

Nikkel-, vas- és cinkoxid nanopartikulumok tüdősejtekre gyakorolt membránkárosító hatása

SZALAY BRIGITTA, TÁTRAI ERZSÉBET, PÁNDICS TAMÁS,
DURA GYULA

Országos Környezetegészségügyi Intézet, Budapest

Összefoglalás: A nanorészecskék méretéből adódóan mind az expozíció, transzlokáció, mind pedig a penetráció terén eltérő tulajdonságaik következtében a várható biológiai hatások jelentősen eltérhetnek a nagyszemcsés anyagformákétól. Az eltérő hatás felderítése a nanotechnológiai anyagok felelősségteljes alkalmazása szempontjából elengedhetetlen. Számos egyéb mellett a nanopartikulumok expozíciója leggyakrabban inhaláció útján történhet. Az inhaláció útján a tüdőbe jutó nanopartikulumok hatásának vizsgálata elsősorban az elsődleges védelmi vonalat képező sejtekre, az alveoláris makrofágokra (AM) és a II. típusú pneumocitákra (P2) gyakorolt hatása miatt kiemelt jelentőségű. Vizsgálataink során a nikkel-, vas- és cinkoxid tüdősejtekre gyakorolt hatását tanulmányoztuk in vitro lektinhisztokémiai módszerrel CrI:CD(SD) hím patkányok primer AM és P2 sejttenyészeit, valamint humán tüdő alveoláris carcinoma epitheliális (A549) sejt kultúráján. A 24 órás expozíció hatását 0.1, 0.5 és 1 µg/mL nikkeloxid (>100nm), 1, 5 és 10 µg/mL vas(III, II-III)oxiddal (20-30nm) és 1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL cinkoxid (<100nm) oldattal vizsgáltuk. NiO kezelés hatásaként, mindhárom sejt típusnál már 0.1 µg/mL koncentrációnál a sejtek majdnem 50%-nál részleges membrán-festődést tapasztaltunk, az 1 µg/mL koncentrációnál a sejthatárok 5-10%-a festődött. Fe(III)O és Fe(II-III)O esetében, az AM és P2 sejteknél a legmagasabb (10 µg/mL) koncentrációval történő mérgezés hatására töredezték fel a sejtmembránok, míg a humán A549 sejteknél már az 1 µg/mL-es kezelés hatására is. A ZnO –ra kevésbé voltak érzékenyek a sejtek, a 10µg/mL-es kezelés okozott nagyobb mértékű membránkárosodást, az 50µg/mL-es koncentráció hatására már jelentős sejtszám-csökkenés is tapasztalható. E vizsgálatok eredményeként tehát megállapíthatjuk, hogy a különböző nanoméretű fém-oxidok membránkárosító hatásúak mind a patkány mind a humán tüdősejtekben

Kulcsszavak: fém-oxid nanorészecskék, tüdő sejt, lektinhisztokémia

Bevezetés

Számos természetes és mesterséges úton előállított nanopartikulum létezik, amelyek a nanotechnológia rendkívüli gyors fejlődése következtében, hosszú évek óta a figyelem középpontjában vannak (1). A nanorészecskék ill. a nanorészecskéket tartalmazó anyagok képesek inhaláció útján, a bőrön keresztül vagy a gyomor-bél rendszeren át a szervezetbe jutni, hatást gyakorolva az emberi szervezet működésére, amely hatás a sajátos méret és a kapcsolódó fizikai kémia sajátságok következtében jelentősen eltérhet a nagyszemcsés anyagformákétól (2).

A nanoszemcsés fémoxidok számos alkalmazást nyertek az elmúlt évtizedben többek között a kozmetikai iparban, a mezőgazdaságban, a gyógyszergyártás és a betegellátás terén (3). Számos, már évek óta forgalmazott kozmetikum, betegellátásban alkalmazott krém tartalmaz antibakteriális hatása miatt nanoszemcsés cinkoxidot (4). Az MR diagnosztika optimalizálására, kontrasztanyagként kerül alkalmazásra a nanoszemcsés vasoxid (5).

A nanotechnológiai termékek felelősségteljes használatának alapfeltétele a részletekbe menő toxikológiai vizsgálat (6). Annak ellenére, hogy az antropogén tervezetten és nem tervezetten előállított nanopartikulumok leggyakoribb expozíciós útja az inhaláció, a különböző nanométeres nagyságrendbe eső fém-oxidok tüdőre gyakorolt hatását még kevéssé vizsgálták, elsősorban a transzlokációt és a depozíciót mérték (7).

Célkitűzés

Az inhaláció útján történő expozíció során várható biológiai hatás vizsgálata szempontjából elsődleges a tüdő első és legfontosabb védelmi vonalát képező sejtféleségek: az alveoláris makrofágok (AM) és a II. típusú pneumociták (P2) vizsgálata. Tanulmányunk során meghatároztuk a membrán szénhidrátkötő képességét, amely érzékeny indikátora a korai sejtkárosodásnak, illetve összehasonlítottuk a primer állati és a humán tüdő-sejtvonal (A549) nanoméretű fém-oxidokra való érzékenységet.

Módszer

Nikkel-, vas (III, II-III)- és cinkoxid nanopartikulumok tüdősejtekre gyakorolt hatását vizsgáltuk in vitro lektinhisztokémiai módszerrel. A lektin-kötési reakciók specificitása (I. táblázat) az immunhisztokémiai módszerek specificitásához hasonló. A lektinek a megfelelő monoszacharidot akkor is felismerik és megkötik, ha az oligo- vagy poliszacharid alkotó eleme.

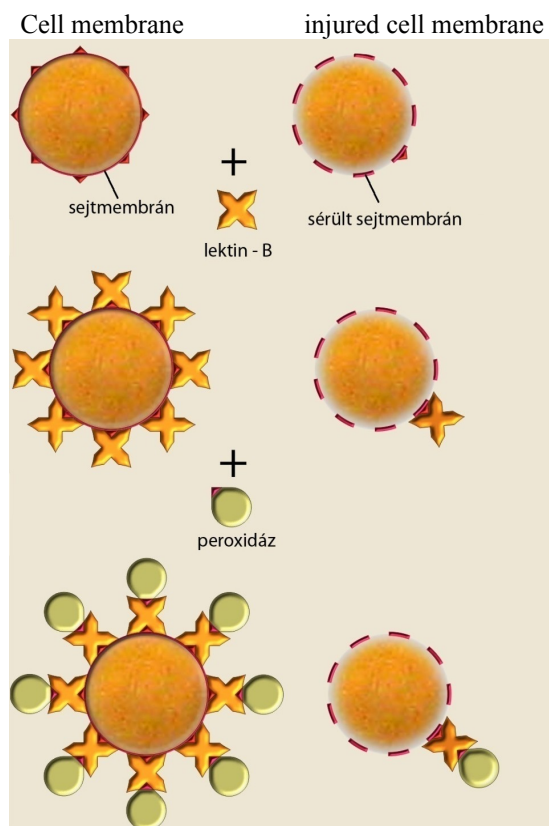
I. TÁBLÁZAT: A gyakran használt lektinek neve és cukorspecificitása

I. TABLE: Carbohydrate-specificity among the most used lectins

Forrás	Cukorspecificitás	Név
Bandeiraea simplicifolia	α -Laktóz	BSA
Pisum sativum (borsó)	D-mannóz, D-glükóz	PSA
Helix pomatia (éti csiga)	N-acetil-galaktózamin	HPA
Glycine max (Soybean)	N-acetil-galaktózamin, D-galaktóz	SBA
Maclura pomifera (narancseperfa)	D-galaktóz	MPA

A peroxidázzal jelzett lektint – amely egy adott sejtféleség sejtmembránjára jellemző monoszacharidhoz kötődik – reagáltatjuk a kezelt preparátummal, majd 3,3' diamino-benzidinnel (DAB) való előhívás után fénymikroszkópos elemzést végzünk, amely során megfelelő

érzékenységgel kimutatható a membránkárosodás (1. ábra).

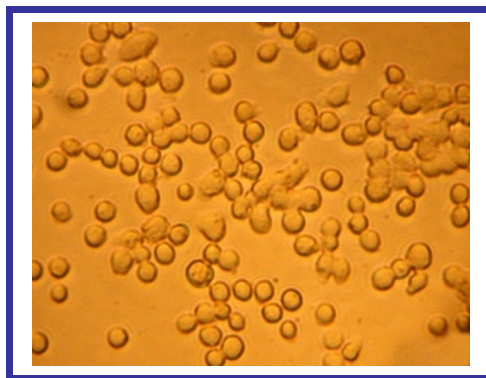


1. ábra: Az egészséges és a sérült sejtmembrán lektinkötése
Fig. 1: Lectin binding of healthy and injured cell membrane

Vizsgálataink során Crl:CD(SD) hím patkányok AM és P2 primer sejtenyészeteit, valamint humán A549 sejtvonalat kezeltünk. A 24 órás expozíciókat: 0.1, 0.5 és 1µg/mL-es koncentrációjú nikkeloxiddal (>100nm); 1, 5 és 10µg/mL-es koncentrációjú vas(III)oxiddal (átlagos szemcseméret 29nm); 1, 5 és 10µg/mL-es koncentrációjú vas(II-III)oxiddal (20-30nm); 1, 5, 10, 25, 50, 100µg/mL-es koncentrációjú cinkoxiddal (<100nm) végeztük.

Eredmények

A **kontroll** (állati AM, P2 és humán A549) sejtek membránjai épek, így barna színű vonallal rajzolódnak ki a sejthatárok (2. ábra).



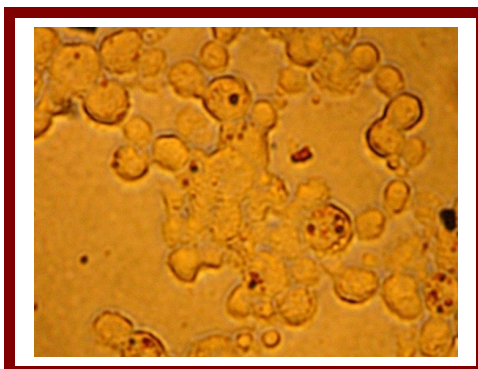
2. ábra: Kezeletlen alveoláris makrofágok ép membránjának képe
Fig. 2.: Uninjured cell membranes of untreated alveolar macrophages

Nikkeloxid kezelés hatásaként az AM és P2 sejtek esetében már $0.1\mu\text{g/mL}$ koncentrációnál a sejtek majdnem 50%-nál részleges membrán-festődést tapasztalunk, az $1\mu\text{g/mL}$ koncentrációnál a sejthatárok 5-10%-a festődik (3.ábra). A humán A549 sejteknél a $0.1\mu\text{g/mL}$ –es kezelésre a sejtek kb. 60% érintett, míg az $1\mu\text{g/mL}$ koncentrációval való kezelést követően a sejtmembránjaik max. 5%-a festődik.



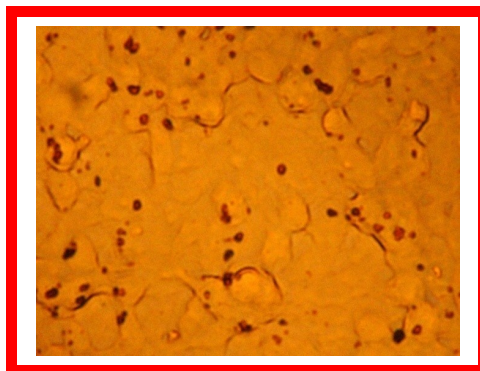
3. ábra: Alveoláris makrofágok képe $1\mu\text{g/mL}$ -es 24h nikkeloxid expozíciót követően.
Fig. 3: Alveolar macrophages after 24 h nickel-oxide exposure at $1\mu\text{g/mL}$

Vas(III)oxid és vas(II-III)oxid kezelés – az AM és P2 sejteknél a legmagasabb ($10\mu\text{g/mL}$) koncentrációval történő mérgezés hatására töredezték fel a sejtmembránok (4.ábra)



4. ábra: Alveoláris makrofágok képe $10\mu\text{g/mL}$ -es 24h vas(III)oxid expozíciót követően.
Fig. 4: Alveolar macrophages after 24h iron(III)oxide exposure at $10\mu\text{g/mL}$

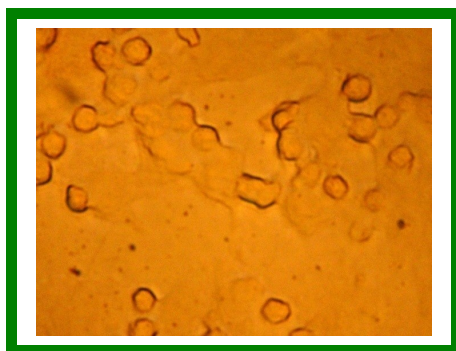
A humán A549 sejteknél már az $1\mu\text{g/mL}$ -es vas(III)oxid és vas(II-III) kezelés hatására is jelentős sejtmembrán károsodás következett be, a sejtek jelentősen érzékenyebben reagáltak (5.ábra).



5.ábra: Humán A549 sejtek képe 1µg/mL-es 24h vas(II-III)oxid expozíciót követően.

Fig. 5: Human cells (A549) after 24h iron(II-III)oxide exposure at 1µg/mL

A cinkoxid kezelésre kevésbé voltak érzékenyek a sejtek. A 10µg/ml-es kezelés okoz nagyobb mértékű membránkárosodást ez az AM és P2 sejtek több, mint 50%-át, míg a humán A549 sejtek közel 70%-át érinti (6.ábra). Az 50µg/ml-es koncentráció hatására már jelentős sejtszám-csökkenés is tapasztalható. Az AM és P2 sejtek kb. 30%-a, míg a humán A549-es sejtek közel 50%-a pusztult el (6.ábra).



6.ábra: Humán A549 sejtek képe 10µg/mL-es 24h nikkelloxid expozíciót követően.

Fig. 6: Human cells (A549) after 24h nickel-oxide exposure at 10µg/mL

Megbeszélés

A nanoszemcsék, méretükből adódóan jelentős fizikai és kémiai eltérést mutatnak a nagyszemcsés anyagformákéhoz képest. Így feltételezhető, hogy biológiai hatásaik is jelentősen eltérnek. A kis szemcseméret lehetővé teszi olyan struktúrákba való beépülésüket, amelyekre a nagyszemcsés anyagformák nem képesek (8). Reaktivitásuk is jelentősen eltér a nagyságrendekkel nagyobb tömegi fajlagos felületből következően, ezáltal a fém oxidok jelentős oxidatív stresszt okozhatnak, amely több tanulmány során A549 sejtek esetében is igazolásra került (9). Az általunk alkalmazott fém oxidok, a nikkelloxid, vas(III, II-III)oxid, cinkoxid jelentős oxidatív stresszt válthatnak ki. Az oxidatív stressz több tanulmány eredményei alapján vezethet jelentős mértékű membránkárosodáshoz (10), amely alapján magyarázható a vizsgálataink során tapasztalt jelentős membránkárosodás (II. táblázat).

II- TÁBLÁZAT: a fém-oxid expozíció hatására kialakuló alveoláris makrofág, II. típusú pneumocytá és humán A549-es sejtek membrán károsodása a sejtek százalékában

TABLE II: membrane injuries of alveolar macrophages, type II pneumocytes and human A549 cells after metal-oxide exposure

	Koncentráció (µg/mL) concentratio n	Károsodott sejtek (%) Injured cells			
		ZnO	FeO	Fe ₂ O ₃	NiO
AM és P2	0,1	x	x	x	50%
	1	x	x	x	90-95%
	10	50%	100%	100%	x
A549	0,1	x	x	x	60%
	1	x	100%	100%	95%
	10	70%	x	x	x

A sejtek eltérő érzékenysége, különösen a P2 típusú sejtek kisebb érzékenysége magyarázatot adhat a P2 típusú sejtek által termelt, már korábban leírt oxidatív stressz rezponzív protein kedvező hatása (11).

Következtetés

E vizsgálatok eredményeként tehát megállapíthatjuk, hogy a különböző tanulmányaink során vizsgált nanoméretű fémoxidok membránkárosító hatásúak mind a patkány mind a humán tüdősejtekben. Az érzékenységbeli eltérések a rendelkezésre álló korábbi kapcsolódó vizsgálatok eredményei alapján részben magyarázhatóak, de különbség teljes körű magyarázatára további vizsgálatok szükségesek.

IRODALOM

1. *Paschen, H., Coenen, C., Fleischer, T. et al.* In: Nanotechnologie – Forschung, Entwicklung, Anwendung; Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 2004. 282-294.
2. *Oberdörster, G., Ferin, J., Lehnert, B.E.*: Correlation between particle-size, in-vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.* 1994. 102(S5). 173–179.
3. *Kleiner, K., Hogan, J.*: How safe is nanotech. *New Sci. Tech.* 2003. 177. 14-15.
4. *Nohynek, G. J., Lademann, J., Ribaud, C. et al.*: Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2007. 37. 251-257.
5. *Muldoon, L L., Manninger, S., Pinkston, K E. et al.*: Imaging, distribution and toxicity of iron oxide magnetic resonance agents in rat brain and intracerebral tumor. *Neurosurgery*, 2005, 57, 785–95.
6. *Oberdörster, G.*: Toxicology of ultra fine particles: in vivo studies, *Philos Trans R Soc Lond A.* 2000. 358. 2719-2740.
7. *Ferin, J., Oberdörster, G.*: Translocation of particles from pulmonary alveoli into the interstitium. *J Aerosol Med* 1992. 5(3). 179–187.

8. *Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V. et al.*: Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2002. 65. 1531–1543.
9. *Choi, S.J., Oh, J.M., Choy, J.H.*: Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A 549 cells. *2009. 103 (3)*. 463-471.
10. *Belia, S., Santilli, F., Beccafico, S. et al.*: Oxidative-induced membrane damage in diabetes lymphocytes: Effects on intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Free Radical Research*, 2009, 43(2), 138-148.
11. *Duan, X., Kelsen, S.G., Merali, S.*: Proteomic Analysis of Oxidative Stress-Responsive Proteins in Human Pneumocytes: Insight into the Regulation of DJ-1 Expression. *J. Proteome Res*, 2008. 7 (11). 4955–4961.

BRIGITTA SZALAY
National Institute of Environmental Health
Budapest
Gyáli út 2-6
tel.: 06-1-476-1100/2290
e-mail: szalay.brigitta@oki.antsz.hu

Membrane damaging effects of nickel, iron and zinc oxide nanoparticles on lung cells

Abstract: The expected biological effects of nanoparticles may differ from other materials in different properties, in exposure, translocation, as well as in penetration to several tissues with higher particle size due to their size. For responsible use is it essential to study the difference in impact of nanomaterials. Among other ways, inhalation is the most common way for exposure. In the course of inhalation to the lungs, nanoparticles affect mostly the primary line of defense forming cells, as alveolar macrophages (AM), type II pneumocytes (P2), according to the examination of the impact is this of particular importance. The effects of nickel, iron and zinc oxide nanoparticles on lung cells were studied by in vitro lectin histochemistry method on primary cell cultures of AM and P2 as well as human A549 tumor-cell line of CrI:CD (SD) male rats. The 24-hour exposure was tested by nickel oxide (<100nm) at 0.1, 0.5 and 1 µg/mL; iron (III, II-III) oxide (20-30nm) at 1.5 and 10 µg/mL; and zinc oxide at 1, 5, 10, 25, 50,100 µg/mL concentration. By NiO treatment at 0.1 µg/mL concentration on all cell types was 50% membrane staining observed, while at 1 µg/mL only 5-10%. The membranes of alveolar macrophages and pneumocytes were fragmented only at high concentration (10 µg/mL) of Fe(III)O and Fe(II-III)O, while in case of human A549 cells already at 1 µg/mL. Cells were less sensitive on ZnO exposure, only at 10 µg/mL treatment was caused greater membrane damage, at 50 µg/mL concentration was observed a significant cell count reduction. As a result of these studies can be concluded that the different nanoscale metal oxides occur membrane damage in both, the rat and the human, lung cells.

Keywords: metal oxide nanoparticles, lung cell, lectin histochemistry
