

Lidia ZAPÓR

e-mail: lizap@ciop.pl

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa

Ocena cytotoksycznego działania nanocząstek tlenku ceru

Wstęp

Nanomateriały, coraz szerzej stosowane w wielu dziedzinach gospodarki, powinny być oceniane nie tylko pod kątem rozwiązań technicznych, ale również zagrożeń, jakie mogą stwarzać dla zdrowia ludzi i środowiska naturalnego.

Tlenek ceru $\text{CeO}_2\text{-NM}$ (*nanoceria*) nanometryczny (inaczej: nanometryczny) należy do nanomateriałów o przewidywanym w najbliższej przyszłości największym zastosowaniu komercyjnym [OECD, 2011]. $\text{CeO}_2\text{-NM}$ jest stosowany przede wszystkim jako katalizator paliwa w silnikach Diesla, elektrolit w stałotlenkowych ogniwach paliwowych SOFC (*Solid Oxide Fuel Cells*), materiał polerski, barwnik plastiku, warstwa buforowa dla nadprzewodników, powłoka dla filtrów podczernieni, pochłaniacz UV.

Pomimo, że produkcja $\text{CeO}_2\text{-NM}$ jest wielkotonażowa, to istniejące dane toksykologiczne uznane zostały za niewystarczające do oceny zagrożeń, jakie może stwarzać dla ludzi i środowiska (w tym środowiska pracy) [OECD, 2011]. Badania prowadzone w ostatnich latach dają bowiem niespójny obraz toksycznego działania $\text{CeO}_2\text{-NM}$. Wyniki badań wykazują zarówno działanie cytotoksyczne [Kroll i in., 2011; De Marzi i in., 2013], jak i jego brak [Xia i in. 2008; Park i in. 2008; De Marzi i in., 2013], działanie prooksydacyjne [Kroll i in., 2011], jak również antyoksydacyjne [Niu i in. 2007; Xia i in. 2008], wystąpienie reakcji prozapalnych [Celardo i in., 2011], jak i ich brak [Xia i in. 2008]. Powyższe dane wskazują, że ocena bezpieczeństwa chemicznego $\text{CeO}_2\text{-NM}$ jest problem otwartym i ważnym.

Jednym z pierwszych etapów oceny zagrożeń stwarzanych przez chemikalia są badania prowadzone w warunkach *in vitro* na komórkach wyizolowanych z narządów, głównie ssaków, w tym badanie działania cytotoksycznego [Zapór, 2012]. Ocena cytotoksyczności nanomateriałów jest podstawowym narzędziem w określaniu ich potencjalnych skutków na poziomie komórkowym, wskazuje bowiem nie tylko stopień uszkodzeń, ale również ich mechanizm [Arora i in. 2012].

Celem badań prezentowanych w niniejszej pracy była ocena cytotoksycznego działania nanocząstek tlenku ceru na komórki układu oddechowego i rozrodczego. Badano wpływ $\text{CeO}_2\text{-NM}$ na integralność błon komórkowych i aktywność metaboliczną komórek. Dodatkowo oceniano wpływ niektórych elementów metodyki stosowanych testów na wielkość efektu cytotoksycznego.

Metodyka

Badano tlenek ceru o nominalnej wielkości cząstek: < 25 nm w zawiesinie wodnej (*Sigma* nr kat. 643009). Badania wykonywano na komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO-9) oraz komórkach nabłonkowych płuc człowieka (A549). Do oceny cytotoksycznego działania $\text{CeO}_2\text{-NM}$ zastosowano *test NRU* pochłaniania czerwieni obojętnej (*Neutral Red Uptake*) oceniający integralność błon komórkowych oraz *test MTT* redukcji soli tetrazolowej (MTT), określający aktywność metaboliczną komórek.

Przygotowanie prób do badań

$\text{CeO}_2\text{-NM}$ charakteryzowano pod kątem wielkości i rozkładu wielkości cząstek w roztworze wyjściowym (zawiesina wodna dostarczona przez producenta) oraz w pożywce do hodowli komórek na podstawie analizy śledzenia nanocząstek NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) z wykorzystaniem analizatora *LM 10 Series (NanoSight, UK)*. Badania wykonywano w *Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej* w Warszawie.

Roztwór wyjściowy sonifikowano (420 J/cm^3 , w lodzie) (*Sonica Q 700, Qsonica LLC, USA*), a następnie bezpośrednio przed doświadczeniem sporządzano roztwory robocze $\text{CeO}_2\text{-NM}$ w pożywkach odpow-

wiednich dla danej linii komórkowej pozbawionych surowicy. Roztwory przed podaniem na komórki mieszano (*vortex*) przez 2 min.

Ocena cytotoksyczności

Ocenę cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z protokołami *test NRU* wg [INVITTOX: nr 64] i *test MTT* wg [INVITTOX: nr 17]. Komórki adherowano w 96-dołkowych mikroplątkach (10 tys. komórek w dołku), po czym narażano przez 24 h na różne stężenia $\text{CeO}_2\text{-NM}$ (9 powtórzeń). Zakres stężeń wynosił $5\text{--}200 \mu\text{g/cm}^3$. Po ekspozycji usuwano roztwory $\text{CeO}_2\text{-NM}$ z komórek, komórki płukano czystym medium i wykonywano testy cytotoksyczności.

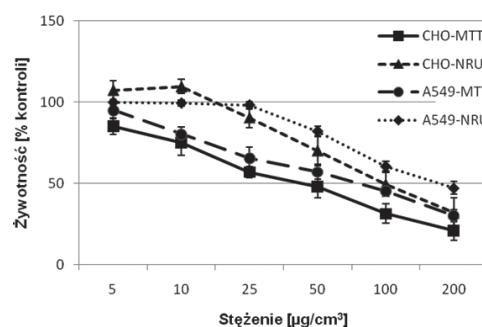
W teście NRU komórki inkubowano przez 3 h w roztworze czerwieni obojętnej w medium hodowlanym ($50 \mu\text{g/cm}^3$), po czym usuwano barwnik z komórek. Następnie, za pomocą mieszaniny elucyjnej (50% etanolu, 49% wody destylowanej, 1% lodowatego kwasu octowego) niszczone błony komórkowe, uwalniając zgromadzony w żywych komórkach barwnik, którego stężenie oznaczano kolorymetrycznie na czytniku do mikroplątek *SYNERGY 2 (BioTek Instruments, Inc.)*, przy długości fali 540/450 nm, po wytrząśnięciu płytek przed pomiarem przez 2 min.

W teście MTT komórki inkubowano przez 3 h w roztworze soli tetrazolowej MTT ($0,5 \text{ mg/cm}^3$). Po usunięciu barwnika, za pomocą DMSO (*Dimethyl SulfOxide*) niszczone błony komórkowe oraz rozpuszczano wytrącony w wyniku zachodzącej w mitochondriach reakcji enzymatycznej formazan, którego stężenie oznaczano kolorymetrycznie ($570/630 \text{ nm}$, *SYNERGY 2*). Do standardowej procedury obu testów wprowadzono dodatkowe kroki mające na celu ograniczenie optycznej interferencji nanocząstek polegające na przeniesieniu nadsączonego z komórek do czystych mikroplątek przed pomiarem absorbancji.

Przeżywalność komórek eksponowanych na $\text{CeO}_2\text{-NM}$ (procent żywych komórek w porównaniu z kontrolą, którą stanowiły komórki inkubowane w medium odżywczym) obliczano na podstawie pomiarów absorbancji a następnie wyliczano stężenie ograniczające żywotność komórek o 50% w porównaniu z kontrolą IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Wartości IC_{50} obliczano stosując program komputerowy *GEN 5* wykorzystujący interpolację krzywymi (logistyka czteroparametrowa) (*BioTek Instruments, Inc.*). Istotność statystyczną różnic między wartościami IC_{50} oceniano testem *t-Studenta* przy $p < 0,05$. Badania cytotoksyczności wykonywano co najmniej trzykrotnie.

Wyniki

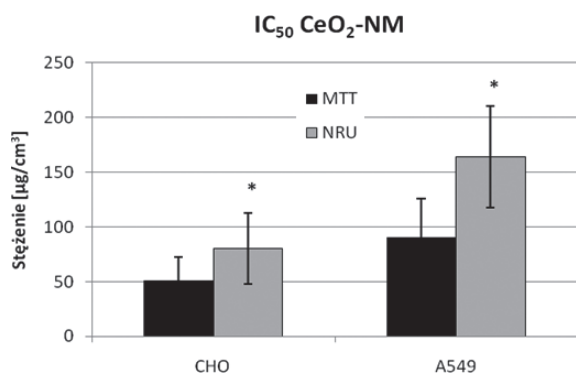
Analiza NTA wykazała, że roztwór wyjściowy (zawiesina wodna $\text{CeO}_2\text{-NM}$) zawierał cząstki o średniej wielkości 100 ± 43 nm (mediana



Rys. 1. Wpływ tlenku ceru ($\text{CeO}_2 < 25$ nm) na żywotność komórek CHO oraz komórek A549 ocenianą testem NRU i testem MTT. Za 100% przyjęto stopień pochłaniania czerwieni obojętnej i stopień redukcji MTT w próbach kontrolnych. Każdy punkt reprezentuje średnią i odchylenie standardowe z 27 pomiarów w 3 niezależnych eksperymentach

= 53 nm; 50% < 114 nm). Pożywka powodowała jednak agregację cząstek CeO₂-NM do wielkości 300 nm (SD = 70), dodatkowo obserwowano wysoką sedymentację cząstek.

Narażenie komórek CHO oraz A549 na CeO₂-NM powodowało zależny od stężenia spadek ich przeżywalności ocenianej na podstawie obu testów (Rys. 1). Krzywe zależności dawka – efekt wyznaczone w teście MTT, jak również w teście NRU mają podobny przebieg w przypadku obu linii komórkowych. Wskazują, że CeO₂-NM powodował zarówno zmiany w przepuszczalności błon komórkowych, jak i zaburzenia aktywności metabolicznej mitochondriów. Różnice w odpowiedzi komórkowej były widoczne, ale nie różniły się istotnie statystycznie (brak istotnych statystycznie różnic między wartościami IC₅₀) (Rys. 2).



Rys. 2. Porównanie działania cytotoksycznego nanocząstek tlenku ceru (CeO₂ < 25 nm) na komórki CHO oraz A549 na podstawie wartości IC₅₀ wyznaczonych w testach MTT i NRU. Każdy słupek reprezentuje wartość średnią IC₅₀ ± SD z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. *) p < 0,05

Dyskusja i wnioski

Dane dotyczące cytotoksycznego działania nanocząstek tlenku ceru są bardzo kontrowersyjne. Przyczyną niespójnych wyników jest prawdopodobnie duża liczba parametrów, które mogą mieć wpływ na toksyczność nanocząstek. Podstawowym problemem jest charakterystyka nanomateriałów oraz ich interferencja z metodami badawczymi [Stone *et al.*, 2009].

W prezentowanej pracy badano nanotlenek ceru w postaci zawiesiny wodnej o określonej przez producenta nominalnej wielkości cząstek < 25 nm. Analiza NTA wykazała duże różnice w wielkości i rozkładzie wielkości cząstek w roztworze wyjściowym (zawiesina wodna) i w medium hodowlanym, które sprzyjało tworzeniu się agregatów, co sugerowałoby, że badano tlenek ceru o wymiarze przekraczającym skalę nano, rozumianą jako zakres 1÷100 nm. Nadmienić należy, że definicja nanomateriału wg Komisji Europejskiej [OECD, 2011] obejmuje również agregaty i aglomeraty. Poza tym istnieją dane świadczące o tym, że metody wyznaczające średnicę hydrodynamiczną cząstek mają ograniczenia. W obecności agregatów dają skringingowy obraz rozkładu wielkości cząstek, w którym gubią się cząstki mniejsze (nawet do 90%), dlatego też w analizie należy zakładać ich obecność i wpływ na toksyczność [Filipe *et al.*, 2010].

Pomimo niestabilności zawiesiny i obecności agregatów, otrzymano zbliżone wartości dawek cytotoksycznych wyznaczonych obiema metodami na obu liniach komórkowych. Na powtarzalność wyników miały wpływ m.in. zastosowane adaptacje testów. W przypadku odczytów absorbancji bezpośrednio na mikropłytkach z narażanymi komórkami otrzymywano wielokrotnie wyższe wartości IC₅₀ lub też nie uzyskiwano cytotoksycznego działania w badanym zakresie stężeń (dane nie umieszczone). Różnice pomiędzy wartościami IC₅₀ wyznaczonymi w testach MTT i NRU są na tyle nieistotne, że świadczą raczej o różnej czułości testów, niż wskazują na mechanizm działania CeO₂-NM. Nie można jednak wykluczyć, że CeO₂-NM w pierwszej kolejności powoduje zaburzenia metabolizmu komórkowego, a następnie zmiany przepuszczalności i destrukcję błon komórkowych. Wnioski wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.

Wyznaczone dawki cytotoksyczne mieściły się w niskim przedziale stężeń (30÷200 µg/cm³) i chociaż nie mogą być wprost ekstrapolowane

do narażenia w warunkach *in vivo*, to wskazują, że CeO₂-NM może stanowić zagrożenie dla organizmów.

Podsumowanie

Nanocząstki tlenku ceru wykazują działanie cytotoksyczne. Mogą powodować zaburzenia metabolizmu komórkowego i zmiany w przepuszczalności błon komórkowych. Z uwagi na szerokie zastosowanie i możliwość emisji do środowiska (zwłaszcza środowiska pracy, gdzie może występować narażenie na wysokie stężenia przez długi czas) istnieje pilna potrzeba poszerzonych badań toksykologicznych nanocząstek tlenku ceru.

LITERATURA

- Arora S., Rajwade J.M., Paknikar K.M., 2012. Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **258**, 151-165. DOI: 10.1016/j.taap.2011.11.010
- Cassee F.R., van Balen E.C., Singh C., Green D., Muijsers H., Weinstein J., Dreher K., 2011. Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive. *Crit. Rev. Toxicol.*, **41**, 213-229. DOI: 10.3109/10408444.2010.529105
- Celardo I., Pedersen J.Z., Traversa E., Ghibelli L., 2011. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*, **3**, 1411-1420. DOI: 10.1039/c0nr00875c
- De Marzi L., Monaco A., De Lapuente J., Ramos D., Borrás M., Di Gioacchino M., Santucci S., Poma A., 2013. Cytotoxicity and genotoxicity of ceria nanoparticles on different cell lines *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 3065-3077. DOI:10.3390/ijms14023065
- Filipe V., Hawe A., Jiskoot W., 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm. Res.* **27**, 796-810. DOI: 10.1007/s11095-010-0073-2
- INVITTOX Protocol No 17. *MTT Assay*. The ERGATT/FRAME Data Bank of *In Vitro* Techniques in Toxicology, Nottingham, 1990
- INVITTOX Protocol No 64. *The Neutral Red Cytotoxicity Assay*. The ERGATT/FRAME Data Bank of *In Vitro* Techniques in Toxicology, Nottingham, 1992
- Kroll A., Dierker C., Rommel C., Hahn D., Wohlleben W., Schulze-Isfort C., Göbbert C., Voetz M., Hardinghaus F., Schnekenburger J., 2011. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part. Fibre Toxicol.*, **8**, 9. DOI: 10.1186/1743-8977-8-9
- Niu J., Azfer A., Rogers L.M., Wang X., Kolattukudy P.E., 2007. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* **73**, 549-559. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.11.031
- OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. No 29. *Current developments/activities on the safety of manufactured nanomaterials*. ENV/JM/MONO(2011)12, 2011. (05. 2014). [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2011\)12&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2011)12&doclanguage=en)
- Park E.J., Choi J., Park Y.K., Park K., 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, **245**, 90-100. DOI: 10.1016/j.tox.2007.12.022
- Stone V., Johnston H., Roel P., Schins F., 2009. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit. Rev. Toxicol.*, **39**, 613-626. DOI: 10.1080/10408440903120975
- Xia T., Kovoich M., Liang M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel A.E., 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, **2**, 2121-2134. DOI: 10.1021/nm800511k
- Zapór L., 2012. Zintegrowane strategie badań toksyczności produktów nanotechnologii. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, 4(74), 33-40

Praca przygotowana na podstawie wyników III etapu programu wieloletniego pn. „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2014-2016 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Koordynator programu: CIOP-PIB.