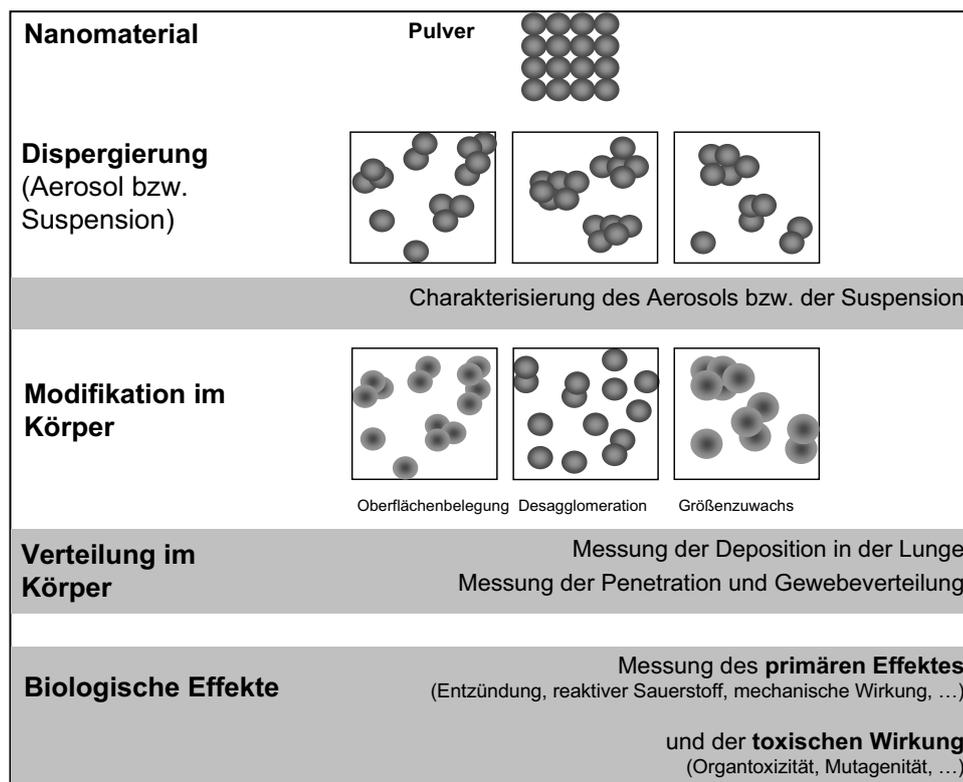


# In vivo Studien für die Sicherheitsbewertung von Nanomaterialien

NanoCare  
Abschlussveranstaltung  
am 16. Juni 2009  
in Berlin

Dr. Robert Landsiedel  
BASF SE  
Ludwigshafen

# Verhalten und Wirkung von Nanomaterial im Körper

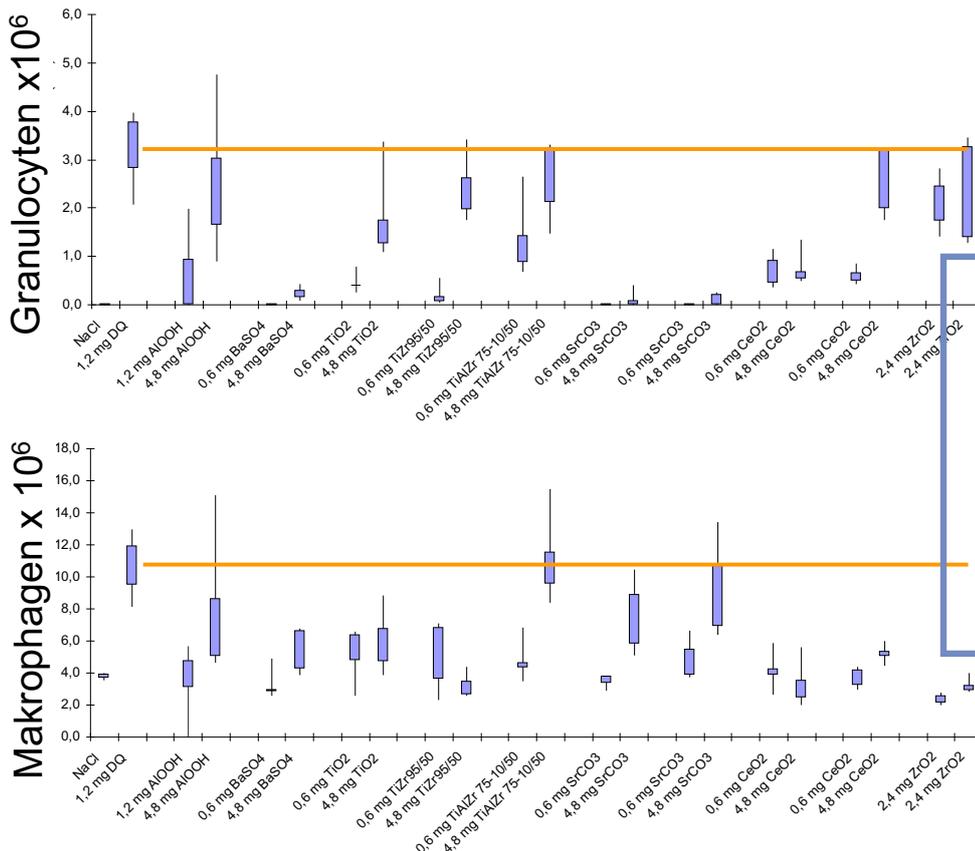


# In vivo Studien im NanoCare Projekt

Effekt Intratracheale Instillation	Standard Inhalationstest 5 Tage	Kinetik Inhalationsstudie 28 Tage
<ul style="list-style-type: none"> <li>- TiO<sub>2</sub></li> <li>- BaSO<sub>4</sub></li> <li>- CeO<sub>2</sub></li> <li>- CeO<sub>2</sub> dotiert</li> <li>- SrCO<sub>3</sub></li> <li>- Ti-Zr</li> <li>- Al-Ti-Zr</li> <li>- Böhmit 1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TiO<sub>2</sub></li> <li>- ZnO</li> <li>- BaSO<sub>4</sub></li> <li>- CeO<sub>2</sub></li> <li>- CeO<sub>2</sub> dotiert</li> <li>- Quarz</li> <li>- TiO<sub>2</sub> Pigment</li> <li>- ZnO Pigment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Böhmit 1</li> <li>- Böhmit 2</li> </ul>

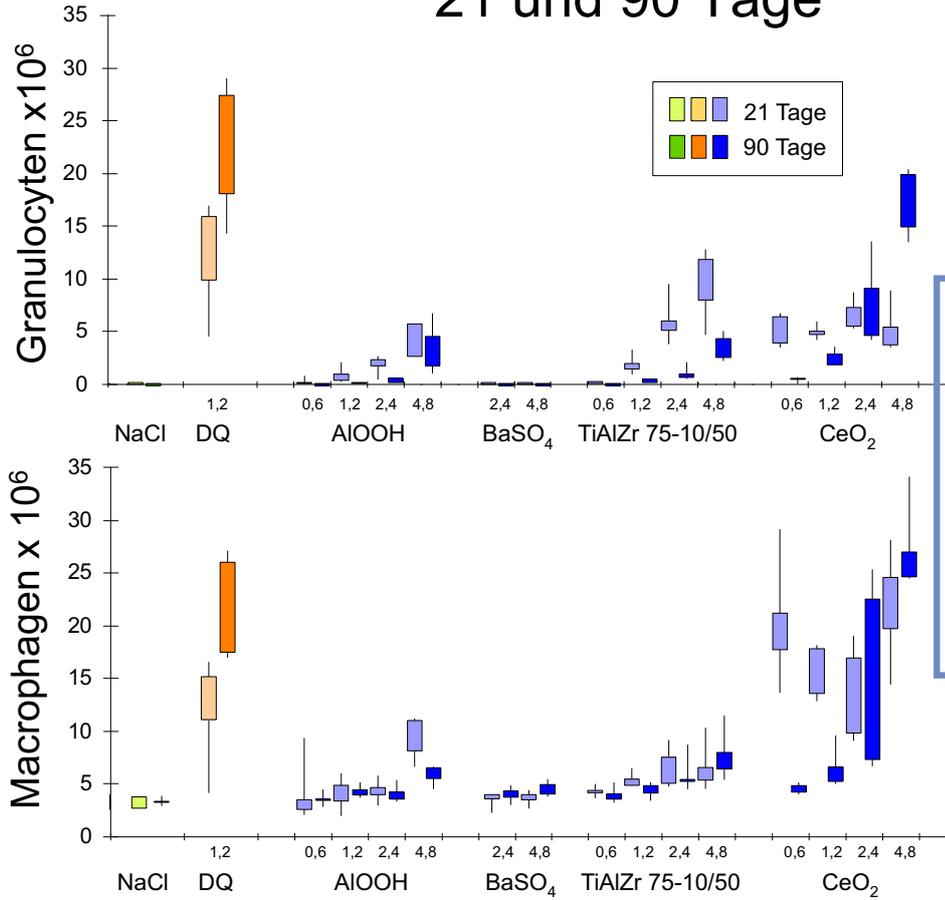
NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

## Intratracheale Instillation 3 Tage



Die durch  
Nanomaterialien  
herbeigeführten  
Effekte übertreffen  
nicht die  
progressive, durch  
Quarz ausgelöste  
Entzündung!

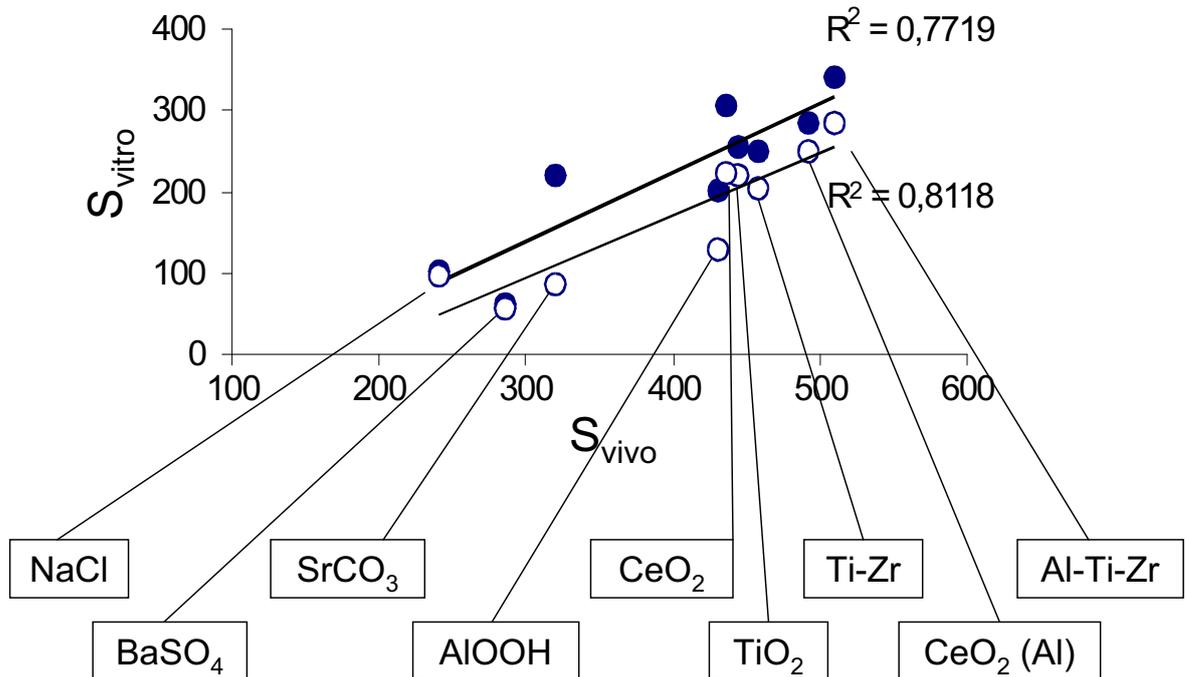
# Intratracheal Instillation 21 und 90 Tage



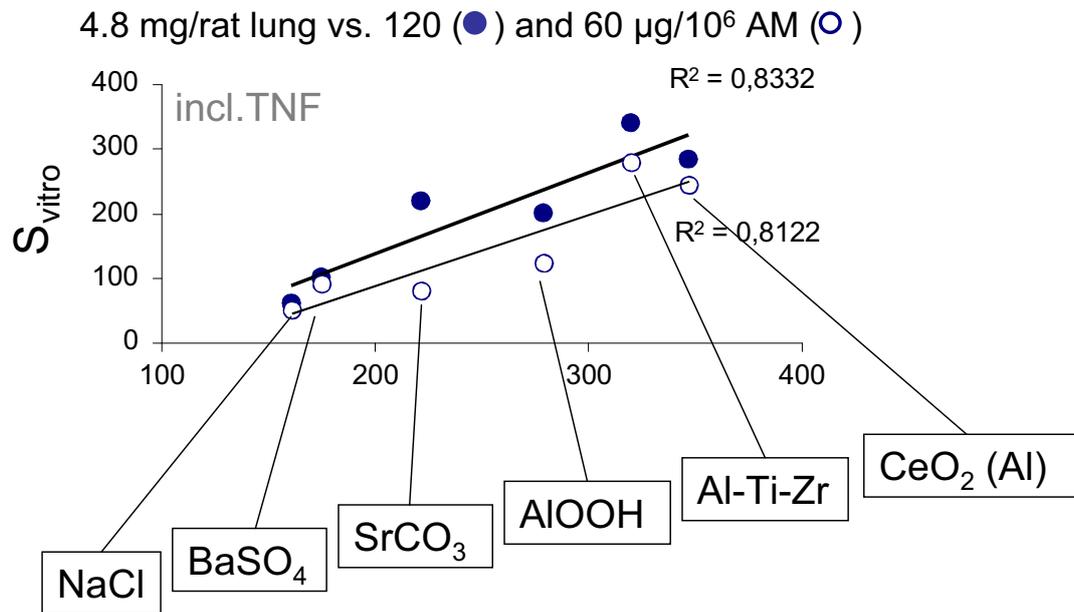
Die durch Nanomaterialien herbeigeführten Effekte bilden sich zurück, sofern im Experiment kein Overload erzeugt wird!

# Intertracheale Instillation *In vitro* versus *In vivo*

4.8 mg/rat lung vs. 120 (●) and 60 µg/10<sup>6</sup> AM (○)



# Intertracheale Instillation *In vitro* versus *In vivo* (90 Tage)



# Intratracheale Instillation Zusammenfassung

- Die Ausprägung biologischer Befunde nach intratrachealer Instillation und Inhalation sind grundsätzlich vergleichbar (BaSO<sub>4</sub>, AlOOH, TiO<sub>2</sub>, Al-Ti-Zr, CeO<sub>2</sub>, Al-dotiertes CeO<sub>2</sub>)
- Nachbeobachtungszeiten von 90 Tagen können für vollständige Beurteilungen erforderlich sein (Al-CeO<sub>2</sub>)
- *In vitro* Ergebnisse (Vektorenmodell) and *in vivo* Ergebnisse lassen sich auf der Basis geeigneter Summenindices korrelieren

# Inhalative Exposition

## Inhalationsstudien mit Aerosolen



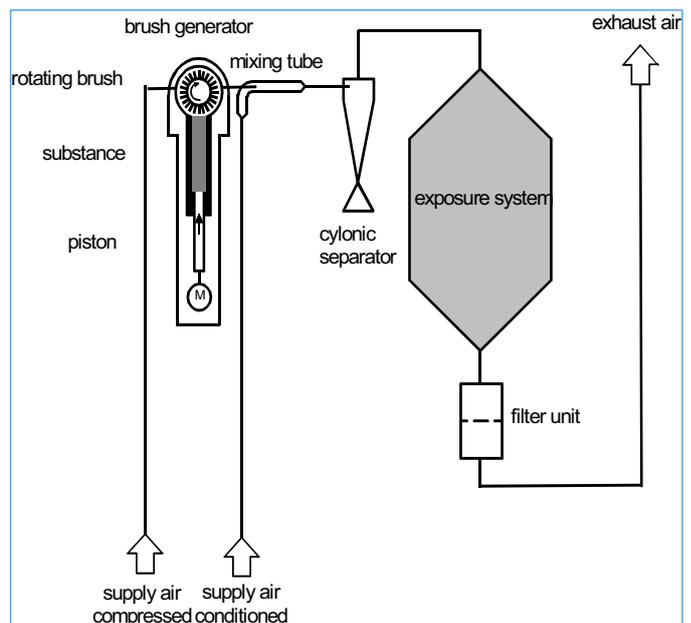
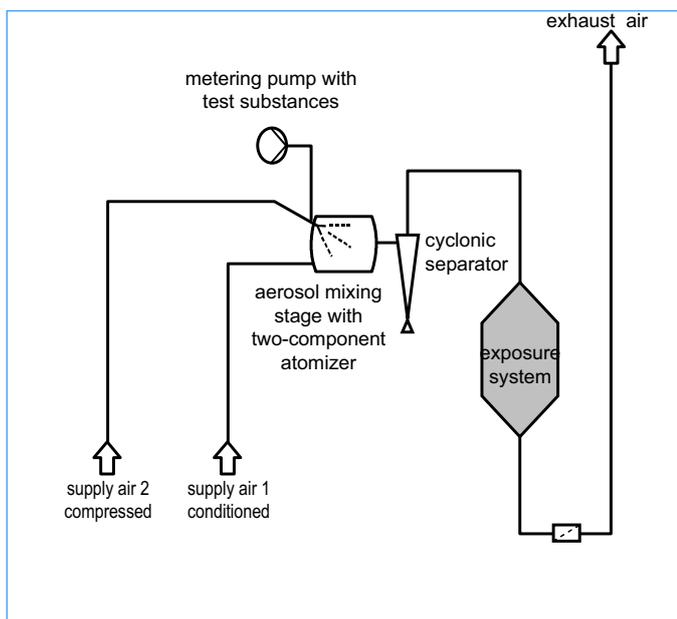
### Methodenoptimierung bei BASF:

- technisch aufwendige Aerosol-Generierung und Charakterisierung
- 5-Tage-Inhalationsstudien mit geeigneten biologischen Parametern

NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Inhalative Exposition

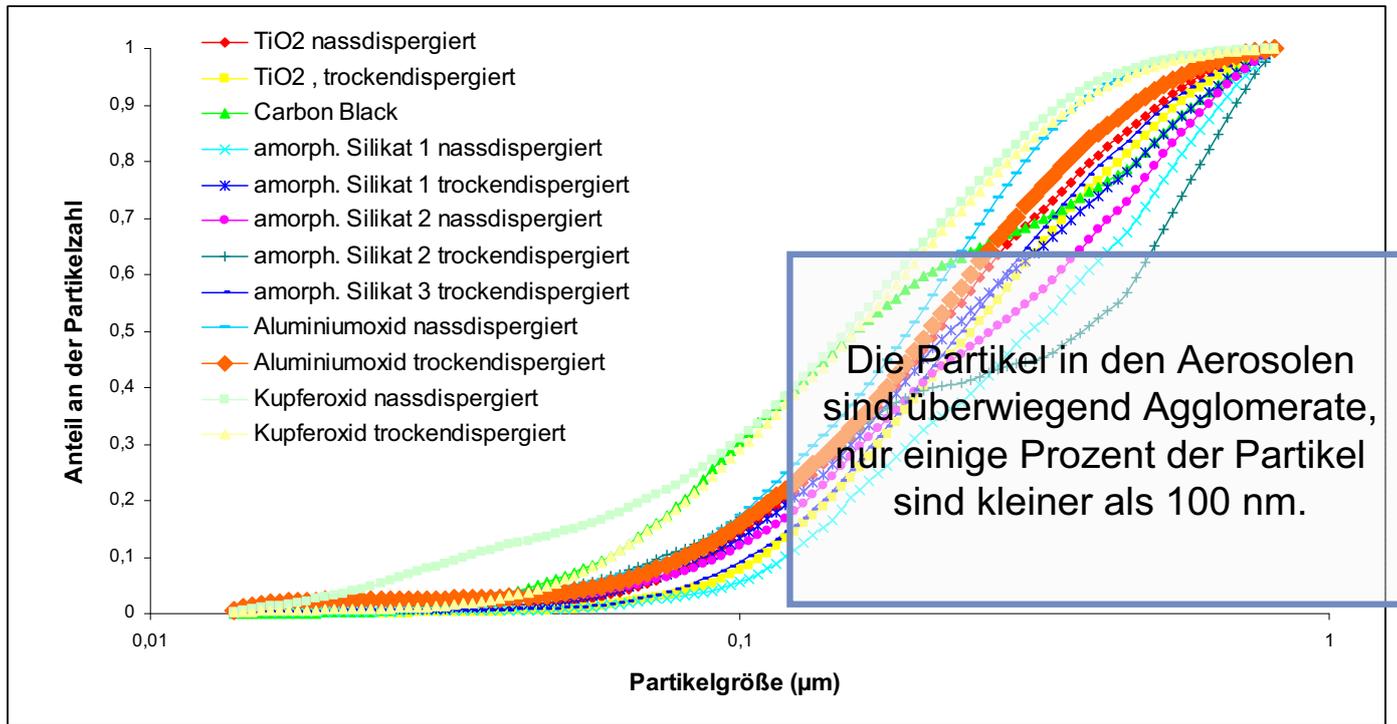
## Generierung und Charakterisierung der Aerosole



Partikelgrößenbestimmung mit Impactor, OPC, SMPS

NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Inhalative Exposition Charakterisierung von Aerosolen aus Nanomaterialien



NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Standard Inhalations Studie

- Männliche Wistar Ratten
- Kopf/Nase exponiert
- 6 Stunden pro Tag

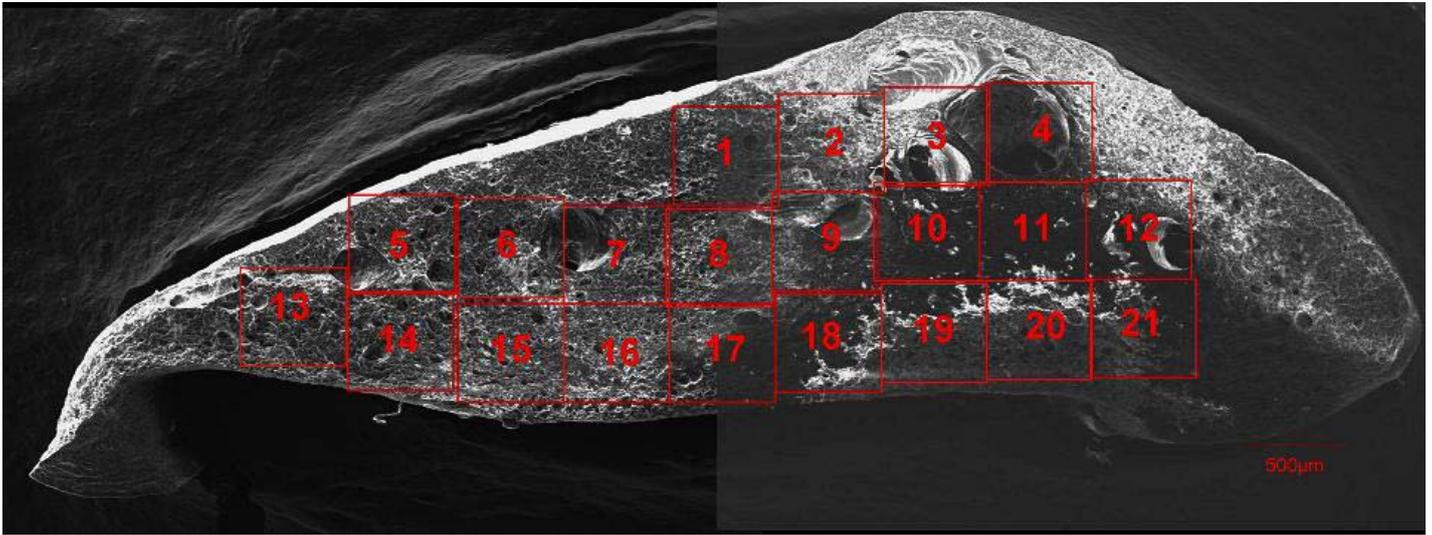


1	2	3	4	5	6	7	8	9 - 20	21
x	x	x	x	x	R	R	R	R	R
				U			U		U



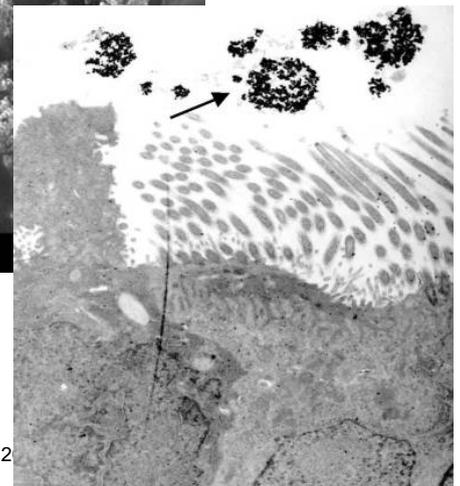
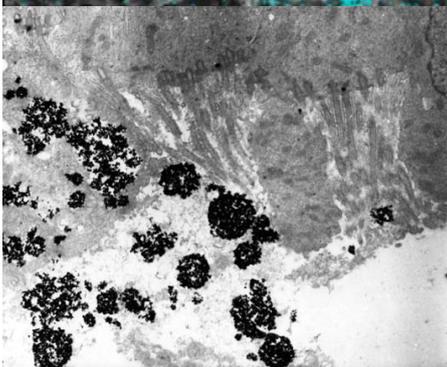
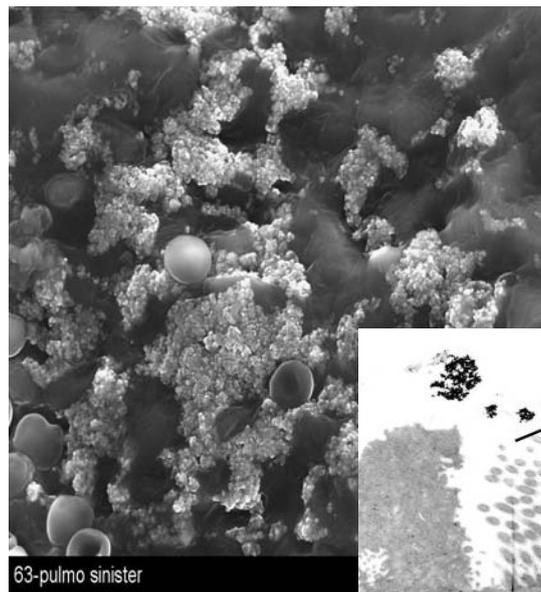
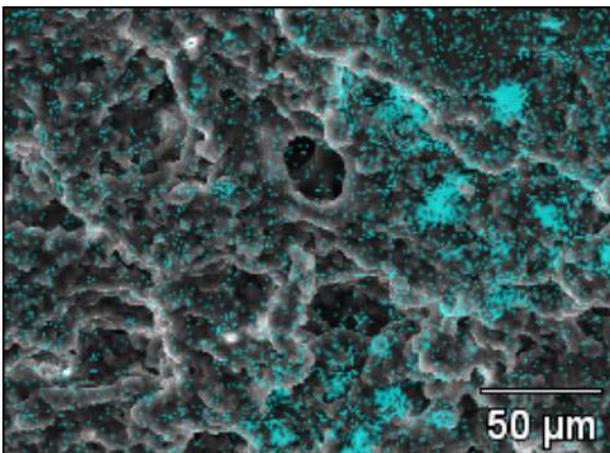
NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Inhalative Exposition Verteilung in der Lunge



NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Inhalative Exposition Verteilung in der Lunge



oCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2

# Inhalative Exposition

## Verteilung in der Lunge



Partikel in der Lunge

Auf der Oberfläche und in Freßzellen

Partikelgröße gleich derjenigen in der Atmosphäre  
(Agglomerate bis zu 3 µm)

1 µm

Keine Anzeichen einer Des-agglomeration

1 µm

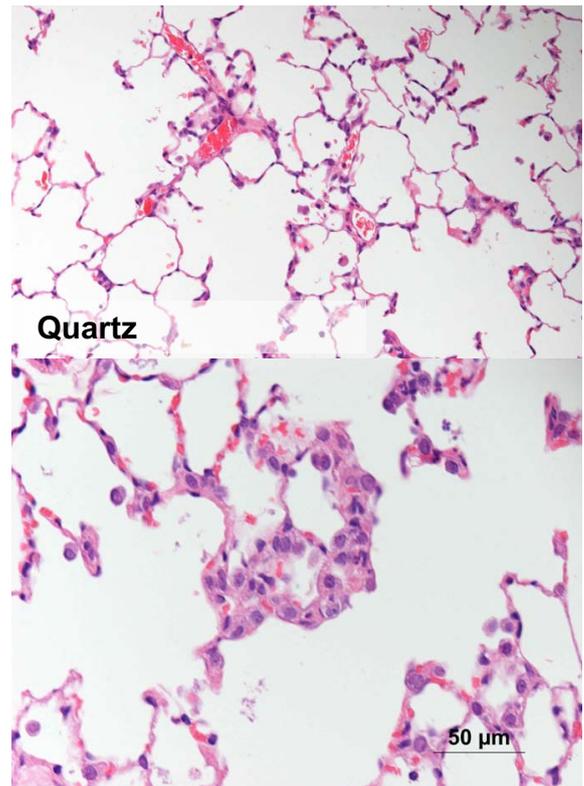
# Inhalative Exposition

## Effekte in der Lunge



unbehandelt

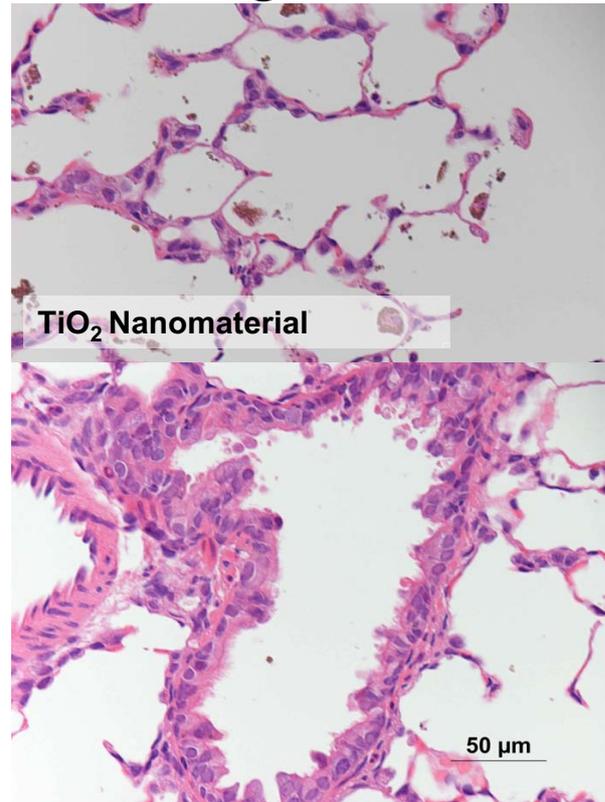
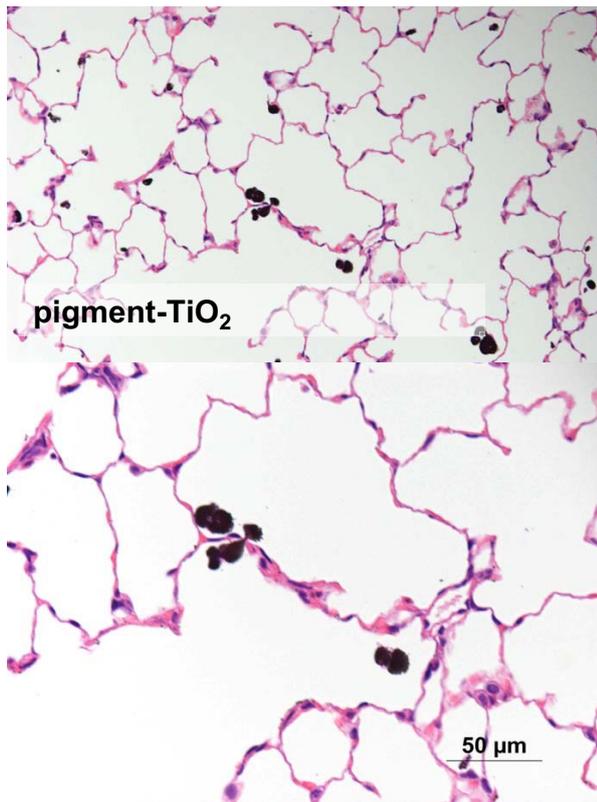
50 µm



Quartz

50 µm

# Inhalative Exposition Effekte in der Lunge



NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Inhalative Exposition Biologische Parameter

## Histopathologie

### Proliferation und Apoptose

### Klinische Chemie

Protein

lactate dehydrogenase (LDH)

Alkaline phosphatase (ALP)

$\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT)

N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (NAG)

total cell count

cell differential analysis

- macrophage (MPH)

- polymorph nuclear granulocytes (PMN)

- lymphocyte (LYMPH)

Troponin I

### Parameter für oxidativen Stress

Carboxymethyllysin (CML)

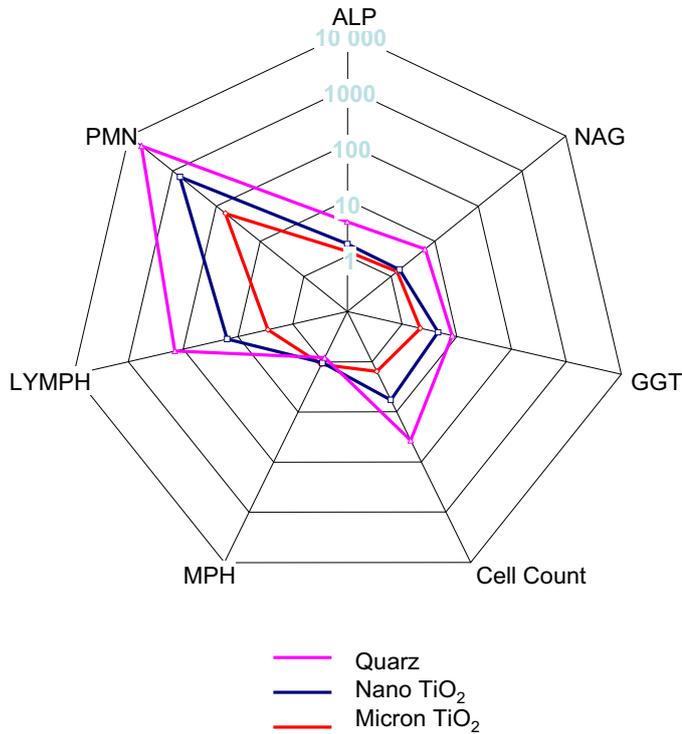
Malondialdehyd (MDA)

8-OHdG

## Cytokine *et al.*

- |                             |                     |                           |
|-----------------------------|---------------------|---------------------------|
| 1. Apolipoprotein A1        | 24. IL-1 $\alpha$   | 47. MDC                   |
| 2. $\beta$ -2 Microglobulin | 25. IL-1 $\beta$    | 48. MIP-1 $\alpha$        |
| 3. Calbindin                | 26. IL-2            | 49. MIP-1 $\beta$         |
| 4. CD40                     | 27. IL-3            | 50. MIP-1 $\gamma$        |
| 5. CD40L                    | 28. IL-4            | 51. MIP-2                 |
| 6. Clusterin                | 29. IL-5            | 52. MIP-3 $\beta$         |
| 7. C-Reactive Protein       | 30. IL-6            | 53. MMP-9                 |
| 8. Cystatin                 | 31. IL-7            | 54. Myoglobin             |
| 9. EGF                      | 32. IL-10           | 55. OSM                   |
| 10. Emdothelin-1            | 33. IL-11           | 56. Osteopontin           |
| 11. Eotaxin                 | 34. IL-12p70        | 57. RANTES                |
| 12. Factor VII              | 35. IL-17           | 58. SCF                   |
| 13. FGF-basic               | 36. Insulin         | 59. Serum Amyloid P       |
| 14. FGF-9                   | 37. IP-10           | 60. SGOT                  |
| 15. Fibrinogen              | 38. KC/GRO $\alpha$ | 61. TIMP-1                |
| 16. GCP-2                   | 39. Leptin          | 62. Tissue Factor         |
| 17. GM-CSF                  | 40. LIF             | 63. TNF- $\alpha$         |
| 18. Growth Hormone          | 41. Lipocalin-2     | 64. TPO                   |
| 19. GST- $\alpha$           | 42. MCP-1           | 65. VCAM-1                |
| 20. GST-1 Yb                | 43. MCP-2           | 66. VEGF                  |
| 21. Haptoglobin             | 44. MCP-3           | 67. von Willebrand Factor |
| 22. IFN- $\gamma$           | 45. MCP-5           |                           |
| 23. IgA                     | 46. M-CSF           |                           |

# Inhalative Exposition Effekte in der Lunge



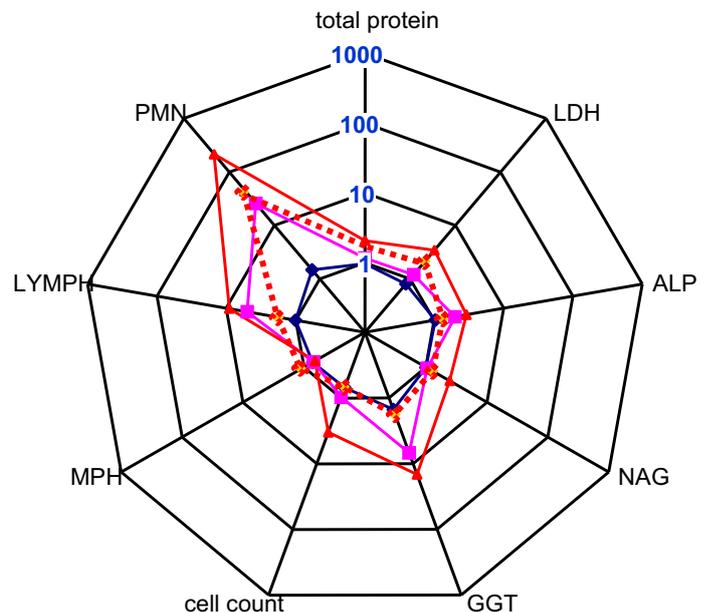
## Reaktion auf Fremdstoffe in der Lunge

- entzündliche Reaktion in der Lunge
- Erholung nach Ende der Exposition
- Relative Stärke der Reaktion messbar

# Inhalative Exposition TiO<sub>2</sub>

5-Tage Standard Inhalationsstudie  
für Nanomaterial

relative Erhöhung ausgewählter  
biologischer Parameter

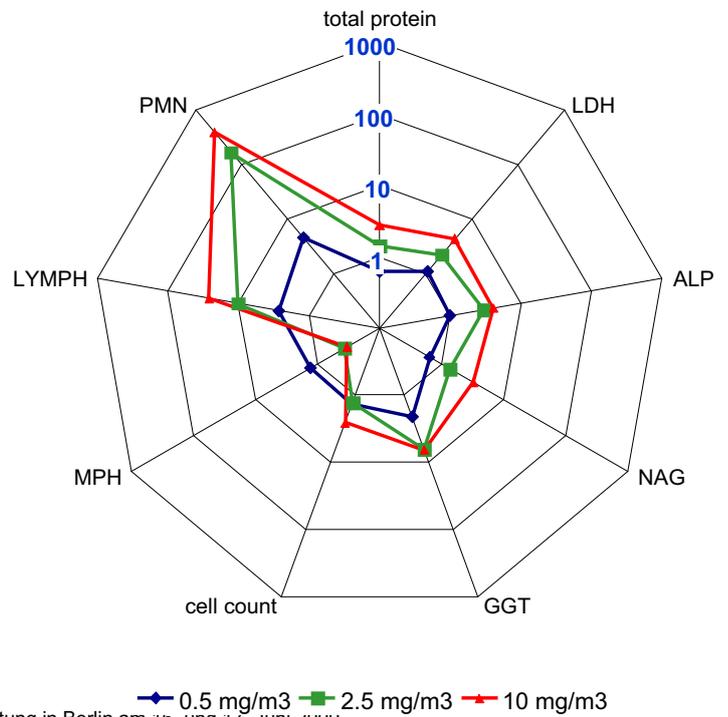


# Inhalative Exposition CeO<sub>2</sub>

## Konzentrations-Effekt Diagramm

5-Tage Standard Inhalationsstudie  
 für Nanomaterial

relative Erhöhung ausgewählter  
 biologischer Parameter



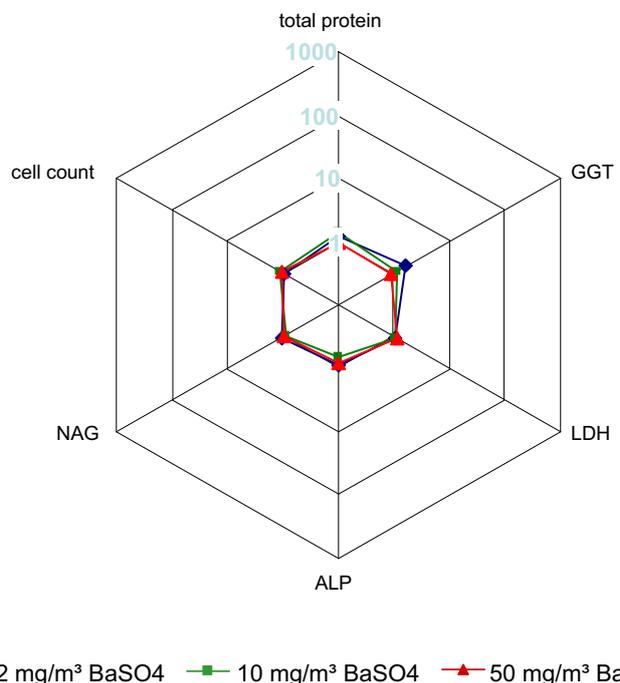
NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Inhalative Exposition BaSO<sub>4</sub>

## Konzentrations-Effekt Diagramm

5-Tage Standard Inhalationsstudie  
 für Nanomaterial

relative Erhöhung ausgewählter  
 biologischer Parameter



NanoCare Abschlussveranstaltung in Berlin am 16. und 17. Juni 2009

# Inhalative Exposition

## Ergebnisse der Prüfung von Nanomaterialien

	Target conc. [mg/m <sup>3</sup> ]	NOAEC / LOAEC [mg/m <sup>3</sup> ]	Lavage	Pathologie	Reversibilität	Translokation
<b>Quarz</b>	100	-	pronounced inflammation	diffuse histiocytosis significantly increased apoptosis granulomatous inflammation	no	no indication
<b>TiO<sub>2</sub></b>	2, 10, 50	LOAEC: 2	inflammation	histiocytosis	not complete	no indication
<b>pigment TiO<sub>2</sub></b>	250	-	inflammation	diffuse histiocytosis / increased apoptosis	not complete	no indication
<b>CeO<sub>2</sub></b>	0.5; 2.5; 10	LOAEC: 0.5	inflammation	histiocytosis, mild inflammation	not complete	n.d.
<b>CeO<sub>2</sub>, dotiert</b>	0.5; 2; 10	LOAEC: 0.5	inflammation	histiocytosis, mild inflammation	not complete	n.d.
<b>ZnO</b>	0.5; 2.5; 12.5	LOAEC: 0.5 (mild effects)	inflammation	lung: inflammation / cell death; nose: necrosis	yes	yes (soluble)
<b>pigment ZnO</b>	12.5	-	inflammation	mild diffuse histiocytosis nose: necrosis	yes	yes (soluble)
<b>BaSO<sub>4</sub></b>	2; 10; 50	NOAEC: 50	no adverse finding	no adverse finding	-	n.d.
<b>AlOOH</b>	0.3; 3.0; 28	NOAEC: 3	inflammation	inflammation	not complete	no indication

# Inhalative Exposition

## Zusammenfassung

- Testsysteme zur Messung der Wirkung in der Lunge sind verfügbar.
- Nanomaterialien zeigen unterschiedliche Wirkungen in der Lunge - wie andere Stoffe auch.
- *wie bei jedem Stoff:*  
Erkennen und Messen der Wirkung ermöglicht einen sicheren Umgang (Schützen, Beschränken, Vermeiden)

- Landsiedel R, Wiench K, Wohlleben W: Geeignete Methoden zur Prüfung der Sicherheit von Nanomaterialien, [Chemie Ingenieur Technik - CIT, Volume 80 Issue 11](#) pages 1641 - 1651
- Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer A, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R (2008): Development of a short-term inhalation test in rats using nano-titanium dioxide as a model substance, *Inhalation Toxicology*, [Inhalation Toxicology](#) 2008 Sep 17.:1
- Ma-Hock L, Gamer A, Landsiedel R, Leibold E, Frechen T, Sens B, Huber G, van Ravenzwaay B (2007): Generation and Characterization of Test Atmospheres with Nanomaterials, *Inhalation Toxicology* 19: 833-848
- Schulze Ch, Kroll A, Lehr CM, Schäfer UF, Becker K, Schnekenburger J, Schulze Isfort Ch, Landsiedel R, Wohlleben W (2008): [Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media](#) *Nanotoxicology* 2: 51-61
- Landsiedel R, Schulz M, Kapp MD, Oesch F (2009) Genotoxicity Investigations on Nanomaterials: Methods, Preparation and Characterization of Test Material, Potential Artifacts and Limitations - Many Questions, Some Answers, *Mutation Research* 681: 241-258