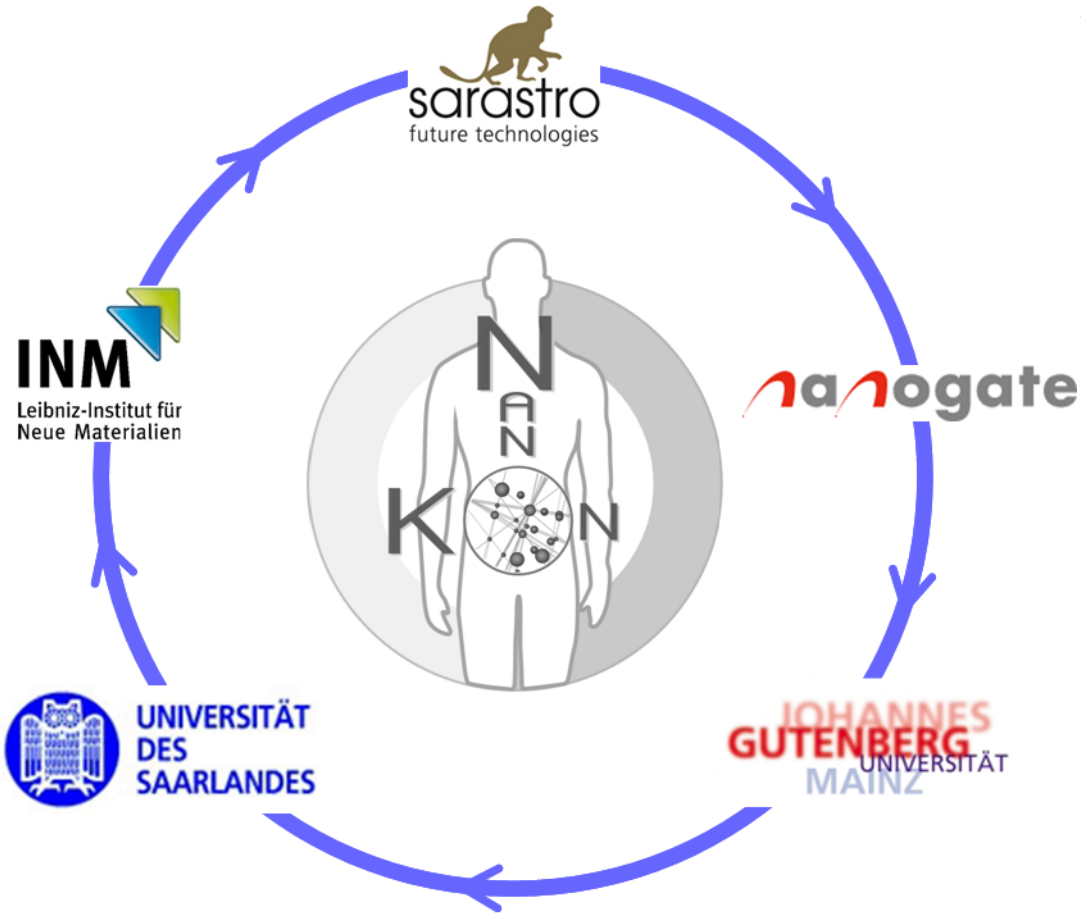
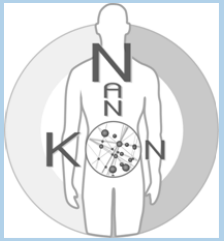
NanoKon - Systematische Bewertung der Gesundheitsauswirkungen nanoskaliger Kontrastmittel

Projektträger Jülich
Forschungszentrum Jülich

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



NanoKon – im Überblick



Nanoskalige Kontrastmittel → **Duale Abbildung des Gastro-Intestinaltraktes mittels Röntgen / CT und Magnetresonanztomographie**

Benefit

- **Computertomographie** → Gute Ortsauflösung
- **MRT** → Gute Kontrastauflösung

Kontrastmittel

- **μ-$BaSO_4$** (nephrogene systemische Fibrose)
  - Kontrasterhöhung: T1-Effekt: Gd^{3+}-Komplexe
  - Size ↓ → Immobilisation → **n-$BaSO_4$**
- oder Kontrasterniedrigung: T2: SPIONs (d<25nm) → **Fe_xO_y**

Entwicklung

Risikobewertung

NanoKon – Arbeitspakete

AP 1 Materialsynthese,-eigenschaften

Nanopartikel – Herstellung, Modifikation und physikochemische Charakterisierung

SARASTRO
NANOGATE
INM

AP 2 *in vitro*

Analyse biologischer NP-Auswirkungen auf Zellen des Magen-Darm Traktes

STAUMA
PharmBio
PATHOMA
CHIR
INM

AP 3 *in vitro*

Transportprozesse und subzelluläre Lokalisation

INM
PharmBio
STAUMA
PATHOMA

AP 4 *in vivo*

Analyse biologischer Nanopartikel-Auswirkungen im Mausmodell

CHIR
RADIO
PATHOMA

AP 5 *in silico*

Modellierung

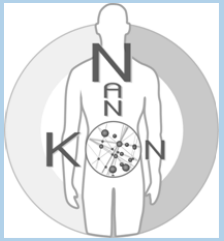
PHYS

AP 6 Bewertung und Kommunikation

Risikobewertung, Datenweitergabe, SOPs

ALLE PARTNER

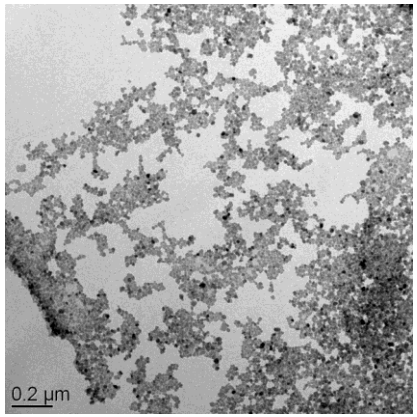
NanoKon – AP1: Nanopartikel-Herstellung, Modifikation und physikochemische Charakterisierung



AP 1 Materialsynthese,-eigenschaften

	Fe_xO_y		$BaSO_4$	SiO_2/Gd^{3+}
	3 nm	19 nm		
Herstellung von Referenzpartikeln	√	√	√	
Herstellung von Kern-Schale Partikeln	√	√	√	
		Silika-Hülle		
Syntheseoptimierung	√	x		√
Stabilitätsverbesserung			√	
Dual abbildbare Nanopartikelsuspensionen				$BaSO_4$ – Gd^{3+} dotiert

Stabilitätsverbesserung



$BaSO_4$

Citrat-stabilisiert

Gastro-intestinal-(GI)-trakt

Keine ausreichende Langzeitstabilität in…

- Wasser → pH = 5.0-7.0
- Speichel → pH = 6.5-7.2
- Magensaft → pH = 1.2-4.0
- Darmflüssigkeit → pH = 5.0-8.3

Weitere Informationen:
Poster Nanogate

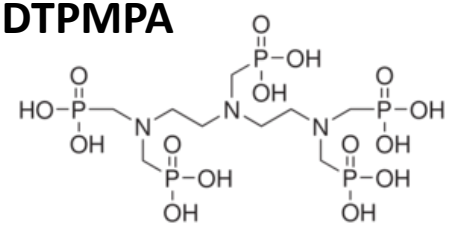
NanoKon – AP1: Nanopartikel-Herstellung, Modifikation und physikochemische Charakterisierung

Stabilitätsverbesserung

$BaSO_4$

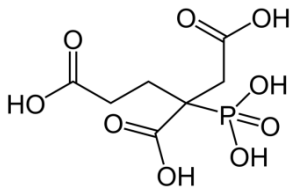
Herstellung von Nanoteilchen aus Bariumsulfat mit Phosphonatmodifizierung

DTPMPA

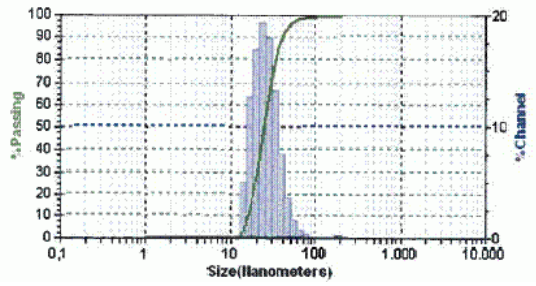


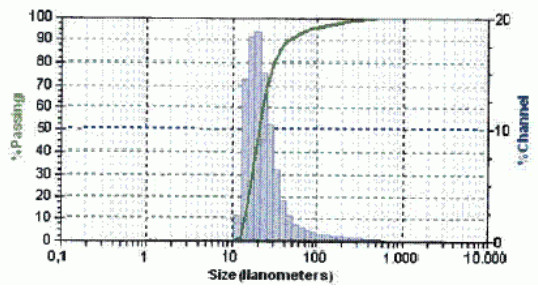
Diethylenetriaminpentakis-methylphosphonsäure

PBTC



2-Phosphonobutan-1,2,4-tricarbonsäure





Erhaltene Partikel stabil in:

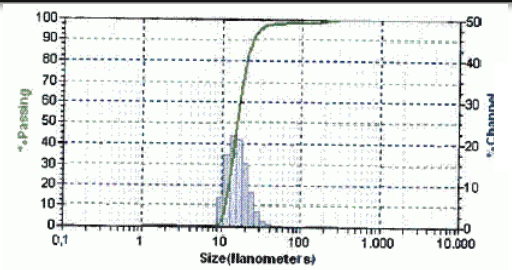
- **Wässriger Suspension: > 60 Tage**
- **Kochsalzlösung (200mM): 24h**
- **Natriumsulfatlösung (50mM): 2-4 h**

Co-Fällung mit Gd/Eu^{3+} Zur dualen Abbildung des Magen-Darm-Traktes mittels MRT / CT

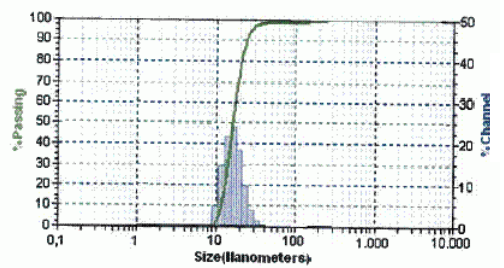
Weitere Informationen:
Poster Nanogate

NanoKon – AP1: Nanopartikel-Herstellung, Modifikation und physikochemische Charakterisierung

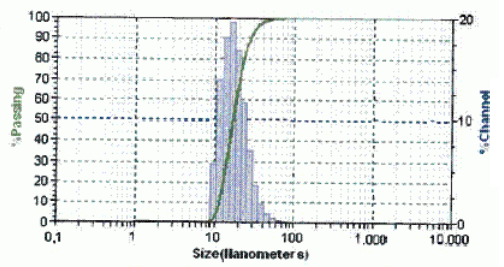
Co-Fällung mit Gd/Eu^{3+}



Gd^{3+} - Dotierung
Citrat - stabilisiert



Eu^{3+} - Dotierung
Citrat - stabilisiert

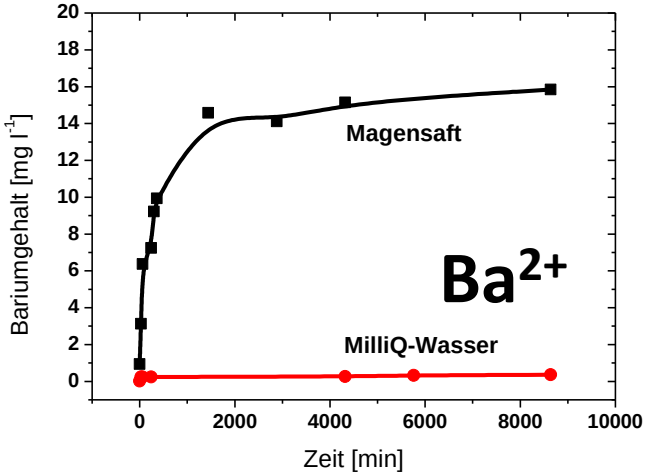


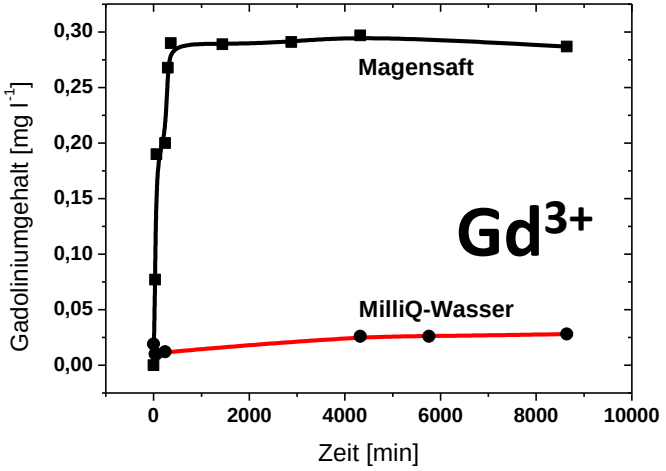
Gd^{3+} - Dotierung
Biphosphat- stabilisiert

Weitergabe an Radiologen (MRT-Kontrast) und Chirurgie (*in vivo* – Toxizität)

Weitere Informationen:
Poster Nanogate/INM

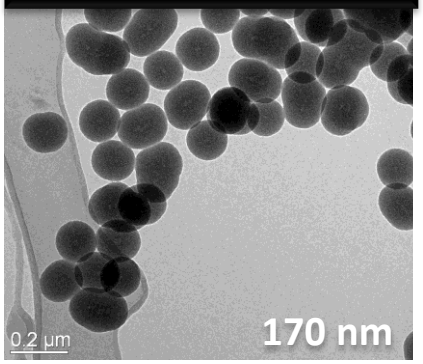
Aber: Freisetzung von Ionen in künstl. Magensaft

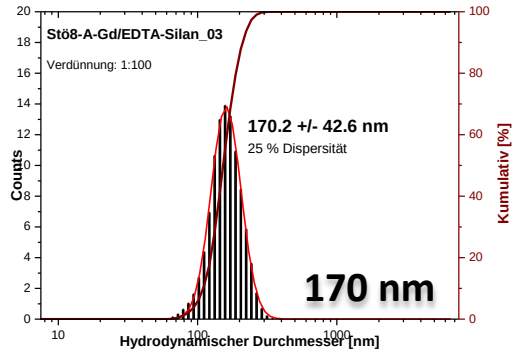


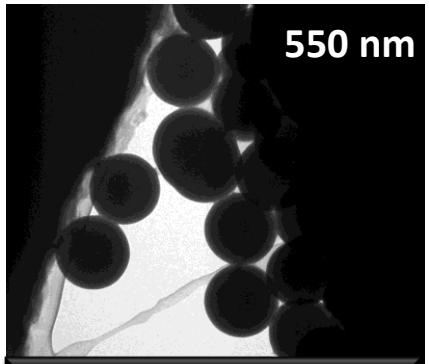


Kovalente Immobilisierung von Gd^{3+} in Silica-Partikelmatrix

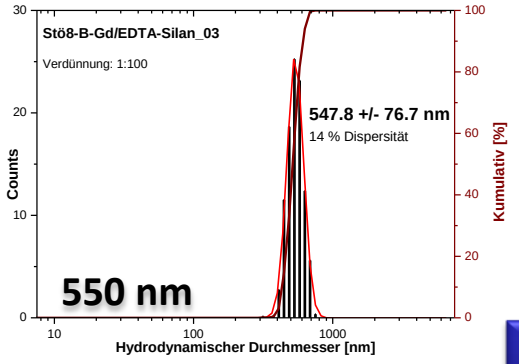
SiO_2/Gd^{3+} dotiert



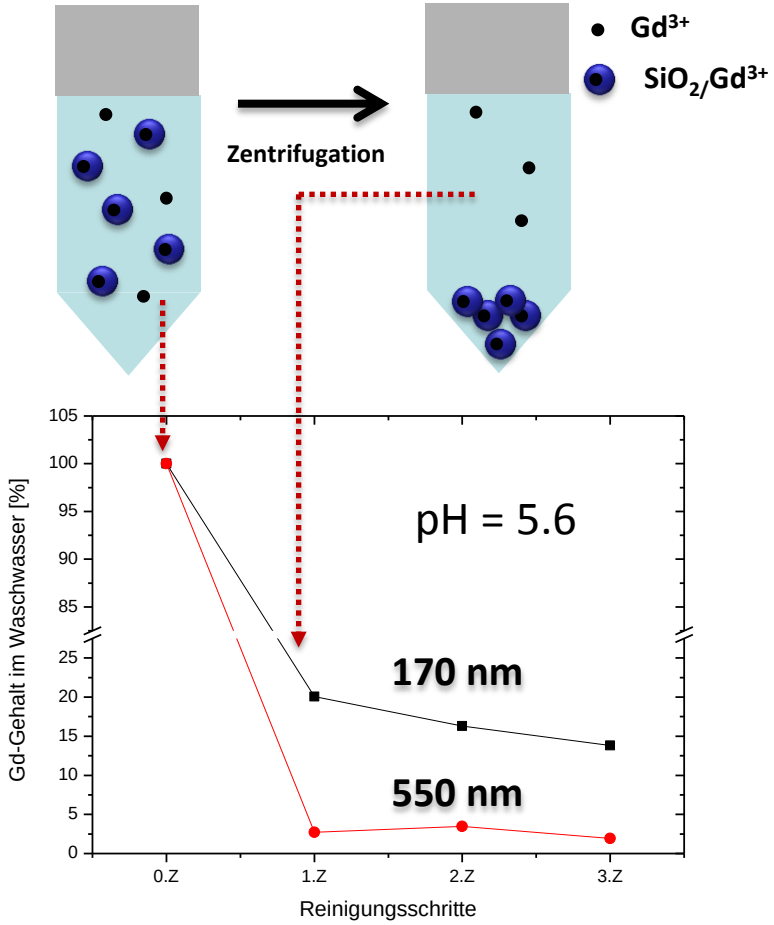




SiO_2/Gd^{3+} dotiert



Weitere Informationen:
Poster INM



Weitergabe an Radiologen (MRT-Kontrast) und Chirurgie (*in vivo*-Toxizität)

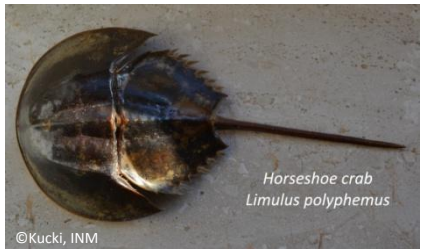
NanoKon – AP1: Nanopartikel-Herstellung, Modifikation und physikochemische Charakterisierung

AP 1

Prüfung auf mikrobiologische Kontamination/Sterilität

Bakterienwachstum (KBE-Test)

Endotoxine (LAL-Gel Clot / rFC-Assay)



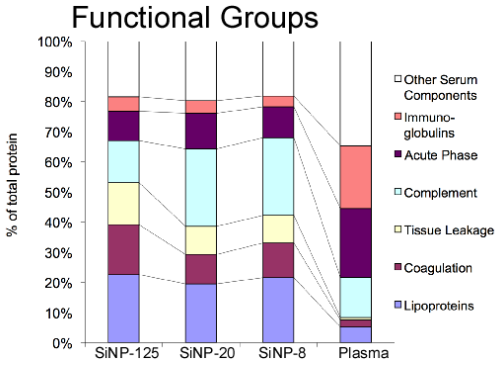
- Endotoxine beeinflussen Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Assays und deshalb die Risikobewertung sowie die Zulassung von Nanomaterialien für biomedizinische Anwendungen
- Basis: **Verlässlichkeit der Endotoxin-Testsysteme in Bezug auf NP-Suspensionen**
  - Systematische Studie mit Fokus auf Interferenz von Silica- und $Fe_xO_y@SiO_2$-Nanopartikeln mit dem LAL Gel Clot Assay
    - Kucki et.al, *submitted 2012*
  - Vergleichsstudie mit alternativem Endotoxin-Testsystem (laufend)
  - Bisherige Ergebnisse:
    - Nicht-optische Assay-Interferenz durch Protein-Partikel-Interaktionen

Weitere Informationen: NanoKon SOP 2.2.2,
http://www.nanopartikel.info/cms/Wissensbasis/Standardarbeitsanweisungen

AP 2

Untersuchung der Protein-Corona von Silica-Partikeln mittels zeitaufgelöster quantitativer LC-MS

- In biologischen Medien sehr schnelle Bildung einer Protein-Corona (< 30 sec)
- Corona beeinflusst die Aufnahme, Toxizität und biologischen Effekte der NP.
- Komplexe Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Proteinen (ca. 300 verschiedene Plasmaproteine)
- Zusammensetzung der Protein-Corona abhängig von physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel
- Profil-Erstellung
  - erlaubt bioinformatische Vorhersage (patho-) biologischer Reaktionen sowie ursächlicher Proteine
  - Berücksichtigung beim Design von Nanomaterialien
- Tenzer et al. ACS Nano 2011



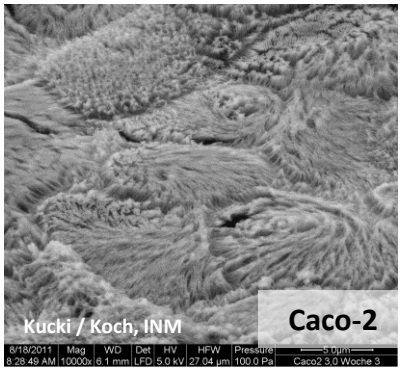
Weitere Informationen:
Poster Stauber (STAUMA)

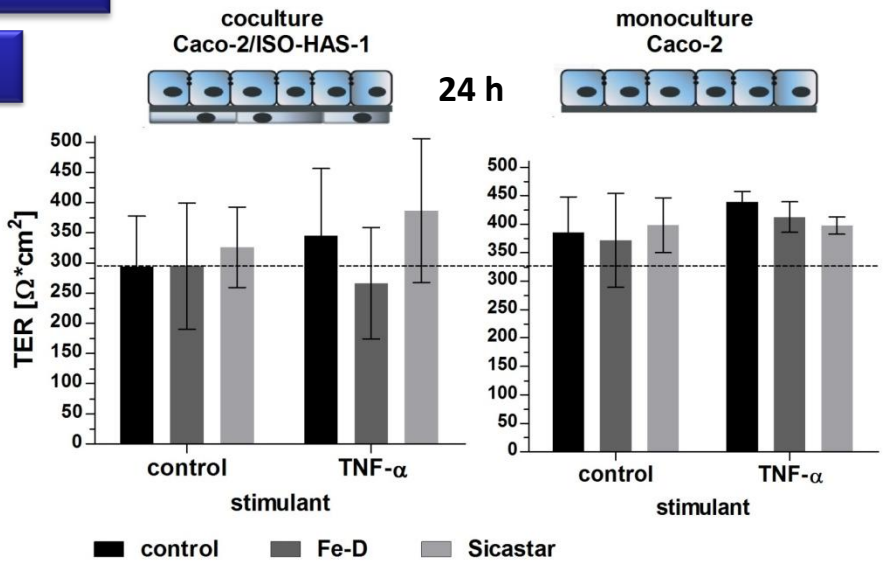
NanoKon – AP2: *In vitro*-Analyse der NP-Auswirkungen, Identifizierung molekularer Wirkmechanismen

AP 2

Analyse biologischer NP-Auswirkungen auf Zellen des Magen-Darm Traktes

- Darmepithel: Caco-2, HT-29
- Endothel: HMEC-1, ISO-HAS-1
- Ko-Kulturmodell: Caco-2/ISO-HAS-1
- Gesunde Ko-Kultur
- Entzündete Ko-Kultur (TNF-α stimuliert)





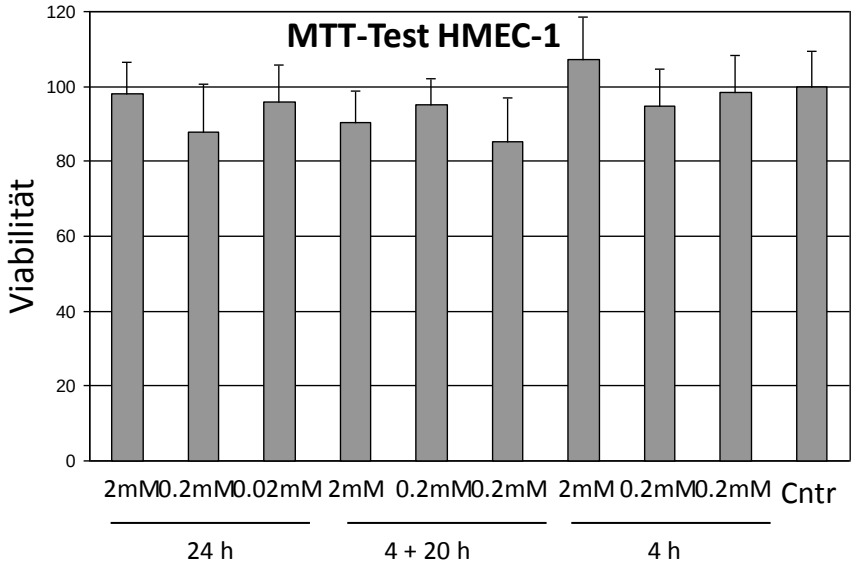
Keine signifikante Änderung des TER nach Partikelzugabe = Barrierefunktion bleibt erhalten

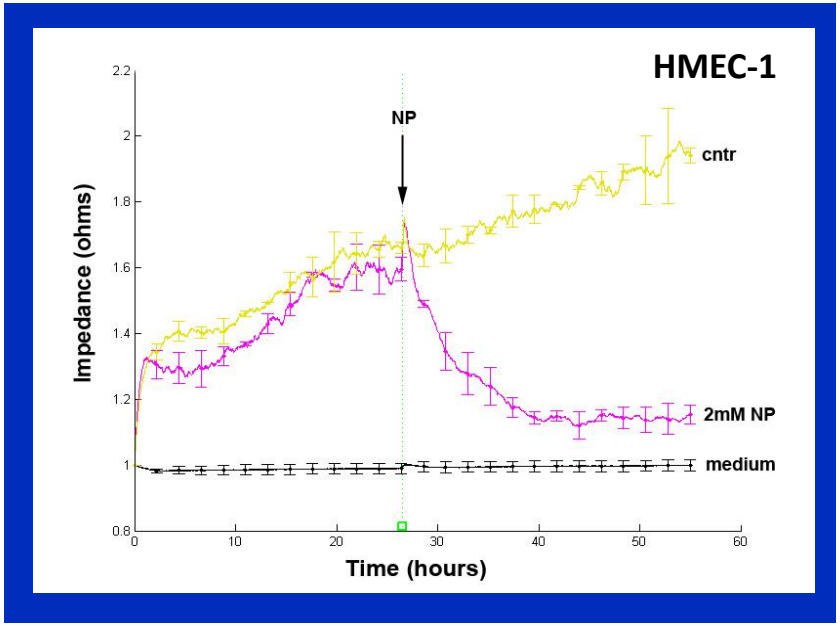
Weitere Informationen zur Ko-Kultur:
Poster Kasper (PathoMA)

AP 2

Toxizitäts-Assays, Impedanz-Messung

- bisher kein Hinweis auf eine hohe Toxizität der $Fe_xO_y@SiO_2$-Partikel sowie der getesteten Primärreferenzen (z.B. Endorem®, Micropaque®)
- NP-Zugabe in hohen Konzentrationen führt jedoch nach 24h zu einem deutlichen Abfall der Impedanz von HMEC-1 Zellen

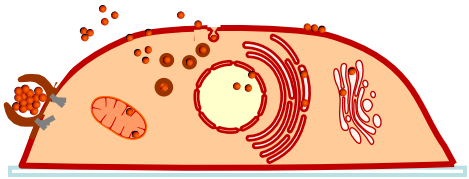




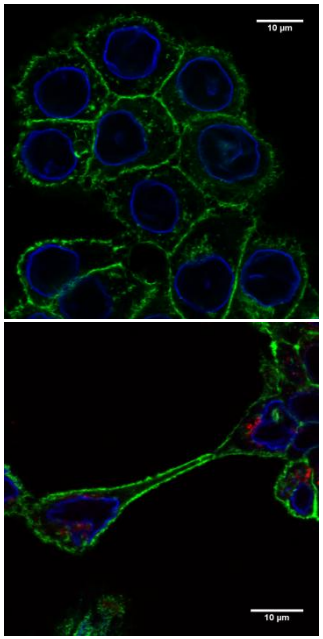
Weitere Informationen:
Poster Astanina (PharmBio)

AP 3

Mikroskopische Untersuchungen



- Untersuchung auf pathologische Veränderungen der Zellmorphologie
  - Primärreferenzen:
    - bisher keine morphologischen Veränderungen festgestellt; weitere Versuche mit hohen Partikelkonzentrationen laufen
  - Sekundärreferenzen:
    - nach 24h morphologische Veränderungen des HT-29 Zellverbandes bei hohen Konzentrationen (100 µg/ml) der $Fe_xO_y@SiO_2$ und $Fe_xO_y@SiO_2$ -Atto647N Partikel, (kein Farbstoff-Effekt)

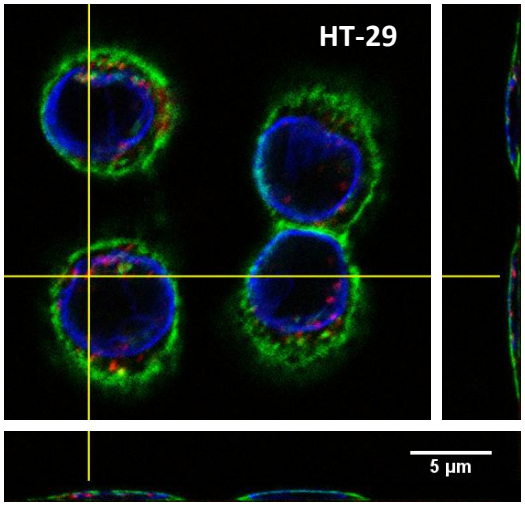


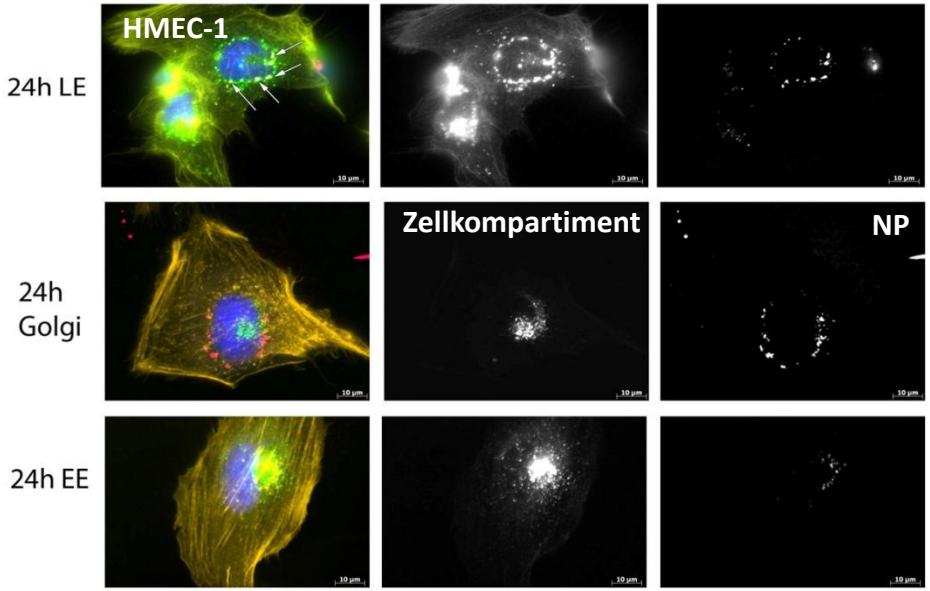
- Untersuchung der subzellulären NP-Lokalisation
  - durch Einsatz fluoreszenz-markierter NP ($Fe_xO_y@SiO_2$-Atto647N)
  - NP-Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie, CLSM, STED-Mikroskopie

Weitere Informationen:
Poster Astanina (PharmBio), Kasper (PathoMa), Kucki (INM)

AP 3 **Subzelluläre NP-Lokalisation**

- Ergebnisse:
  - Aufnahme der Partikel < 2 h (HT-29, Caco-2)
  - Akkumulation der $Fe_xO_y@SiO_2$ -Atto647N Nanopartikel in der Nähe des Zellkerns
  - HMEC-1-Zellen: Nanopartikel akkumulieren in späten Endosomen (LE), keine Ko-Lokalisation mit frühen Endosomen (EE) oder dem Golgi-Apparat

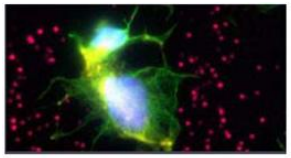
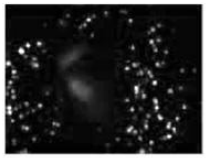
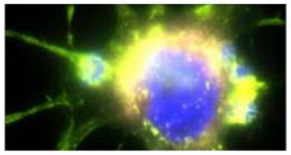
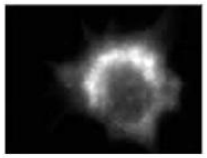
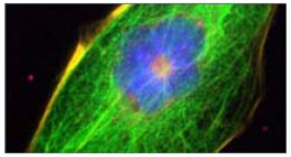
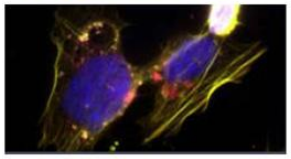
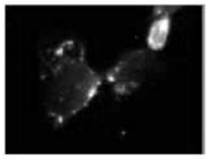




Weitere Informationen:
Poster Astanina (PharmBio), Kucki (INM)

AP 3 Partikelaufnahme und Transport: Rolle des Zytoskeletts

> Untersuchung an HMEC-1 Zellen durch Einsatz von Inhibitoren

Aktin-Stabilisierung *Jasplakinolid*			Inhibition der Partikelaufnahme
Hemmung der Aktin Polymerisation *Cytochalasin D*			
Tubulin-Stabilisierung *Paclitaxel (Taxol)*			NP-Akkumulation am MTOC
Hemmung des Mikrotubuli Aufbaus *Nocodazol*			
	Überlagerung	NP	

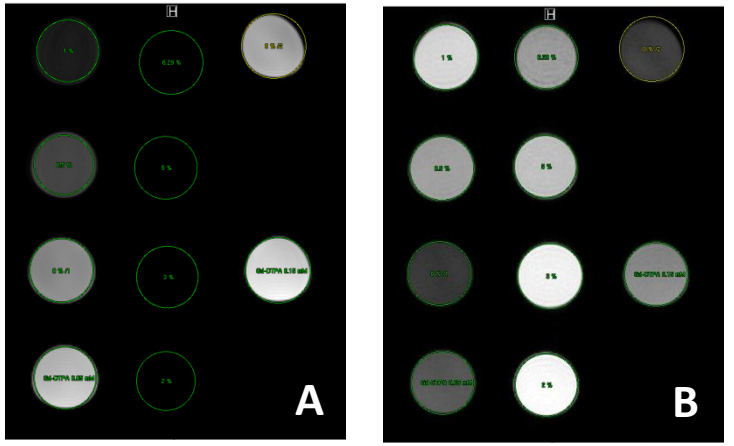
Rot = NP (Fe_xO_y@SiO_2-Atto647N)
Grün = Tubulin/Aktin
Blau = Zellkern

Weitere Informationen:
Poster Astanina (PharmBio)

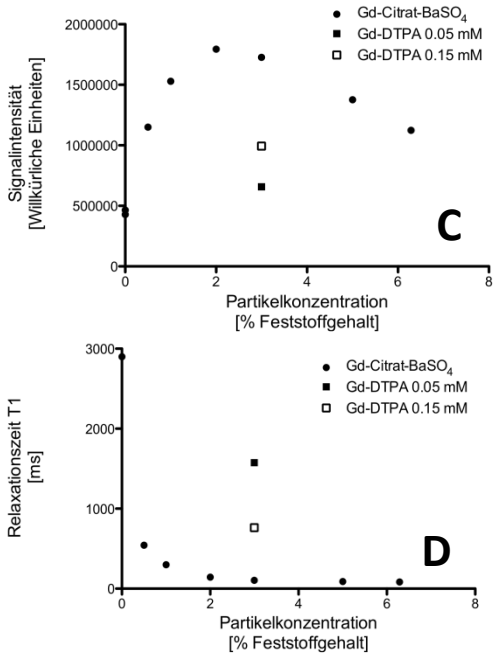
AP 4

Darstellung der Partikel in der MRT (Magnetresonanztomographie)

$BaSO_4$ – Gd^{3+} dotiert



Bildgebung | **Relaxometrie**

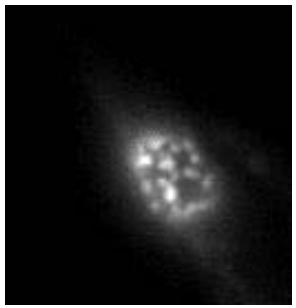


A T1-gewichtete Bildgebung, FLASH
B T2-gewichtete Bildgebung, TSE
C Signalintensitätsmessung aus **b**
D Messung der Relaxationszeit T1
a,b Beschriftungen entsprechen der Gd-DTPA-Konzentration in mmol/l

Orale Einzeldosen einer Konzentration von 0,5% bis 2% für die *in vivo*-Testung ausreichend

Weitere Informationen:
Poster A. Müller (RADIO)

AP 5 **Tracking von NP in Live-Cell Imaging Daten**



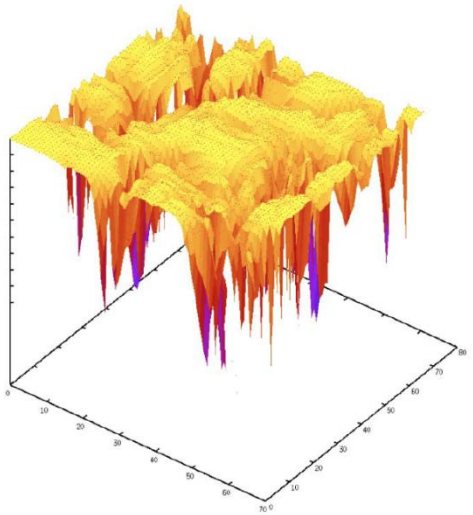
Standardverfahren zur Bildanalyse sind effizient, wenn es sich um gut differenzierbare einzelne Objekte handelt.

Probleme:

Unscharfe Ränder, variable scheinbare Teilchengröße und –zahl, verschiedene Helligkeiten

Methode 1 **PIV (Particle Imaging Velocimetry):**

Im Prinzip anwendbar, aber bei Auswertung von Videodaten zeigte sich wenig Struktur



Methode 2 **Besser: Analyse des Korrelationsfeldes zwischen den Verschiebungsvektoren**

Position der Partikel ist durch die Amplitude der Korrelationsfunktion deutlich erkennbar.

Ausblick **3D-Simulationen zum NP-Transport**

Weitere Informationen:
L. Santen (Phys)

AP 6 **Bewertung und Kommunikation**

- Methoden-Standardisierung
- Erstellung von Standard Operation Procedures
  - NanoKon-SOP 2.2.2
- Entwicklung eines Referenzsystems zur Evaluierung von NP-Effekten
- Selektion biologischer Parameter zur Bewertung der Materialien
- Weiterentwicklung in Plattform für Risikobewertung
  - Weitergabe relevanter Erkenntnisse

NanoKon – Partner

Dipl.-Chem.
H. Schirra

sarastro
future technologies

Dr. R. Danzebrink

nanogate

Dr. A. Kraegeloh

INM
Leibniz-Institut für
Neue Materialien

Prof. R. Stauber
Molekulare u.
Zelluläre
Onkologie

JOHANNES
GUTENBERG
UNIVERSITÄT
MAINZ

Prof. A. K. Kiemer
Pharmazeutische
Biologie

UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Prof. L. Santen
Theoretische
Physik

UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Prof. C. J.
Kirkpatrick

Pathologie

JOHANNES
GUTENBERG
UNIVERSITÄT
MAINZ

Prof. M. Menger
Klinisch-
Experimentelle
Chirurgie

UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Prof. A. Bücker
Diagnostische u.
Interventionelle
Radiologie

UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES