

Crack the Egg

Ein alternatives Konzept zur Testung von Nanomaterialien

Dagmar Fischer, Martin Rabel



Hühnereier, eingebettet in ein Stufenkonzept mit klassischen Zellexperimenten, werden an der Uni Jena als Alternative zu Tierversuchen und zur zweidimensionalen Zellkultur eingesetzt. Die Sicherheit von Nanomaterialien kann so untersucht werden.

Zur Testung der Sicherheit von Nanomaterialien sind vor allem in Pharmazie und Medizin Tierversuche als Goldstandard momentan unabdingbar. Diese stehen jedoch vor allem aus ethischen Gründen immer wieder auf dem Prüfstand, sind mit einem hohen Aufwand verbunden und eignen sich in frühen Entwicklungsphasen nur bedingt für Versuche mit großem Probenumfang. Alternativmethoden boomen in der Literatur, wobei die Art und Durchführung der verwendeten Methoden äußerst divers ist. Der Fokus liegt dabei zumeist auf zweidimensionalen Zellkulturen, die jedoch nur bedingt die *In-vivo*-Situation widerspiegeln, da ihnen die Komplexität der Gewebe fehlt. Hühnereier, die in unserem Labor in ein Stufenkonzept mit klassischen Zellexperimenten eingebettet sind, stellen eine interessante Alternative dar.

Standardcharakterisierung reicht nicht – Äußerlichkeiten entscheiden

Grundvoraussetzung für eine valide toxikologische Bewertung von Nanomaterialien ist unbestritten die umfassende Kenntnis ihrer physikochemischen Eigenschaften. Oftmals wird darunter aber nur die Standardcharakterisierung („as synthesized“) verstanden, bei der die Nanomaterialien in der gelieferten Form charakterisiert werden. Eine Charakterisierung unter den gewählten biologischen Testbedingungen wird häufig vernachlässigt. In unserem Labor werden Nanomaterialien systematisch vor jedem biologischen Test auf Veränderungen im jeweiligen Testmedium (z.B. Zellkulturmedien, Injektionslösungen, Körperflüssigkeiten) untersucht (Bild 1).

Veränderungen der Morphologie, Größenverteilung oder Oberflächenladung von Nanopartikeln (NP) können den Transport über Körperbarrieren, die zelluläre Aufnahme sowie die Elimination entscheidend verändern [1]. Agglomerierte NP verhalten sich daher anders als Einzelpartikel [2]. Doch nicht nur die Eigenschaften der Nanomaterialien selbst müssen berücksichtigt werden, auch biologische Verunreinigungen oder Syntheserückstände (z.B. Lösemittel oder Endotoxine),

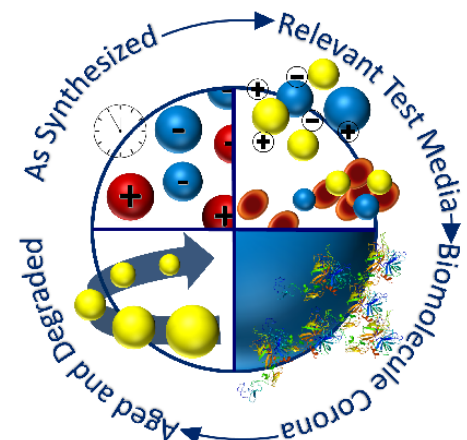


Bild 1: Der Lebenszyklus von Nanopartikeln für medizinische Anwendungen. (Bild: Uni Jena)

können zu falsch-positiven Effekten führen [3]. Eine unzureichende Materialcharakterisierung in testrelevanten Medien mindert somit erheblich die Aussagekraft der Studien.

Für Nanomaterialien, die länger im Körper verweilen, sind zusätzlich Langzeituntersuchungen („Alterung und Abbau“), die die Veränderungen der Erscheinungsform der Partikel, die Bildung von Abbauprodukten und die Freisetzung von Substanzen bestimmen, unabdingbar. Sie wurden jedoch bisher in Studien kaum berücksichtigt. Dabei wird der Weg von NP im Körper mittels Körperflüssigkeiten (Blut, Sputum, Urin, Leberextrakten, etc.) oder artifiziellen simulierten Flüssigkeiten (artifizielles Endosomen-/Lysosomenmilieu, künstliches Zellplasma, Lungenmucus, etc.) einzeln oder in sequenzieller Abfolge im Reagenzglas simuliert; die Effekte der Endprodukte werden in biologischen Tests untersucht. Für Eisenoxid-NP konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Abbau in verschiedenen Körperflüssigkeiten von zahlreichen Faktoren, wie z.B. Größe, Morphologie oder Art des Hüllmaterials, abhängt (s. auch Info-Kasten). Dies zeigt, dass eine umfassende Charakterisierung des gesamten Lebenszyklus von Nanomaterialien erforderlich ist, um ein vollständiges Bild ihres Verhaltens im Organismus zu erhalten.

Umgebung entscheidet über biologische Identität

Im „Leben“ eines NP spielt zudem die Biomolekül-Corona (die den NP umgebende Hülle) eine entscheidende Rolle. Sie gibt den NP eine neue „biologische Identität“ und bildet sich unmittelbar beim Kontakt mit Körperflüssigkeiten und Zellkulturmedien durch Anlagerung von Proteinen, Lipiden oder Zuckern. Die Oberfläche der NP wird dadurch massiv verändert. Es handelt sich hierbei um einen dynamischen, innerhalb weniger Sekunden ablaufenden Prozess mit teilweise mehr als 300 verschiedenen Proteinen [4]. Die biolo-

gische Identität bzw. die Biomolekül-Corona dominiert nahezu alle Eigenschaften, z.B. die kolloidale Stabilität, die Toxizität, die Verteilung sowie die Interaktion der NP mit Zellen, die Internalisierung und somit das Schicksal der NP im Körper [5].

Um den Einfluss der Biomolekül-Corona frühzeitig in der Entwicklung und Testung neuer Partikel berücksichtigen zu können, werden im Rahmen der Lebenszyklus-Untersuchungen NP in relevanten Körperflüssigkeiten im Vergleich mit und ohne Biomolekül-Corona getestet. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Corona-Bildung die Toxizität von NP gegenüber Blutbestandteilen verringert [2] oder die Aufnahme von NP in Makro-

phagen verstärkt [6]. Um die Veränderungen beim Transport durch den Körper zu simulieren, werden mit einer Corona überzogene NP nacheinander in verschiedenen relevanten Körperflüssigkeiten inkubiert und anschließend die Effekte charakterisiert.

Alles im Fluss - Sedimentation verhindern

Klassischerweise werden zur *In-vitro*-Testung der Zyto- und Hämotoxizität zweidimensionale Zellkulturen (z.B. Blut, Haut, Tumor, Lunge, Darm) eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass sie einfach, schnell und kostengünstig durchführbar und gut reproduzierbar sind und sich somit für Hochdurchsatzverfahren eignen [7]. Allerdings ist häufig die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *In-vivo*-Situation limitiert, da die fehlende Komplexität der Gewebe, die abweichende Zellmorphologie, oder eine fehlende extrazelluläre Matrix Einfluss auf das Verhalten der NP nehmen können [8]. Daher fokussieren sich aktuelle Arbeiten mehr auf 3D-Zellkulturen in Form von Sphäroiden, die solche Aspekte abdecken können. Für Eisenoxid-Nanopartikel konnte z.B. gezeigt werden, dass ihre Toxizität in 3D-Kulturen gegenüber 2D-Kulturen erheblich reduziert ist [9]. Aller-

DaNa2.0 - Daten und Wissen zu Nanomaterialien

Mit dem Projekt DaNa2.0 sollen in einem interdisziplinären Ansatz Forschungsergebnisse zu Nanomaterialien und deren Auswirkungen auf den Menschen und die Umwelt für Interessierte verständlich aufbereitet werden. Daher werden Ergebnisse von Wissenschaftlern aus Humantoxikologie, Ökotoxikologie, Biologie, Physik, Chemie und Pharmazie zusammengetragen.

NanoBEL - Biologische Elimination komplexer diagnostischer Nanopartikel

NanoBEL ist eines von mehreren auf der Plattform beschriebenen Projekten. Es befasst sich mit der Abschätzung von Langzeiteffekten der Exposition mit magnetischen Nanopartikeln (z.B. als Folge von regelmäßigen Bildgebungssitzungen), der Bedeutung von Degradations- und Eliminationsprozessen entlang des Lebenszyklus der Nanopartikel sowie der Auswirkung der Exposition im Zusammenhang mit Erkrankungen mit hoher sozioökonomischer Relevanz (Krebs, Entzündungen).

NanoBEL berücksichtigt Formulierungen von magnetischen Nanopartikeln, die gegenwärtig eine hohe diagnostische Relevanz aufweisen und auch in der Zukunft von Bedeutung sein werden. Neben der Weiterentwicklung und Optimierung dieser Nanopartikel trägt NanoBEL auch zur Entwicklung neuer tierfreier Alternativmethoden zur Langzeitestung von magnetischen Nanopartikeln bei (z.B. in Zellkulturen und im Hühnerei).

www.nanopartikel.info/projekte/laufende-projekte/nanobel

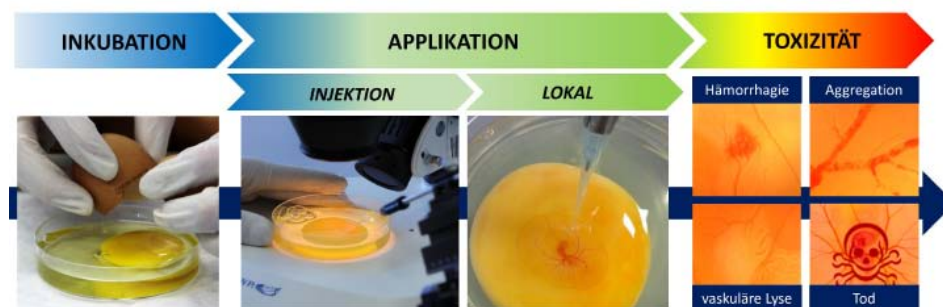


Bild 2: Schematische Darstellung des HET-CAV-Versuchsprinzips zur Bewertung der Zyto- und Hämotoxizität von Nanomaterialien. (Bild: Uni Jena)

dings sind die Versuchszeiten aufgrund der langsameren Proliferation solcher Systeme erhöht und bei längerer Testdauer kann die Viabilität verringert sein, da das Innere der Sphäroide nekrotisieren kann.

Die Bedingungen von 2D- und 3D-Kulturen können noch näher an die *In-vivo*-Situation angepasst werden, indem sogenannte dynamische Systeme verwendet werden, da unter statischen Bedingungen vor allem die Sedimentation von NP die Interaktionen mit Zellen beeinflussen kann. Der „Fluss“ in solchen dynamischen Systemen verhindert weitgehend die Sedimentation der NP, kann zusätzlich durch Scherkräfte desaggregierend wirken. Nährstoffe sowie toxische Stoffe können besser transportiert bzw. abtransportiert werden [10]. Ein wesentlicher Nachteil dieser Systeme ist jedoch, dass die

Hühnereitest an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM) *in ovo*, d.h. durch teilweises Öffnen der Schale, ist dabei die am häufigsten genutzte Methode – üblicherweise zur Testung der Schleimhautreizwirkung [12, 13]. Allerdings können Substanzen fast nur lokal appliziert werden und nur ein kleiner Teil des Blutgefäßsystems kann inspiert werden [14]. Diese Nachteile können mit einem schalenlosen Hühnereimodell (*ex ovo*), das einfach und schnell durchführbar, sehr empfindlich, gut reproduzierbar und im Vergleich zu Tierstudien deutlich kostengünstiger ist, umgangen werden [15]. Zudem stellt es keinen genehmigungspflichtigen Tierversuch dar. Dafür wird ein angebrütetes Ei aufgebrochen und der gesamte Inhalt in eine Petrischale überführt (Bild 2). Der Embryo und sein gesamtes Blutgefäß-

teilung von Nanopartikeln in der Blutbahn sowie zu Interaktionen mit Blutbestandteilen. Als Besonderheit können nanospezifische Effekte identifiziert werden im Vergleich zum Bulkmaterial. [2].

Auswirkungen auf den Organismus, Veränderungen in der Entwicklung des Organismus und die Bestimmung von LD₅₀-Werten (letale Dosis bei 50 % der Lebewesen) sind ebenfalls möglich [14, 16]. Testreihen mit einer großen Anzahl an Testmaterialien können zeitsparend und aufgrund der niedrigen Probenmenge kostengünstig durchgeführt werden.

Der HET-CAV ist damit ein vielseitiges, reproduzierbares und kostensparendes Modell zur Testung von Nanomaterialien. Es kann helfen, ungeeignete NP-Kandidaten vor einem Tierversuch bereits auszusortieren.

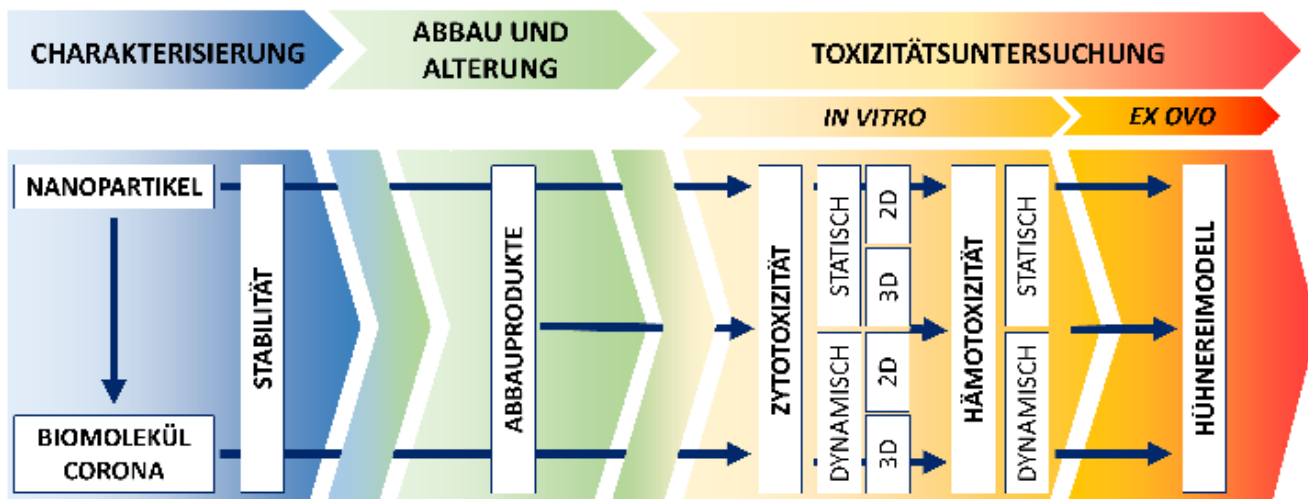


Bild 3: Stufenkonzept zur toxikologischen Bewertung von Nanomaterialien (Bild: Uni Jena).

resultierenden Effekte stark von der Flussgeschwindigkeit abhängen und sich durch hohe Flussraten der Kontakt von NP mit der Zelle verringert und damit Effekte „verschleiert“ werden könnten [11].

Schalenloses Ei in der Petrischale

Jede der zuvor genannten Methoden liefert einzelne Antworten zur toxikologischen Charakterisierung von Nanomaterialien. Um Parameter wie Biomolekül-Corona, Flussbedingungen, etc. in ihrer Gesamtheit erfassen zu können, ohne Experimente an Tieren durchführen zu müssen, wurden Hühnereier in die Diskussion eingebracht.

Hühnereimodelle werden seit mehr als 100 Jahren in der Forschung genutzt. Der

system liegen offen und sind im Gegensatz zum klassischen *In-ovo*-HET-CAM sichtbar und unmittelbar für Tests zugänglich. Nanomaterialien lassen sich nicht nur lokal auftragen, sondern auch systemisch mittels Mikroinjektion direkt in den Blutstrom oder Embryo einbringen [2].

Zur zyto- und hämotoxikologischen Bewertung von Nanomaterialien können unter dynamischen Flussbedingungen bei simultaner Ausbildung einer Biomolekül-Corona über bis zu 48h das Auftreten von Effekten wie z.B. Hämorrhagien, vaskuläre Lysen, Hämoaggregationen sowie ihre mögliche Reversibilität bewertet werden. Zusätzlich erlaubt diese Technik mittels bildgebender Verfahren (z.B. Raman-Spektroskopie, Fluoreszenzmikroskopie) die Bearbeitung von Fragestellungen zum Transport und zur Ver-

Step-by-Step zum umfassenden toxikologischen Bild

Aus den oben genannten Aspekten wurde ein Stufenkonzept (Bild 3) zur Bewertung der Toxikologie von Nanomaterialien entwickelt. Zu Beginn jeder Untersuchung erfolgt die physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel („as synthesized“, „in relevant test media“), unter Einbeziehung der Biomolekül-Corona („biomolecule corona“). Nach Abschluss der „Grundcharakterisierung“, die entscheidend für das Verständnis der biologischen Effekte der Nanomaterialien ist [17], erfolgt die Betrachtung von Abbau- und Alterungsprozessen („aged and degraded“). Alle Modifizierungen der NP im Lebenszyklus werden dann bezüglich der Zytotoxizität und Hämotoxizität untersucht. Dabei

wird vom einfachen statischen 2D-System über 3D-Systeme bis zu dynamischen „fließenden“ Systemen variiert, an deren Ende die Testung im Hühnerei steht. Alle Untersuchungen werden im Vergleich zu Nano-Referenzmaterialien durchgeführt, um die Standardisierung und Validität der Tests zu gewährleisten. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass im Gegensatz zu üblichen Studien, die meist nur Teilaspekte betrachten, ein umfassenderes toxikologisches Bild von Materialien erhalten wird.

Die Vielzahl an Testmethoden ermöglicht eine dynamische Anpassung des Konzepts an die jeweiligen Bedürfnisse der Nanomaterialentwicklung, so können z.B. NP zur oralen, pulmonalen, dermalen oder auch systemischen Anwendung untersucht werden. Vor allem das eingesetzte Hühnereimodell kann dabei viele Hindernisse der *In-vitro*-Testung an Zellkulturen überwinden. Durch die schrittweise („Step-by-Step“) Durchführung der Partikeluntersuchungen können ungeeignete Formulierungen frühzeitig aussortiert werden und damit Zeit, Kosten und vor allem auch Tierversuche eingespart werden.

Fazit

Das Stufenkonzept ermöglicht ein umfassendes Bild der Nanomaterialien – und dies in frühen Phasen der Testung dieser Nanomaterialien.

Die Nutzung von standardisierten Methoden sowie die umfassende Charakterisierung der Nanomaterialien über den gesamten Lebenszyklus sind dabei entscheidend. Vor allem das *Ex-ovo*-Hühnereimodell (HET-CAV) stellt eine Innovation für die Nanosicherheitsforschung dar und überwindet viele Hindernisse reiner Zellkulturmodelle.

Förderung

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Projekt O3XP0003, NanoBEL) für die finanzielle Unterstützung.

Prof. Dr. Dagmar Fischer
Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
E-Mail: dagmar.fischer@uni-jena.de

Literaturverzeichnis

- [1] M. Zhu, G. Nie, H. Meng, T. Xia, A. Nel, Y. Zhao, *Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate*, *Accounts of chemical research* 46(3) (2012) 622-631.
- [2] F. Schlenk, S. Werner, M. Rabel, F. Jacobs, C. Bergemann, J.H. Clement, D. Fischer, *Comprehensive analysis of the in vitro and ex ovo hemocompatibility of surface engineered iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, *Archives of Toxicology* (2017) 1-16.
- [3] M. Roman, *Toxicity of Cellulose Nanocrystals: A Review*, *Industrial Biotechnology* 11(1) (2015) 25-33.
- [4] S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Mulyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, *Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology*, *Nature nanotechnology* 8(10) (2013) 772-781.
- [5] D. Docter, D. Westmeier, M. Markiewicz, S. Stolte, S.K. Knauer, R.H. Stauber, *The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted?*, *Chemical Society reviews* (2015).
- [6] C.A. Ruge, U.F. Schaefer, J. Herrmann, J. Kirch, O. Canadas, M. Echaide, J. Pérez-Gil, C. Casals, R. Müller, C.-M. Lehr, *The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles*, *PLoS One* 7(7) (2012) e40775.
- [7] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, *Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors, Assay and Drug Development Technologies* 12(4) (2014) 207-218.
- [8] F. Schlenk, S. Grund, D. Fischer, *Recent developments and perspectives on gene therapy using synthetic vectors, Therapeutic delivery* 4(1) (2013) 95-113.
- [9] J. Lee, G.D. Lilly, R.C. Doty, P. Podsiadlo, N.A. Kotov, *In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture*, *Small* 5(10) (2009) 1213-1221.
- [10] C. Grabinski, M. Sharma, E. Maurer, C. Sulentic, R. Mohan Sankaran, S. Hussain, *The effect of shear flow on nanoparticle agglomeration and deposition in in vitro dynamic flow models*, *Nanotoxicology* 10(1) (2016) 74-83.
- [11] E.K. Breitner, S.M. Hussain, K.K. Comfort, *The role of biological fluid and dynamic flow in the behavior and cellular interactions of gold nanoparticles*, *Journal of Nanobiotechnology* 13 (2015) 56.
- [12] G. Zwadlo-Klarwasser, K. Görlitz, B. Hafemann, D. Klee, B. Klosterhalfen, *The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12(3) (2001) 195-199.
- [13] National Institute of Environmental Health Sciences, *ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Appendix B3, NIH Publication No. 10-7553* (2010).
- [14] A. Vargas, M. Zeisser-Labouèbe, N. Lange, R. Gurny, F. Delie, *The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems*, *Advanced drug delivery reviews* 59(11) (2007) 1162-1176.
- [15] B.E. Dunn, *Technique of shell-less culture of the 72-hour avian embryo*, *Poultry science* 53(1) (1974) 409-12.
- [16] H.C. Yalcin, A. Shekhar, A.A. Rane, J.T. Butcher, *An ex-ovo chicken embryo culture system suitable for imaging and microsurgery applications*, *Journal of visualized experiments: JoVE* (44) (2010).
- [17] B. Halamoda-Kenzaoui, M. Ceridono, P. Urbán, A. Bogni, J. Ponti, S. Gioria, A. Kinsner-Ovaskainen, *The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation*, *Journal of Nanobiotechnology* 15(1) (2017) 48.

