

Gevaaridentificatie van nanodeeltjes met *in vitro* modellen

RIKILT (contact: dr.ir. Hans Bouwmeester: hans.bouwmeester@wur.nl)

8 november 2012

Voor onderzoek naar toxiciteit van stoffen worden nog steeds veel proefdieren gebruikt. Dat zal voor nanodeeltjes niet anders zijn. Nanodeeltjes zijn deeltjes die in drie dimensies kleiner zijn dan 100nm. Er wordt op dit moment volop onderzoek gedaan naar innovatieve toepassingen van nanodeeltjes in een breed scala aan industriële en consument product toepassingen. Van een duurzame toepassing kan alleen sprake zijn als er ook aandacht is voor mogelijke gevaren van nanodeeltjes voor mens en milieu. Daarbij is het tot op heden onduidelijk of er volstaan kan worden met klassieke proefdierstudies.

“Juist om een beter begrip te krijgen van interacties van nanodeeltjes met biologische processen in ons lichaam, zijn *in vitro* studies erg geschikt” aldus Hans Bouwmeester, senior onderzoeker bij het RIKILT- Instituut voor Voedselveiligheid en onderdeel van Wageningen UR. Samen met een door ZonMW gefinancierde AIO voor dierproeven begrensd onderzoek, voeren hij en zijn collega's al enkele jaren onderzoek uit naar de mogelijkheden van de toepassing van *in vitro* modellen voor digestie en darmpassage voor de gevaaridentificatie van nanodeeltjes.

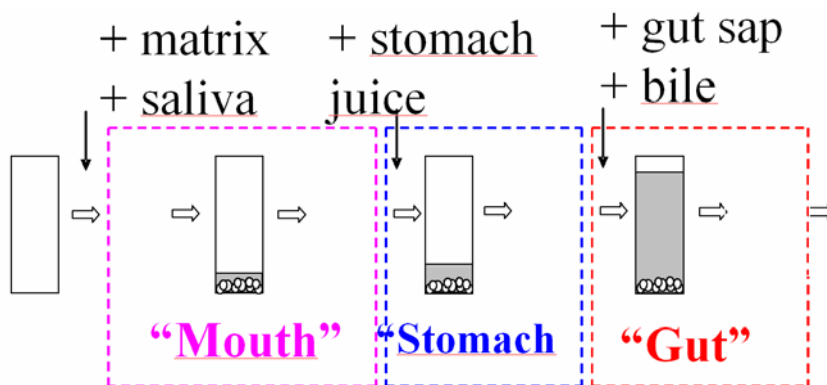


Natuurlijke barrières in ons lichaam

In ons onderzoek richten we ons op orale blootstelling aan nanodeeltjes. Wil een nanodeeltje in ons bloed terecht komen, moet het twee grote barrières overwinnen. Als eerste de maag en als tweede de darmwand. Voor beide barrières zijn *in vitro* modellen beschikbaar. Op het RIKILT maken we gebruik van een eenvoudig model. Met dit model wordt in drie fasen het mond-maag-darmstelsel gesimuleerd. Het gebruikte model is oorspronkelijk opgezet door het RIVM voor onderzoek naar de bio-toegankelijkheid van lood uit bodem.

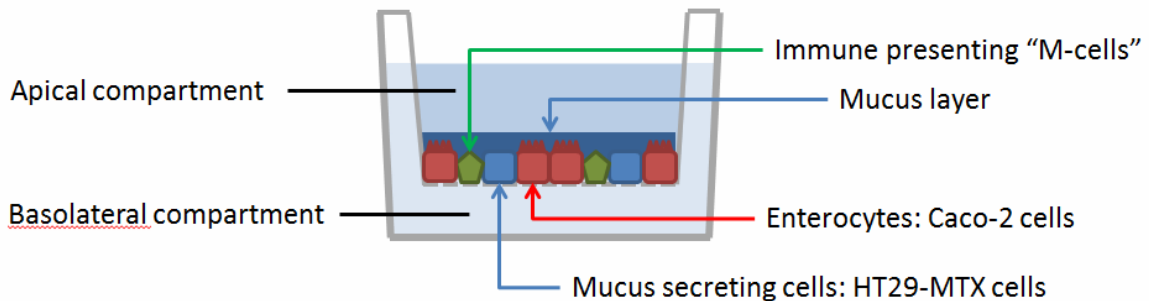
1. De eerste buis (fase 1) simuleert de mond. Aan deze buis, met daarin het te onderzoeken monster, wordt een kunstmatig speeksel toegevoegd.
2. Vervolgens worden hieraan maagsappen toegevoegd (fase 2), waardoor er een zure matrix ontstaat.
3. Na een incubatie van ongeveer 2 uur worden hieraan vervolgens ook nog darmsappen en gal toegevoegd, om zo alvast de omstandigheden in de dunne darm (fase 3) na te bootsen.

Na afloop van elke fase kunnen monsters genomen worden voor analyse. M.b.t. de nanodeeltjes is elke fase onderzocht om vast te stellen of de nanodeeltjes nog aanwezig zijn en of ze als individueel deeltjes of als agglomeraat (een cluster van nanodeeltjes) aanwezig zijn. Of zijn ze misschien wel opgelost?



Figuur 1: Schematisch weergegeven mond-maag-darm *in vitro* digestie model

In ons huidige onderzoek richten we ons op het koppelen van de darm fase van het *in vitro* model voor het mond-maag-darmstelsel aan een cellulair *in vitro* model voor de darmwand. Hierbij willen we de fysiologische complexiteit van de darmwand nabouwen door gebruik te maken van drie celtypen die van cruciaal belang zijn voor de functionaliteit van een darm in de mens: een drievoudige co-cultuur van darmcellen (enterocyten), immuun cellen en mucus cellen op een doorlatende membraan.



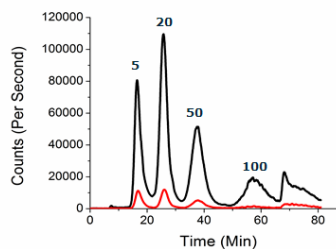
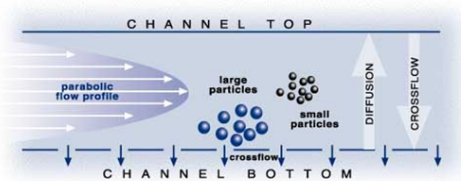
Figuur 2: drievoudige co-cultuur als *in vitro* model voor de humane darmwand

Zonder goede detectiemethoden zijn we nergens

De *in vitro* modellen moeten worden gecombineerd met goede detectiemethoden voor de te onderzoeken stoffen, dus om zo een uitspraak te kunnen doen over het voorkomen van de nanodeeltjes in de verschillende fasen en ook voor de vorm waarin ze voorkomen. Op het RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid maken we gebruik van twee typen detectiemethoden voor de nanodeeltjes. De eerste is gebaseerd op het meten van de massa van elementen: Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS); al dan niet gecombineerd met een scheidings- en monsterzuiveringstechniek: Field Flow Fractionation. Met deze analytisch chemische meetmethoden zijn we in staat om een onderscheid te maken tussen de intacte nanodeeltjes en de opgeloste stof/deeltjes (ionen). De uitkomst van deze metingen zijn grafieken met een grootteverdeling van de nanodeeltjes.

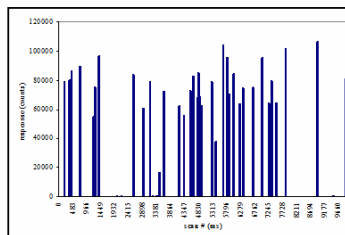
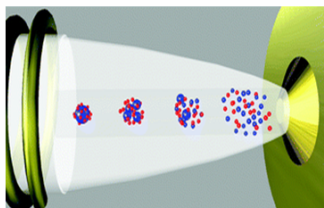
Voor visualisatie van nanodeeltjes maken we gebruik van scanning elektronen microscopie met element karakterisatie (SEM-EDX). Daarmee kunnen we vragen over de vorm van de nanodeeltjes beter beantwoorden.

Field Flow Fractionation- ICP-MS



Assess: form, size distribution, concentration, chemical composition

Single Particle - ICP-MS



Assess: size distribution, numbers per size, chemical composition

Figuur 3: Schematische weergave van Field Flow Fractionation- ICP-MS en Single Particle ICP-MS.

***In vitro* studie naar de effecten van het maag-darmstelsel op zilver nanodeeltjes**

Onlangs hebben we een onderzoek gepubliceerd in *Nanotoxicology**. Hierin beschrijven we hoe 60 nm zilver nanodeeltjes reageren in de *in vitro* gesimuleerde condities van de humane vertering. Gebleken is dat de aanwezigheid van eiwitten gedurende de vertering cruciaal is voor het "overleven" van de nanodeeltjes. In afwezigheid van eiwitten en verteringsenzymen lossen de zilver nanodeeltjes namelijk op in de maag (ten gevolge van de zure omstandigheden). Echter, in de aanwezigheid van verteringsenzymen en eiwitten, simulatie van nanodeeltjes in voeding en dus onder fysiologisch veel meer relevantere condities, bereiken intacte nanodeeltjes de darm fase van het *in vitro* model. Blijkbaar beschermen de eiwitten de zilver nanodeeltjes voor de bijzondere omstandigheden in de maag.

In een volgende stap wordt het *in vitro* digestiemodel gekoppeld aan het te ontwikkelen en hierboven beschreven *in vitro* darmwand model met 3 celtypen. Met dit onderzoek verwachten we uiteindelijk een *in vitro* systeem te implementeren waarmee we een indruk kunnen krijgen van de biobeschikbaarheid van nanodeeltjes. Voor de eerste fase van het toxicologische onderzoek van nanodeeltjes zijn dan in de toekomst wellicht minder proefdierstudies nodig.

* Walczak, AP; Fokkink, R; Peters, R; Tromp, P; Herrera Rivera, Z E.; Rietjens, I; Hendriksen, P J.M.; Bouwmeester, H. Behavior of Silver Nanoparticles and Silver Ions in an *In Vitro* Human Gastrointestinal Digestion Model. *Nanotoxicology* 2012. DOI: 10.3109/17435390.2012.726382) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22931191>