

## Wissen und Wissenslücken zum Thema Hautpenetration von Nanopartikeln in Sonnenschutzmitteln

*T. Butz, Koordinator des NANODERM-Consortiums*

*Universität Leipzig, Fakultät für Physik und Geowissenschaften, Linnéstr.5, 04103 Leipzig*

In vielen Sonnenschutzmitteln werden Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) Nanopartikel als physikalische UV-Filter verwendet. Der sogenannte Weiß-Effekt von  $\text{TiO}_2$  in Pigmentform, d.h. mit Partikelgrößen deutlich über  $1 \mu\text{m}$ , der für den Verbraucher unerwünscht ist, verschwindet bei Nanopartikeln mit typischen Primärteilchengrößen um  $20 \text{ nm}$ . Die physikalischen Filter sind gegenüber chemischen UV-Filtern besser hautverträglich und ermöglichen Sonnenschutzfaktoren von bis zu etwa 60. Kristallines  $\text{TiO}_2$  ist photokatalytisch aktiv, d.h. durch Absorption von UV-Quanten werden Elektronen freigesetzt, die zur Oberfläche wandern können und dort Radikalreaktionen auslösen. Dieser Effekt wird z.B. bei der Abwasserreinigung verwendet, ist aber bei Sonnenschutzmitteln unerwünscht. Deshalb werden die Nanopartikel ge-coated, d.h. z.B. mit einer amorphen Schicht aus  $\text{SiO}_2$  überzogen, die die freien Elektronen einfängt.

Seit geraumer Zeit wird diskutiert, ob  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel über die Haut in vitales Gewebe eindringen können. Die Haut besteht – sehr vereinfacht, siehe Abb. 1 – aus einer  $10 - 15 \mu\text{m}$  dicken Hornhautschicht (stratum corneum), die aus Corneozyten, d.h. abgestorbenen Keratinozyten, besteht. Darunter liegt das stratum spinosum, das aus noch vitalen Keratinozyten besteht, allerdings ohne Blutgefäße. Die Unterseite des stratum spinosum hat eine papilläre Morphologie, es schließt sich die Dermis mit Blutgefäßen an. Darüber hinaus gibt es Schweißdrüsen sowie Haarfollikel mit Talgdrüsen.

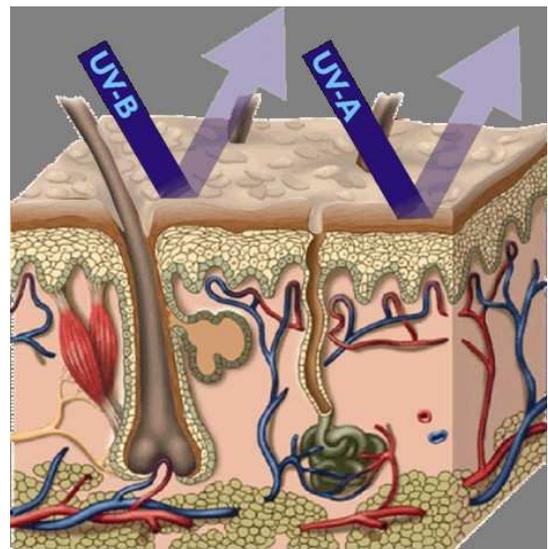


Abb.1: Streuung und Absorption von UV-Strahlung durch  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel in Sonnenschutzmitteln

$\text{TiO}_2$  gilt als chemisch inert, d.h. unter physiologischen Bedingungen als unlöslich. Sollte es also eine Hautpenetration der Nanopartikel in vitales Gewebe geben, sind durchaus gesundheitliche Konsequenzen im stratum spinosum möglich. Erreichen die Nanopartikel sogar die Blutbahn ist die Translokation in sekundäre Organe und auch Akkumulation denkbar.

Es gibt eine ganze Reihe von Methoden zur Untersuchung der Hautpenetration von Nanopartikeln. Dies sind beispielsweise das Tape-Stripping und die Franz-Diffusionszelle. Bei ersterem Verfahren wird die Hornhaut lagenweise abgetragen und auf Titan analysiert. Da die Haut aber faltig ist und Haarfollikel aufweist, liefert diese Technik keine Tiefenprofile, selbst dann nicht, wenn man auf die abgetragene Corneozytenmenge normiert. Bei der zweiten Methode wird ein Stück Haut

explantiert und als Membran verwendet, auf deren Oberseite die Formulierung mit Nanopartikeln aufgetragen wird und auf deren Unterseite mit Pufferlösung gespült wird und regelmäßig gezogene Proben analysiert werden. Die Ergebnisse stehen und fallen mit der Integrität der Hautmembran, und zwar auf einer Skala von 20 nm. Beide Methoden sind integrale Methoden, d.h. sie visualisieren die möglichen Penetrationspfade nicht.

Dafür sind Mikroskopiemethoden und Hautquerschnitte erforderlich, allen voran die Hochauflösende Transmissions-Elektronenmikroskopie (HRTEM) sowie die Ionen-Mikroskopie. Die erstere Methode erfordert Ultradünnschnitte, z.B. 60 nm dick, und umfangreichere Präparationsschritte. Ihr Hauptvorteil ist die Visualisierung einzelner Nanopartikel sowie über energiedispersive Analytik die Bestimmung ihrer Zusammensetzung. In der Regel liegen die Nanopartikel als Agglomerate vor. Ihr Nachteil ist das eingeschränkte Gesichtsfeld und die Gefahr von Präparationsartefakten. Bei der Ionenmikroskopie – Abb. 2 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Ionenstrahlanalysemethoden - verwendet man hauptsächlich Protonen-induzierte Röntgenstrahlung (PIXE) zur simultanen Erzeugung von element-spezifischen Bildern. Diese Methode wird ergänzt durch Techniken wie Rutherford-Rückstreu-Spektrometrie (RBS) zur Schichtdickenbestimmung sowie Raster-Transmissions-Ionen-Mikroskopie (STIM) für den Dichtekontrast. Hierfür verwendet man Hautschnitte von ca. 10 µm Dicke. Die Präparation ist sehr einfach: die Proben werden gefriergetrocknet und mit einem Cryo-Mikrotom geschnitten. Fixierungen und Färbungen sind nicht erforderlich. Die Gefahr von Präparationsartefakten ist dadurch deutlich geringer. Zudem kann man in der Regel unterscheiden, ob sich Nanopartikelagglomerate auf dem Hautquerschnitt oder in dem Hautquerschnitt befinden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist das große Gesichtsfeld und die Möglichkeit, in interessante Areale hineinzuzoomen. Schließlich kann man mit PIXE auch titanhaltige molekulare Spezies nachweisen. Die minimalen Nachweisgrenzen liegen dabei etwa bei einem 20 nm großen TiO<sub>2</sub>-Partikel in einem Volumen von ca. 10 µm<sup>3</sup>. Ein Nachteil der Ionenmikroskopie ist, dass die laterale Ortsauflösung von 100 – 300 nm nicht ausreicht um einzelne Nanopartikel zu visualisieren.

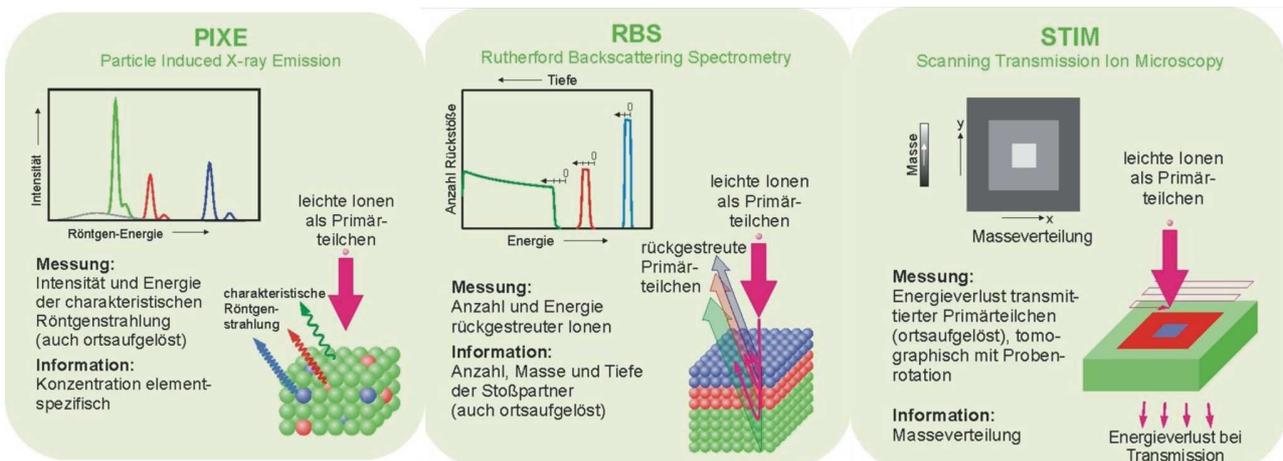


Abb.2: Übersicht über die wichtigsten Ionenstrahlanalysemethoden PIXE, RBS, STIM

Bevor man sich der Beantwortung der Frage zuwendet, ob Nanopartikel über die Haut in vitales Gewebe eindringen können, sollte man sich Klarheit über mögliche Transportmechanismen verschaffen. Die  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel sind in den Sonnenschutzmitteln mit üblicherweise bis zu 5 Gewichtsprozent in viskose Formulierungen eingearbeitet. Sie liegen dabei im wesentlichen als Agglomerate vor. Die Diffusion der Partikel und schon gar der Agglomerate in diesen Formulierungen ist in stationärem Zustand viel zu gering um in ca. 30 Tagen, d.h. der Zeit für die Hautproliferation, eine Strecke von 10-15  $\mu\text{m}$  zurückzulegen. Die Corneozytenlagen, die im oberen Bereich kurz vor dem Abschilfern nur lose verbunden sind (stratum corneum disjunctum) und im tieferliegenden Bereich kompakt sind (stratum corneum compactum) behindern den diffusiven Transport noch zusätzlich. Üblicherweise nimmt man an, dass Moleküle hautgängig sind, die kleiner als 0,5 – 1 kDa sind. Ein 20 nm großes  $\text{TiO}_2$  Partikel hat aber etwa ein MDa. Es ist also schwer denkbar, dass diese Nanopartikel durch diffusiven Transport in vitales Gewebe gelangen können. In vitalem Gewebe gibt es allerdings die Möglichkeit, dass Hautzellen die Partikel internalisieren und transportieren. Als plausibler Transportmechanismus bleibt die mechanische Einbringung der Formulierungen inklusive der Nanopartikel beim Einreiben. Diese Hypothese wird durch folgende Beobachtungen unterstützt (Gontier et al. 2008):

1) Mit HRTEM und PIXE findet man Ti in den obersten 3-5 Corneozytenlagen im stratum corneum disjunctum (siehe Abb. 3); bei partiell gestrippter Haut bis zum stratum corneum compactum beobachtet man keinerlei tiefere Penetration (siehe Abb. 4).

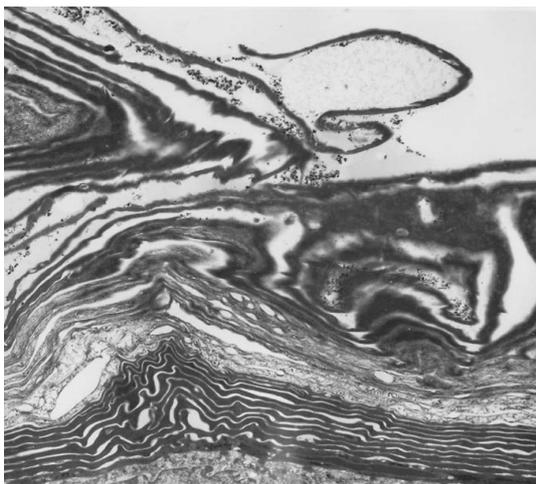


Abb.3: HRTEM-Aufnahme eines Hautquerschnitts mit einer tiefen Hautfalte. Unten befindet sich das stratum corneum compactum, oben das stratum corneum disjunctum.  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel findet man in der Hautfalte sowie im stratum corneum disjunctum (ca.  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ ).

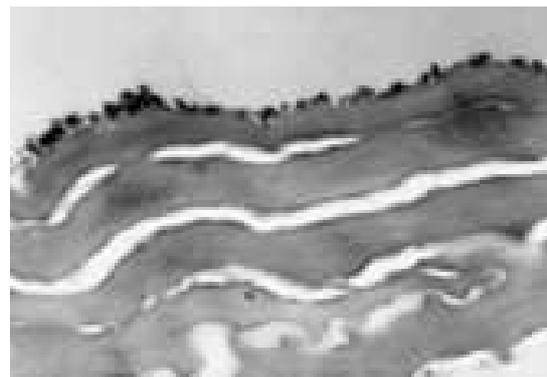


Abb.4: HRTEM-Aufnahme eines Hautquerschnitts mit entferntem stratum corneum disjunctum und anschließender Exposition. Die Dicke der Corneozytenlagen beträgt ca.  $0,5 \mu\text{m}$ . Man findet keine Penetration in tiefere Lagen.

2) Man findet Ti in Haarfollikeln bis zu einer Tiefe von etwa einem halben mm (siehe Abb. 5); es ist völlig undenkbar, dass die Formulierung mit Nanopartikeln in diese Tiefe diffundiert ist. Beim Einreiben wird das Haar aber makroskopisch hin- und herbewegt und nimmt das Material dann in größere Tiefen mit.

3) Die Form der Nanopartikel – eher scheibchenförmig oder lanzettförmig – spielt keine Rolle.

4) Die Expositionszeit hat keinen Einfluss auf die Penetrationstiefe.

5) Überraschenderweise ist die Spreitung der Nanopartikel meist sehr inhomogen, ganz im Gegensatz zu Abb. 4 bei partiell gestrippter Haut. Das bedeutet, dass die nicht geschützten Areale durchaus der UV-Strahlung ausgesetzt sind, auch wenn dies nicht zu einem Sonnenbrand führt.

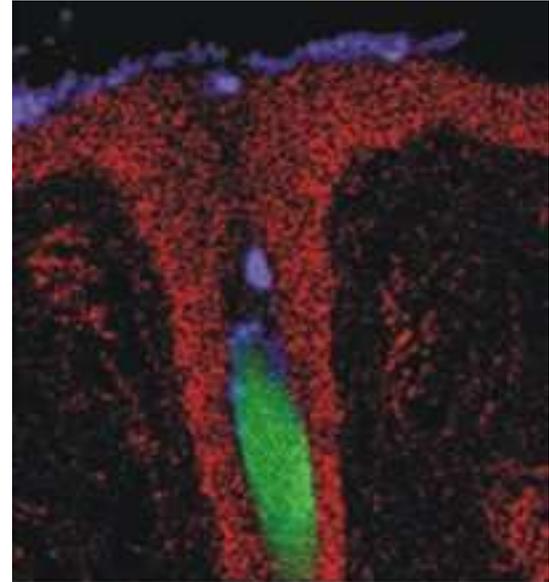


Abb.5: Schnitt durch einen Haarfollikel. PIXE-Falschfarbenbild (380µm x 400 µm).

Blau: Titan

Rot: Phosphor (hohe Konzentration im stratum spinosum)

Grün: Schwefel (hohe Konzentration im Haar, schräg durchschnitten)

Die Schlußfolgerung aus der groß angelegten EU-Studie NANODERM (<http://uni-leipzig.de/~nanoderm>) lautet daher: "We do not expect any health effects for the topical application of sunscreens containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles (especially when coated) on healthy skin which are related to the particulate state; wir erwarten keine Gesundheitseffekte bei der topischen Anwendung von Nanopartikel-haltigen Sonnenschutzmitteln (speziell wenn gecoaed) auf gesunder Haut, die mit dem Partikelstatus zu tun haben." Weitere Arbeiten, die zu derselben Schlußfolgerung kommen, sind Pflücker et al. 1999, 2001 und Cross et al. 2007.

Natürlich gibt es eine Reihe von Publikationen, in denen über Penetration von Nanopartikeln in vitales Gewebe berichtet wird. Die Publikationen, in denen zwar einzelne Partikel, z.B. Quantendots, in vitalem Gewebe gefunden werden, aber keine Penetrationspfade sichtbar sind, sollten aber mit Vorsicht betrachtet werden. Man sieht immer das, was man präpariert hat. Und jede Methode liefert ihre eigenen Resultate. In diesem Zusammenhang ist es äußerst wichtig, dieselbe Fragestellung mit verschiedenen Methoden und Präparationsschritten zu bearbeiten, wie dies in einer vergleichenden Studie mit HRTEM und PIXE/STIM/RBS gezeigt wurde (Gontier et al. 2008). Zwar wurden in dieser Arbeit leichte morphologische Unterschiede zwischen den Bildern der Elektronen- und Ionenmikroskopie festgestellt, die Schlußfolgerungen waren aber dieselben.

Natürlich gibt es noch eine Reihe von offenen Fragen. Zum einen gibt es Hinweise, dass mechanisch gestreckte/gestauchte Haut zu einer besseren Penetration von Partikeln führen kann (Tinkle et al. 2003, Rouse et al. 2007). Beide Arbeiten sind aber nicht gut auf 20 nm TiO<sub>2</sub>-

Nanopartikel übertragbar. Die Arbeit von Tinkle et al. hatte Dextranskugeln verwendet, die deutlich größer als 100 nm waren und wohl eher in die Kategorie „Mikroläsionen“ gehört. Die Arbeit von Rouse et al. hat funktionalisierte Fullere verwendet, d.h. hautgängige Moleküle, die durch die „Fußfessel“ des C60-Moleküls mit einem Durchmesser von knapp 1 nm nicht essentiell behindert wurden. Dennoch lohnt es sich, weitere Untersuchungen mit gestreckter/gestauchter Haut durchzuführen.

Eine weitere offene Frage ist die Hautpenetration bei Haut mit gestörter Barrierenfunktion, z.B. psoriatischer Haut oder atopischer Haut. Es könnte durchaus sein, dass es hier Überraschungen gibt. Eine kürzlich erschienene Arbeit hat sich mit Sonnenbrand-geschädigter Mauhaut befasst (Mortensen et al. 2008). Dort wurden Quantendots verwendet. Man hat Partikel in vitalem Gewebe gefunden, weiß allerdings nicht, wie sie dorthin gelangt sind. Solange man nicht weiß, wie diese Partikel an diesen Ort gelangt sind, ist Skepsis angezeigt.

Schließlich ist auch die Frage nach der Teilchengrößenverteilung und der möglichen besseren Löslichkeit von Nanopartikeln mit Größen unter ca. 2 nm noch offen. Die flammenpyrolytische Herstellung von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln vermeidet sehr wahrscheinlich die Herstellung von Partikeln mit deutlich unter 20 nm Primärteilchengröße, da diese extrem kleinen Teilchen schon in der Flamme mit größeren Teilchen verschmelzen. Wir haben im NANODERM-Projekt in der Tat auch keine Hinweise auf extrem kleine Nanopartikel gefunden, obwohl wir bis ca. 2 nm große Teilchen mit HRTEM hätten sehen können. Demgegenüber sind Verfahren bei tieferen Temperaturen eher anfällig, breitere und bis zu 1 - 2 nm hinab reichende Teilchengrößenverteilung herzustellen. Interessanterweise kann pigmentäres TiO<sub>2</sub>, wie es z.B. in Farben, Zahnpasta, Lippenstift, Kaugummi und Tabletten verwendet wird, durchaus eine Teilchenfraktion im Nanometerbereich enthalten. Die damit verbundenen Fragestellungen führen natürlich etwas weiter weg von der dermalen Penetration und mehr in Richtung Resorption im Magen-Darm-Trakt, über die noch sehr viel weniger bekannt ist.

### Literatur:

- Cross S. E., Innes B., Roberts M. S., Tsuzuki T., Robertson T. A., McCormick P., Skin. Pharm. Physiol. 20(2007)148
- Gontier E., Ynsa M.-D., Bíró T., Hunyadi J., Kiss B., Gáspár K., Pinheiro T., Silva J.-N., Filipe P., Stachura J., Dabros W., Reinert T., Butz T., Moretto Ph., and Surlève-Bazeille J.-E.
- Nanotoxicology 2(4) (2008) 218
- Mortensen L. J., Oberdörster G., Pentland A. P., Delouse L. A., Nano Lett. 8(9)(2008)2779
- Pflücker F., Hohenberg H., Hölzle E., Will T., Pfeiffer S., Wepf R., Diembeck W., Wenck H., Gers-Barlag H., Int. J. Cosmetic Sci. 21(6) (1999) 399
- Pflücker F., Wendel V., Hohenberg H., Gärtner E., Will T., Pfeiffer S., Wepf R., Gers-Barlag H., Skin Pharmacol. & Physiol. 13(suppl.1) (2001)92 2001
- Tinkle S. S., Antonioni J. M., Rich B. A., Roberts J. R., Salmen R., DePree K., and Adkins E. J. , Environ. Health Perspect. 111(9) (2003)1202
- Rouse J. G., Yang J., Ryman-Rasmussen J. P., Barron A. R., Monteiro-Rivière N. A., Nano Lett. 7(1) (2007)155