



Nanosilberpartikel (AgNP)

Wirkmechanismen und Untersuchungen ihrer möglichen
Interaktionen mit Geweben, Zellen und Molekülen.

Definition ihres relevanten
Unverträglichkeitspotentials.

Förderkennzeichen: 03X0103

**Für das Konsortium:
Hans-Curt Flemming
Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen**

2. Clustermeeting
NanoCare und NanoNature



Nanosilberpartikel-Projekt

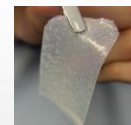
Herstellung von Nanosilber



rent a scientist®
ideen bewegen



Entwicklung und Charakterisierung von
Nanosilber dotierten Implantatwerkstoffen



Untersuchungen zum Freisetzungsverhalten
von Silberspezies aus Medizinprodukten

rent a scientist®
ideen bewegen



Antimikrobielle Wirksamkeit



Einfluss auf Zellen des Knochenbaus in vitro und in vivo



Wechselwirkung mit den Zellen des Haut- und Gefäßsystems



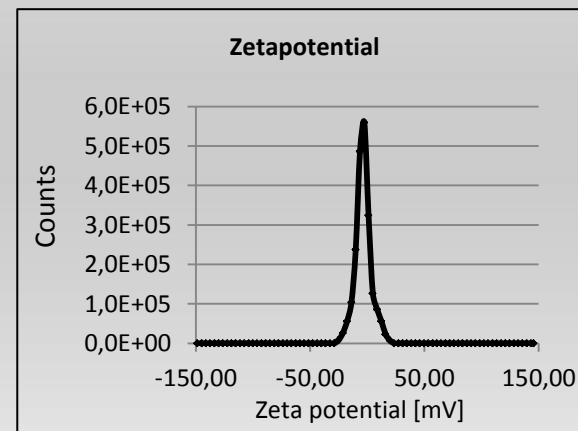
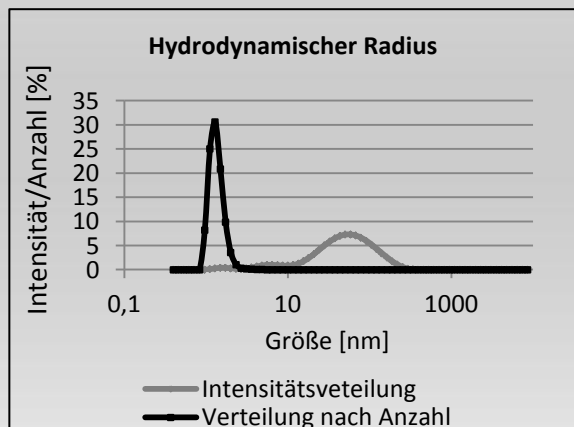
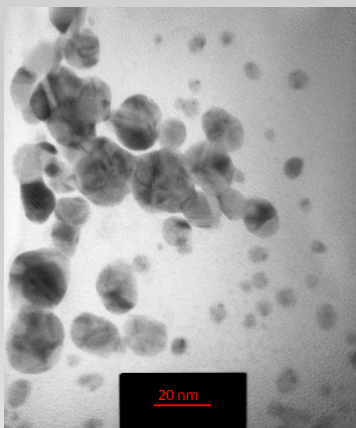


Nanosilberpartikel



- **Ausgangsprodukt Nanosilber (AgPURE W10)**
 - Wässrige Nanosilberdispersion (10 Gew.-%)
- **Optimierung Produktionsprozesse**
 - Einarbeitung von Nanosilber als Additiv in Knochenzement nur nahezu wasserfrei möglich
 - Positiver Nebeneffekt: Abtrennung des im wässrigen Anteil gelösten Ammoniumnitrats
 - Entwicklung Produktqualität für Verträglichkeitstests (Ausschluss von Matrixeffekten)
 - 10 Gew.-% wässrige Nanosilberdispersion ohne Ammoniumnitrat
 - Matrix und Matrixbestandteile werden berücksichtigt

Charakterisierung der Nanopartikel

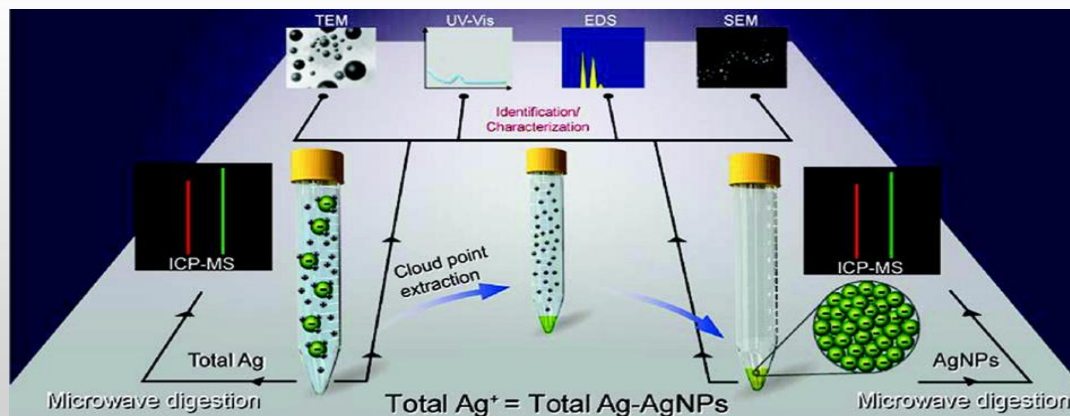




Ag⁺ oder AgNP?

Cloud-Point Extraction (CPE) mittels T-X 114

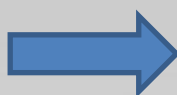
- CPE: Vorkonzentrations- und Extraktionsmethode bis in den Ultraspurenbereich



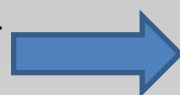
Liu, J., 2011



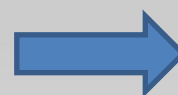
Nanosilber-Stammlösung:
10 µg Ag/g Lösung



Cloud-Point-
Extraction



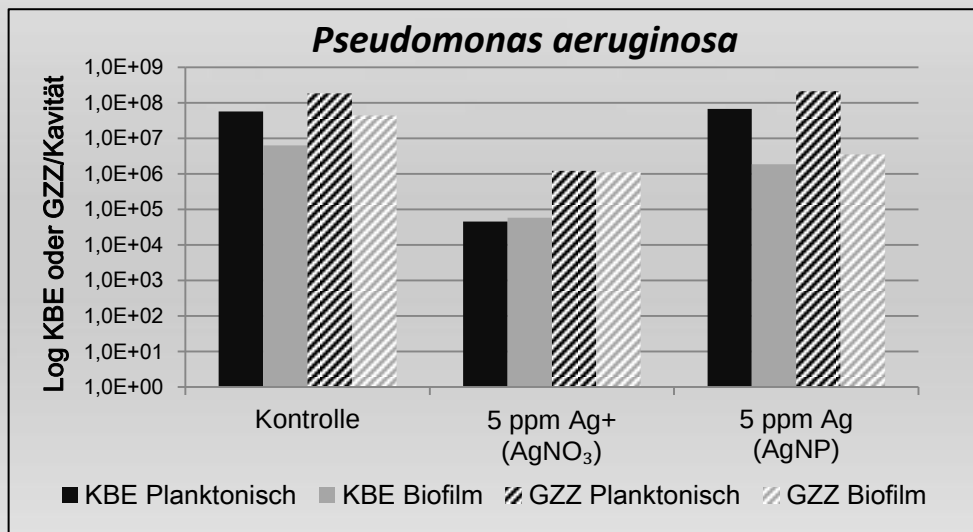
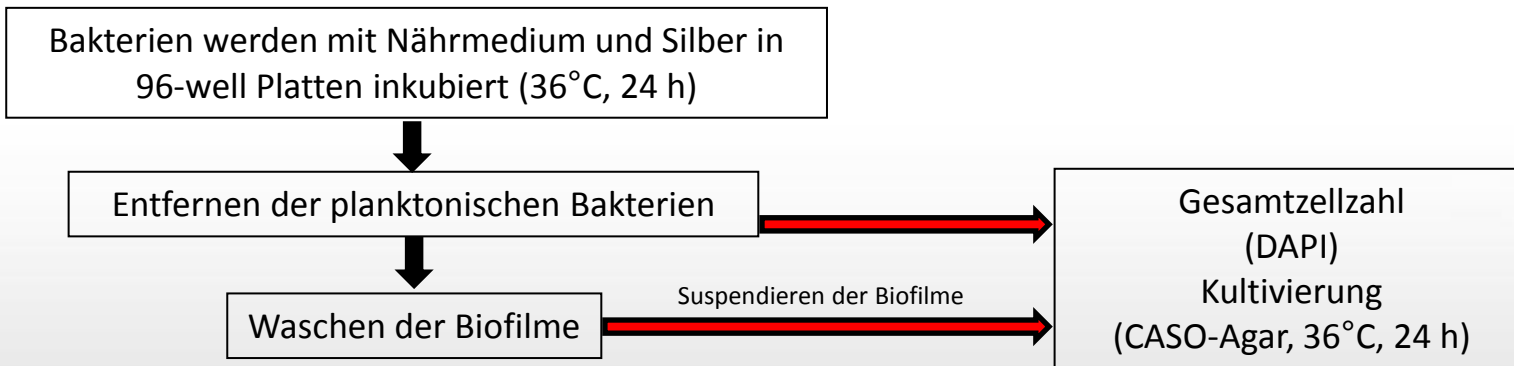
Gelber Extrakt: Silbernanopartikelhaltige
Tensidphase, darüber wässrige ionenhaltige Phase



Messung GF-AAS:
 $c(\text{Ag}^+) + c(\text{AgNP}) = c(\text{Ag Total})$



Konzentrationsabhängiger Einfluss von Silber auf planktonische Bakterien und Biofilme





Schädigung von primären Humanzellen

LC ₅₀	Zelltyp			
	HUVEC	HUASMC	HDF	NHEK
AgNP	68 ± 37	179 ± 91	167 ± 46	90 ± 44
AgNO ₃	7,2 ± 7,8	13,8 ± 4,1	7,4 ± 3,5	3,8 ± 1,2
Ag ₂ SO ₄	9,4 ± 6,5	15,4 ± 2,1	9,3 ± 2,6	3,9 ± 1,2
Matrix	435 ± 148	557 ± 71	369 ± 134	197 ± 111

Rohstoffe sind pyrogenfrei

(ppm Ag)

Antibakterieller Effekt

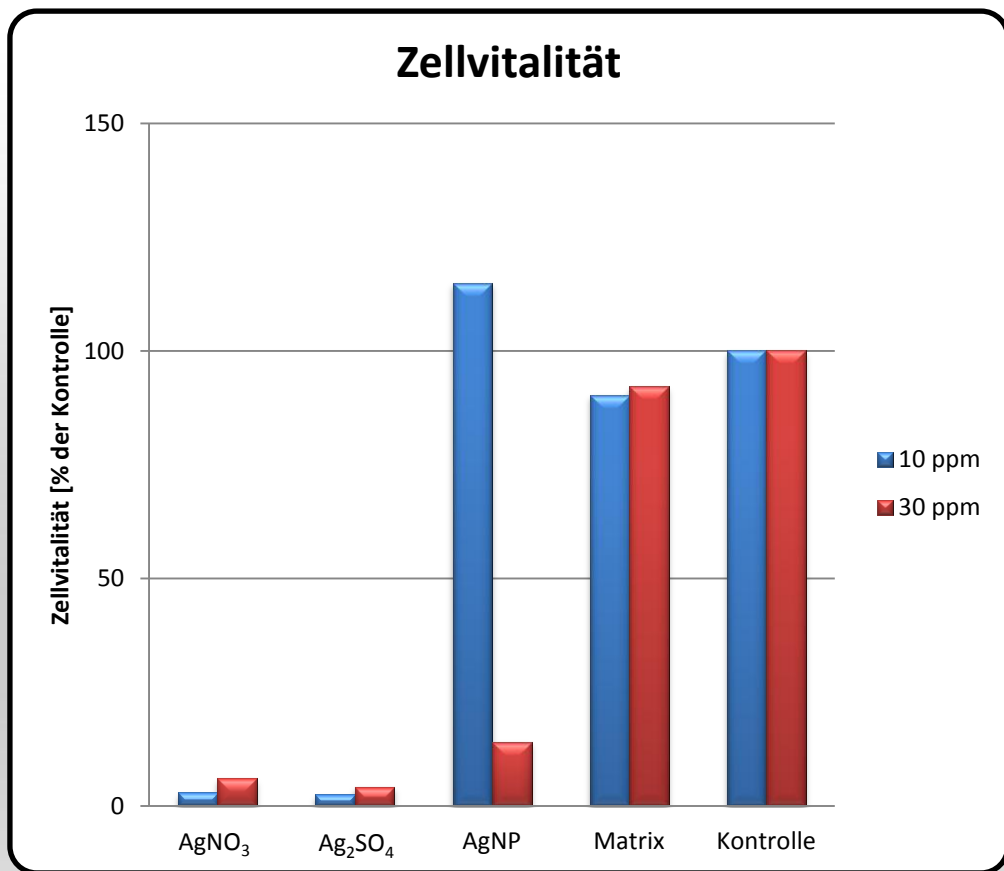
MHK (LB-Lennox 50 %)	Teststamm		
	<i>P. aeruginosa</i> AdS	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984
AgNP	15,6	125	62,5
AgNO ₃	7,8	15,6	7,8
Ag ₂ SO ₄	7,8	7,8	7,8

(ppm Ag)

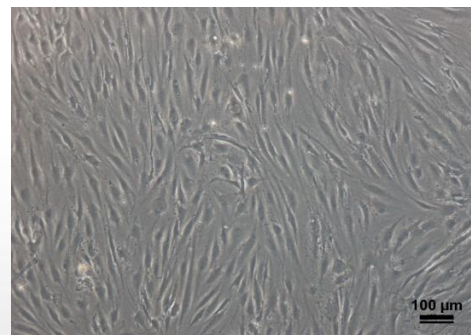


Ag⁺ und AgNP: Wirkung auf Humane Multipotente Stromazellen *in vitro*

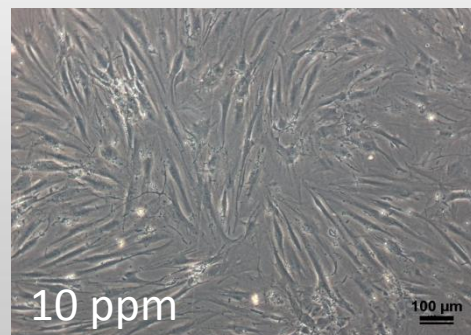
Humane Multipotente Stromazellen



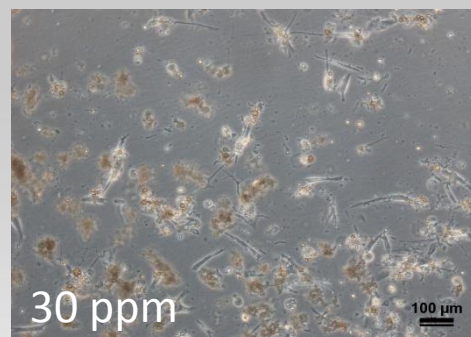
N = 1



Kontrolle



AgNP



AgNP

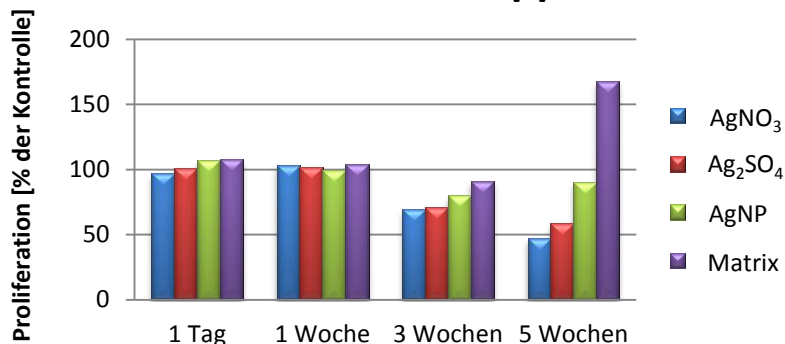
100x Vergrößerung



Einfluss von Silbernanopartikeln und Silberionen auf die Zellen des Knochenbaus in vitro

Humane Multipotente Stromazellen

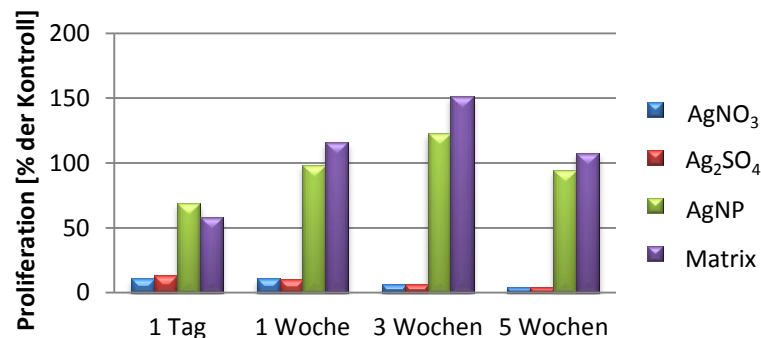
Proliferation 3 ppm



N = 2

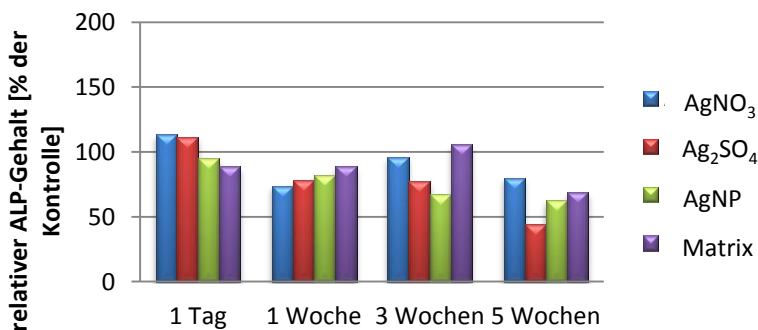
Humane Osteoblasten

Zellwachstum 3 ppm



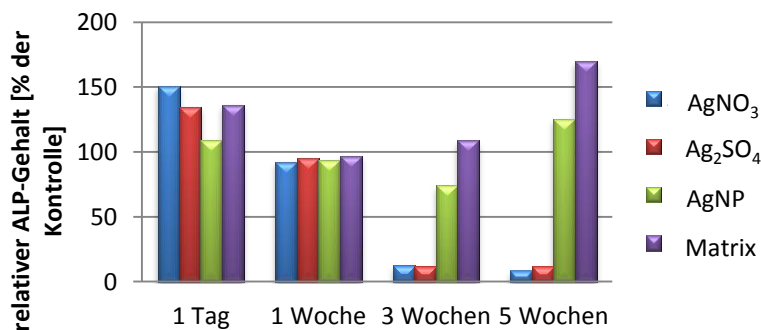
N = 2

Mineralisierung 3 ppm



N = 2

Mineralisierung 3 ppm



N = 2

Medizinprodukte, die AgNP enthalten



Nanosilber/
Elektrolytlösung

↓
Titanimplantat an
Elektrode

↓
Ringelektrode um
Implantat

↓
Modulierte Wechselspannung
hoher Stromstärke

↓
Herstellung der Prüfkörper

γ- Sterilisation



Monomerkomponente
(MMA, DmpT, HQ)

↓
Emulgator

↓
AgPure

↓
Vermischen des Pulvers
mit Monomer

↓
Herstellung der Prüfkörper

Kollagen (Schwein)

↓
Zerkleinerung

↓
Chemische Aufreinigung

↓
Neutralisation

↓
AgPure

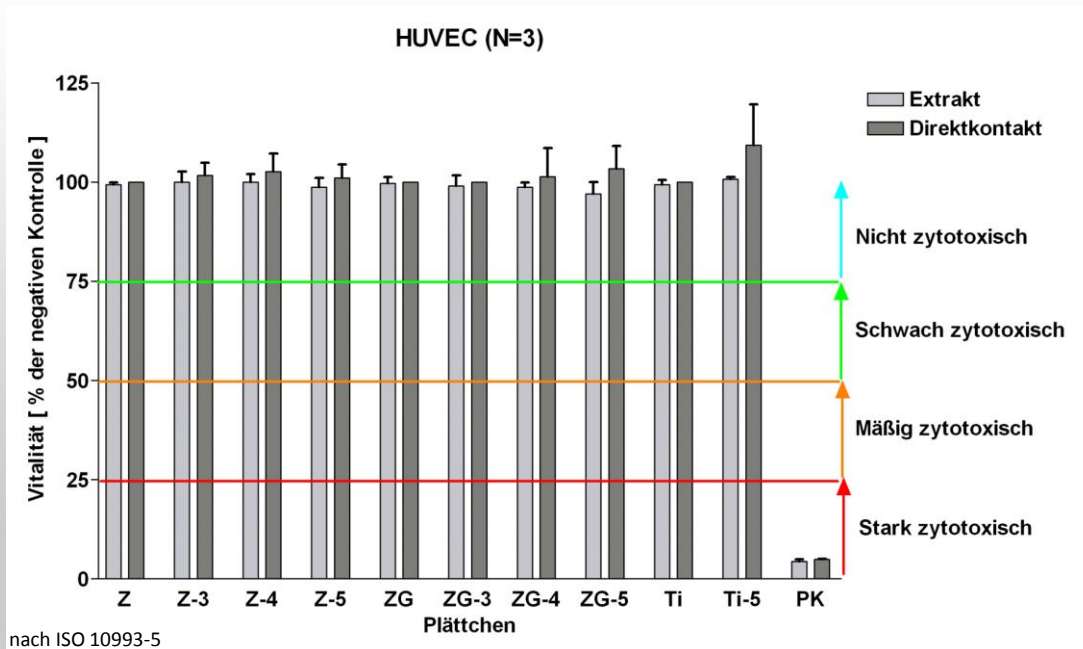
↓
Herstellung der Prüfkörper
Sterilisation mit Ethylenoxid



Zement- und Titanplättchen: nicht zytotoxisch

Zytotoxizität der Medizinprodukte

→ Vitalität von humanen Primärzellen



Medizinprodukte
sind pyrogenfrei

Keine Schädigung von Stromazellen und Osteoblasten durch Knochenzement



Verwendung der Daten für die Risikoabschätzung von Nanosilber

- Risiko-Definition (Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge, Harald F. Krug, Angewandte Chemie, 2011, Vol. 123, pp. 2–23,)

- R = Gefährdungspotential x Eintrittswahrscheinlichkeit

$$R = f_p\{E, H\}$$

- H = Hazard, z.B.

- Zytotoxizität auf bestimmte Zelllinien
(in diesem Projekt ermittelt) siehe Ergebnis-Tabelle

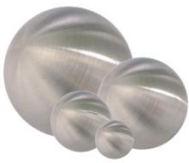
- E = Exposition, z.B.

- Eluierbare Menge Silberionen bzw. AgNP aus Medizinprodukten mit Nanosilber (in diesem Projekt ermittelt) **UND**
 - Verfügbare Konzentration der Substanz am Ort der biologischen Wirkung



Erste Aussagen

- Nanosilber hat geringeren Effekt auf Bakterien-Teststämme als Ag^+ und Silberionen sind zytotoxischer als AgNP (Ergebnisse Deckungsgleich mit Literatur)
- Zytotoxizitätsgrenze für AgNP bei 30 ppm, für Ag^+ bei 3 ppm (Ergebnisse Deckungsgleich mit Literatur)
- Die verschiedene Zelltypen zeigen untereinander ähnliche LC_{50} Werte im Bezug auf jeweils Ag^+ bzw. AgNP
- Enges therapeutisches Fenster für Nanosilber und Silbersalze
- Erfolgreiche Herstellung dreier nanosilberhaltiger Implantatmaterialien (Charakterisierung abgeschlossen)
- Titan- und zementhaltige Testmaterialien zeigen nach 24h keine Zytotoxizität bei Endothelzellen
- Differenzierte Betrachtung Rohstoff & Produkte:
 - Keine Zytotoxizität des Knochenzements
 - Zytotoxizität von AgNP-dotiertem Titan noch offen



Nächste Schritte

- Mikrobiologie: Anwendung kultur-unabhängiger Verfahren, um auch nicht-kultivierbare Stadien zu erkennen
- Mikrobiologische Untersuchungen nach Industriestandardmethoden
- Methodenoptimierung Silberspeziestrennung
- TEM-Untersuchung von Knochenzellen
- Weitere Herstellungsoptimierungen und Standardisierungen der Implantat Materialien
- In vitro Untersuchungen auf mRNA Ebene
- *In-vivo*-Überprüfung der Biokompatibilität der Produkte (Tiermodell)
- Charakterisierung des Zelltods (Apoptose/Nekrose) bei den Rohmaterialien
- Prüfung der Testmaterialien mit weiteren Zelltypen
- Etablierung eines Hautmodells zur Überprüfung der Irritation durch Prüfkörper



Danksagung

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Eva Gerhard-Abozari