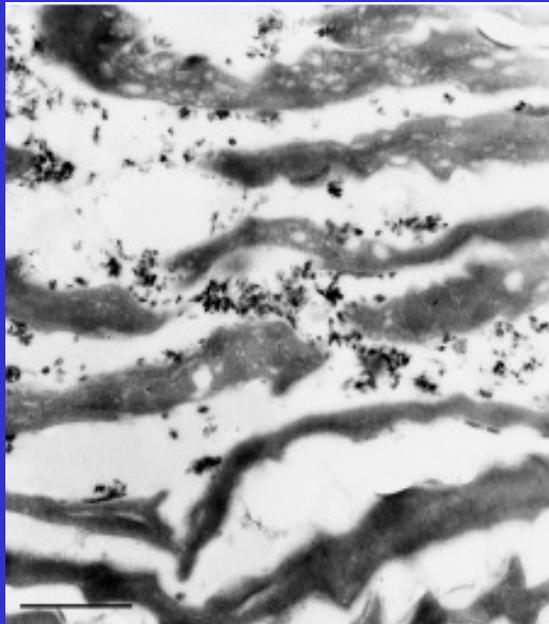


tiefe  
Hautfalte

Querschnitt durch das *stratum corneum*

# HRTEM-Bilder von Humanhaut- Querschnitten (Bordeaux)

---



TiO<sub>2</sub> im *stratum corneum disjunctum*

*s.c. disjunctum stripped*



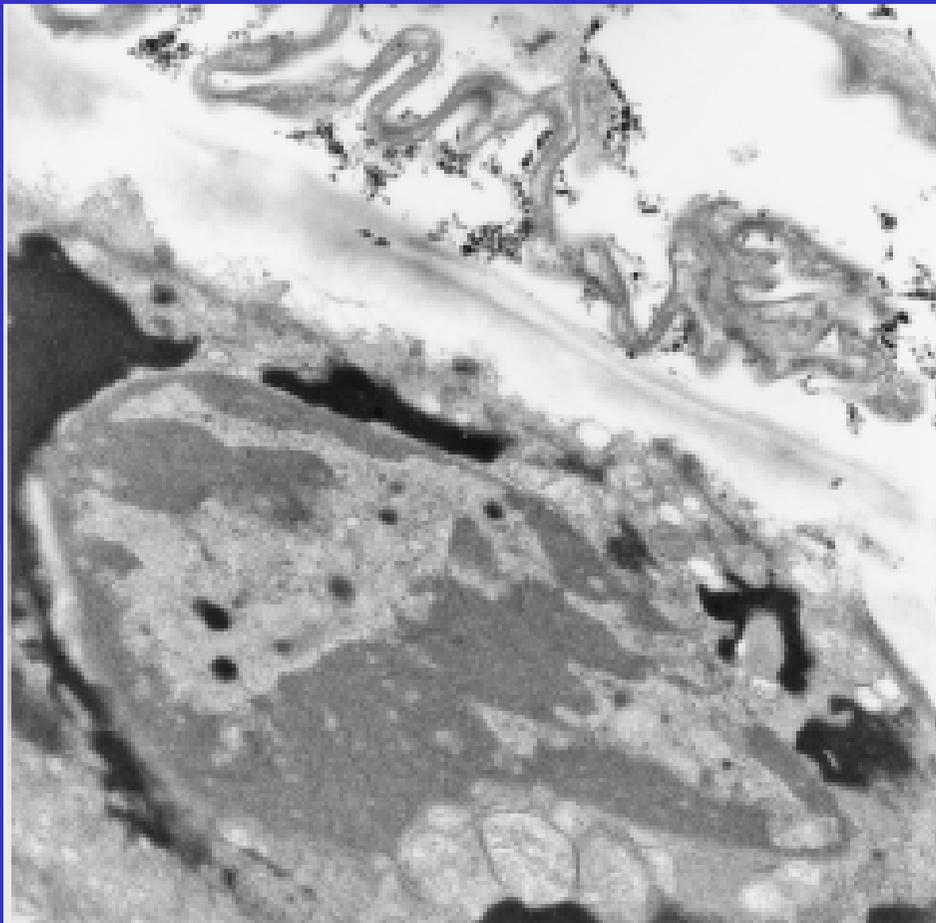
keine Penetration  
in das *stratum corneum compactum*

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

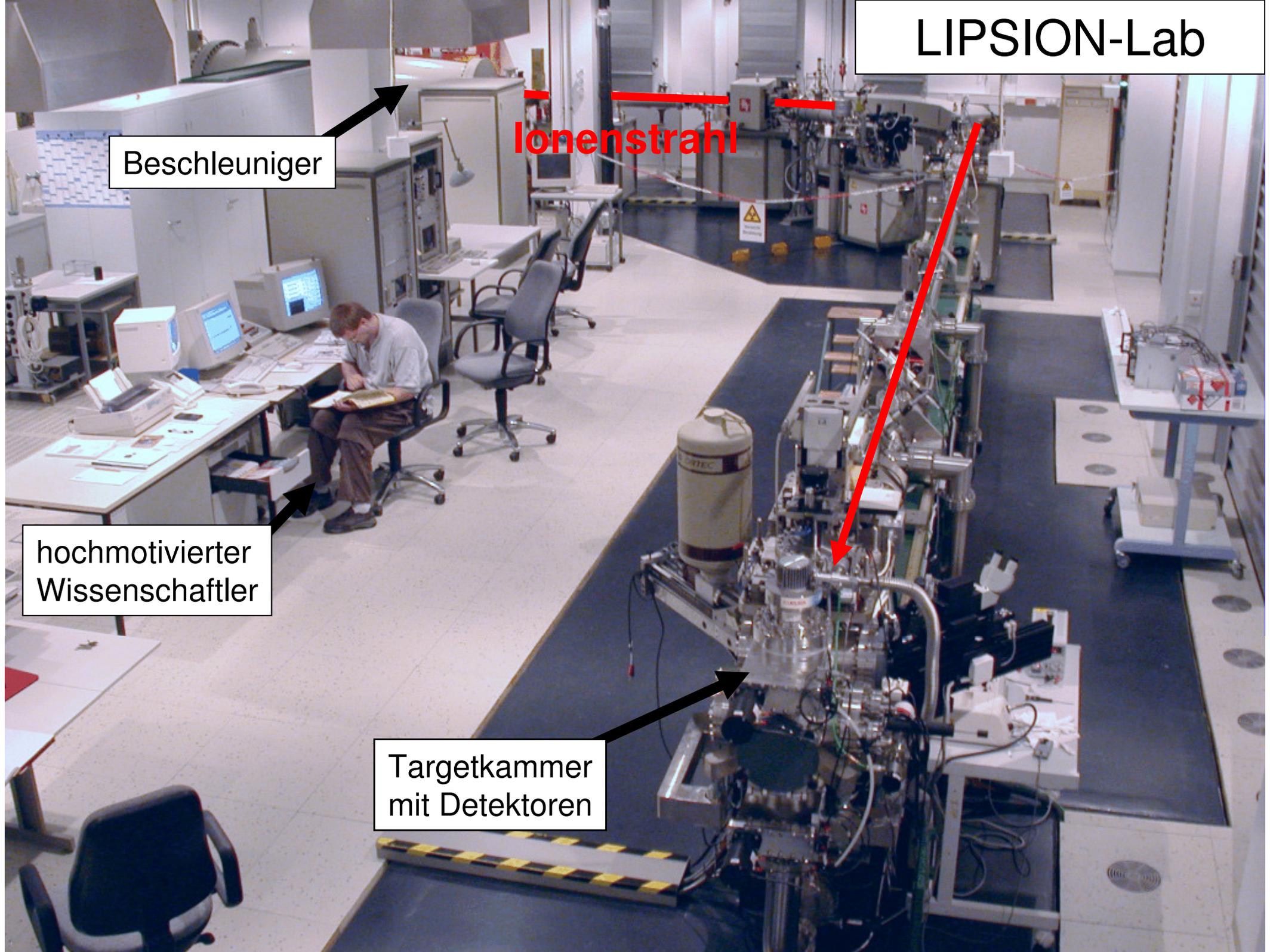
# LIPSION-Lab

Beschleuniger

Ionenstrahl

hochmotivierter  
Wissenschaftler

Targetkammer  
mit Detektoren



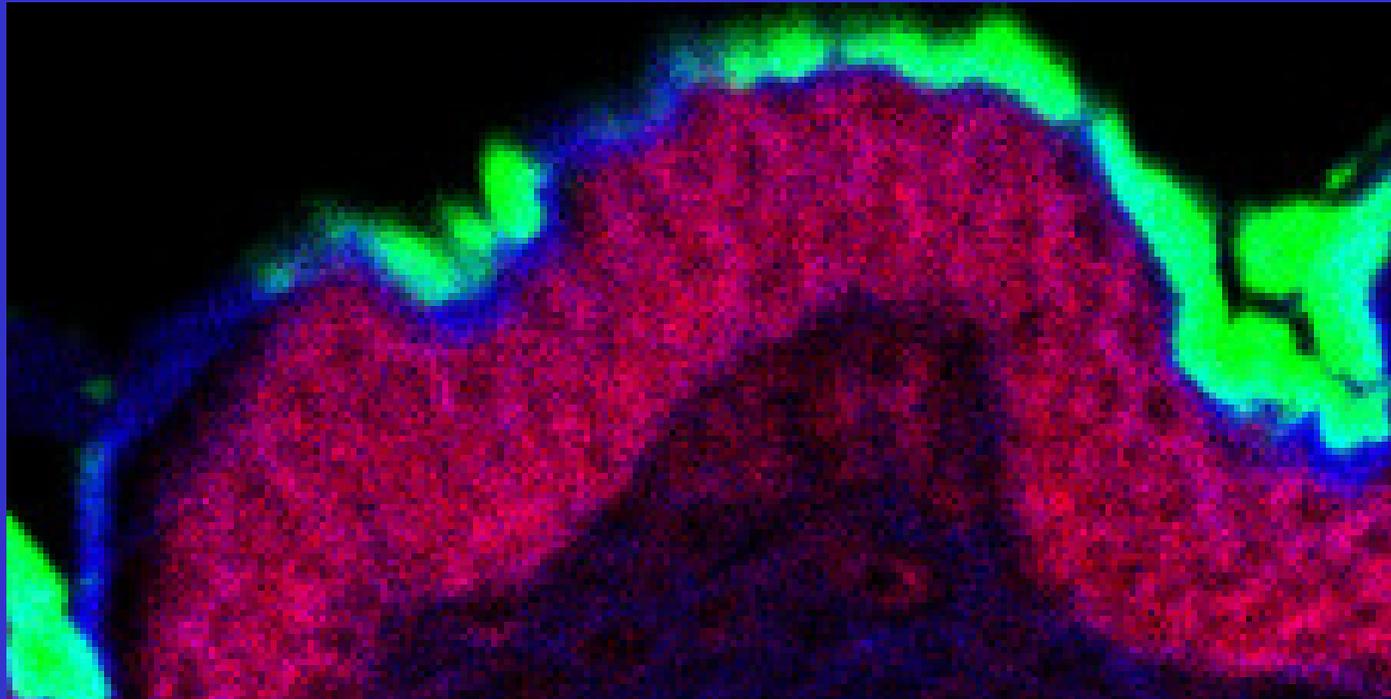
# 10 $\mu\text{m}$ dicke Probe montiert auf Probenhalter

---



# PIXE an Schweinehaut -Querschnitt

rot: P  
blau: S  
grün: Ti

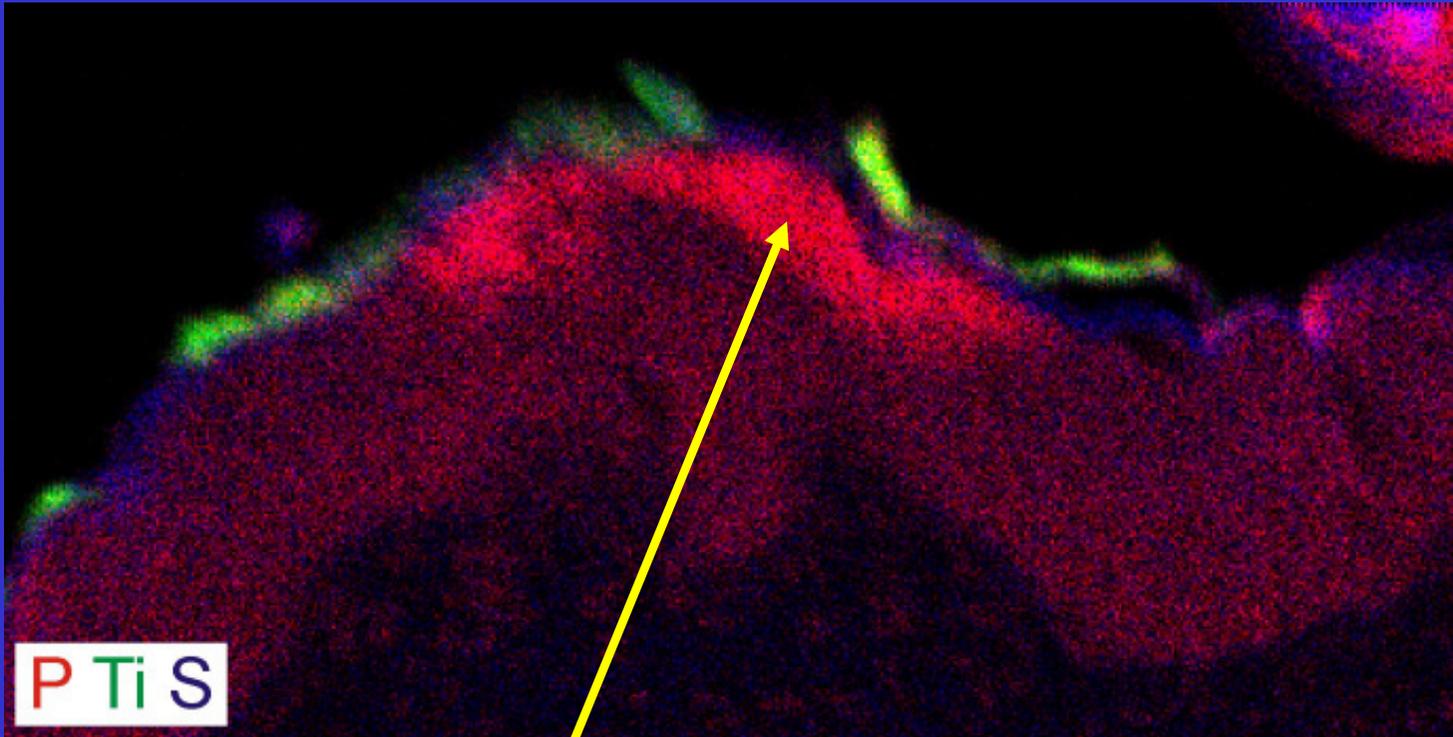


Klare Abgrenzung der Strata ohne Einfärbung:

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

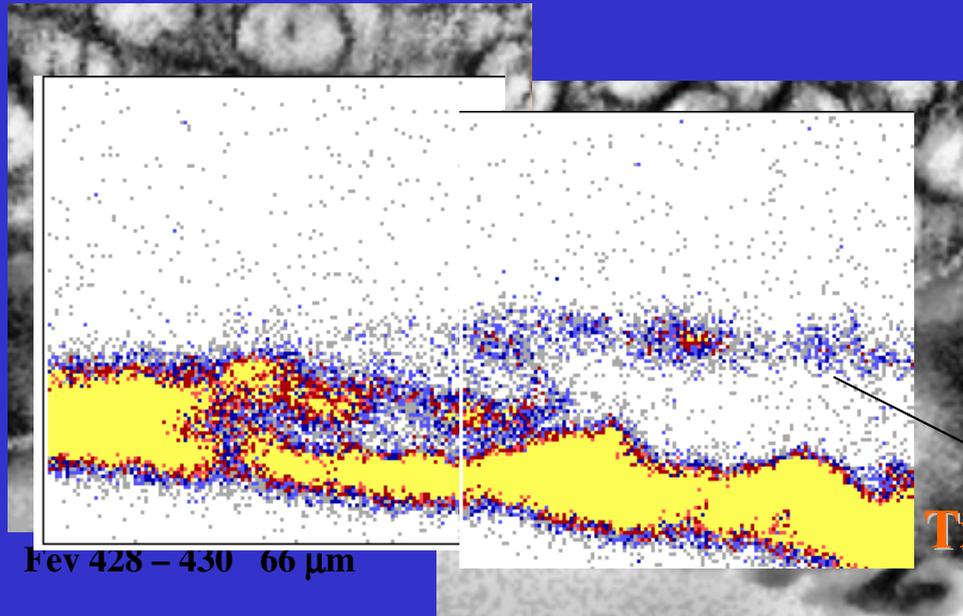
# Schnelle Transporter: Liposomenformulierung

---



Hoher Phosphorgehalt wegen Liposomenpenetration

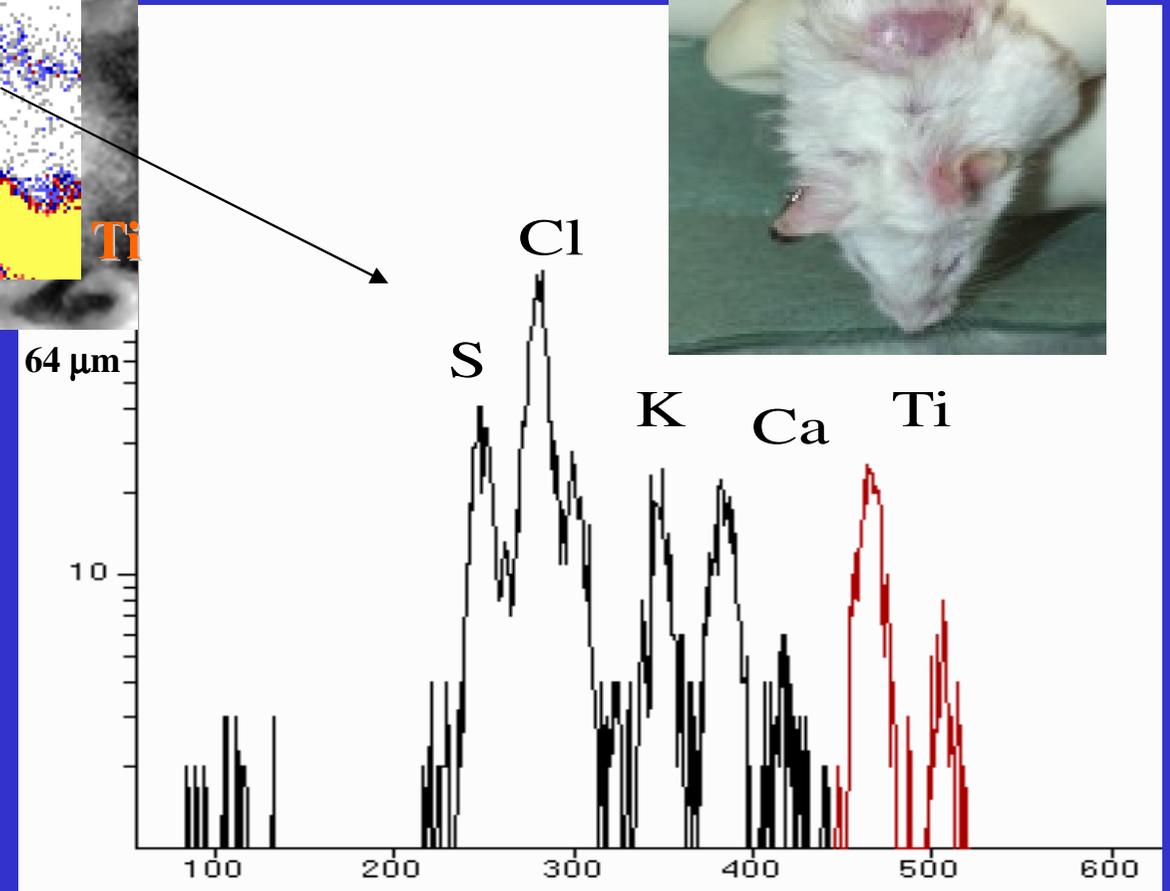
# Humanhaut auf SCID-Maus



Bordeaux  
Debrecen

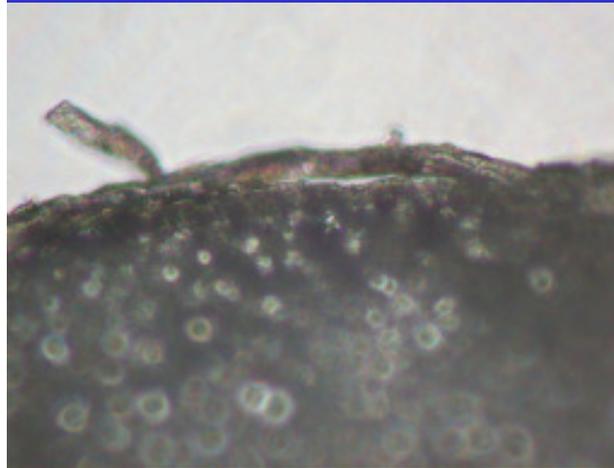


Signifikanter Ti-Gehalt im  
*stratum corneum compactum*  
und *stratum granulosum*

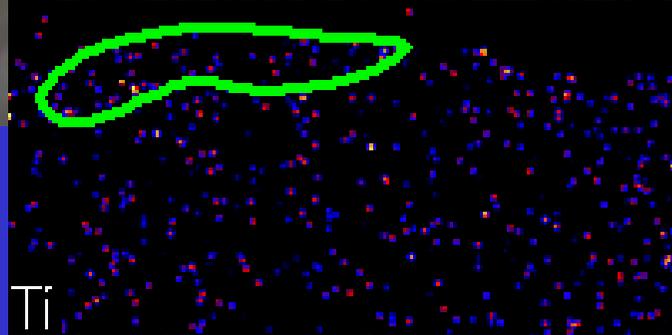
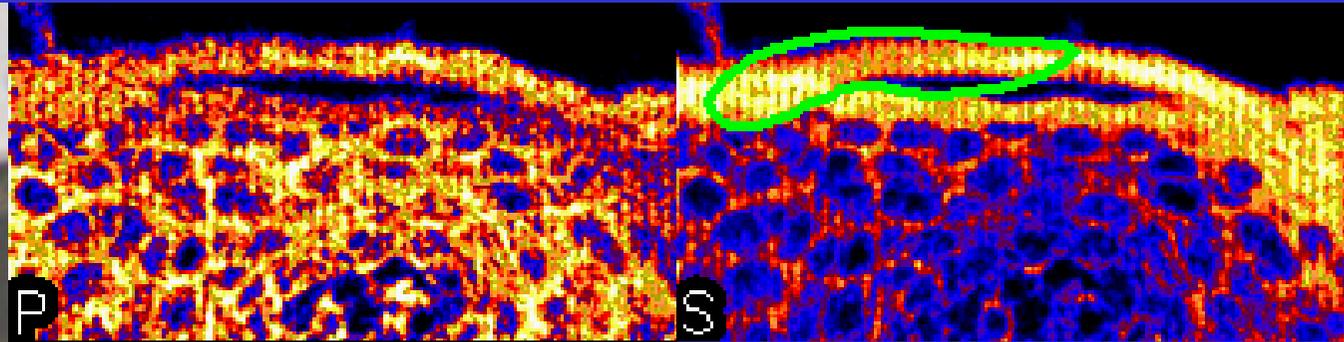


# Psoriatische Haut

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



optisches Bild



PIXE maps

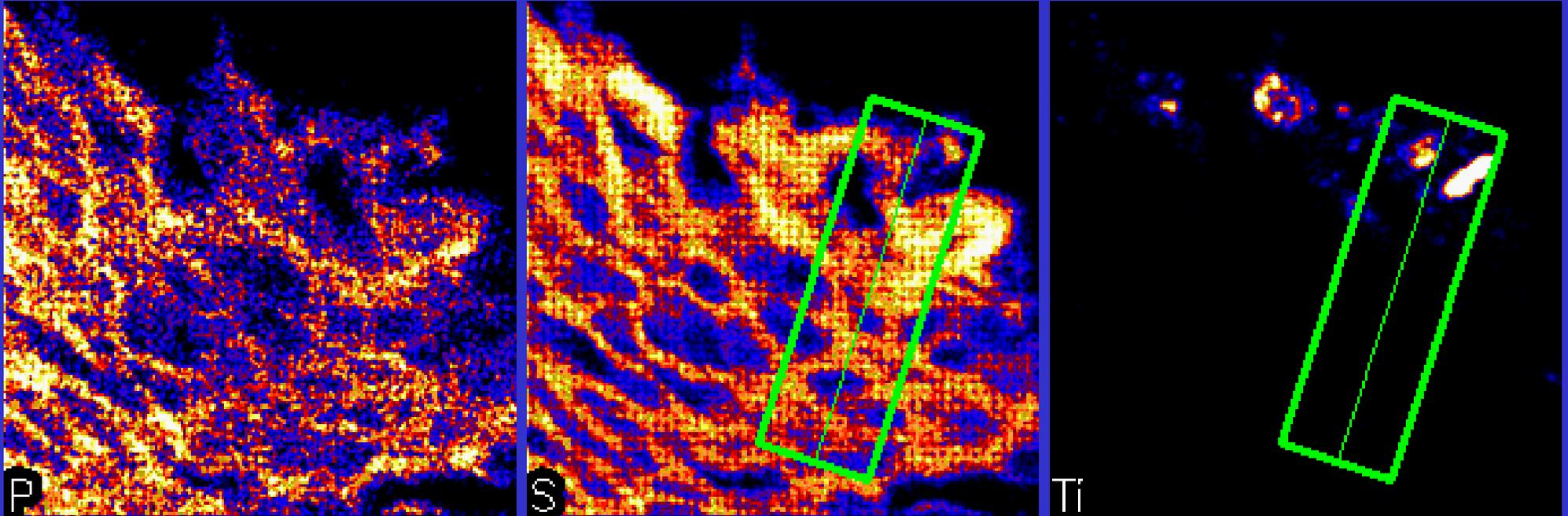
In dem eingekreisten Bereich ist die Ti-Konzentration unter 8ppm  
Es gibt eine klare Abgrenzung zwischen dem *stratum corneum* und dem *str. spinosum* im der S-map, nicht in der P-map (Hyperproliferation)

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

# Psoriatische Haut

M37d12 map (100  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$ , 0.27  $\mu\text{C}$ )

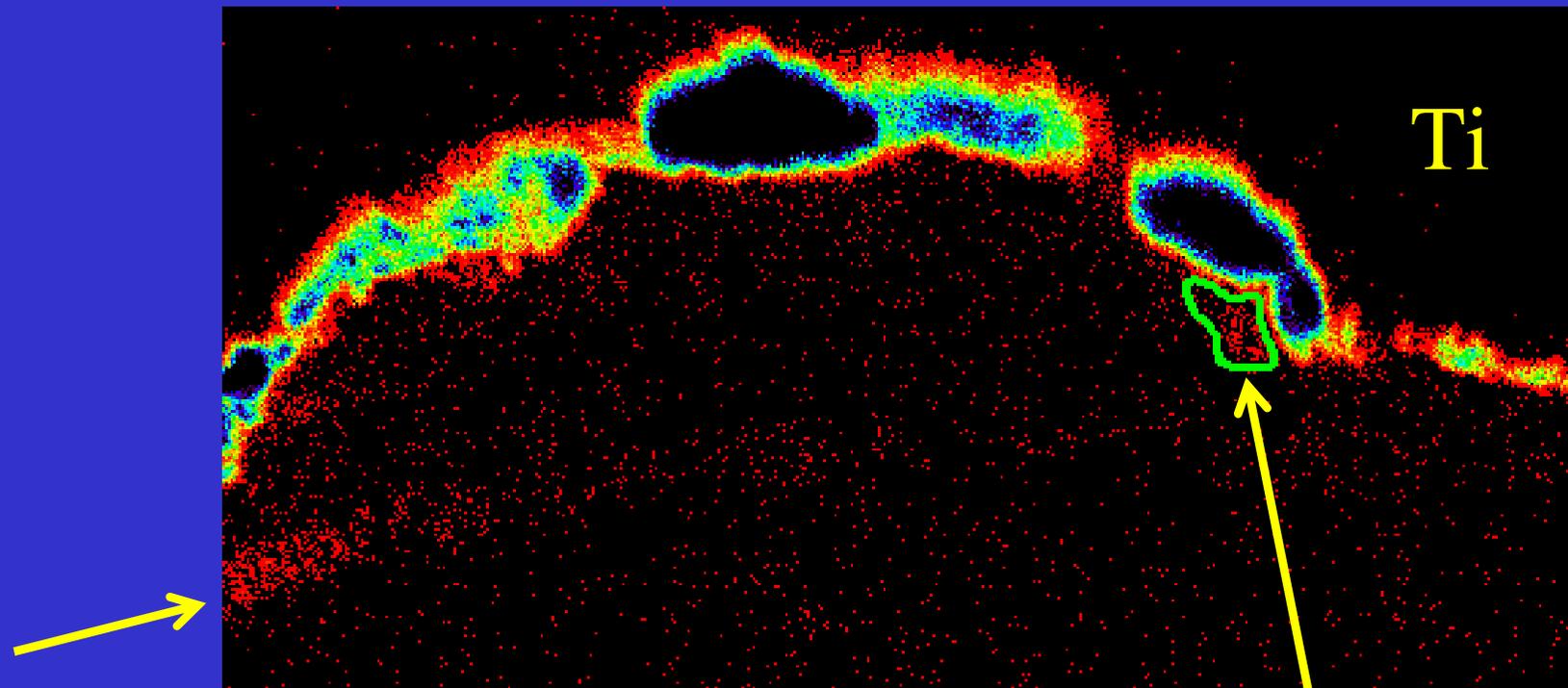
---



**Ti ist hauptsächlich in den obersten 30 $\mu\text{m}$  lokalisiert**  
**Es gibt keine klare Grenze zwischen dem *stratum corneum* und dem *stratum spinosum***

# Kontamination oder Penetration ?

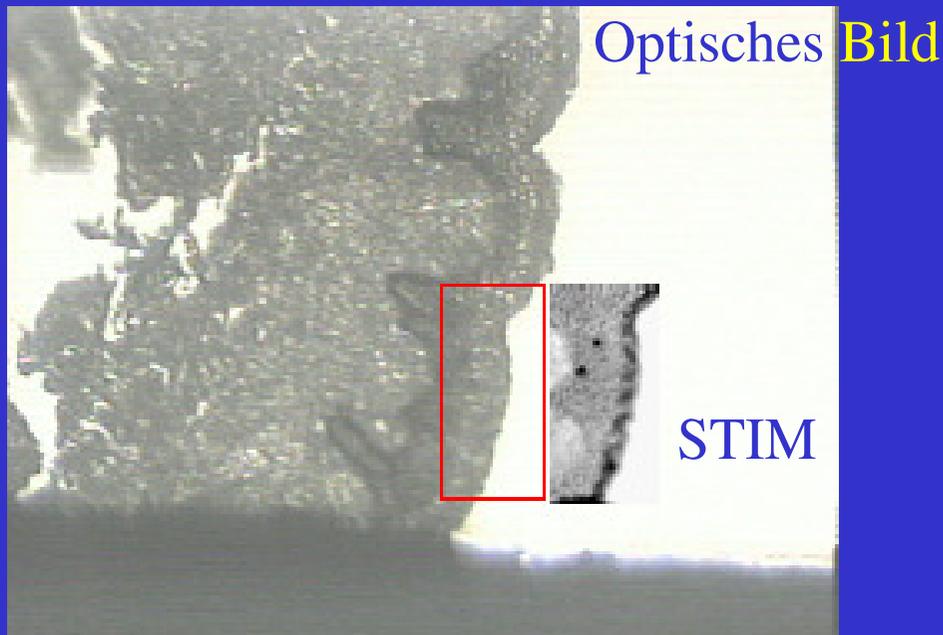
---



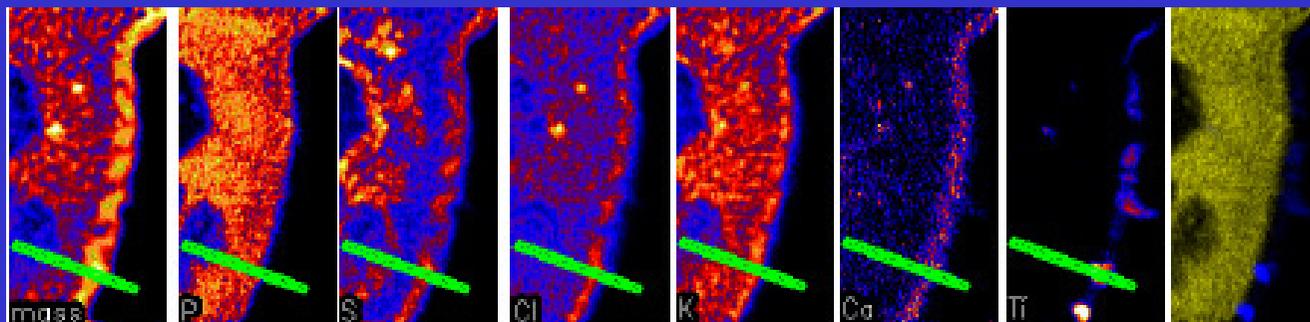
Schleifspur entlang der Schnittrichtung

Penetration?

# Präparationsartefakte

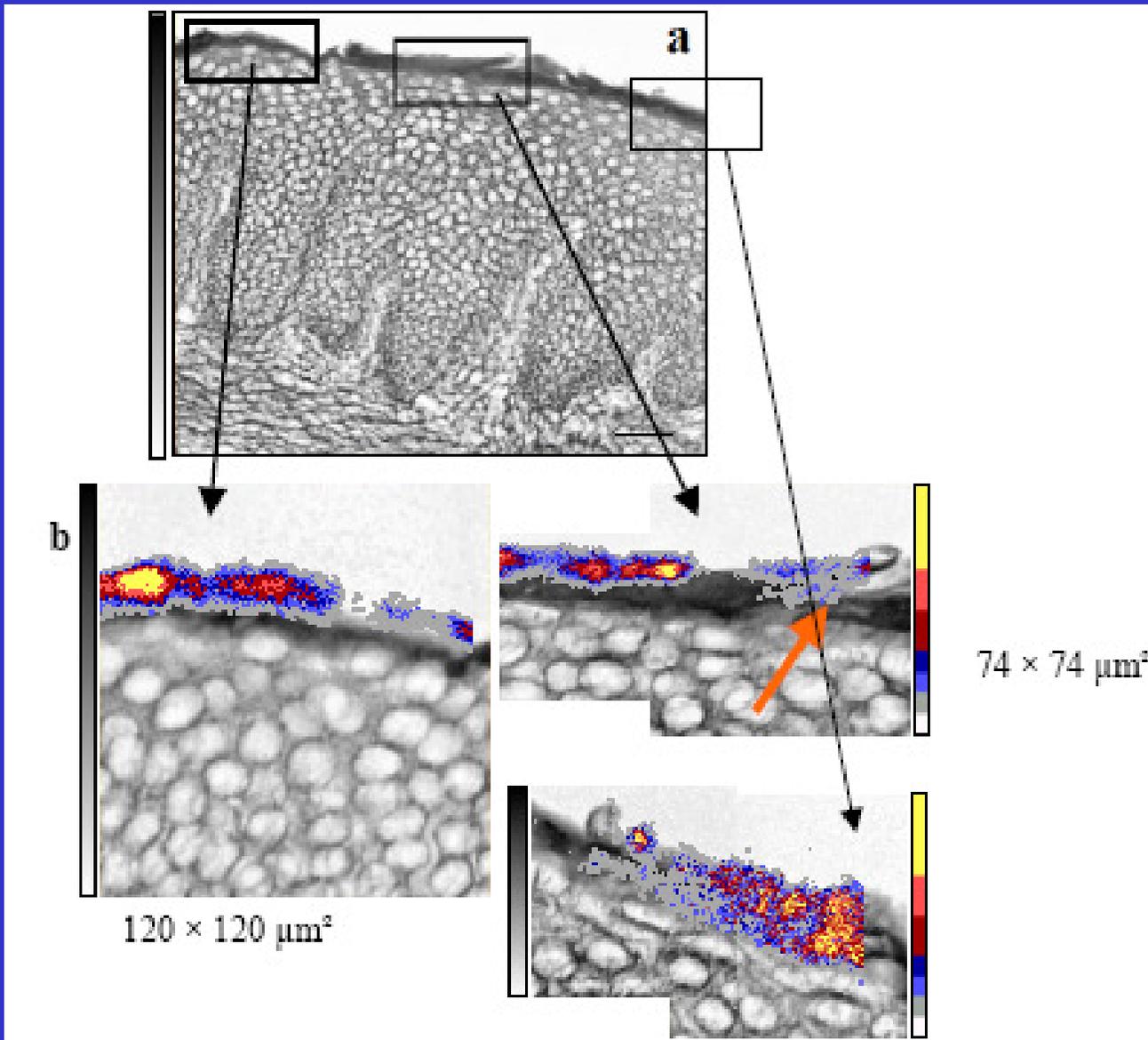


Dunkle Spots im  
optischen Bild  
aufgrund von  
abgelösten  
Hornhaut-Partikeln



PIXE

# Sind Mikroläsionen wichtig?



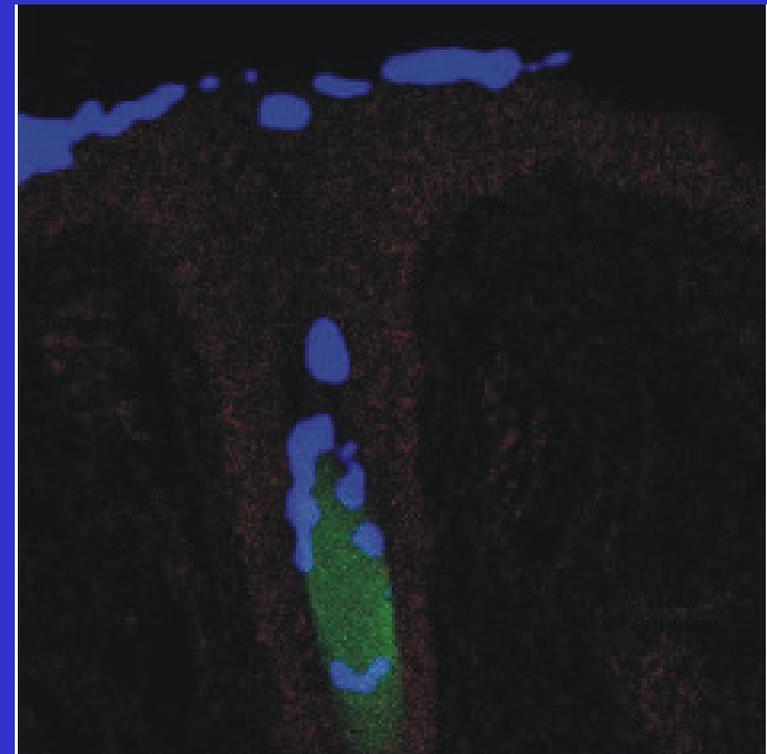
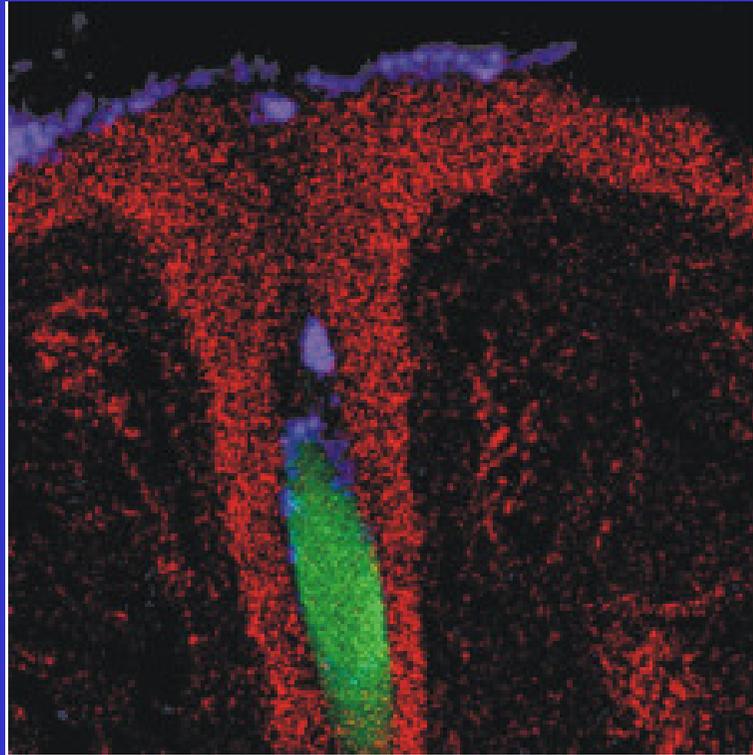
STIM and PIXE  
Bilder

Anthelios SPF 60  
24h/okklusiv

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

# Haar-Follikel

---



rot: P  
grün: S  
blau: Ti

400  $\mu\text{m}$  x 400  $\mu\text{m}$

Penetration in vitales Gewebe?

# Radioaktiv markiertes $\text{TiO}_2$ Autoradiographie mit Mikroemulsionen

---

## Vorteile:

- ultrasensitiv

- individuelle Positronenspuren sind sichtbar

## Nachteil:

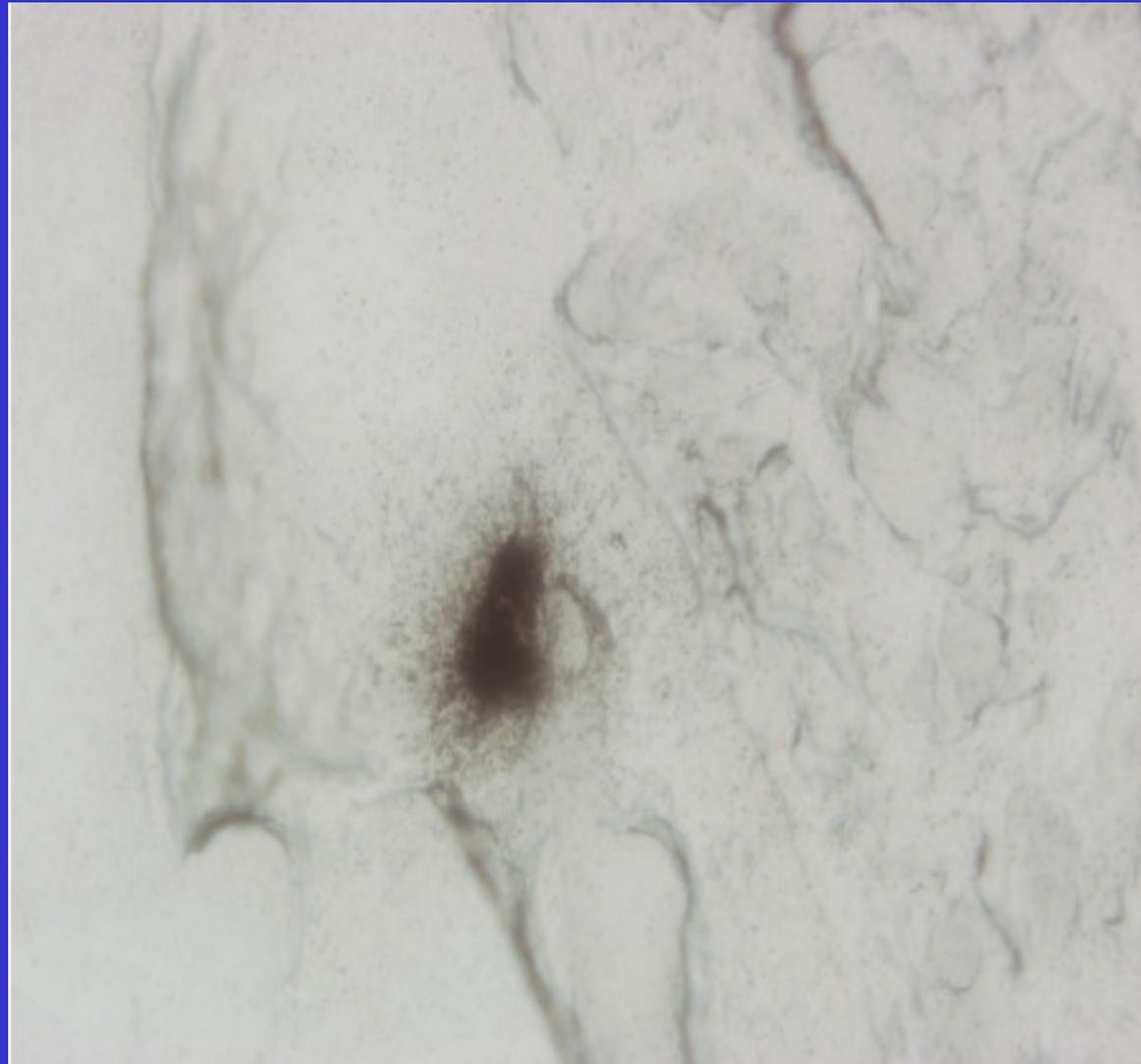
- Kontaminationen sind schwierig zu vermeiden

# Autoradiographie mit Mikroemulsionen und $^{48}\text{V}$ -markiertem $\text{TiO}_2$

---

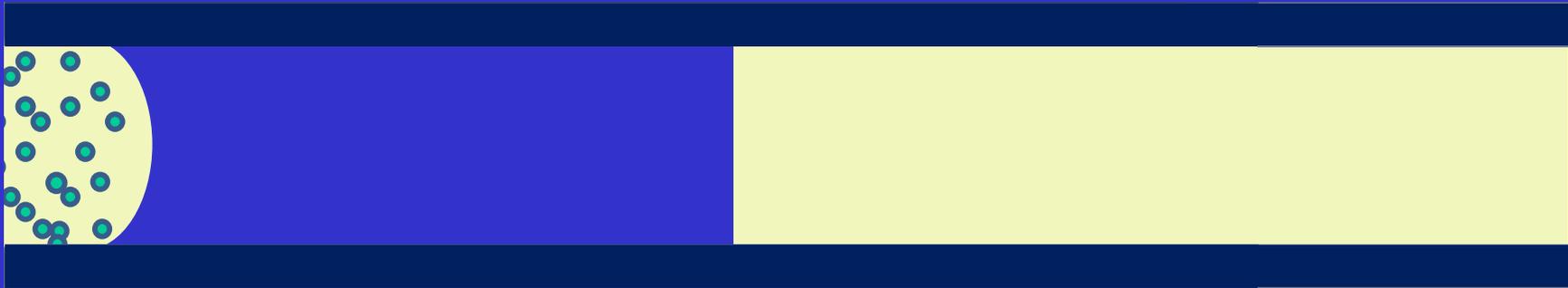
Hautfalte

individuelle  
Positronen-  
spuren sind  
sichtbar



# Transportmechanismus?

---



transient: mechanisches Einbringen

stationär: Diffusion ist zu langsam

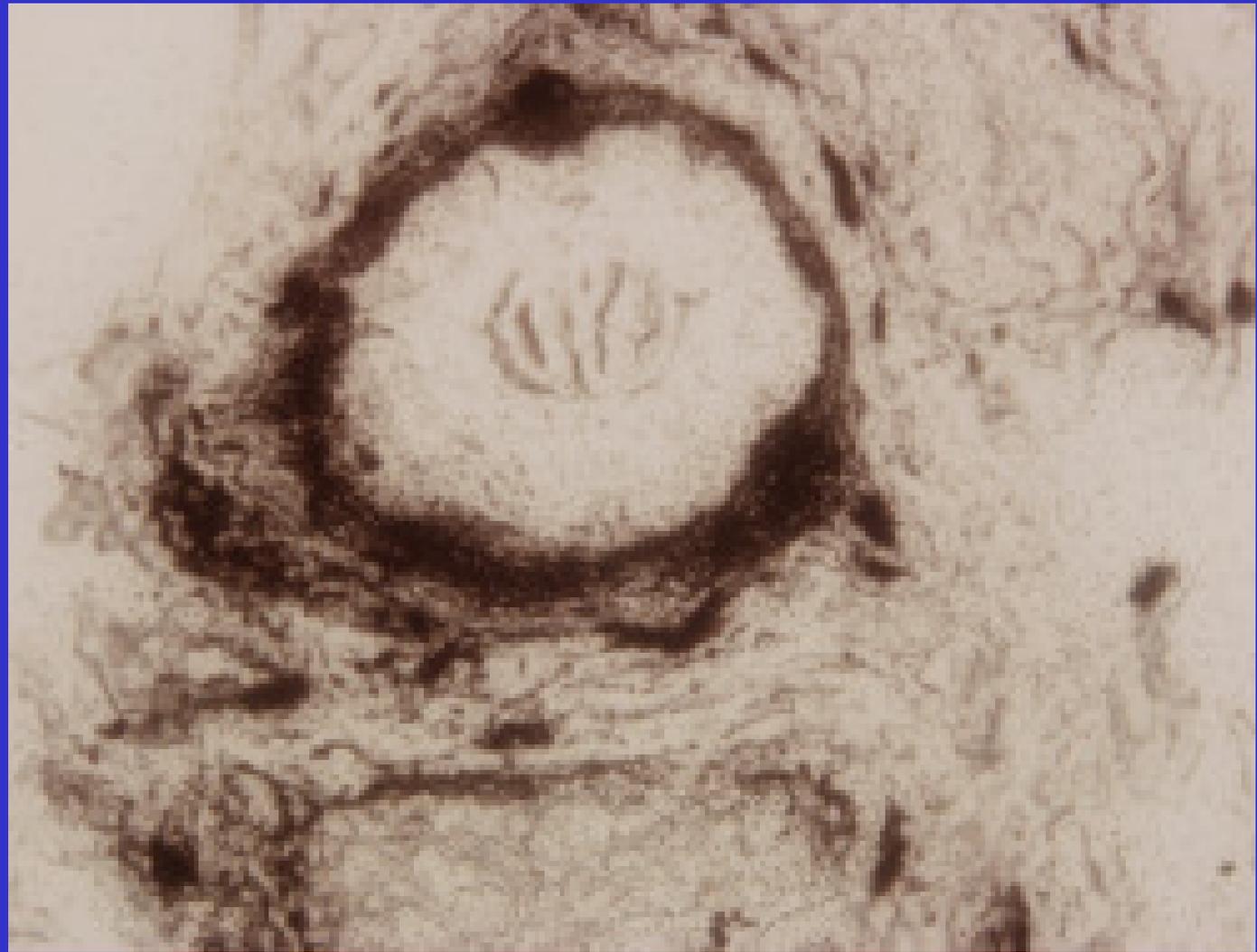
in vitalem Gewebe: Macrophagen, Langerhanszellen

# Autoradiographie mit Mikroemulsionen und $^{48}\text{V}$ -markiertem $\text{TiO}_2$

---

Haarfollikel  
Transversal-  
schnitt

Problem:  
Kontaminationen



# In-vitro / in-vivo Untersuchung des zellulären Respons auf TiO<sub>2</sub> Nanopartikel

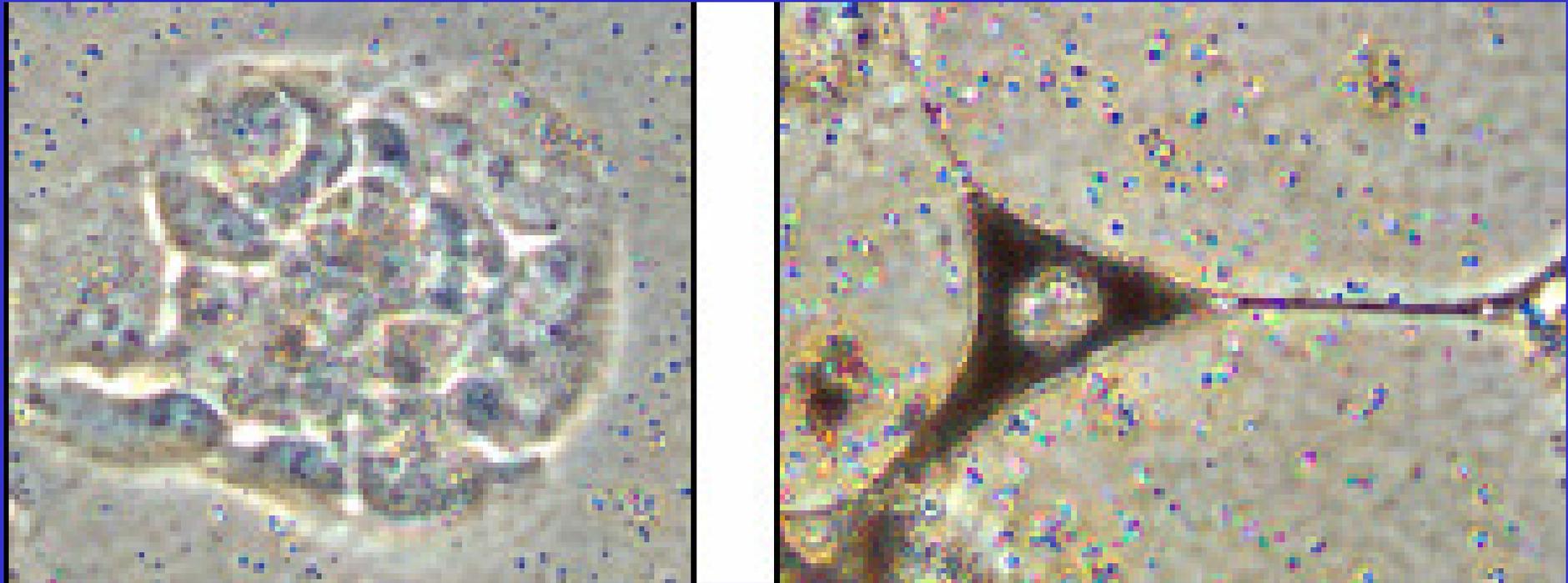
---

Verschiedene Hautzellen mit immunohistochemischen Methoden / verschiedene Marker für verschiedene Endpunkte

Atomic Force Microscopy zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften von Zellen

# Internalisierung von $\text{TiO}_2$ in Zellen

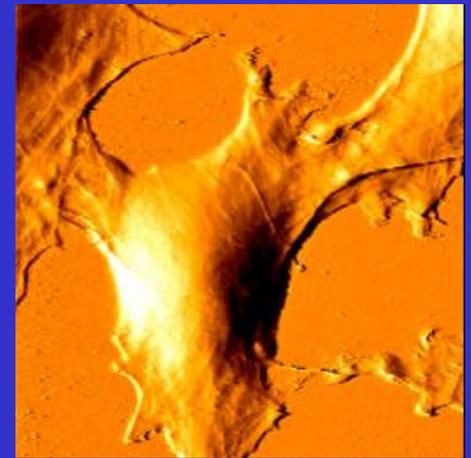
---



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

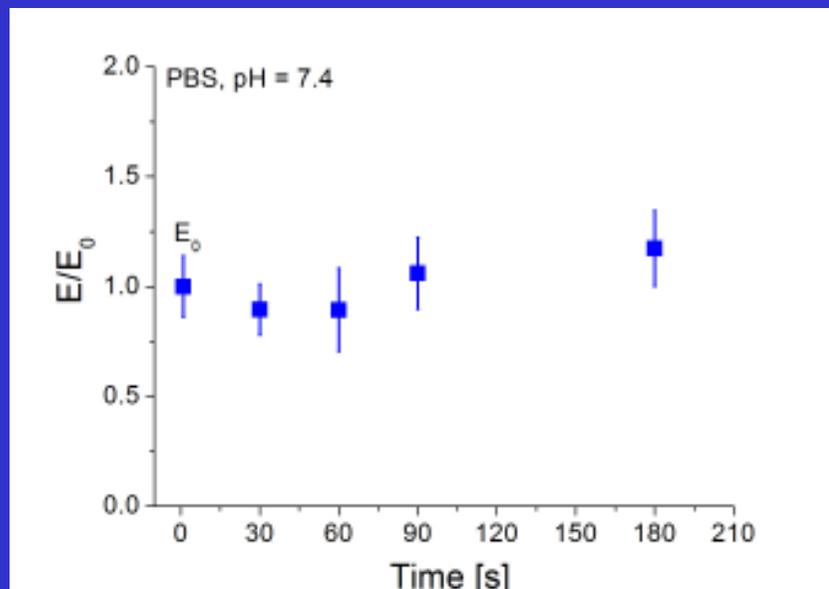
# Veränderung der Elastizität von Humanfibroblasten unter UVB-Licht in Gegenwart von $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln

M. Lekka et al. Kraków

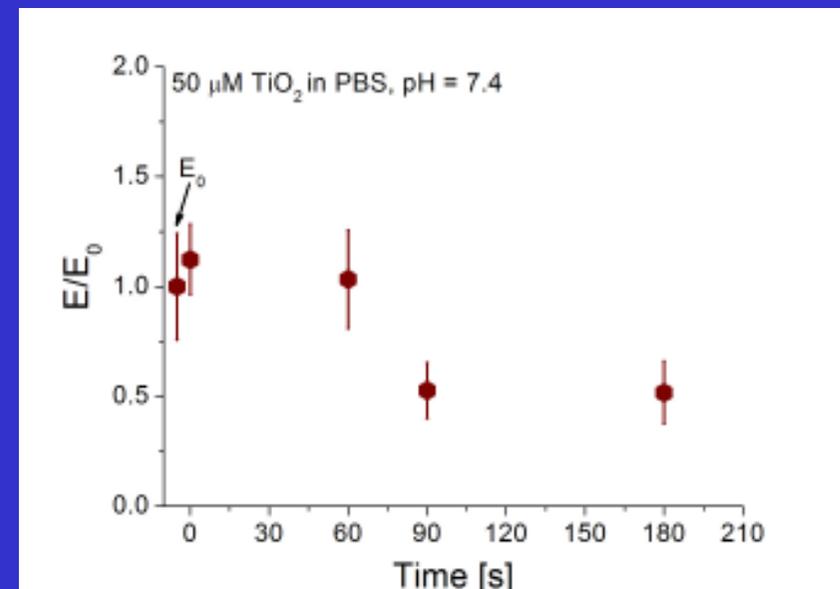


$\text{TiO}_2$ : ungecoated, 6 nm Durchmesser; Anatas  
UVB: 250 nm-350 nm;  $\sim 20 \text{ mW/cm}^2$

## Relative Änderung der Zellelastizität

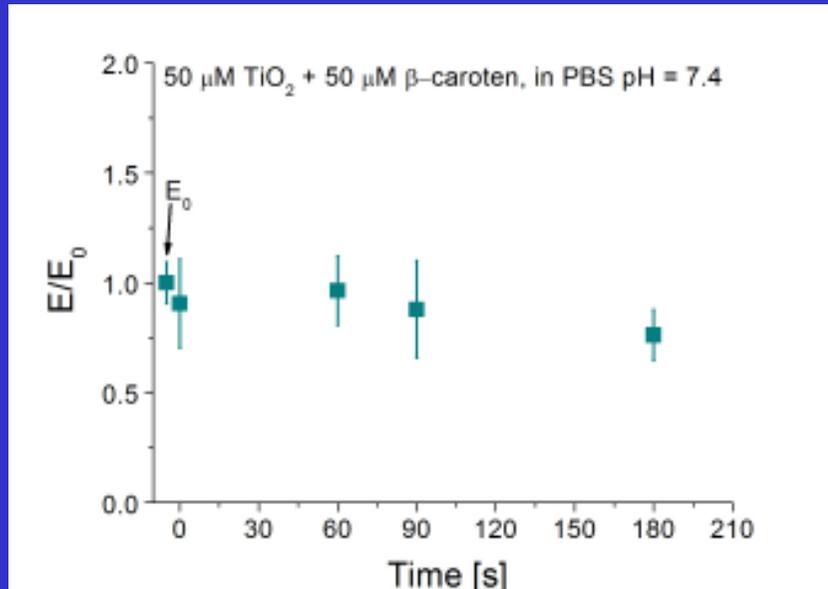
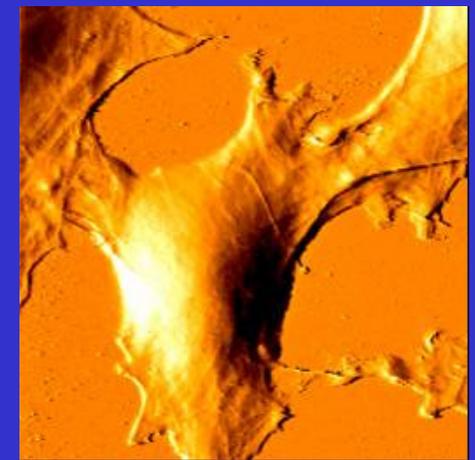


Nur UVB, kein  $\text{TiO}_2$

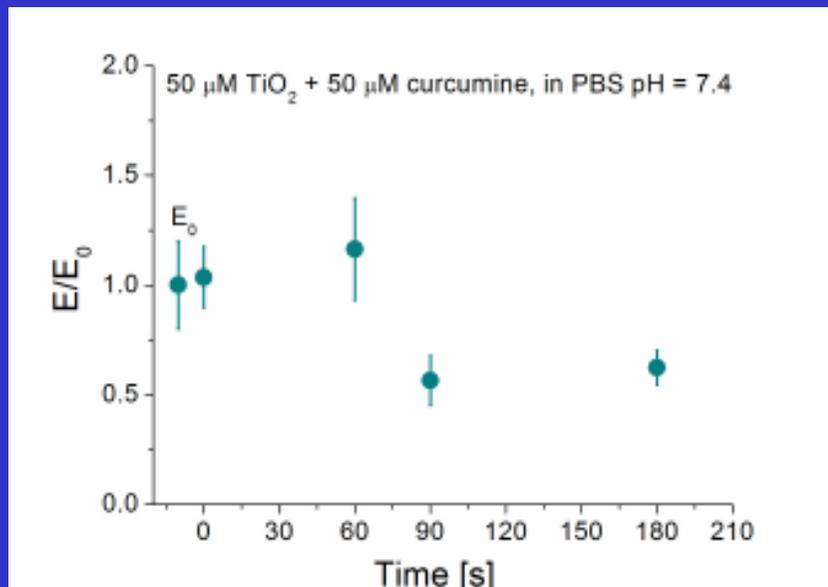


UVB in Gegenwart von  $\text{TiO}_2$   
Der erste Datenpunkt ( $E_0$ ) ist die Kontrolle, d.h. kein  $\text{TiO}_2$

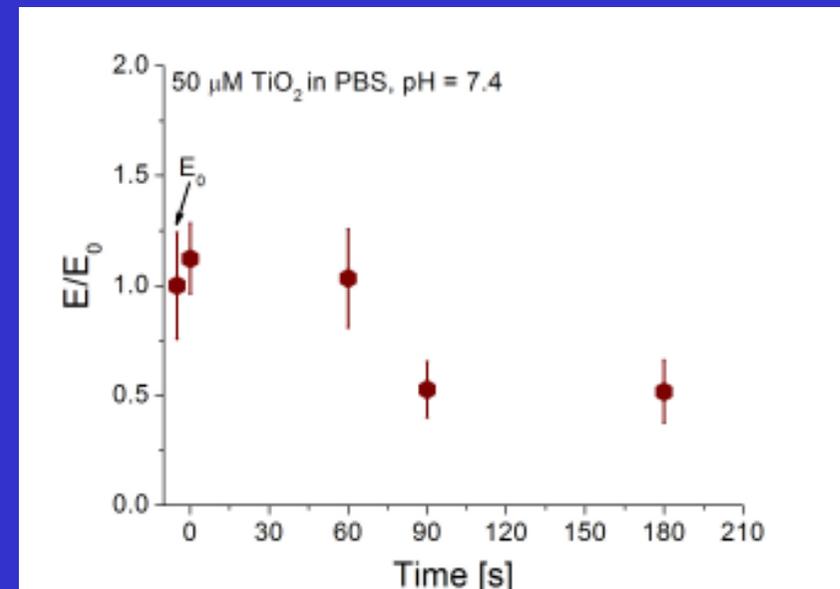
# Der Effekt von Radikalfängern



UVB/ $\text{TiO}_2$  und  $\beta$ -Caroten



UVB/ $\text{TiO}_2$  und Curcumin



Nur UVB/ $\text{TiO}_2$ , keine Quencher

In allen Bildern ist der erste Datenpunkt ( $E_0$ ) die Kontrolle, d.h. kein  $\text{TiO}_2$

# Zusammenfassung (TiO<sub>2</sub>)

---

- Die Verteilung von TiO<sub>2</sub> 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 (TiO<sub>2</sub>)

---

- Es sieht so aus dass die TiO<sub>2</sub>-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: [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, Proliferation, Viabilität, Apoptose
- elastische Eigenschaften von Zellen ändern sich mit ungecoateten Nanopartikeln unter UV-Beleuchtung

# Zusammenfassung (TiO<sub>2</sub> und andere Nanopartikel)

---

Keine Penetration:

TiO<sub>2</sub> (*Pflücker et al. 1999, 2001, NANODERM 2007*)

ZnO (*Cross et al. 2007*)

Penetration in vitales Gewebe:

TiO<sub>2</sub> (*Tan et al. 1996*)

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

Fe-Nanopartikel (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>?) (*Baroli et al. 2007*)

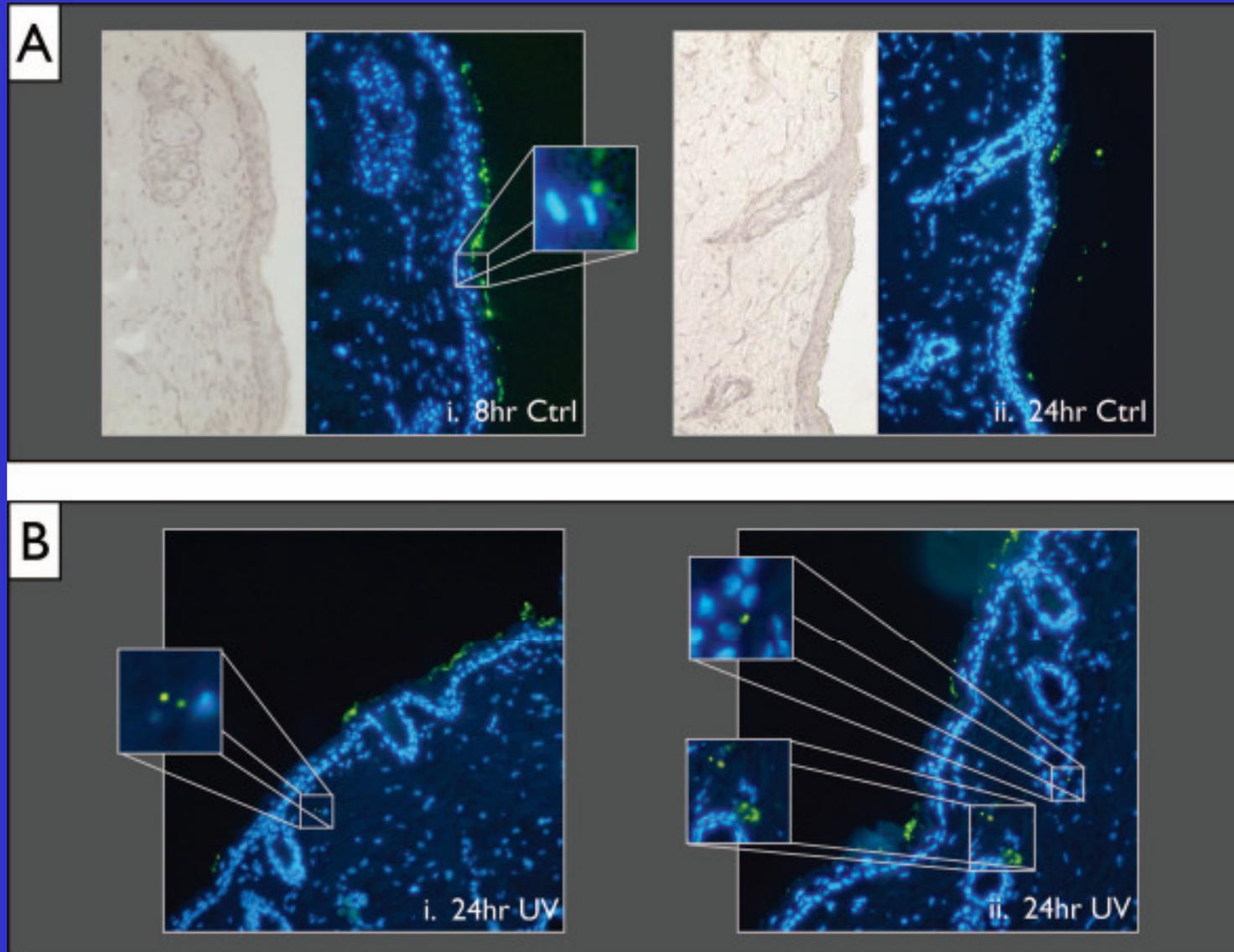
Quantum dots (*Ryman-Rasmussen et al. 2006*)

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](http://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