



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

De kristalvorm van titaniumdioxide nanodeeltjes beïnvloedt de maturatie van dendritische cellen

RIVM rapport 090016001/2013

R. J. Vandebriel et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

De kristalvorm van titaniumdioxide nanodeeltjes beïnvloedt de maturatie van dendritische cellen

RIVM Rapport 090016001/2013

Colofon

ISBN:

© RIVM 2013

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

R.J. Vandebriel, J.P. Vermeulen, L.B. van Engelen, B. de Jong, D.L.A.C. Leseman
(RIVM)

L.M. Verhagen, M.E. Hoonakker (IntraVacc)

H. van Loveren (RIVM)

Contact:

Rob Vandebriel

GZB

rob.vandebriel@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit, in het kader van Nanomaterialen in non-foodproducten

Rapport in het kort

De kristalvorm van titaniumdioxide nanodeeltjes beïnvloedt het effect op het immuunsysteem

Het gebruik van gefabriceerde nanodeeltjes is wijdverbreid en neemt nog steeds toe. Om deze reden is er behoefte om te weten welk effect ze hebben op de gezondheid van de mens. In dat verband heeft het RIVM onderzocht wat risico's van blootstelling aan synthetische nanodeeltjes zijn, bijvoorbeeld bij het gebruik van haarspray of zonnebrand in sprayvorm. Hieruit blijkt dat een bepaalde kristalvorm van titaniumdioxide-nanodeeltjes effect hebben op het immuunsysteem. Zij beïnvloeden namelijk het rijpingsproces van de zogeheten dendritische cellen. Deze dendritische cellen vormen een belangrijk onderdeel van het immuunsysteem. De hoeveelheid cellen die rijpen is een maat voor reacties van het immuunsysteem: hoe meer cellen rijpen, hoe actiever het immuunsysteem reageert op ziekteverwekkers en dergelijke.

Titaniumdioxide nanodeeltjes bestaan in twee kristalvormen: anatase en rutiel. Het blijkt dat de anatase-vorm een groter percentage dendritische cellen laat rijpen dan de rutiele vorm. In zonnebrandcrèmes worden titaniumdioxide deeltjes in beide kristalvormen gebruikt. Het lijkt erop dat de deeltjes met de rutiele vorm om deze reden de voorkeur hebben. Meer onderzoek is nodig om hier een definitieve uitspraak over te doen.

Van dieselroetdeeltjes, fijn stof en titaniumdioxide is bekend dat zij een allergische reactie veroorzaken. Bovendien krijgen steeds meer mensen zo'n reactie en neemt de ernst daarvan toe.

De hier gevonden resultaten ondersteunen de invloed van nanodeeltjes op het immuunsysteem en de noodzaak hier aandacht aan te schenken. De resultaten kunnen worden gebruikt voor onderzoek naar de effecten van nanodeeltjes als ze worden geïnhaleerd.

Abstract

The crystal form of titanium dioxide nanoparticles influences the effect on the immune system

The use of manufactured nanoparticles is widespread and still increasing. For this reason, there is a need to know what effect they have on human health. In that respect, the RIVM investigated the risks of exposure to engineered nanoparticles, for example when using hair spray or sunscreen in spray form. This study shows that a specific crystal form of titanium dioxide nanoparticles has an effect on the immune system. They affect the maturation process of the so-called dendritic cells. These dendritic cells are an important part of the immune system. The percentage of cells maturing is a measure of the response of the immune system: the more cells mature, the more active the immune response to pathogens, and the like.

Titanium dioxide nanoparticles exist in two crystal forms: anatase and rutile. It turns out that the anatase form induces a greater percentage of dendritic cells to mature than the rutile form. In sunscreens titanium dioxide particles are used in both crystal forms. For this reason it seems likely that particles of the rutile form are preferred. More research is needed to make a final statement.

Diesel soot, particulate matter and titanium dioxide are known to cause an allergic reaction. In addition, more and more people acquire such a response and its severity is increasing. The results obtained support the influence of nanoparticles on the immune system and the need to pay attention to these effects. The results can be used for research into the effects of inhaled nanoparticles.

Inhoud

Samenvatting	6
1	Inleiding 8
1.1	Achtergrond van de studie 8
1.2	Dendritische cellen 8
1.3	Effect van dieselroetdeeltjes op DC <i>in vitro</i> en <i>in vivo</i> 8
1.4	Oxidatieve stress en adjuvans-effecten van TiO ₂ -nanodeeltjes en de invloed van de kristalvorm 9
1.5	Doel van de studie 9
2	Materialen en methoden 11
3	Resultaten 13
3.1	Grootte van de nanodeeltjes in dispersie 13
3.2	Viabiliteit van de DC na blootstelling 13
3.3	Effect van blootstelling aan TiO ₂ -nanodeeltjes op DC-maturatie 13
3.4	Effect van blootstelling aan TiO ₂ -nanodeeltjes op cytokineproductie 15
4	Discussie en conclusies 18
5	Referenties 20
6	Figuren 22

Samenvatting

Het gebruik van synthetische nanodeeltjes is wijdverbreid en neemt nog steeds toe. Om deze reden bestaat er grote behoefte om hun effect op de gezondheid van de mens vast te stellen. Omdat regelmatig nieuwe nanodeeltjes op de markt komen, is er behoefte aan meetmethoden die relatief snel een resultaat geven. Een invitroscreeningsassay is hiervoor geschikt.

De huidige kennisvraag richt zich op risico's van inhalatieblootstelling. Van dieselroetdeeltjes, fijn stof en TiO₂-nanodeeltjes is bekend dat zij na inhalatie een allergische respons kunnen versterken (adjuveren). Dendritische cellen (DC) vormen een belangrijk onderdeel van het immuunsysteem in de long. Maturatie van DC is een essentiële stap in de adaptieve immunorespons. Het speelt een belangrijke rol bij het versterken van een allergische respons na inhalatie van dieselroetdeeltjes en waarschijnlijk ook van nanodeeltjes. DC-maturatie is daarmee een belangrijke parameter voor versterking van de allergische respons *in vivo* en de basis voor de hier gebruikte *in vitro* screeningsassay.

Het doel van deze studie is het vaststellen van het effect van een reeks TiO₂-nanodeeltjes op DC-maturatie *in vitro*. Mononucleaire cellen werden geïsoleerd uit buffy coats afkomstig van humane bloeddonoren. Immature DC werden gekweekt uit monocytën en blootgesteld aan een concentratiereeks van veertien typen TiO₂-nanodeeltjes gedurende 48 uur. Deeltjesgrootte, viabiliteit van de cellen, expressie van de maturatiemarkers CD83 en CD86 en productie van IL-12p40 en TNF- α werden gemeten.

Alle TiO₂-nanodeeltjes bleken te zijn geaggregeerd tot een grootte van gemiddeld 180 nm (160-210 nm). De vier anatase nanodeeltjes en het anatase/rutiel nanodeeltje induceerden een statistisch significant hogere expressie van CD83 ($P = 6,69 \times 10^{-6}$) en CD86 ($P = 0,00081$) en een statistisch significant grotere productie van IL-12p40 ($P = 0,0025$) en TNF- α ($P = 0,016$), dan de negen rutiele nanodeeltjes. In deze reeks waren rutiele nanodeeltjes met coating of met een ongeveer tien maal grotere primaire diameter opgenomen; dit gaf geen verschil in effect ten opzichte van ongecoate rutiele deeltjes. Van welke fabrikant de deeltjes afkomstig waren, had geen invloed.

De conclusie van deze studie is dat anatase TiO₂-nanodeeltjes DC-maturatie *in vitro* stimuleren. Eerdere proefdierstudies hebben een adjuverend effect van TiO₂-nanodeeltjes laten zien, maar in die studies zijn de verschillende kristalstructuren niet vergeleken en evenmin zijn de *in vivo* resultaten vergeleken met invitrostudies. Op basis van de hier beschreven resultaten is een proefdierstudie ingezet waarin twee deeltjes met verschillende kristalstructuur maar verder gelijke grootte, coating en herkomst worden vergeleken. Hierin worden muizen, die allergisch zijn voor het modelwit ovalbumine, blootgesteld aan deze twee deeltjes. Naar verwachting geeft deze proefdierstudie additionele informatie over de effecten van deze deeltjes voor de mens, en inzicht in hoeverre de hier gebruikte invitrotest voorspellend is voor de invivosituatie. De resultaten van deze dierstudie zijn binnenkort beschikbaar.

In zonnebrandcrèmes worden anatase, anatase/rutiele en rutiele deeltjes gebruikt; de rutiele deeltjes lijken immunologisch minder actief en hebben om deze reden de voorkeur. Voor een definitieve keuze van de deeltjes voor toepassing in zonnebrandcrèmes zullen ook resultaten uit toekomstige invivostudies en mogelijk additionele deeltjeskarakteristieken moeten worden meegewogen.

De hier gevonden resultaten ondersteunen de invloed van nanodeeltjes op het immuunsysteem en de noodzaak hier aandacht aan te schenken.

De hier gebruikte invitroscreeningsassay bleek succesvol om het verschil in immunologische activiteit tussen kristalvormen van TiO₂-nanodeeltjes op te sporen. Dit verschil is ook in andere invitrostudies aangetoond. Onderzoek naar de meer algemene bruikbaarheid van deze assay vindt momenteel plaats in het NanoNext.NL-project.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond van de studie

Het gebruik van synthetische nanodeeltjes is wijdverbreid en neemt nog steeds toe. Deze nanodeeltjes worden gevonden in allerlei producten, ook in consumentenproducten zoals zonnebrandcrèmes, lotions, deodorant en andere cosmetica. Vanwege dit algemene gebruik bestaat er grote behoefte om hun effect op de gezondheid van de mens vast te stellen. Omdat regelmatig nieuwe nanodeeltjes op de markt komen, wil men dit effect op een relatief snelle manier kunnen meten. Een invitroscreeningsassay (of een panel van assays) is hiervoor geschikt.

In zonnebrandcrèmes worden anatase en rutiele deeltjes gebruikt (Lewicka et al., 2011). Aluminium (Al_2O_3) en silica (SiO_2) worden gebruikt als coating om de fotochemische activiteit van TiO_2 zo gering mogelijk te maken.

1.2 Dendritische cellen

Dendritische cellen (DC) zijn essentieel voor de inductie van de adaptieve immuunrespons, omdat ze naïeve T-cellen activeren. Bovendien sturen ze de adaptieve immuunrespons door integratie van verschillende stimuli, zoals van verschillende pathogene geassocieerde moleculaire patronen en het cytokine milieu (Banchereau & Steinman, 1998). De respons van DC speelt een belangrijke rol in het totaal van de immuunrespons; afgenomen DC-activiteit kan leiden tot immuunsuppressie *in vivo* en toegenomen DC-activiteit kan leiden tot adjuvering *in vivo*. Pulmonaire DC vormen een dicht netwerk in de longen; ze reguleren de inductie van pulmonaire immuniteit of tolerantie (Lambrecht & Hammad, 2010).

Maturatie van DC is het proces waarin ze zich van immature DC, die heel goed antigenen opnemen, ontwikkelen tot mature DC, die heel goed de primaire respons op gang brengen door het 'tonen' van het antigeen aan naïeve T-cellen. Het effect van blootstelling van DC aan diverse agentia wordt gemeten als effect op maturatie. Dit wordt vastgesteld door het meten van veranderingen in oppervlaktemarkers en/of cytokineproductie. CD83 (Zhou & Tedder, 1995) en CD86 (McLellan et al., 1995) zijn markers voor DC-maturatie. Verhoogde expressie van deze markers als gevolg van blootstelling aan anatase en anatase/rutiele TiO_2 suggereert DC-maturatie.

Glutathion (GSH) is een essentiële antioxidant die beschermt tegen oxidatieve stress. GSH in de cel daalt als gevolg van blootstelling aan oxidanten (Rahman & MacNee, 2000). Het GSH-niveau in antigeen presenterende cellen (zoals DC) beïnvloedt de Th1- versus Th2-respons; verlaging van het GSH-niveau leidt tot een verlaagde Th1-respons (Peterson et al., 1998).

1.3 Effect van dieselroetdeeltjes op DC *in vitro* en *in vivo*

Er is nog weinig bekend over het effect van nanodeeltjes op DC. Voor andere typen deeltjes, zoals dieselroetdeeltjes, is meer bekend over dit effect. Ook in het geval van dieselroetdeeltjes vindt blootstelling plaats via inhalatie en functioneren de deeltjes als adjuvans voor allergische sensibilisatie. Om deze redenen wordt het effect van dieselroetdeeltjes op DC hier besproken.

Porter et al. (2007) vonden dat dieselroetdeeltjes de expressie van CD40, CD80, CD83, CD86 en MHC II op DC stimuleerden; daarnaast werd de productie door DC van IL-6, IL-12, IL-18 en TNF- α verhoogd. In co-cultures van DC met T-cellen werd een verhoogde IL-13-productie en een verlaagde IFN- γ -productie,

door T-cellen gevonden. Dit profiel is kenmerkend voor een Th2 ('allergische') respons. Vergelijkbare resultaten werden gevonden na blootstelling aan fijn stof (Williams et al., 2007).

Naast een direct effect van dieselroetdeeltjes op DC bestaat er ook een indirect effect: dieselroetdeeltjes stimuleren longepitheelcellen om cytokines te produceren die DC beïnvloeden. Dieselroetdeeltjes werden door middel van endocytose opgenomen door luchtwegepitheelcellen en dit leidde tot de productie van IL-1 β , IL-8 en GM-CSF (Boland et al., 1999). De GM-CSF-productie werd in detail onderzocht; deze bleek afhankelijk van fagocytose en vorming van 'reactive oxygen species' (ROS) (Boland et al., 2000).

Dieselroetdeeltjes induceerden GM-CSF-productie door humane bronchiale epitheelcellen; GM-CSF induceerde maturatie van DC (Bleck et al., 2006). Voor TSLP werd een vergelijkbaar effect gevonden; dieselroetdeeltjes induceerden TSLP-productie door humane bronchiale epitheelcellen en productie van dit cytokine was afhankelijk van ROS. DC werden door TSLP gepolariseerd in de richting van Th2-inductie (Bleck et al., 2008; 2010).

Blootstelling van muizen aan dieselroetdeeltjes door middel van instillatie gaf een dosisafhankelijke toename te zien van het aantal neutrofielen, monocyten en DC in de bronchoalveolaire lavage (Provoost et al., 2010). Expressie van de maturatiemarker CD86 nam dosisafhankelijk toe. Dieselroetdeeltjes migreerden intracellulair (in DC) naar de T-celzone van de mediastinale lymfeklieren (MLN). De productie van de Th2 ('allergische') cytokines IL-4, IL-5 en IL-13 was verhoogd in de MLN van muizen die waren blootgesteld aan dieselroetdeeltjes. Deze studie toont de essentiële rol van DC in de translocatie van dieselroetdeeltjes van de long naar de drainerende lymfeklieren en de inductie aldaar van een allergische reactie. Dit onderschrijft het gebruik van DC als invitroteststelsel.

1.4 Oxidatieve stress en adjuvans effecten van TiO₂-nanodeeltjes en de invloed van de kristalvorm

In vivo studies laten inductie van oxidatieve stress door blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes zien: inhalatieblootstelling van muizen aan anatase TiO₂ gedurende 15-75 dagen induceerde expressie van Nrf2, hemo-oxygenase-1 en glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (Sun et al., 2012).

Anatase (4 en 10 nm) TiO₂ induceerde lipideperoxidatie, terwijl rutiele (25 en 60 nm) TiO₂ dit niet deed (Xue et al., 2010). Anatase, maar niet rutiele TiO₂ induceerde apoptose na 24 uur blootstelling onder UV-A-bestraling (Xue et al., 2010). UV-A-bestraling van <25 nm anatase, maar niet <100 nm rutiele TiO₂ induceerde de vorming van hydroxylradicalen en singlet zuurstof (¹O₂) (Yin et al., 2012). Lipideperoxidatie en vorming van eiwitradicalen was hoger na blootstelling onder UV-A-bestraling aan anatase dan aan rutiele TiO₂ (Yin et al., 2012). Samenvattend betekent dit dat, vooral onder UV-A straling, anatase TiO₂ duidelijk meer oxidatieve stress induceert dan rutiele TiO₂. In hoeverre de grootte van de deeltjes een effect heeft (de anatase deeltjes waren steeds kleiner dan de rutiele deeltjes) kan niet uit deze studies worden opgemaakt. Aangevoerd is dat het adjuvans-effect *in vivo* van ultrafijne deeltjes wordt bepaald door hun oxidatieve capaciteit (Li et al., 2009). Dit suggereert dat anatase nanodeeltjes een sterkere adjuvans-activiteit hebben dan rutiele deeltjes.

1.5 Doel van de studie

Doel van de voorliggende studie was het vaststellen van het effect van blootstelling aan een reeks van veertien TiO₂-nanodeeltjes op de maturatie van

humane DC. De nanodeeltjes hadden een verschillende kristalvorm, grootte en coating en waren afkomstig van drie verschillende fabrikanten.

2 Materialen en methoden

Veertien verschillende TiO₂-nanodeeltjes zijn getest (Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Union; Skyspring Nanomaterials Inc., Houston, TX; Ionic Liquids Technologies GmbH, Heilbronn, D). Alle gegevens zijn afkomstig van de fabrikanten. Zie Tabel 1.

Tabel 1. Overzicht van de geteste TiO₂ nanodeeltjes

kristalvorm	grootte (nm)	SSA* (m ² /g)	zuiverheid (%)	coating	fabrikant	bestelnr
anatase	20	90	n.a.	geen	JRC	NM102
rutiel	20	60	n.a.	hydrofoob	JRC	NM103
rutiel	20	60	n.a.	hydrofiel	JRC	NM104
anatase	10-25	50-150	99.5	geen	Skyspring	7910DL
anat./rut.	10-30	50-100	99.5	geen	Skyspring	7918DL
rutiel	10-30	≈50	99.5	geen	Skyspring	7920DL
rutiel	20-40	>40	99	Al ₂ O ₃	Skyspring	7923DL
rutiel	20-40	>40	99	SiO ₂	Skyspring	7925DL
anatase	20	>120	99.5	geen	Io-Li-Tec	NO-0038-HP
rutiel	10-30	≈50	99.5	geen	Io-Li-Tec	NO-0046-HP
rutiel	200	8	99.5	geen	Io-Li-Tec	NO-0051-HP
anatase	10-25	50-150	99.5	geen	Io-Li-Tec	NO-0058-HP
rutiel	20-40	40	99	sil. olie	Io-Li-Tec	NO-0065-HP
rutiel	20-40	>40	99	SiO ₂	Io-Li-Tec	NO-0066-HP

*Specific Surface Area

De deeltjesgrootte werd bepaald met een Nanosight™ op basis van de brownse beweging van de nanodeeltjes (Nanosight Tracking Analysis). Ter bevochtiging van de nanodeeltjes (het poeder) werd er een druppeltje absolute ethanol op gebracht; vervolgens werd dit opgenomen in dispersievloeistof (H₂O + 0,05% BSA) tot een concentratie van 2,56 mg/ml. Deze oplossingen werden met 10 procent van de maximale energie gesonificeerd gedurende zestien minuten. Elke oplossing werd vijf maal gemeten, gefilterd door een filter van 0.45 µm en opnieuw vijf maal gemeten. De grootte is uitgedrukt als mediaan (grootte, passend bij de piek in de grootteverdeling) en als gemiddelde, beide ± SD over de vijf metingen.

Immature DC werden gekweekt uit mononucleaire cellen geïsoleerd uit 'buffy coats'. De buffy coats waren afkomstig van Sanquin (Amsterdam).

De DC werden 48 uur blootgesteld aan een concentratiereeks van de TiO₂-nanodeeltjes (0-128 µg/ml). Hierna is gemeten:

- vitaliteit van de cellen, met de WST-1-bepaling
- naast kleuring op vitaliteit ('live-dead'-kleuring) de expressie van oppervlaktemarkers CD14, CD40, CD80, CD83, CD86 en HLA-DR. De cellen werden tweemaal gewassen met PBS en twee maal met FACS-buffer (PBS pH 7,2, 0,5% BSA, 0,5mM EDTA). Aan 100 µl van deze cellen werd 100 µl van kleuring 1 of kleuring 2 toegevoegd (zie schema). Na incubatie bij 4°C gedurende dertig minuten werden de cellen afgedraaid, opgenomen in FACS-buffer en gemeten op de FACS Canto (Becton Dickinson).

Kleuring 1		
Marker	Label	Verdunning
CD80	FITC	1:40
CD14	PE	1:25
HLA-DR	Pacific Blue	1:1600
Live-dead	Aqua	1:200

Kleuring 2		
Marker	Label	Verdunning
CD83	FITC	1:40
CD40	PE	1:20
CD86	Pacific Blue	1:800
Live-dead	Aqua	1:200

- productie van IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70 en TNF- α . IL-12p40 werd gemeten met een ELISA (BD Biosciences), de andere cytokines met een Luminex (BioRad).

Elk type nanodeeltje werd minstens drie maal getest; een representatief resultaat wordt weergegeven.

Om de significantie van het verschil in inductie van CD83, CD86, IL-12p40 en TNF- α tussen de groepen deeltjes na te gaan werd een multigroep ANOVA toegepast voor respectievelijk kristalvorm, coating en fabrikant. Daarnaast werd de nauwkeurigheid van classificatie tot de kristalvorm uitgevoerd met Support Vector Machines.

3 Resultaten

3.1 Grootte van de nanodeeltjes in dispersie

In Tabel 2 is van de veertien geteste nanodeeltjes de grootte in 0,05% BSA weergegeven. De meetresultaten voor en na filtratie zijn vergeleken; weergegeven zijn de gemeten grootten van de gefilterde deeltjes, met uitzondering van de drie deeltjes van JRC en de Io-Li-Tec 20-40 nm rutiele nanodeeltjes met siliconenoliecoating.

De gemiddelde grootte van de verschillende deeltjes lag tussen 157 en 212 nm. Dit betekent dat, met uitzondering van het rutiele deeltje van 200 nm, in suspensie alle deeltjes waren geaggregeerd. Het rutiele deeltje van 200 nm was gemiddeld het grootste, maar deze grootte in suspensie week niet significant af van de andere deeltjes. De mediane grootte (hoogste punt in de piek van de grootteverdeling) in suspensie van de verschillende deeltjes lag tussen 84 en 175 nm en vertoonde meer variatie tussen de verschillende deeltjes dan de gemiddelde grootte.

Tabel 2. Grootte van de nanodeeltjes in dispersie

kristalvorm	grootte (nm)	coating	fabrikant	mediaan \pm SD	gemiddelde \pm SD
anatase	20	geen	JRC	86,6 \pm 30,8	182,6 \pm 21,1
rutiel	20	hydrofoob	JRC	102,0 \pm 49,2	157,4 \pm 8,9
rutiel	20	hydrofiel	JRC	147,4 \pm 14,5	162,4 \pm 5,8
anatase	10-25	geen	Skyspring	175,4 \pm 29,7	186,4 \pm 14,2
anat./rut.	10-30	geen	Skyspring	129,4 \pm 38,9	169,6 \pm 7,9
rutiel	10-30	geen	Skyspring	139,8 \pm 47,3	169,6 \pm 25,7
rutiel	20-40	SiO ₂	Skyspring	84,2 \pm 17,8	177,2 \pm 40,9
rutiel	20-40	Al ₂ O ₃	Skyspring	128,8 \pm 57,2	194,0 \pm 15,9
anatase	20	geen	Io-Li-Tec	144,6 \pm 42,0	208,6 \pm 22,0
rutiel	10-30	geen	Io-Li-Tec	139,2 \pm 10,6	170,6 \pm 13,2
rutiel	200	geen	Io-Li-Tec	140,2 \pm 61,5	212,4 \pm 22,1
anatase	10-25	geen	Io-Li-Tec	121,2 \pm 35,5	157,4 \pm 28,3
rutiel	20-40	sil. olie	Io-Li-Tec	153,0 \pm 2,8	161,6 \pm 9,5
rutiel	20-40	SiO ₂	Io-Li-Tec	157,0 \pm 5,7	175,8 \pm 19,0

3.2 Viabiliteit van de DC na blootstelling

In Figuur 1 is de viabiliteit van de DC na blootstelling aan de veertien nanodeeltjes weergegeven. Een viabiliteit < 80% wordt veelal als grens gekozen voor cytotoxiciteit. Voor geen van de veertien nanodeeltjes werd cytotoxiciteit gevonden in het geteste concentratiegebied (0-128 μ g/ml).

3.3 Effect van blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes op DC-maturatie

Maturatie van DC leidt tot verhoging van de expressie van oppervlaktemarkers, zoals CD40, CD80, CD83, CD86 en HLA-DR (Banchereau & Steinman, 1998). Om na te gaan of blootstelling aan de verschillende deeltjes leidde tot DC-maturatie werd het effect op de expressie van bovengenoemde markers gemeten met flowcytometrie. Een effect op DC-maturatie geeft een effect op de antigeenspecifieke immuunrespons aan en daarmee op het functionerend immuunsysteem. Daarnaast werd de expressie van CD14 gemeten; deze marker komt voor op monocytten, maar niet op DC. Expressie van CD14 moet dus

verdwijnen tijdens de kweek van DC uit monocyten; dit bleek steeds het geval te zijn.

Er bleek een dosisafhankelijk effect op de 'mean fluorescence index' (MFI) van CD83 (Figuur 2) en CD86 (Figuur 3). Er bleek geen effect van blootstelling op de MFI van CD40, CD80 en HLA-DR. Om de vergelijking tussen de deeltjes te maken werd de MFI van CD83 bij de hoogste TiO₂ concentratie (128 µg/ml) gedeeld door die bij de laagste TiO₂ concentratie (2 µg/ml) en werden de deeltjes geordend volgens deze ratio's (Tabel 3). Het delen door de laagste TiO₂ concentratie en niet door de blanco controle gaf een consistentere resultaat. Uit de resultaten blijkt dat anatase en anatase/rutiele deeltjes een hogere CD83-MFI induceren dan rutiele deeltjes. Multigroep ANOVA geeft aan dat dit verschil significant is ($P = 6,69 \times 10^{-6}$). Er is geen sprake van een drempel tussen deze kristalvormen.

Tabel 3. Effect van blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes op de CD83 expressie

Kristalvorm	grootte (nm)	coating	fabrikant	CD83 (inductie)
anat./rut.	10-30	geen	Skyspring	3,6
anatase	10-25	geen	Io-Li-Tec	2,5
anatase	20	geen	JRC	2,5
anatase	20	geen	Io-Li-Tec	2,4
anatase	10-25	geen	Skyspring	2,4
rutiel	20-40	SiO ₂	Skyspring	2,0
rutiel	200	geen	Io-Li-Tec	1,3
rutiel	20-40	Al ₂ O ₃	Skyspring	1,3
rutiel	20	hydrofoob	JRC	1,2
rutiel	10-30	geen	Skyspring	1,2
rutiel	20-40	SiO ₂	Io-Li-Tec	0,92
rutiel	20	hydrofiel	JRC	0,89
rutiel	20-40	sil. olie	Io-Li-Tec	0,88
rutiel	10-30	geen	Io-Li-Tec	0,75

Ook voor CD86 werden deze ratio's bepaald en werden de deeltjes geordend volgens deze ratio's (Tabel 4). Met uitzondering van het met SiO₂ gecoate rutiele deeltje van Skyspring, induceerden anatase en anatase/rutiele deeltjes een hogere CD86 MFI dan rutiele deeltjes. Multigroep ANOVA geeft aan dat dit verschil significant is ($P = 0,00081$). Er is geen sprake van een drempel tussen deze kristalvormen. Het verschil in ratio tussen de verschillende deeltjes was voor CD83 ruim twee maal hoger dan voor CD86 (4,7 versus 2,2).

Tabel 4. Effect van blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes op de CD86 expressie

Kristalvorm	grootte (nm)	coating	fabrikant	CD86 (inductie)
anatase	20	geen	JRC	2,4
anat./rut.	10-30	geen	Skyspring	2,4
anatase	10-25	geen	Skyspring	2,1
anatase	10-25	geen	Io-Li-Tec	2,0
rutiel	20-40	SiO ₂	Skyspring	2,0
anatase	20	geen	Io-Li-Tec	2,0
rutiel	200	geen	Io-Li-Tec	1,6
rutiel	20	hydrofoob	JRC	1,5
rutiel	10-30	geen	Skyspring	1,4
rutiel	20-40	Al ₂ O ₃	Skyspring	1,4
rutiel	10-30	geen	Io-Li-Tec	1,3
rutiel	20	hydrofiel	JRC	1,2
rutiel	20-40	sil. olie	Io-Li-Tec	1,2
rutiel	20-40	SiO ₂	Io-Li-Tec	1,1

3.4 Effect van blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes op cytokineproductie

In Figuur 4 is de IL-12p40-productie door DC na blootstelling aan de veertien TiO₂-nanodeeltjes weergegeven. De IL-12p40-concentratie in de controles was afhankelijk van de bloeddonor en/of kweek van de DC. Voor donor 1 was de IL-12p40-concentratie door onbehandelde DC 750-780 pg/ml, voor donor 2 680-840 pg/ml en voor donor 3 240-390 pg/ml.

Een dosisafhankelijke toename van de IL-12p40-productie werd gevonden voor JRC 20 nm anatase, Skyspring 10-25 nm anatase, Io-Li-Tec 20 nm anatase, Io-Li-Tec 10-25 nm anatase en Skyspring 10-30 nm anatase/rutiel. De rutiele deeltjes van Skyspring en het rutiele Io-Li-Tec-deeltje van 200 nm lieten een geringe dosisafhankelijke toename van de cytokineproductie zien, terwijl de rutiele JRC-deeltjes en de overige rutiele Io-Li-Tec-deeltjes een dosisafhankelijke afname lieten zien.

De IL-12p40-productie bij de hoogste TiO₂-concentratie werd gedeeld door die bij de laagste concentratie en de deeltjes zijn geordend volgens deze ratio's (Tabel 5). Uit de resultaten blijkt dat alle anatase nanodeeltjes (inclusief het anatase/rutiele nanodeeltje) een sterkere inductie van IL-12p40 te zien gaven dan de rutiele nanodeeltjes. Multigroep ANOVA geeft aan dat dit verschil significant is (P = 0,0025). Er is geen sprake van een drempel tussen deze kristalvormen.

Tabel 5. Effect van blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes op de IL-12p40-productie

Kristalvorm	grootte (nm)	coating	fabrikant	IL-12p40 inductie
anatase	20	geen	JRC	4,2
anatase	10-25	geen	Io-Li-Tec	3,3
anat./rut.	10-30	geen	Skyspring	2,5
anatase	20	geen	Io-Li-Tec	2,0
anatase	10-25	geen	Skyspring	1,8
rutiel	200	geen	Io-Li-Tec	1,6
rutiel	20-40	SiO ₂	Skyspring	1,5
rutiel	10-30	geen	Skyspring	1,3
rutiel	20-40	Al ₂ O ₃	Skyspring	1,2
rutiel	20	hydrofoob	JRC	0,6
rutiel	10-30	geen	Io-Li-Tec	0,6
rutiel	20-40	sil. olie	Io-Li-Tec	0,5
rutiel	20-40	SiO ₂	Io-Li-Tec	0,5
rutiel	20	hydrofiel	JRC	0,2

Naast IL-12p40 werd ook de inductie van de cytokines IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 en TNF- α bepaald. De productie van IL-10 en IL-12p70 bleek lager dan de detectiegrens, terwijl de IL-8-productie geen dosis-responsrelatie te zien gaf. IL-6 en TNF- α gaven wel een dosis-responsrelatie te zien en voor deze cytokines werden de deeltjes op volgorde gezet zoals boven aangegeven voor IL-12p40.

Voor donor 1 was de TNF- α productie door onbehandelde DC 34-50 pg/ml, voor donor 2 640-1100 pg/ml en voor donor 3 8-52 pg/ml. De conclusie is dat de variatie tussen de donoren veel groter is dan voor IL-12p40. De TNF- α -productie bij de hoogste TiO₂-concentratie werd gedeeld door die bij de laagste concentratie en de deeltjes werden geordend volgens deze ratio's (Tabel 6). De sterkte van TNF- α -inductie door blootstelling aan de nanodeeltjes was veel groter (tot een factor 30) dan die van IL-12p40 (factor 4,2).

Uit de resultaten bleek dat het rutiele deeltje van 200 nm een vergelijkbare TNF- α -inductie te zien gaf als het anatase deeltje van 10-25 nm van Skyspring. De overige anatase nanodeeltjes (inclusief het anatase/rutiele nanodeeltje) gaven een sterkere TNF- α inductie te zien dan de rutiele nanodeeltjes. Multigroep ANOVA geeft aan dat dit verschil significant is (P = 0,016). Er is geen sprake van een drempel tussen deze kristalvormen.

Tabel 6. Effect van blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes op de TNF- α productie

Kristalvorm	grootte (nm)	coating	fabrikant	TNF- α (inductie)
anatase	10-25	geen	Io-Li-Tec	30,4
anatase	20	geen	Io-Li-Tec	11,4
anatase	20	geen	JRC	11,2
anat./rut.	10-30	geen	Skyspring	8,0
rutiël	200	geen	Io-Li-Tec	5,3
anatase	10-25	geen	Skyspring	5,3
rutiël	20-40	sil. olie	Io-Li-Tec	3,3
rutiël	20-40	Al ₂ O ₃	Skyspring	2,7
rutiël	20	hydrofoob	JRC	2,4
rutiël	10-30	geen	Skyspring	2,2
rutiël	20-40	SiO ₂	Skyspring	1,7
rutiël	10-30	geen	Io-Li-Tec	1,3
rutiël	20	hydrofiel	JRC	0,9
rutiël	20-40	SiO ₂	Io-Li-Tec	0,3

Voor donor 1 was de IL-6-productie door onbehandelde DC 1010-1120 pg/ml, voor donor 2 2900-3900 pg/ml en voor donor 3 560-820 pg/ml. De IL-6-productie bij de hoogste TiO₂-concentratie werd gedeeld door die bij de laagste concentratie en de deeltjes werden geordend volgens deze ratio's (Tabel 7).

Tabel 7. Effect van blootstelling aan TiO₂-nanodeeltjes op de IL-6-productie

Kristalvorm	grootte (nm)	coating	fabrikant	IL-6 inductie
rutiël	200	geen	Io-Li-Tec	2,32
anatase	20	geen	Io-Li-Tec	2,20
anatase	20	geen	JRC	1,46
rutiël	10-30	geen	Skyspring	1,42
rutiël	20-40	sil. olie	Io-Li-Tec	1,38
rutiël	10-30	geen	Io-Li-Tec	1,36
rutiël	20-40	Al ₂ O ₃	Skyspring	1,16
rutiël	20-40	SiO ₂	Io-Li-Tec	1,15
anat./rut.	10-30	geen	Skyspring	1,07
rutiël	20-40	SiO ₂	Skyspring	0,95
anatase	10-25	geen	Io-Li-Tec	0,91
anatase	10-25	geen	Skyspring	0,85
rutiël	20	hydrofoob	JRC	0,59
rutiël	20	hydrofiel	JRC	0,39

Uit de resultaten bleek geen consequent effect van kristalvorm, coating of fabrikant op de IL-6-inductie; het rutiele deeltje van 200 nm gaf een grotere inductie dan de kleinere rutiele deeltjes.

Opvallend is dat het rutiele deeltje van 200 nm de hoogste IL-12p40- en TNF- α -inductie te zien gaf van alle rutiele deeltjes en voor IL-6 zelfs de hoogste inductie van alle deeltjes. Dit kan betekenen dat het rutiele deeltje van 200 nm immunologisch actiever is dan kleinere rutiele nanodeeltjes.

De nauwkeurigheid van classificatie tot de kristalvorm is 93%, met slechts één van de veertien deeltjes verkeerd voorspeld. Classificatie op basis van coating of fabrikant bleek niet tot een resultaat te leiden dat beter was dan een random voorspelling.

4 Discussie en conclusies

De in deze studie gebruikte invitroscreeningsassay bleek succesvol om het verschil in immunologische activiteit tussen kristalvormen van TiO₂-nanodeeltjes op te sporen. Onderzoek naar de algemenere bruikbaarheid van deze assay vindt momenteel plaats in het NanoNext.NL-project.

Anatase en anatase/rutiele TiO₂-nanodeeltjes lieten een statistisch significant sterkere inductie van de expressie van CD83 en CD86 zien dan rutiele deeltjes. Dit suggereert dat DC-maturatie in sterkere mate wordt geïnduceerd door anatase en anatase/rutiele deeltjes dan door rutiele deeltjes. Een immuunstimulerend effect van een component in cosmetica is ongewenst. Om deze reden hebben rutiele deeltjes de voorkeur. Voor een definitieve keuze van de deeltjes voor toepassing in zonnebrandcrèmes zullen ook resultaten uit toekomstige invivostudies en mogelijk additionele deeltjeskarakteristieken moeten worden meegewogen.

Er werd geen effect gevonden van de grootte van het primaire deeltje, coating en fabrikant. De primaire grootte van de nanodeeltjes bedraagt 10-40 nm, met uitzondering van één deeltje met een primaire grootte van 200 nm. Uit meting met de Nanosight bleek dat alle nanodeeltjes een vergelijkbare grootte hebben van 160-210 nm op het moment van toevoegen aan de celkweek. Dit betekent dat, met uitzondering van het deeltje van 200 nm, alle deeltjes zijn geaggregeerd. Dit is een verklaring voor de afwezigheid van een effect van grootte op de testresultaten.

Het hier gebruikte invitromodel is een algemeen geaccepteerd model voor effecten op DC-maturatie. In dit model wordt een verschillende respons na blootstelling aan de beide TiO₂-kristalvormen gevonden. Om de voorspelbaarheid van deze test voor de invivosituatie na te gaan wordt het muis-ovalbumine-allergiemodel gebruikt. De aanname is dat stimulering van DC-maturatie *in vitro* zich vertaalt in adjuvering van de immuunrespons *in vivo*. In dit allergiemodel worden twee deeltjes met verschillende kristalvorm en verder vergelijkbare eigenschappen getest: het rutiele deeltje van 10-30 nm en het anatase deeltje van 10-25 nm, beide niet gecoat en geproduceerd door Io-Li-Tec. Door gebruik van het invitromodel voorafgaand aan de proefdierstudie is het aantal deeltjes waarvoor *in vivo* testen relevant is, afgenomen van veertien naar twee.

Eerdere studies hebben verschillen in respons na blootstelling aan anatase en rutiel TiO₂ gevonden. In A549 humane longepitheelcellen induceerden anatase nanodeeltjes een grotere IL-8-productie dan rutiele deeltjes (Sayes et al., 2006). De mogelijkheid bestaat dat IL-8 geproduceerd door longepitheelcellen de long-DC stimuleert, zodat er sprake kan zijn van een additief of synergistisch effect van anatase versus rutiele deeltjes op DC *in vivo*. In een co-culture van humaan bloedvatendothelcellen en DC induceerden anatase nanodeeltjes meer IL-1 β , IL-10 en IFN- γ dan rutiele deeltjes (Schanen et al., 2009). Anders dan in onze studie vonden zij een vergelijkbare expressie van CD83 en CD86 op DC na blootstelling aan anatase en rutiele deeltjes. Ook de inductie van allogene naïeve CD4⁺-T-cellen door deze DC was vergelijkbaar. Anatase en anatase/rutiele nanodeeltjes induceerden meer ROS dan rutiele deeltjes (Jiang et al., 2008). In PC12-neuronale cellen liet blootstelling aan anatase deeltjes een sterkere glutathiondepletie en een sterkere afname van superoxide dismutase zien dan rutiele deeltjes (Wu et al., 2010). Alleen anatase deeltjes gaven een toename te zien van malondialdehyde, wat door ROS wordt gevormd uit onverzadigde vetzuren. Daarnaast liet blootstelling aan anatase deeltjes een sterkere daling

van de mitochondriële membraanpotentiaal zien. Intratracheale instillatie van 80% anatase/20% rutiele TiO_2 -nanodeeltjes veroorzaakte een toename in neutrofielen en cytotoxie in de BAL en proliferatie van tracheobronchiale epitheelcellen en longparenchymcellen (Warheit et al., 2007). Ontsteking en cytotoxie bleven een maand aantoonbaar. Twee rutiele deeltjes, een met Al_2O_3 -coating en een met $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ -coating, gaven deze effecten niet. Ook drie maanden na instillatie bleek een verschil in effect zichtbaar. In HEL30 keratinocyten waren het echter juist rutiele deeltjes die meer ROS-inductie te zien gaven (Braydich-Stolle et al., 2009). Cytotoxiciteit veroorzaakt door rutiele maar niet door anatase deeltjes kon geremd worden door de antioxidant N-acetylcysteïne. De conclusie van deze studies, met uitzondering van die van Braydich-Stolle et al., is dat anatase en anatase/rutiele TiO_2 -nanodeeltjes een ontstekingsbevorderend effect hebben, veel sterker dan rutiele deeltjes. Dit komt overeen met onze resultaten.

Een algemenere vraag is in hoeverre fysisch-chemische eigenschappen van nanodeeltjes informatie kunnen geven over de mate van oxidatieve stress, en daarmee glutathiondepletie, DC-maturatie en allergische reacties. Jiang et al. (2008) verklaren de grotere ROS-activiteit door anatase nanodeeltjes dan door rutiele deeltjes door verschillen in oppervlaktechemie. Anatase is meer geschikt om zuurstof in de vorm van O_2^- en O^- te adsorberen dan rutiel (Sclafani & Herrmann, 1996). Water wordt door anatase gebonden als H^+ en OH^- , en door rutiel als H_2O (Selloni et al., 1998; Vittadini et al., 1998). Beide processen (adsorptie van O_2^- en O^- en binding van H^+ en OH^-) faciliteren ROS-vorming (Sclafani & Herrmann, 1996). Het volgende mechanisme kan dus worden voorgesteld:

$$\left. \begin{array}{l} \text{adsorptie } \text{O}_2^- \text{ en } \text{O}^- \\ \text{binding water als } \text{H}^+ \text{ en } \text{OH}^- \end{array} \right\} \text{ROS} \Rightarrow \text{glutathiondepletie} \Rightarrow \text{Th1} \downarrow \Rightarrow \text{allergie}$$

De auteurs stellen voor dat intrinsieke niet-biologische oxidantactiviteit als pre-screening kan worden gebruikt voor de toxiciteit van nanodeeltjes. Koppeling van fysisch-chemische eigenschappen aan biologische effecten is beschreven door Zhang et al. (2012). Een dergelijke vraagstelling past binnen het EU-project NanoMILE, dat de NVWA medefinanciert.

Samenvattend hebben we laten zien dat anatase TiO_2 -deeltjes een sterkere inductie van DC-maturatie geven dan rutiele deeltjes; dit is van belang voor de keuze tussen de beide typen deeltjes voor toepassing in zonnebrandcrèmes. De gebruikte assay is een veelbelovende invitroscreen voor immunologische activiteit van nanodeeltjes. Momenteel worden de hier beschreven resultaten vergeleken met een invivostudie (allergiemodel). Daarnaast wordt het panel nanodeeltjes uitgebreid (binnen NanoNext.NL).

5 Referenties

- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673): 245-52.
- Bleck B, Tse DB, Jaspers I, Curotto de Lafaille MA, Reibman J. Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol* 2006; 176(12): 7431-7.
- Bleck B, Tse DB, Curotto de Lafaille MA, Zhang F, Reibman J. Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation and polarization via thymic stromal lymphopoietin. *J Clin Immunol* 2008; 28(2): 147-56.
- Bleck B, Tse DB, Gordon T, Ahsan MR, Reibman J. Diesel exhaust particle-treated human bronchial epithelial cells upregulate Jagged-1 and OX40 ligand in myeloid dendritic cells via thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* 2010; 185(11): 6636-45.
- Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chévrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 1): L604-13.
- Boland S, Bonvallot V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M, Marano F. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(1): L25-32.
- Braydich-Stolle LK, Schaeublin NM, Murdock RC, Jiang J, Biswas P, Schlager JJ, Hussain SM. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity. *J Nanopart Res* 2009; 11(6): 1361-74.
- Jiang J, Oberdörster G, Elder A, Gelein R, Mercer P, Biswas P. Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase? *Nanotoxicology* 2008; 2(1): 33-42.
- Lambrecht BN, Hammad H. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet* 2010; 376(9743): 835-43.
- Lewicka ZA, Benedetto AF, Benoit DN, Yu WW, Fortner JD, Colvin VL. The structure, composition, and dimensions of TiO₂ and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens. *J Nanopart Res* 2011; 13(9): 3607-17.
- Li N, Wang M, Bramble LA, Schmitz DA, Schauer JJ, Sioutas C, Harkema JR, Nel AE. The adjuvant effect of ambient particulate matter is closely reflected by the particulate oxidant potential. *Environ Health Perspect* 2009; 117(7): 1116-23.
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol* 1995; 25(7): 2064-8.
- Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(6): 3071-6.
- Porter M, Karp M, Killedar S, Bauer SM, Guo J, Williams D, Breyse P, Georas SN, Williams MA. Diesel-enriched particulate matter functionally activates human dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(6): 706-19.
- Provoost S, Maes T, Willart MA, Joos GF, Lambrecht BN, Tournoy KG. Diesel exhaust particles stimulate adaptive immunity by acting on pulmonary dendritic cells. *J Immunol* 2010; 184(1): 426-32.
- Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000; 16(3): 534-54.

- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2006;92(1):174-85.
- Schanen BC, Karakoti AS, Seal S, Drake DR 3rd, Warren WL, Self WT. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. *ACS Nano* 2009; 3(9):2523-32.
- Sclafani A, Herrmann JM. Comparison of the photoelectronic and photocatalytic activities of various anatase and rutile forms of titania in pure liquid organic phases and in aqueous solutions *J Phys Chem* 1996;100(32):13655-661.
- Selloni A, Vittadini A, Grätzel M. The adsorption of small molecules on the TiO₂ anatase (101) surface by first-principles molecular dynamics. *Surf Sci* 1998;402-404:219-22.
- Sun Q, Tan D, Zhou Q, Liu X, Cheng Z, Liu G, Zhu M, Sang X, Gui S, Cheng J, Hu R, Tang M, Hong F. Oxidative damage of lung and its protective mechanism in mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 2012;100(10):2554-62.
- Vittadini A, Selloni A, Rotzinger FP, Grätzel M. Structure and energetics of water adsorbed at TiO₂ anatase (101) and (001) surfaces. *Phys Rev Lett* 1998;81(14):2954-7.
- Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007;230(1):90-104.
- Williams MA, Porter M, Horton M, Guo J, Roman J, Williams D, Breyse P, Georas SN. Ambient particulate matter directs nonclassic dendritic cell activation and a mixed TH1/TH2-like cytokine response by naive CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(2):488-97.
- Wu J, Sun J, Xue Y. Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells. *Toxicol Lett* 2010;199(3):269-76.
- Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, Xu H. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J Nanosci Nanotechnol* 2010;10(12):8500-7.
- Yin JJ, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts JE, Fu PP, Mason RP, Zhao B. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;263(1):81-8.
- Zhang H, Ji Z, Xia T, Meng H, Low-Kam C, Liu R, Pokhrel S, Lin S, Wang X, Liao YP, Wang M, Li L, Rallo R, Damoiseaux R, Telesca D, Mädler L, Cohen Y, Zink JI, Nel AE. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano* 2012;6(5):4349-68.
- Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995;154(8):3821-35.

6 Figuren

Figuur 1. Vitaliteit van DC na 48 uur blootstelling aan een concentratiereeks TiO_2 -nanodeeltjes (2-128 $\mu\text{g/ml}$; in dispersiemiddel) en medium (negatieve controle). Vitaliteit is bepaald met WST-1-bepaling. (—) anatase of anatase/rutiel; (----) rutiel.

Figuur 2. CD83-expressie door DC na 48 uur blootstelling aan een concentratiereeks TiO_2 -nanodeeltjes (2-128 $\mu\text{g/ml}$; in dispersiemiddel) en medium (negatieve controle). CD83-expressie is bepaald met FACS. (—) anatase of anatase/rutiel; (----) rutiel.

Figuur 3. CD86-expressie door DC na 48 uur blootstelling aan een concentratiereeks TiO_2 -nanodeeltjes (2-128 $\mu\text{g/ml}$; in dispersiemiddel) en medium (negatieve controle). CD86-expressie is bepaald met FACS. (—) anatase of anatase/rutiel; (----) rutiel.

Figuur 4. IL-12p40-productie door DC na 48 uur blootstelling aan een concentratiereeks TiO_2 -nanodeeltjes (2-128 $\mu\text{g/ml}$; in dispersiemiddel) en medium (negatieve controle). IL-12p40 is bepaald met ELISA. (—) anatase of anatase/rutiel; (----) rutiel.

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl