NanoGEM- Nanostrukturierte Materialien
Gesundheit, Exposition und Materialeigenschaften

nano GEM

nanoGEM
Nanomaterialien – Gesundheit, Exposition und Materialeigenschaften

Thomas A.J. Kuhlbusch

Finanziert vom BMBF
(Förderkennzeichen 03X0105)

nanoGEM - Forschungsziele

NanoGEM:
Integrative Forschung zur Risikoabschätzung

? Gibt es eine Exposition gegenüber nanostrukturierten Materialien? Wie hoch ist das Gefährdungspotential? Besteht ein Risiko?

! Interdisziplinäre und interessensübergreifende Forschung von Behörden, Forschungseinrichtungen und Industrie

Forschungsziele z.B.:

- **Freisetzung, Veränderungen und Transformation von Nanoobjekten (NM)**
- **Biokinetische Untersuchungen mit Hilfe markierter Nanopartikel**
- **Medienübergreifende Messtechnik: Luft, Wasser, Zellen und Gewebe**
- **Modifizierung, Validierung und Etablierung von Toxizitätstests**
- **Welchen Einfluss hat die Oberfläche / Coating auf Wirkmechanismen?**
- **Risikoabschätzung, u.a. Arbeiter und Verbraucher**

nanoGEM – 2010-2013

Projekt-Konsortium

- Forschung
- Industrie
- Behörden

Nanomaterial-Herstellung, -Funktionalisierung und -Charakterisierung

Veränderung von Nanomaterialien im Lebenszyklus:
Agglomeration, Adduktbildung, Oberflächen-Konditionierung

Exposition

Gefährdungspotential für den Menschen

Aufnahme und Verteilung in Zellen und Gewebe

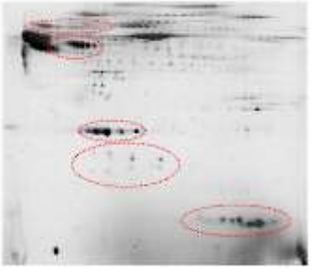
Exposition - Messtechnik und Szenarien

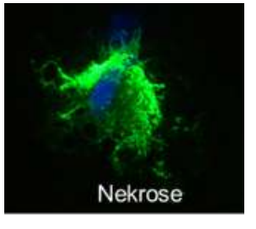
Toxizität - Materialeigenschaften und Wirkung

Wirkmechanismen

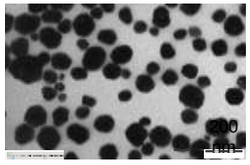
Risikoabschätzung

Kommunikation

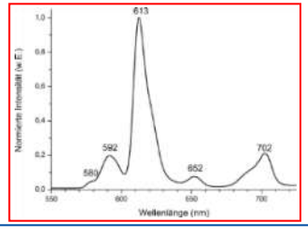




AP 1 - Highlights Herstellung und Charakterisierung



UV- Lumineszenz



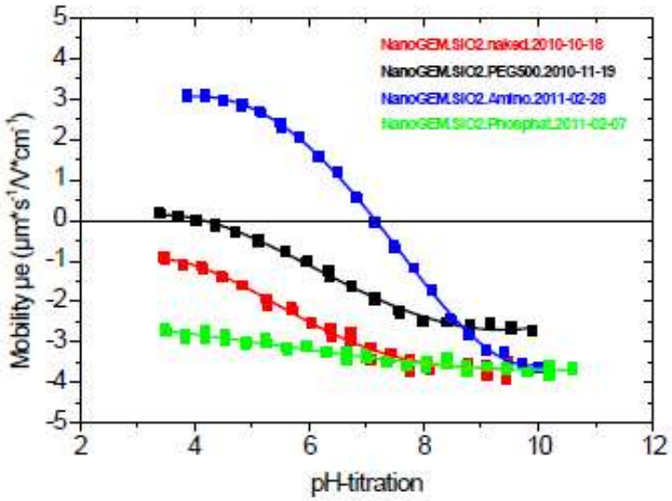
- 8 verschiedene Nanomaterialien, mit Variationen des Coatings, Dopings und lumineszenter Markierungen, hergestellt, charakterisiert, steril verteilt und getestet.
- Charakterisierungsprotokolle erstellt.
- Grundcharakterisierungen: Partikelgrößenverteilung in Flüssigkeiten, Zetapotential, Primärpartikelgrößenverteilung, chemischen Zusammensetzung, Oberflächenchemie, Oberflächenkonzentration, Oberflächenreaktivitäten, Kristallinität, Agglomeratstabilität, organische Kontaminationen, ggfls. Lumineszenz.
- Charakterisierungsdatenblätter erstellt.

AP 1 - Highlights Herstellung und Charakterisierung

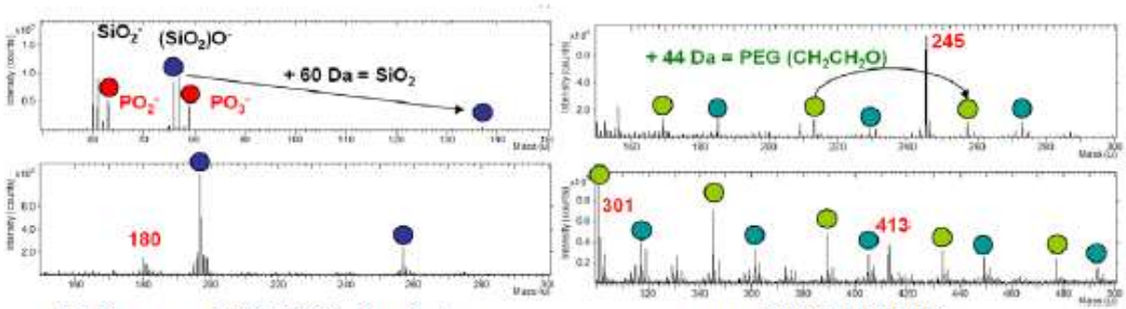
- Vergleichende Charakterisierung der Materialeigenschaften auf 119 Seiten zur Korrelation der beobachteten Expositions- und Gesundheits-Effekte

- Datenblätter und Methoden sind kompatibel mit dem nano-spezifischen Appendix R7.1 der REACH Richtlinien (ECHA 2012).

Deliverable 1.3.1: CHARAKTERISIERUNGSBERICHT ZU ALLEN MATERIALIEN



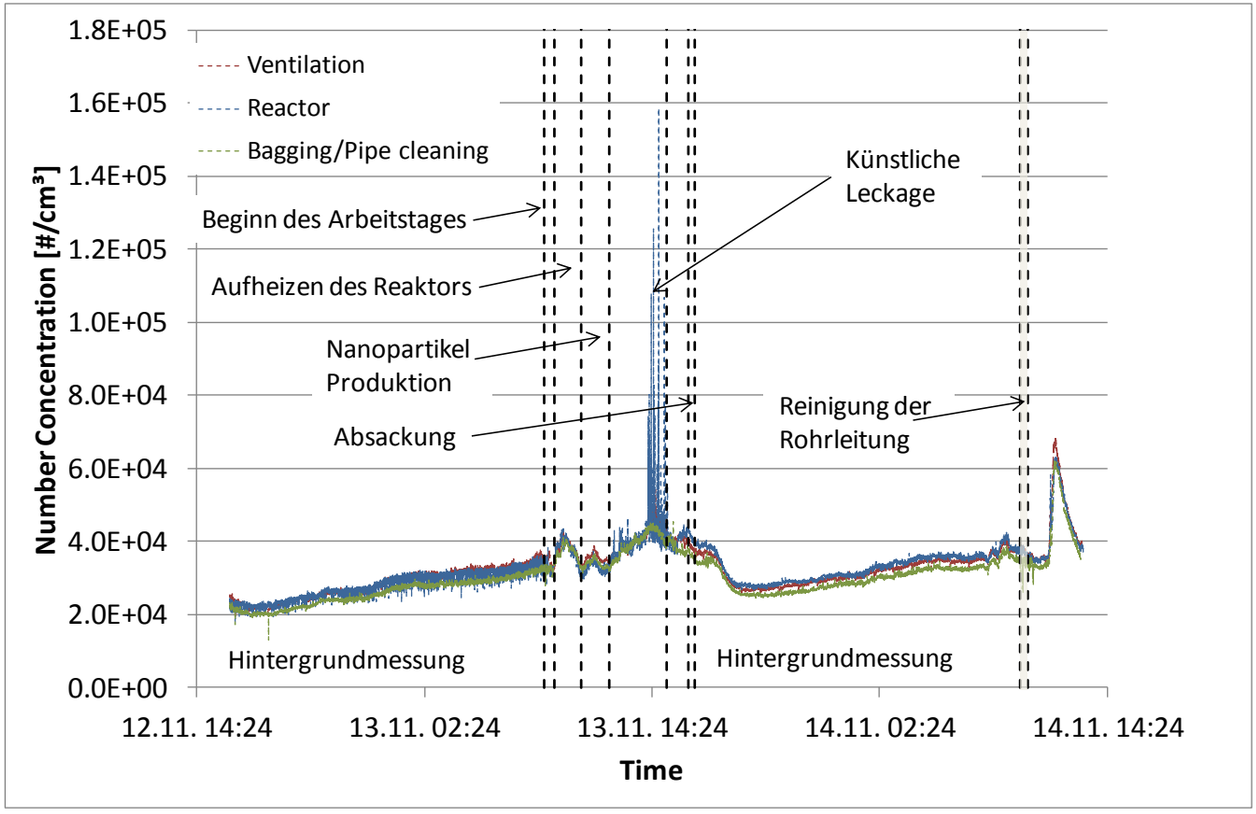
The *surface chemistry* molecular origin is highlighted by SIMS measurements of fragment ions from the top 1 to 3 nm of the nanomaterial's surface after washing with deionized water to remove any non-bound organic components, pelletting by hard sedimentation, drying (40,000 rpm for 2h, nanoGEM SOP SIMS).



SIMS: nanoGEM.SiO2.phosphate nanoGEM.SiO2.PEG

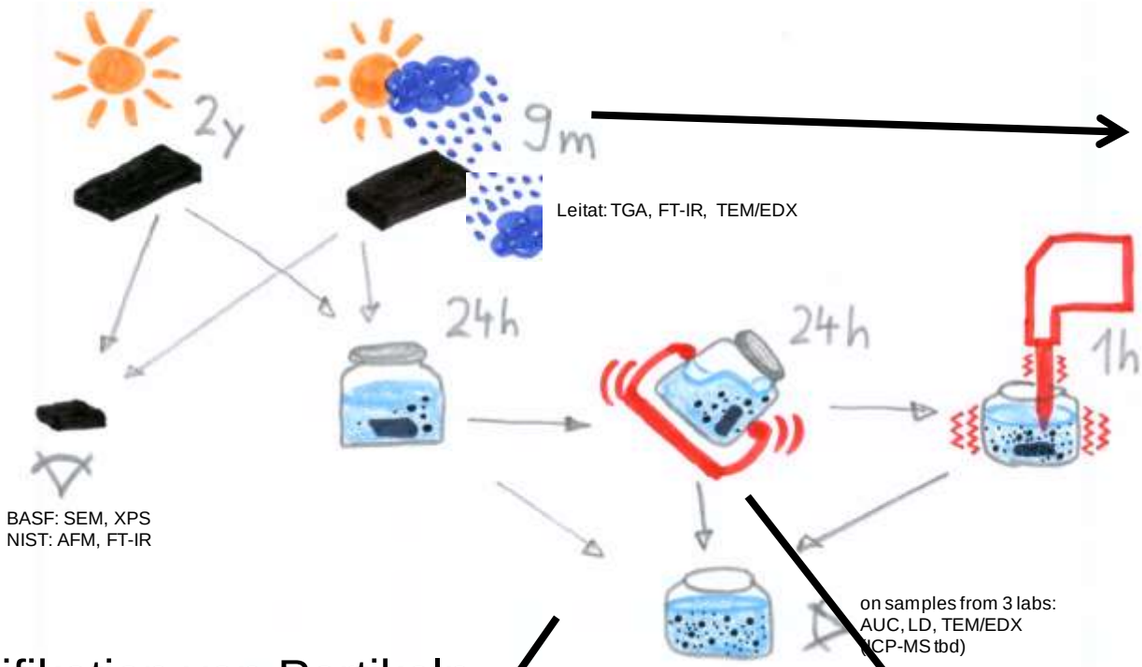
AP 2 - Arbeitsplatzmessungen

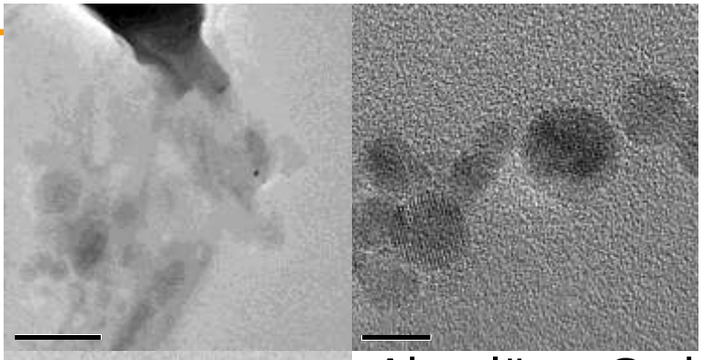
- Tiered Approach weiter entwickelt zur Erfassung der Exposition gegenüber NP am Arbeitsplatz; SOPs verfasst (s. Poster)
- Erste Messungen an Pilotanlage zur NP Synthese gemäß diesem dreistufigen Ansatz durchgeführt, zweite Messkampagne Anfang Februar
- Hierbei: Messung an unterschiedlichen Orten sowie Herbeiführung einer „künstlichen“ Leckage zur Validierung der Strategie
- Alle typischen Arbeitsschritte ergaben keine erhöhte Konzentration, aber Leckage wurde detektiert, vgl. Monitoring (s. Abb.)
- Erkenntnisse aus den Messungen fließen in
- Aktualisierung der SOPs basierend auf den neuen Erkenntnissen

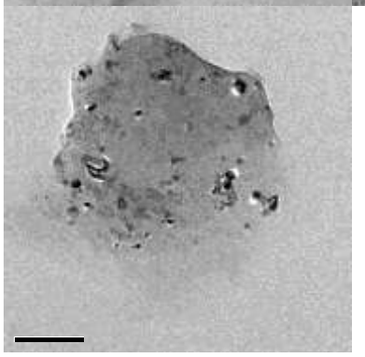


Poster

AP 2 - NP-Freisetzung durch Bewitterung

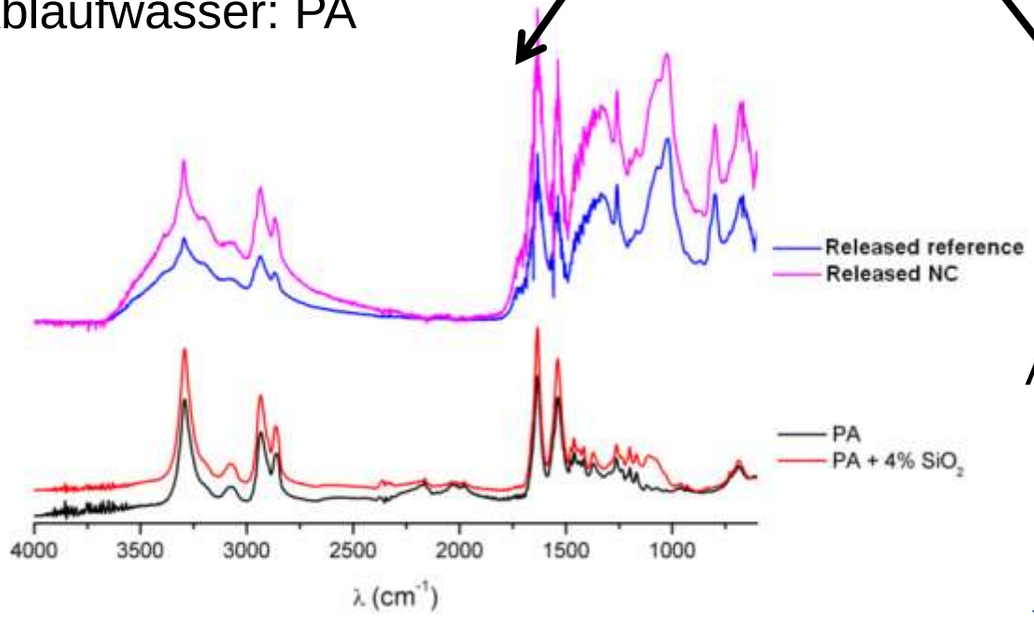


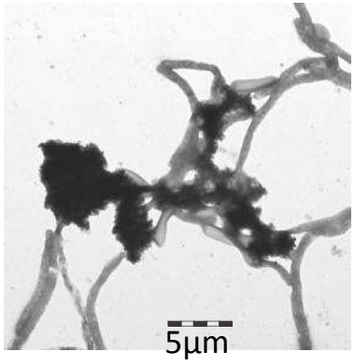


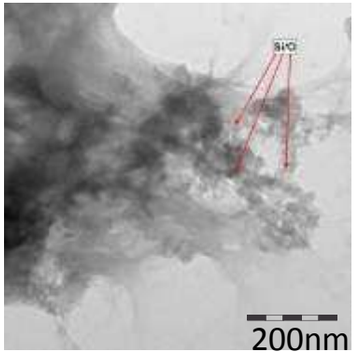


Abgelöste Stukturen *während* UV+Regen (Leitat, Spanien): Ablaufwasser, PA + 4% SiO2

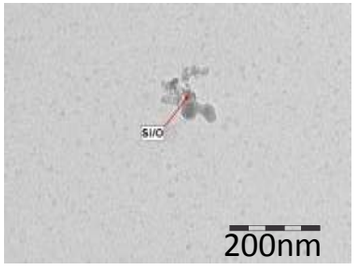
IR-Identifikation von Partikeln im Ablaufwasser: PA







Abgelöste Strukturen im Schüttler *nach* UV (BASF): Ablaufwasser, PA + 4% SiO2

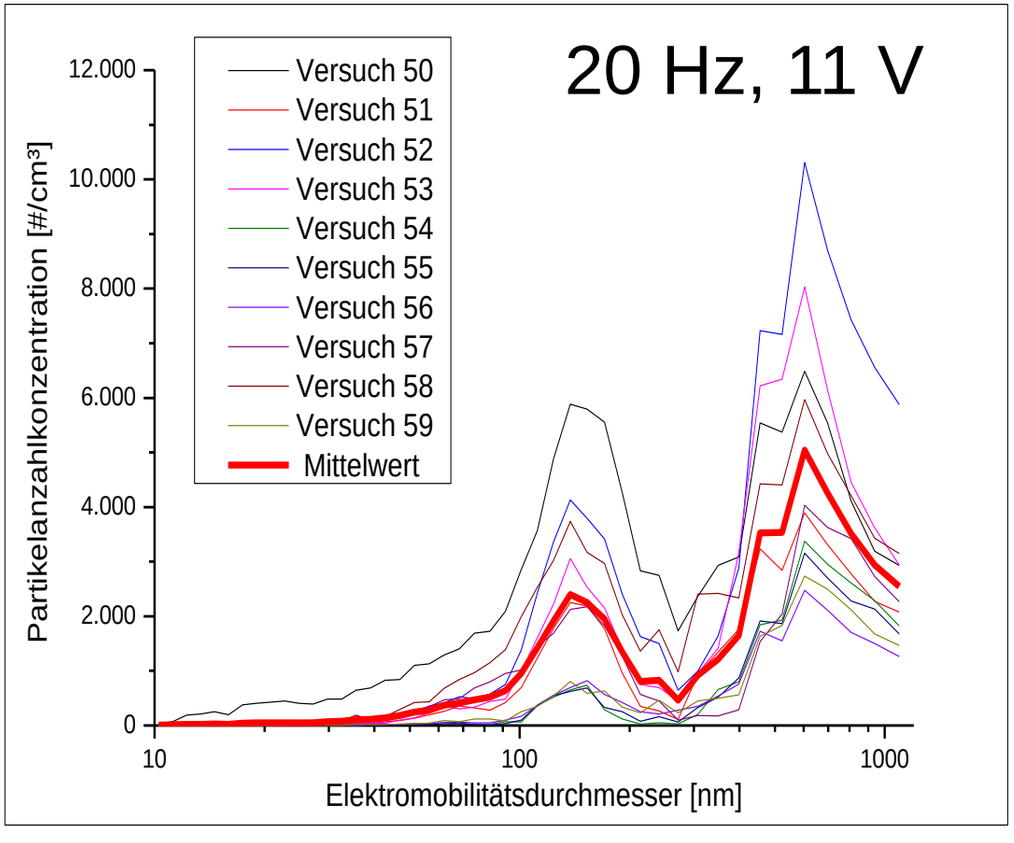


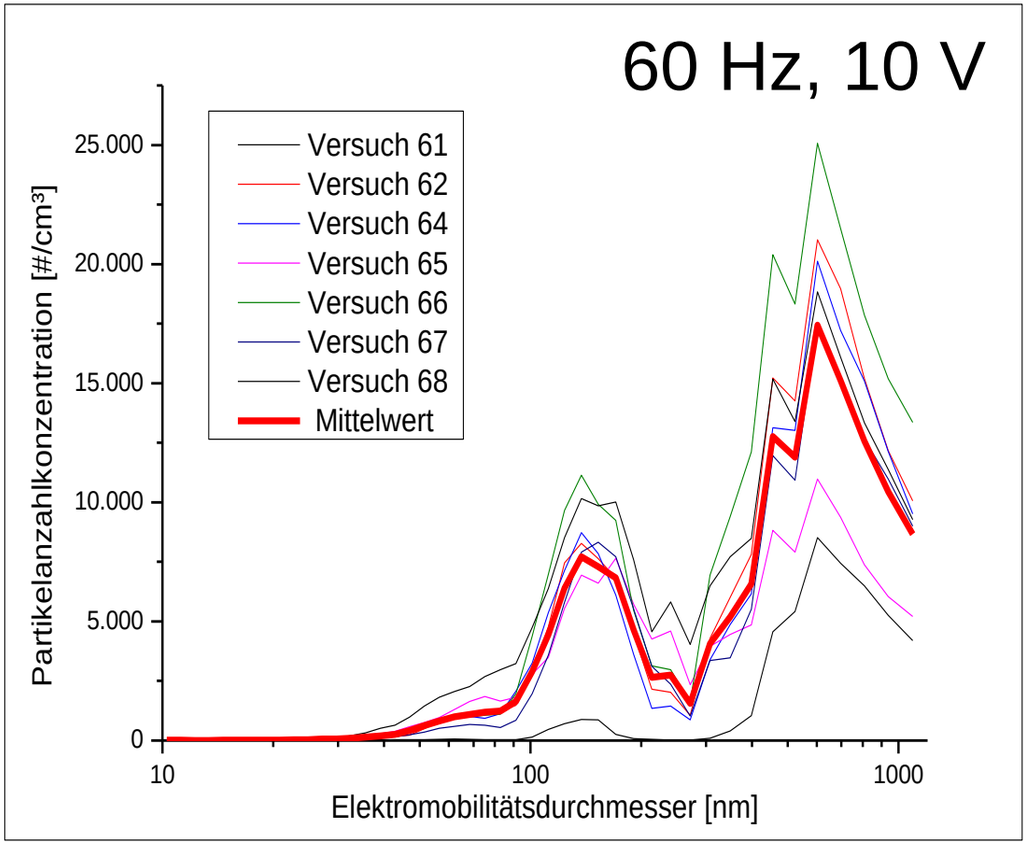
AP 2 - NP Freisetzung durch mech. Beanspruchung

- Drei vergleichbare Prüfstände bei BASF, Bayer und IUTA aufgebaut
- Möglichst Vermeidung von Hintergrundkontamination
- Verwendung gleicher Materialien und Schleifparameter
- Messungen derzeit im Gange
- Eingang in nationale und internationale Normierung

AP 2 - Staubungsneigung von Pulvern

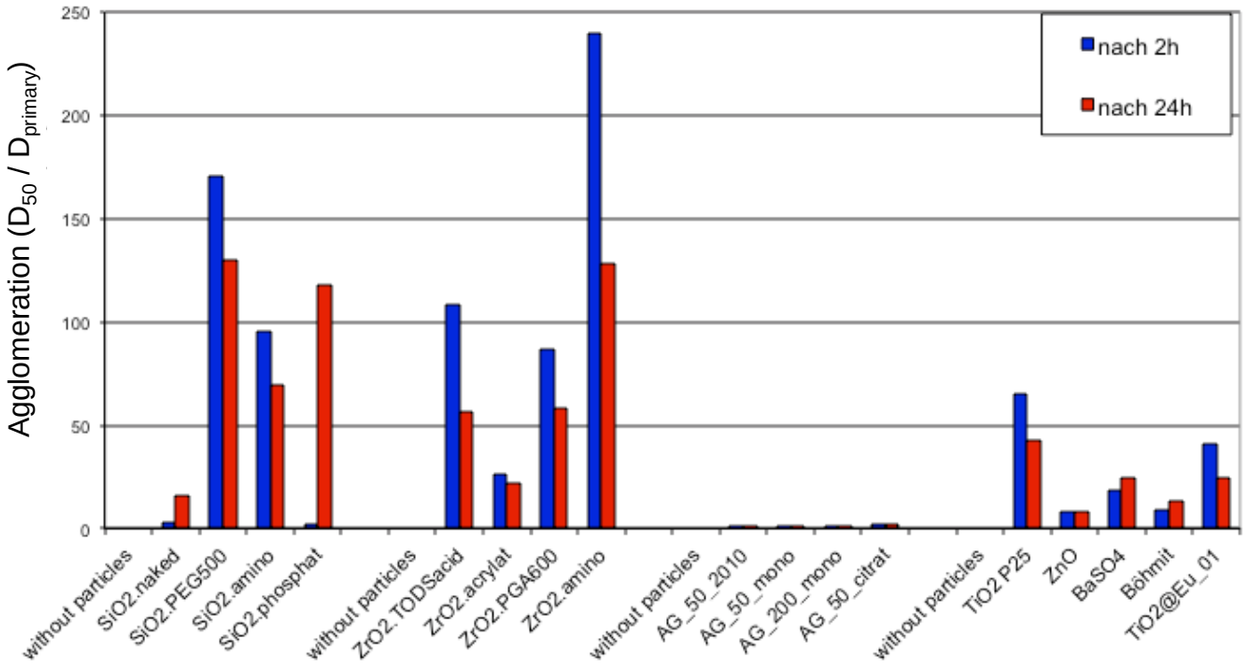
- Untersuchung mit Schwingbett-Aerosolgenerator
- Die Partikelanzahlkonzentrationen zeigen in Abhängigkeit vom Material bei Frequenzen von 20 bis 60 Hz ein Maximum. In höheren Frequenzbereichen sinkt die Partikelanzahlkonzentration wieder ab. Bei 20 und 60 Hz entstehen ähnlich Größenverteilungen





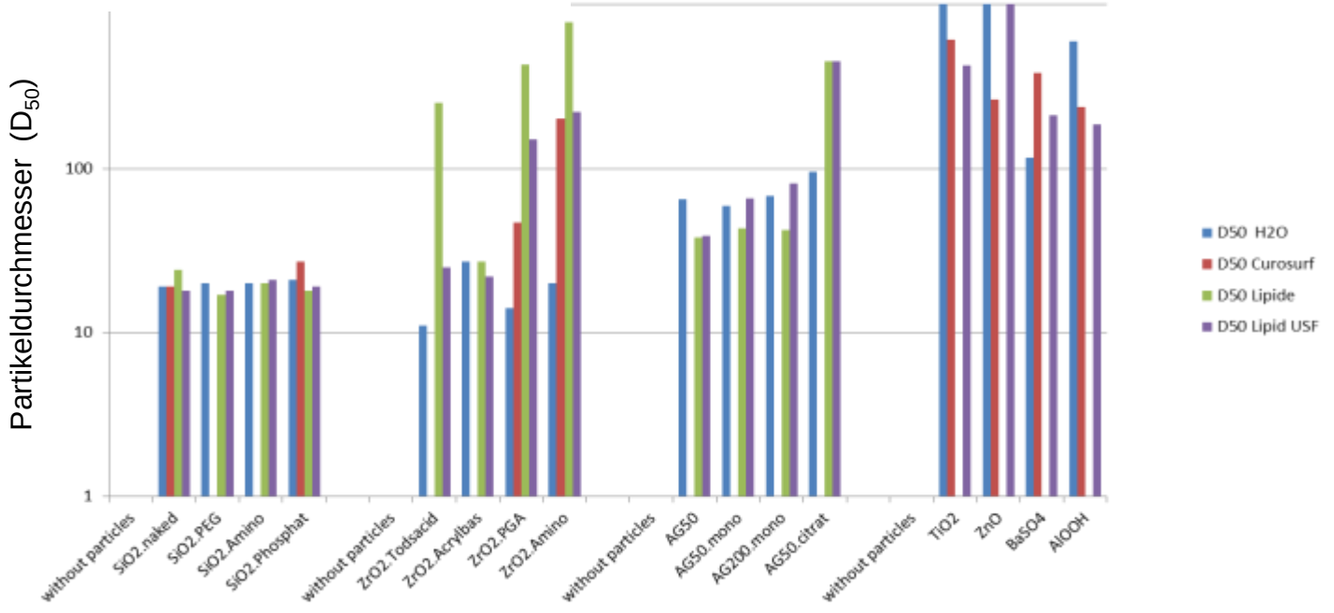
Größenverteilungen mit 350 mg ZnO

AP Q - Agglomerationsverhalten nach Dispersion



nanoGEM Partikel in Zellkulturmedium (DMEM, 10% FKS)

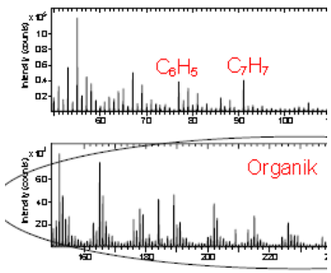
nanoGEM Partikel in Lipiden (CuroSurf™)

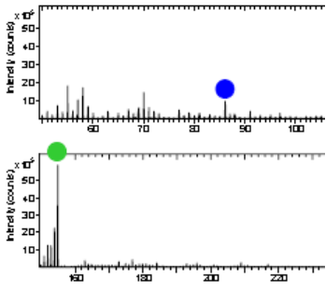


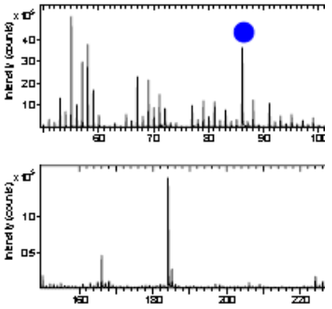
AP Q - Adsorption von Biomolekülen: Lipide (CuroSurfTM)

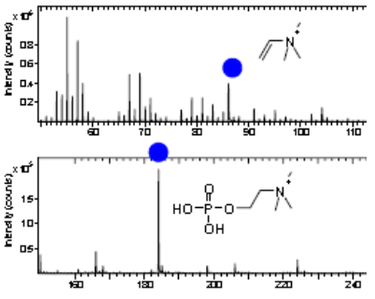
Referenzmaterialien in D_2O + Curosurf^{TM} : Surface coverage after pelletting/washing

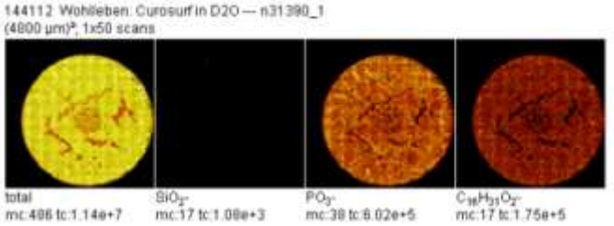
TiO2 NM105 BaSO4 NM220 Böhmit NanoCare Curosurf ref



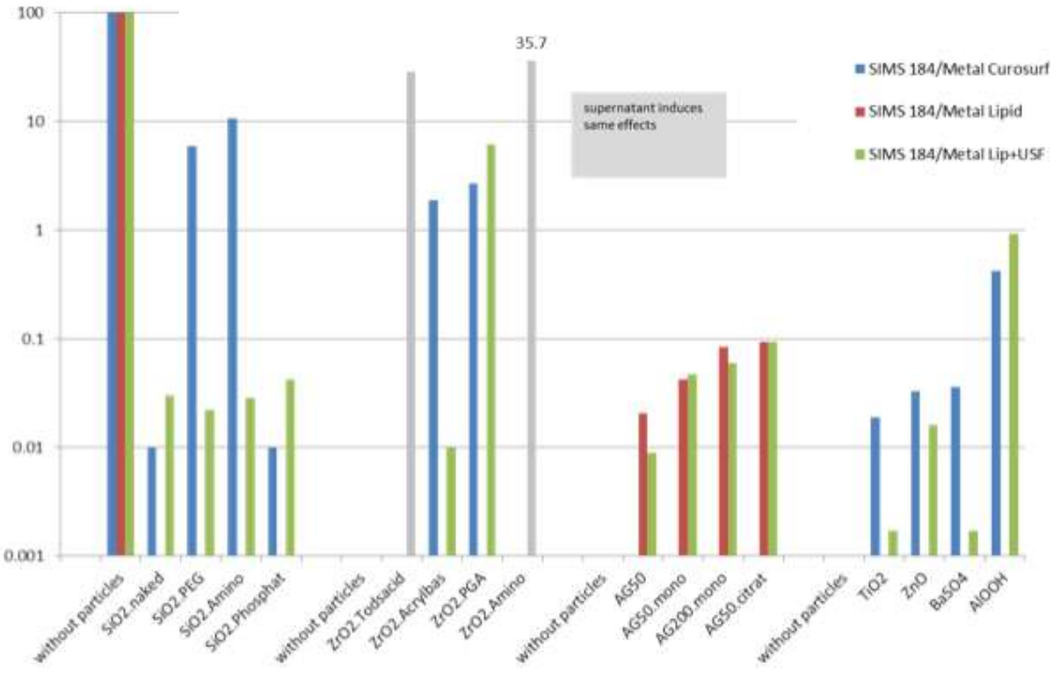




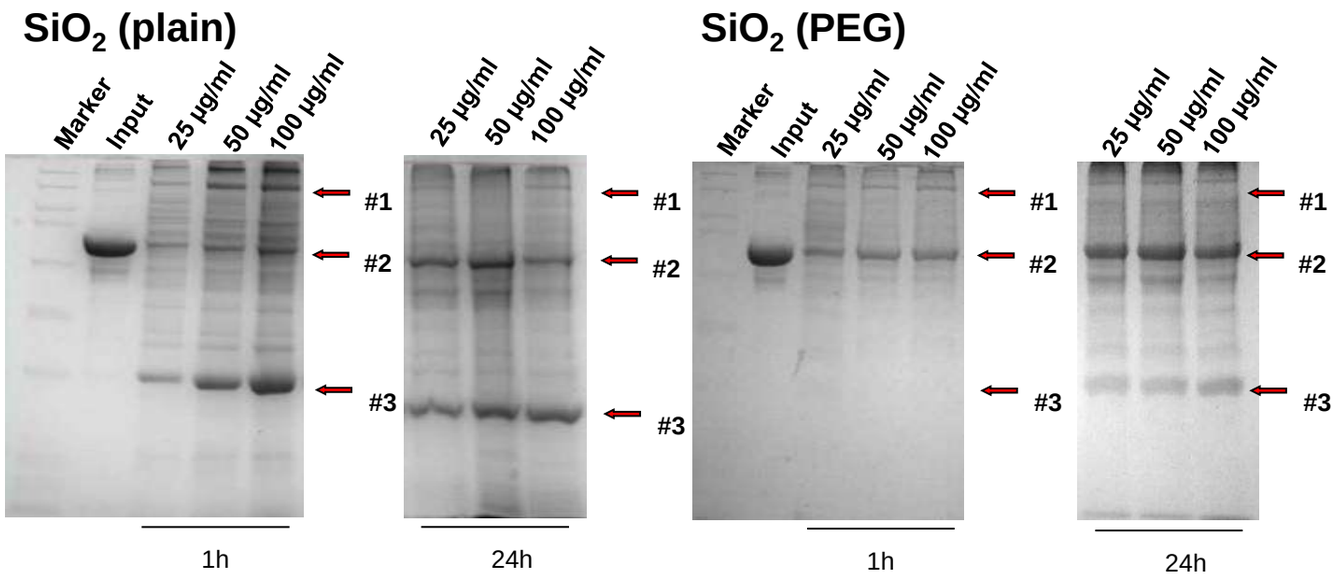




Phospholipid affinity: SIMS peak ratio

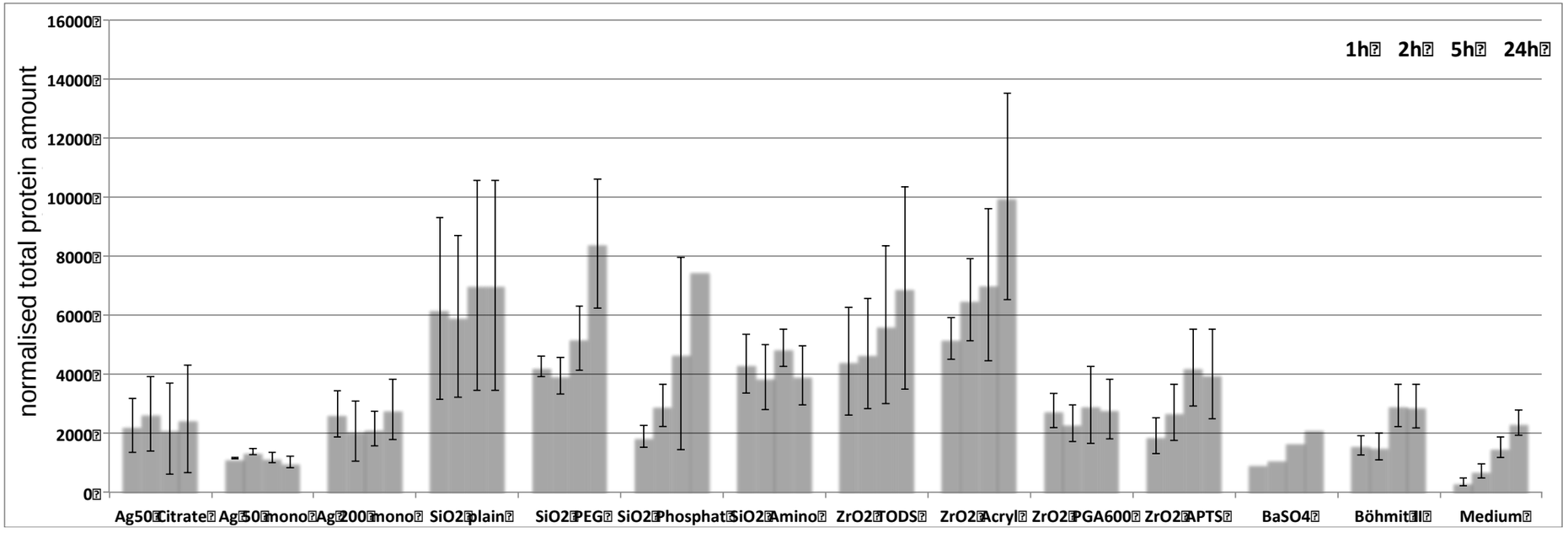


AP Q - Adsorption von Biomolekülen: Proteine (1D Gel)



Poster

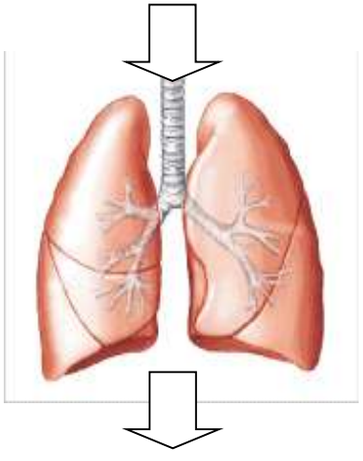
Gesamtprotein



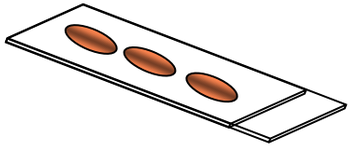
AP 3 - Aufnahme/Verteilung von NP in Zellen und Geweben

AP 3.2: Qualitative u. quantitative Lokalisation von NP in vivo
Lunge (und asservierte Organe)

Intratracheale Instillation

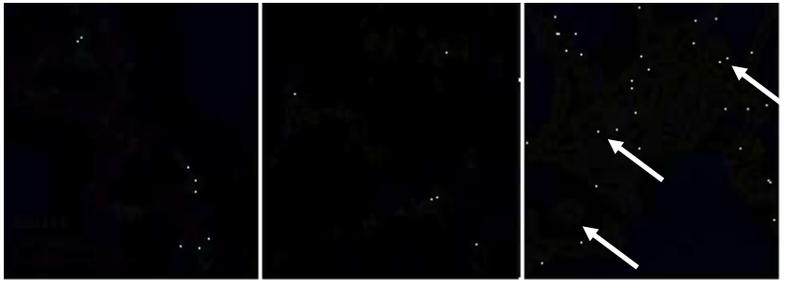


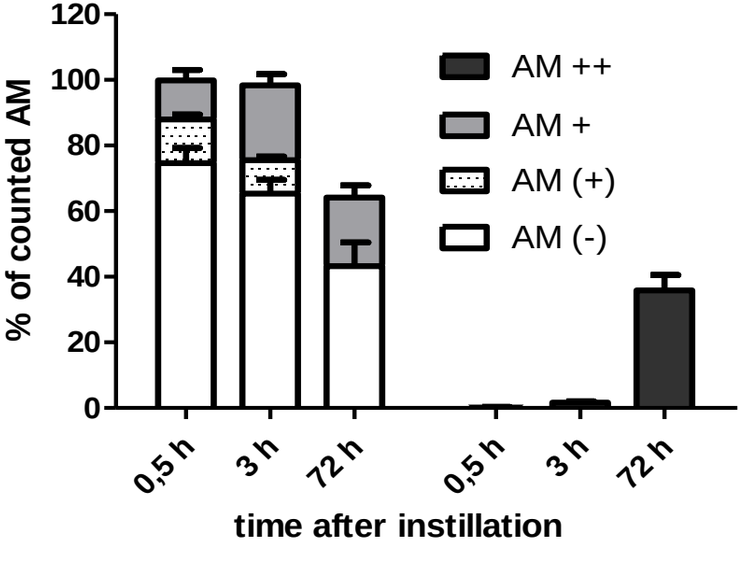
- **3 Tage**
- Kryoschnitte



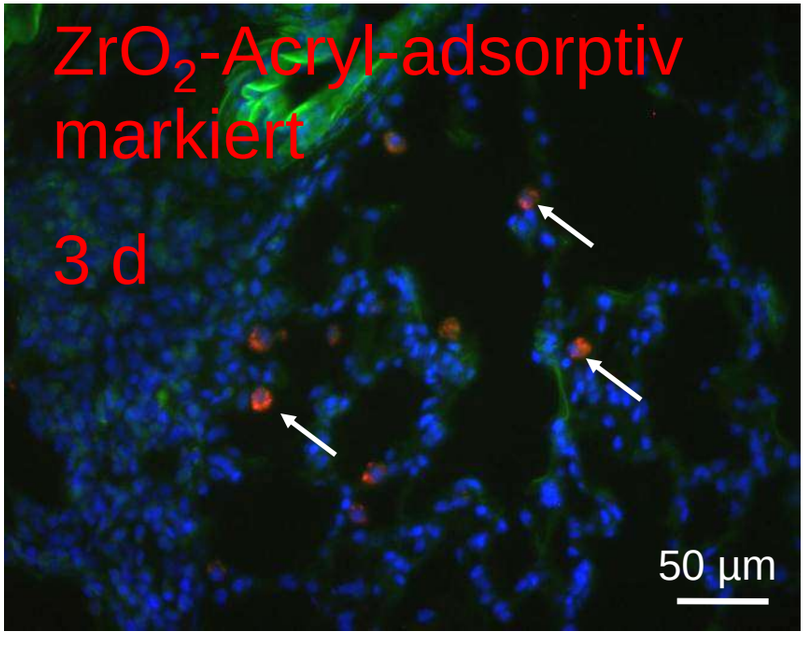
- PFA-Fixierung
- Immunhisto. (CD68)

SiO_2-NP (FITC-markiert) agglomerieren in der Lunge und werden in Alveolarmakrophagen (CD68+) angereichert





Gleiche Befunde u.a. für adsorptiv markiertes ZrO_2-NP (rot)



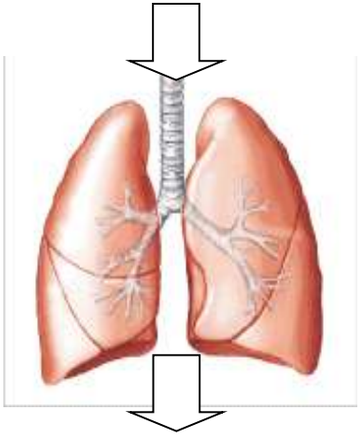
Keine Anreicherung von SiO_2-FITC) in:

Dendritischen Zellen (Ox62+)
Typ-2-Epithelzellen (ALP+, Sudan Bl.+)

AP 3 - Aufnahme/Verteilung von NP in Zellen und Geweben

AP 3.2: Qualitative u. quantitative Lokalisation von NP in vivo
Lunge (und asservierte Organe)

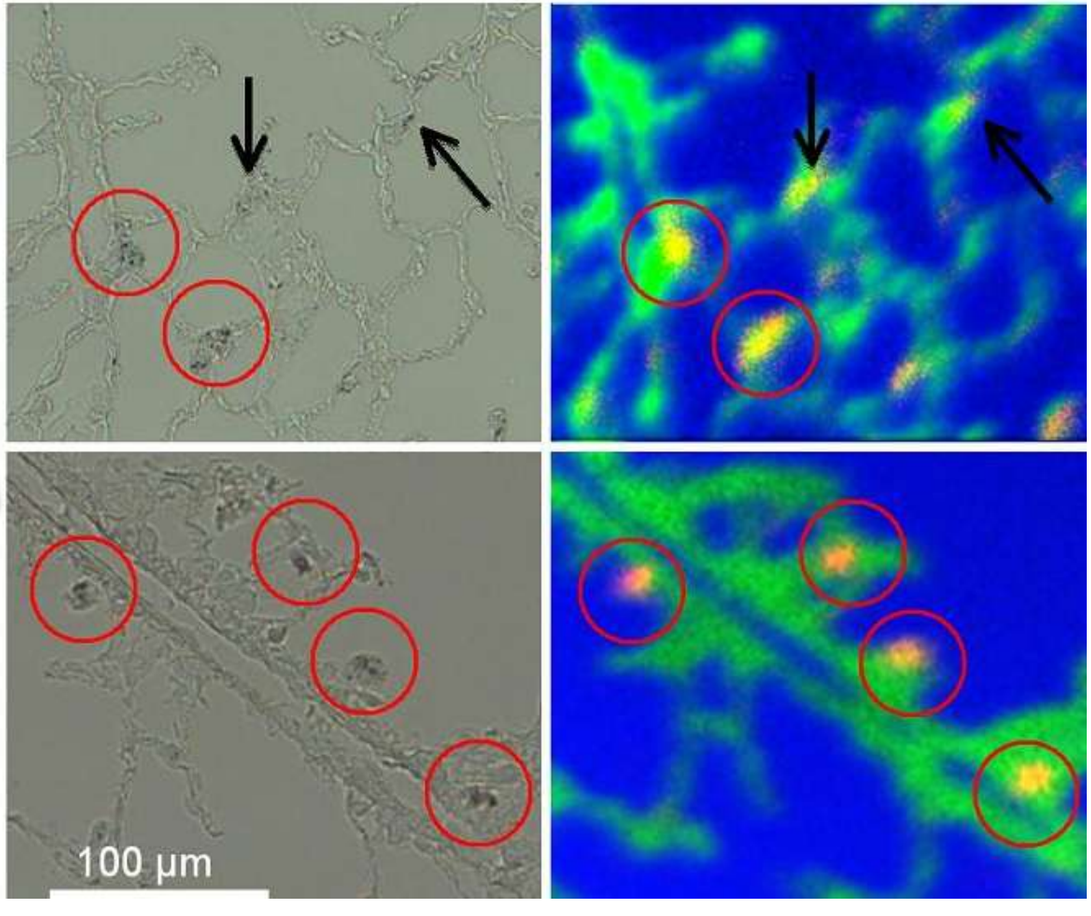
Intratracheale
Instillation
Ag50-NP



- **3 Tage**
- **Kryoschnitte**
- **PFA-Fixierung**
- **dH20**
- **Mikroskopie**
- **ROI festlegen**
- **trocknen**
- **ROI übertragen**
- **ToF-SIMS**

Poster

ToF-SIMS Analyse Ag50-NP behandelter Lungen:
Anreicherung von Ag50 in Alveolarmakrophagen bestätigt



Lichtmikroskopie

ToF-SIMS Bild
Ag – organische - Si

AP 4 - Nanopartikel Toxikologie in vitro

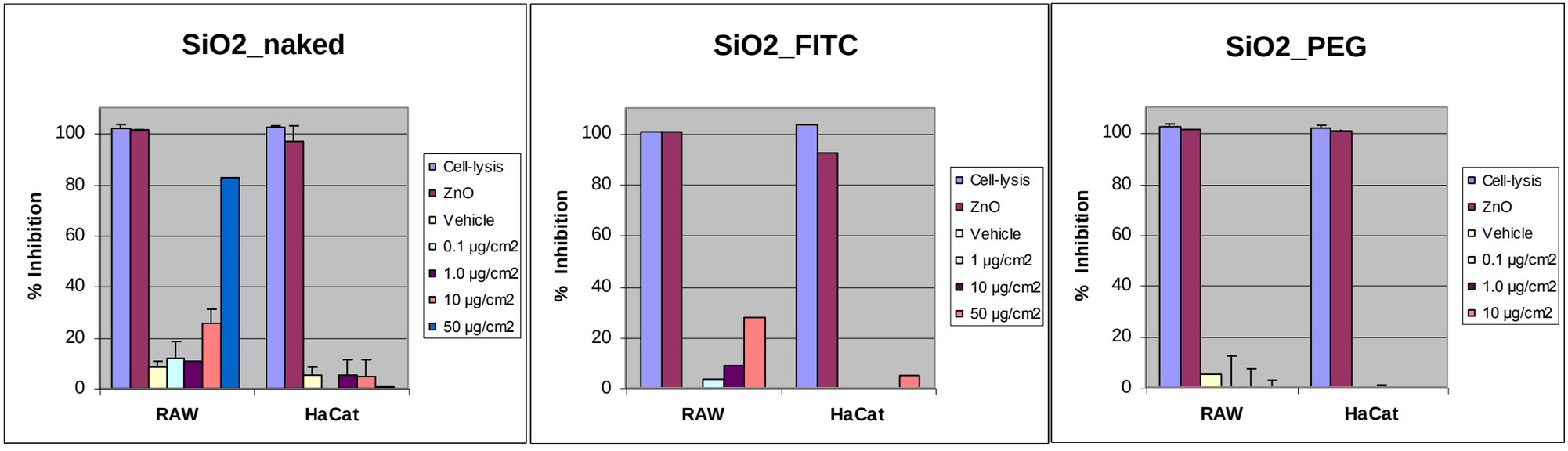
***in vitro* Toxizitäts-Tests: WST8-Assay** metabolische Aktivität proliferierender Zellen

- **RAW264.7** Makrophagen werden deutlich inhibiert durch **SiO_2_naked** und **SiO_2_FITC**

- Oberflächen-Modifizierung mit PEG blockiert toxische Wirkung bei **SiO_2_PEG**

- SiO_2_Amino und SiO_2_Phosphat ebenfalls ohne Wirkung auf RAW264.7

Inhibition metabolische Zellaktivität (RAW264.7 und HaCaT)



AP 4 - Nanopartikel Toxikologie in vitro

***in vitro* Toxizitäts-Tests: WST8-Assay** Inhibition Zell-Viabilität

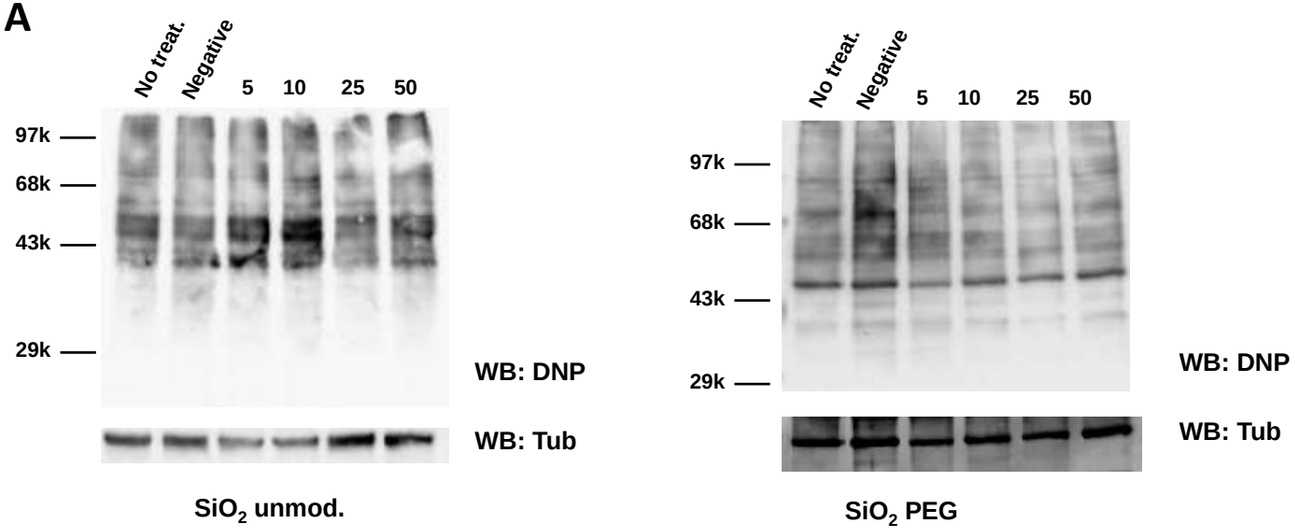
Übersicht: deutlicher toxischer Effekt auf proliferierende Zellen durch mehrere NanoGEM Materialien

	Zell-Viabilität für NanoGEM NM im WST8-Assay Inhibition wurde festgestellt bei einer Dosierung von [µg/cm^2] :					
	RLE	**RAW**	**HaCat**	**NRK**	**NIH**	**A549 Kontrolle**
SiO_2-naked	keine	**10µg/cm^2**	keine	keine	**10µg/cm^2 (gering)**	keine
SiO_2-PEG	keine	keine	keine	keine	keine	keine
SiO_2-Amino	n.d.	keine	keine	keine	n.d.	keine
SiO_2-Phosphat	n.d.	keine	keine	keine	n.d.	keine
ZrO_2-TODacid	keine	keine	keine.	keine	keine	n.d.
ZrO_2-Acrylbas	10µg/cm^2	keine	keine	keine	keine	n.d.
ZrO_2-APTS	**10µg/cm^2**	keine	keine.	keine	keine	n.d.
ZrO_2-PGA600	keine	keine	keine	keine	keine	n.d.
Ag50	**1 µg/cm^2**	keine	n.d.	n.d.	**1 µg/cm^2**	keine
Ag50-Citrat	**10µg/cm^2**	keine	n.d.	n.d.	**10µg/cm^2**	keine
Ag50-mono	**10µg/cm^2**	keine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ag200-mono	keine (**50µg/cm^2**)	keine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

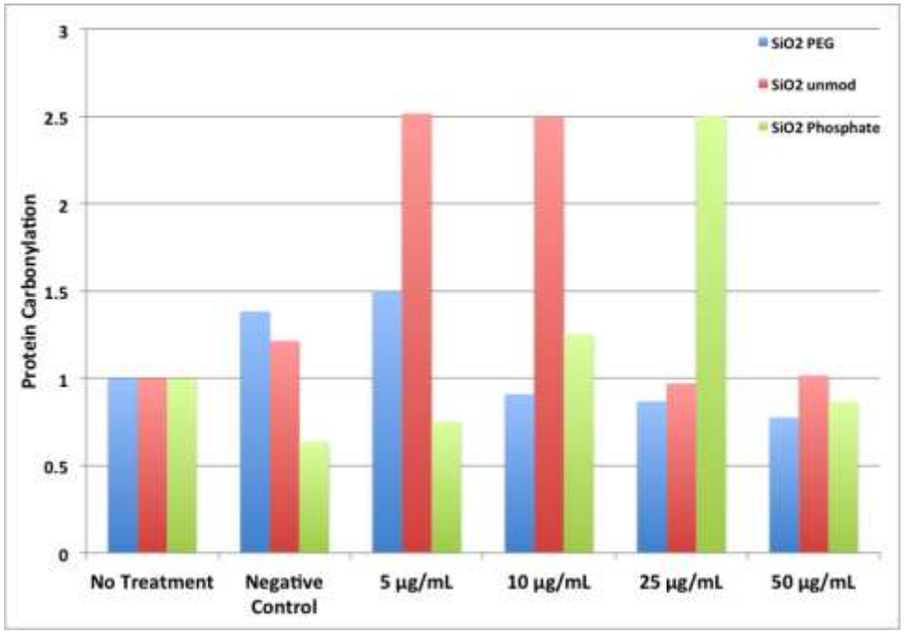
AP 5 - Nanopartikel Toxikologie: Wirkmechanismen

Identifizierung Nanopartikel induzierter Zellschädigung durch Proteinoxidation

A



B



Quantifizierung der Proteinoxidation nach SiO_2 NM Exposition von NRK-52E Zellen.

Nacktes SiO_2 führt bei geringen Konzentrationen zur Proteinoxidation, SiO_2 Phosphate bei höheren Konzentration, SiO_2 PEG zeigt keinen signifikanten Effekt.

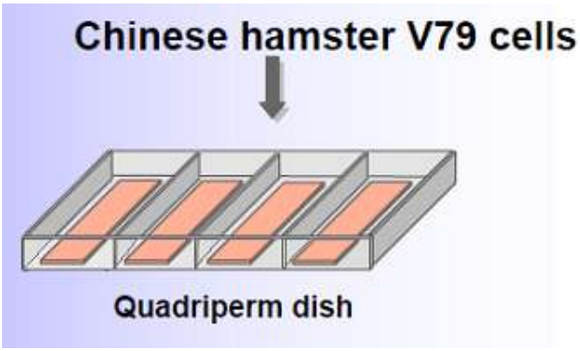
A) Dose dependent analysis of protein carbonyl formation in NRK-52E cells treated with different amounts of SiO2 unmodified and SiO2 PEG. Doses are given in µg/ml. Carbonyls are coupled to Dinitrophenyl- hydrazine. The DNP conjugate can be detected with DNP specific antibodies in western blots. Normalization was done with tubulin. Experiments were done for all nanoGEM nanomaterials in triplicates.
B) Quantification of one representative experiment for SiO2 unmodified (positive), SiO2 PEG (negative) and SiO2 Phosphate (positive).

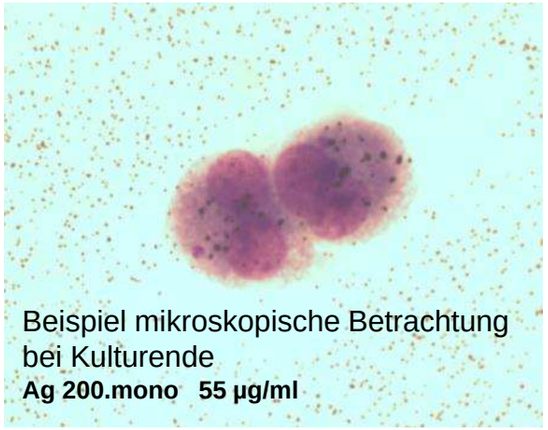
Vergleichende Untersuchungen zur *in vitro* Genotoxizität

Mikrokerntest an V79-Zellen (Chinese Hamster) zur Erfassung von chromosomalen Aberrationen oder Fehlverteilungen.

Poster

Mikrokerntest in vitro (OECD Guideline 487)
Im Mikrokerntest in Vitro wurden an V79 Zellen (Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters) verschiedene NM auf ihr mögliches mutagenes Potenzial überprüft chromosomale Aberrationen oder Fehlverteilungen hervorzurufen die als Mikrokerne neben einem Hauptkern sichtbar werden.




Beispiel mikroskopische Betrachtung bei Kulturende
Ag 200.mono 55 µg/ml

Prüfmuster	Zytotoxisch	Ergebnis
Böhmit I (fein)	schwach ab 50 µg/ml	nicht mutagen
Ag 200.mono	ab 55 µg/ml	mutagen ab 27,5 µg/ml
Ag 50.mono	ab 11 µg/ml	mutagen ab 11 µg/ml
SiO2 naked	ab 500 µg/ml	nicht mutagen
SiO2 Phosphat	schwach ab 100 µg/ml	nicht mutagen
SiO2 PEG 500	keine	nicht mutagen

Ziele

Erörterung der im Rahmen von NanoGEM erzielten Messdaten im Lichte der wissenschaftlichen Literatur

Berücksichtigung neuester externer Erkenntnisse zur Risikoabschätzung

Speziell: Risikoabschätzung im Hinblick auf

- **Chemikaliensicherheit**
- **Arbeitsschutz und**
- **Verbraucherschutz**

AP 6 - Abschätzung potentieller gesundheitlicher Risiken

- Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele TiO_2, SiO_2 und ZrO_2 (BASF)
- Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele Böhmit und Silber (Bayer)

Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele TiO_2, SiO_2 und ZrO_2

Endpunkt	Nano-TiO_2	Nano-SiO_2	Nano-ZrO_2
Akute Toxizität			
Reizwirkung			
Sensibilisierung			
Toxizität nach wiederholter Exposition			
Gentoxizität			
Karzinogenität			
Reproduktionstoxizität (Fruchtbarkeit)			
Reproduktionstoxizität (Entwicklung)			

Daten vorhanden (Nanomaterial)
Daten vorhanden (Nanomaterial ?)
Keine (validen) Daten vorhanden

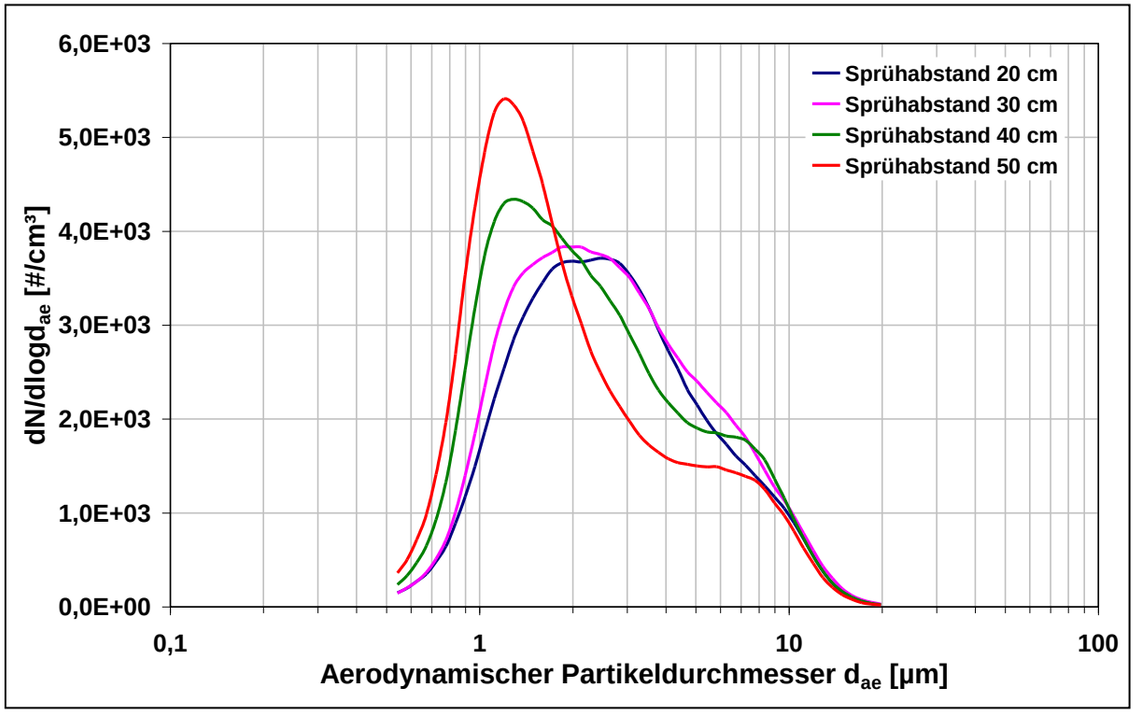
Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele Böhmit und Ag

Endpunkt	Nano-Böhmit	Nano-Silber
Akute Toxizität	möglich	möglich
Akute, lokale Reizwirkung	möglich	möglich
Sensibilisierung	möglich	Humanerfahrung? -> IVDK-Anfrage
Toxizität nach wiederholter Exposition	möglich (inhalativ)	möglich
Gentoxizität/ Mutagenität	möglich	möglich
Karzinogenität	?	?
Reproduktionstoxizität	möglich	(möglich)

Rot: auf Basis des Wirkprinzips beurteilt

AP 6 - Abschätzung potentieller gesundheitlicher Risiken

- Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele TiO_2, SiO_2 und ZrO_2 (BASF)
- Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele Böhmit und Silber (Bayer)
- Expositionsabschätzung synthetisch hergestellter NM aus verbrauchernahen Produkten (BfR)



AP 6 - Abschätzung potentieller gesundheitlicher Risiken

- Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele TiO_2, SiO_2 und ZrO_2 (BASF)
- Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele Böhmit und Silber (Bayer)
- Expositionsabschätzung synthetisch hergestellter NM aus verbrauchernahen Produkten (BfR)
- Übersicht zu Freisetzungsszenarien an Arbeitsplätzen (IUTA)
- Ansätze zur Gefährdungsabschätzung von NM am Arbeitsplatz (BAuA)

nanoGEM Abschlußkonferenz
in der BfR in Berlin
12.-13. 2013
Mehr auf www.nanogem.de

Poster

www.nanoGEM.de

Danke

Finanziert vom BMBF
(Förderkennzeichen 03X0105)