



nanoGEM

Nanomaterialien – Gesundheit, Exposition und Materialeigenschaften

Thomas A.J. Kuhlbusch



nanoGEM - Forschungsziele

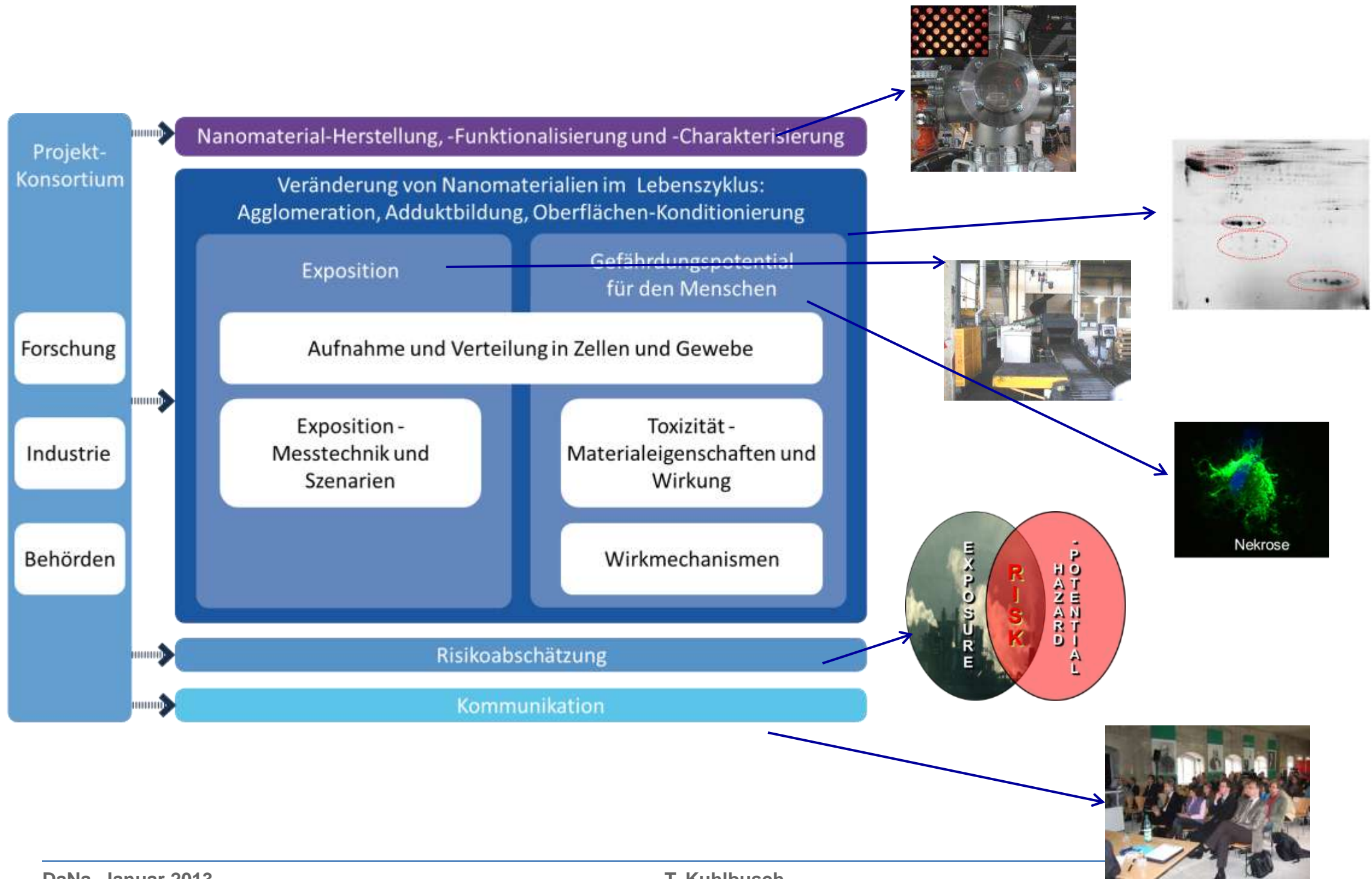
NanoGEM: Integrative Forschung zur Risikoabschätzung

- ?** Gibt es eine Exposition gegenüber nanostrukturierten Materialien? Wie hoch ist das Gefährdungspotential? Besteht ein Risiko?
- !** Interdisziplinäre und interessensübergreifende Forschung von Behörden, Forschungseinrichtungen und Industrie

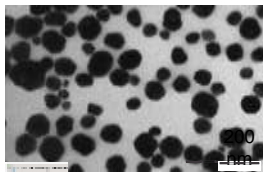
Forschungsziele z.B.:

- **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**

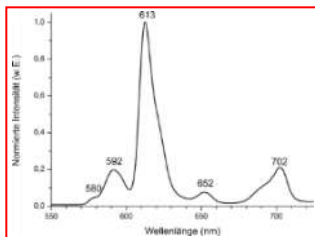
nanoGEM – 2010-2013



- 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.



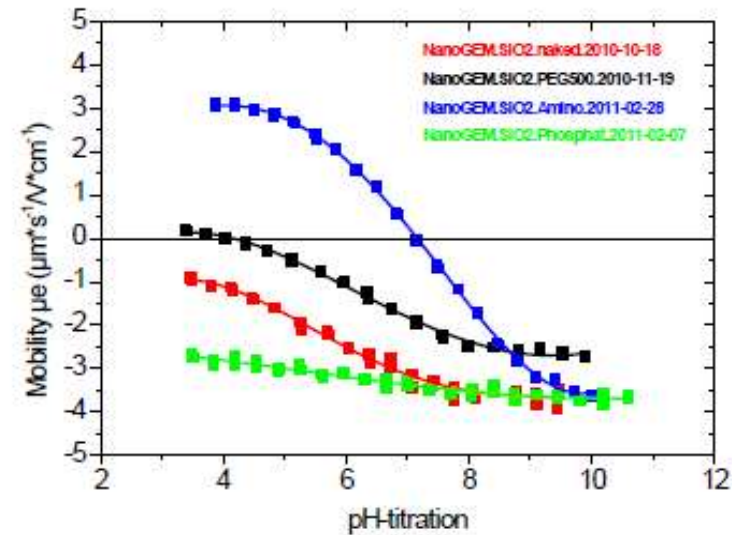
UV- Lumineszenz



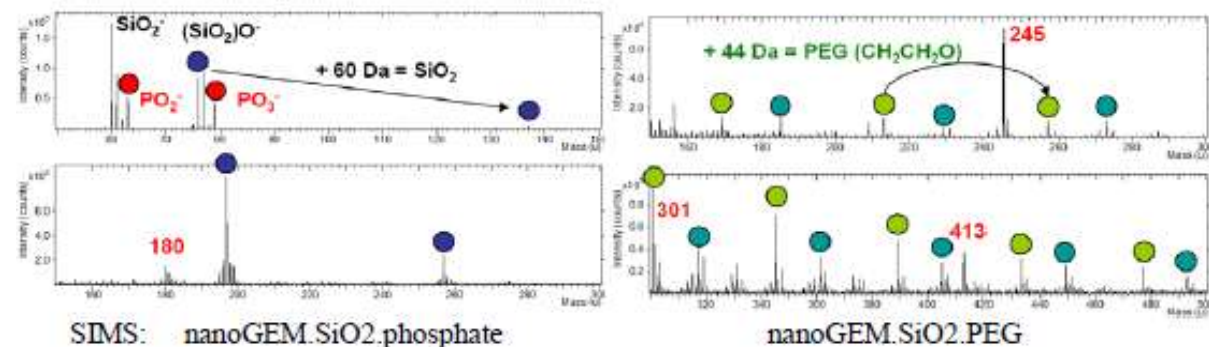
AP 1 - Highlights Herstellung und Charakterisierung

- 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

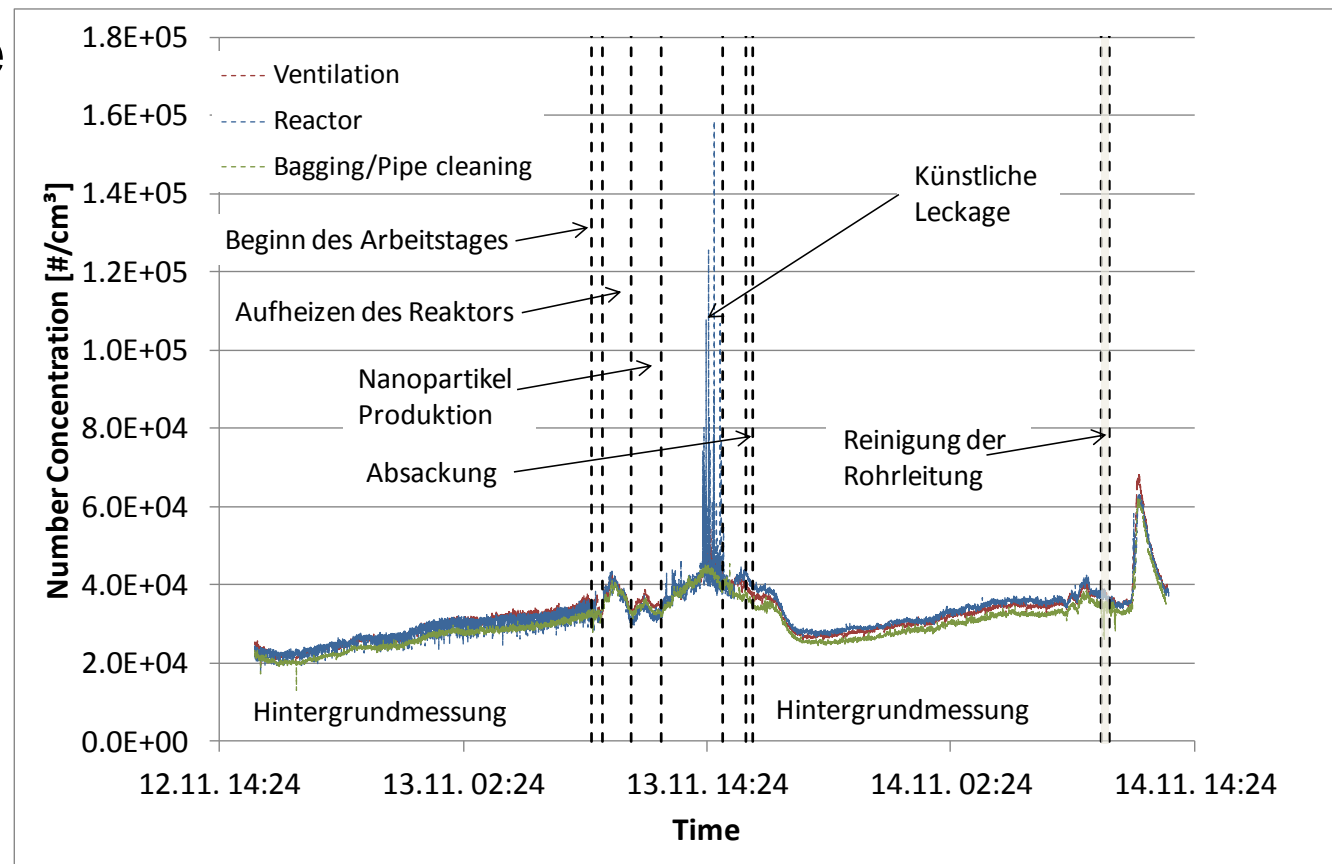


The *surface chemistry* molecular origin is highlighted by SIMS measurements of fragment ions from the top 1 to 3 nm of the nanomaterial's surface after washing with deionized water to remove any non-bound organic components, pelleting by hard sedimentation, drying (40,000 rpm for 2h, nanoGEM SOP SIMS).



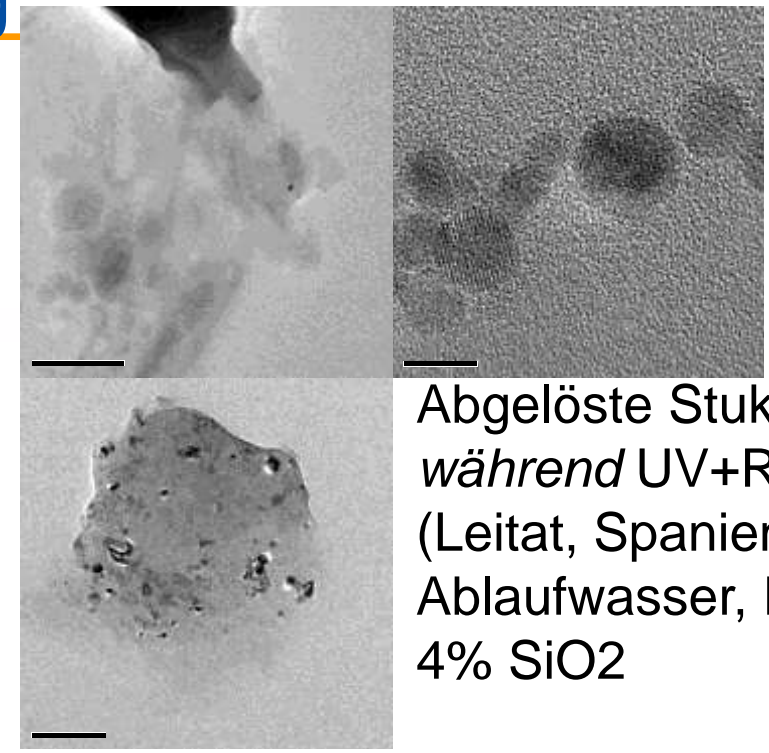
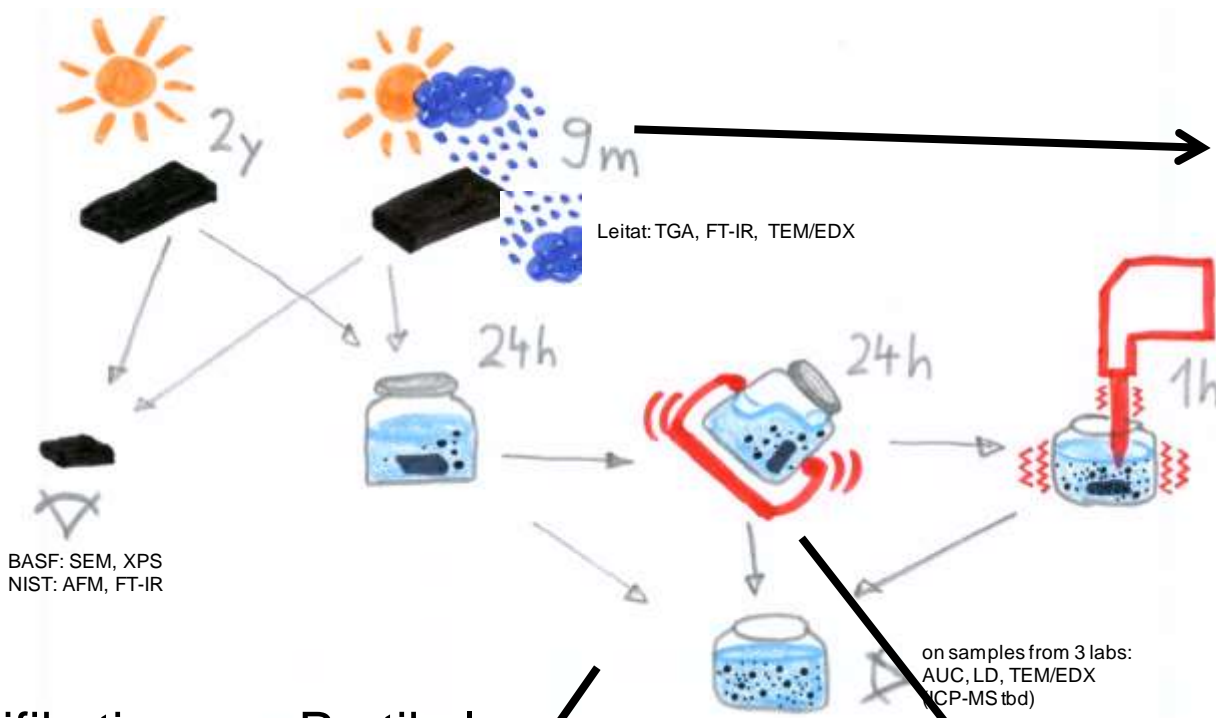
AP 2 - Arbeitsplatzmessungen

- 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



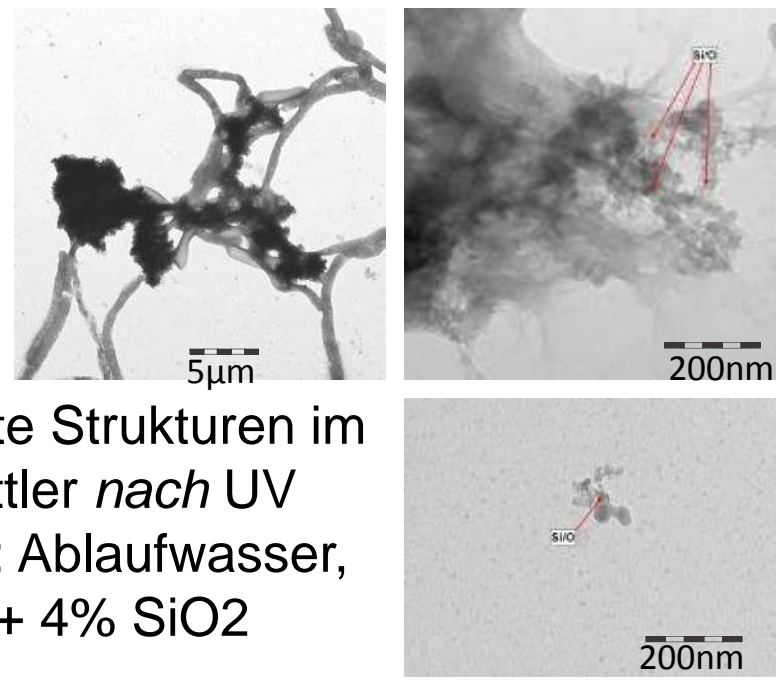
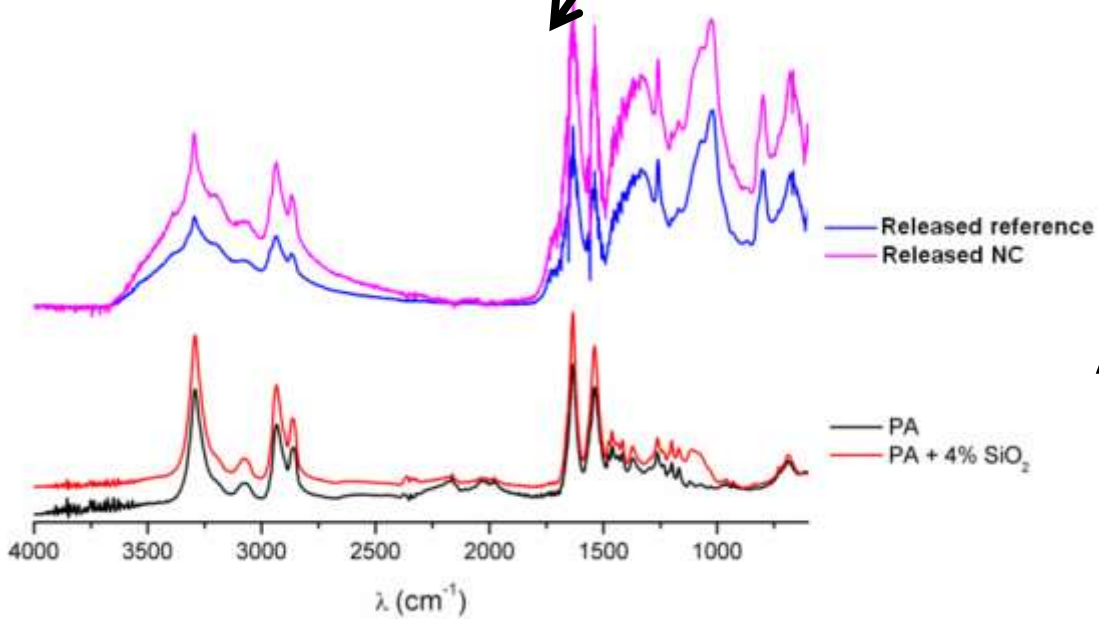
Poster

AP 2 - NP-Freisetzung durch Bewitterung



Abgelöste Strukturen 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

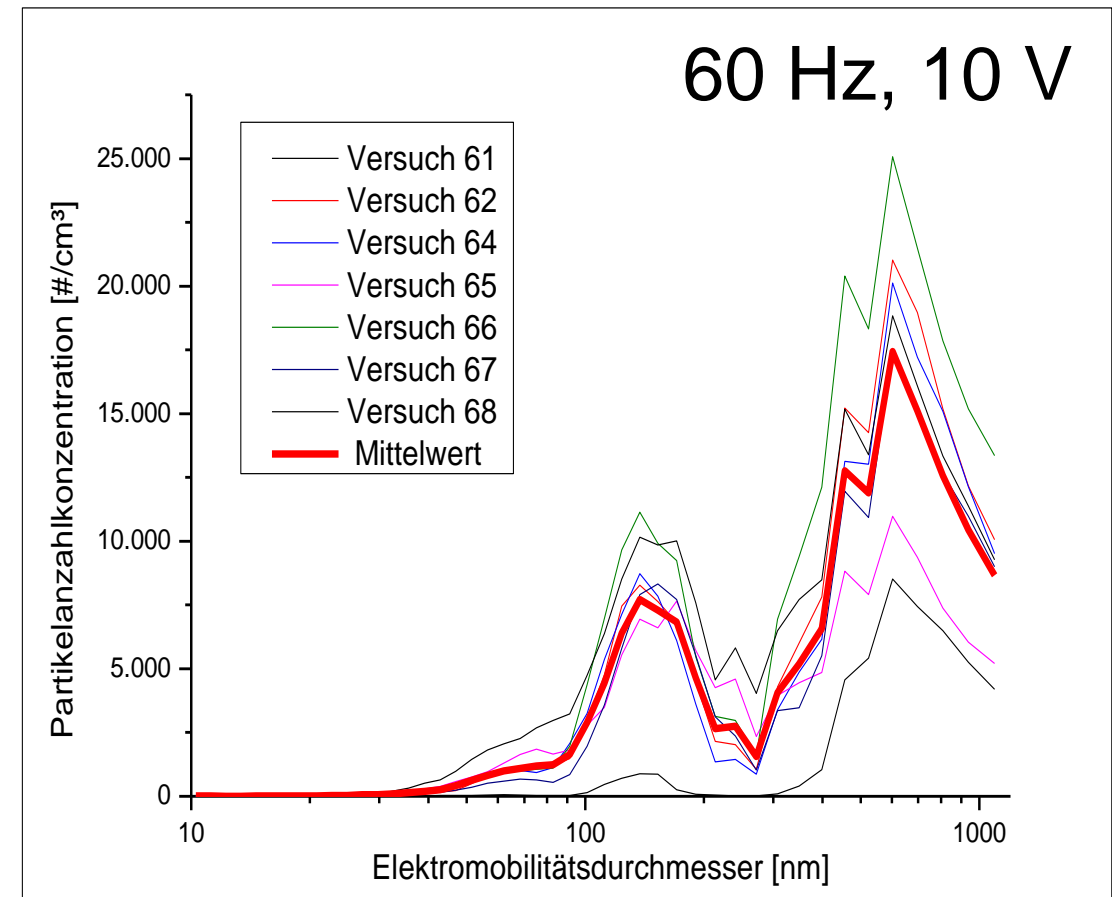
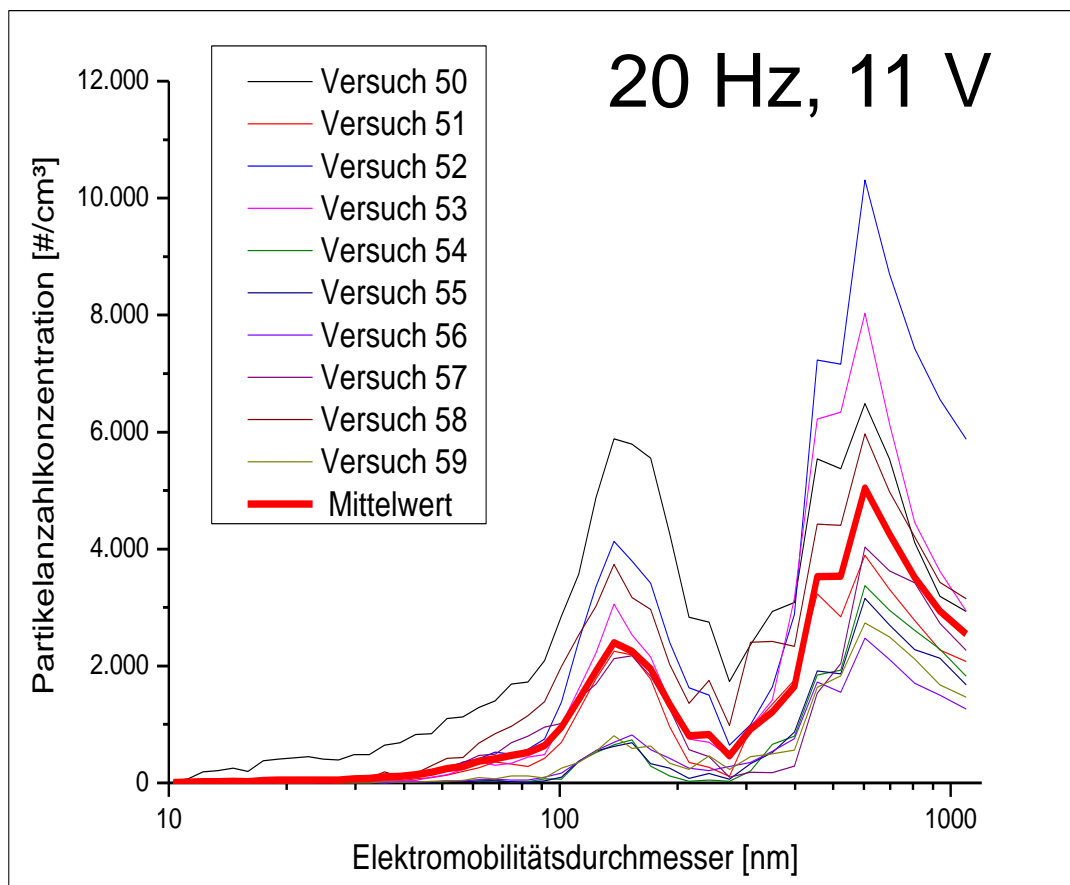
AP 2 - NP Freisetzung durch mech. Beanspruchung

- 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



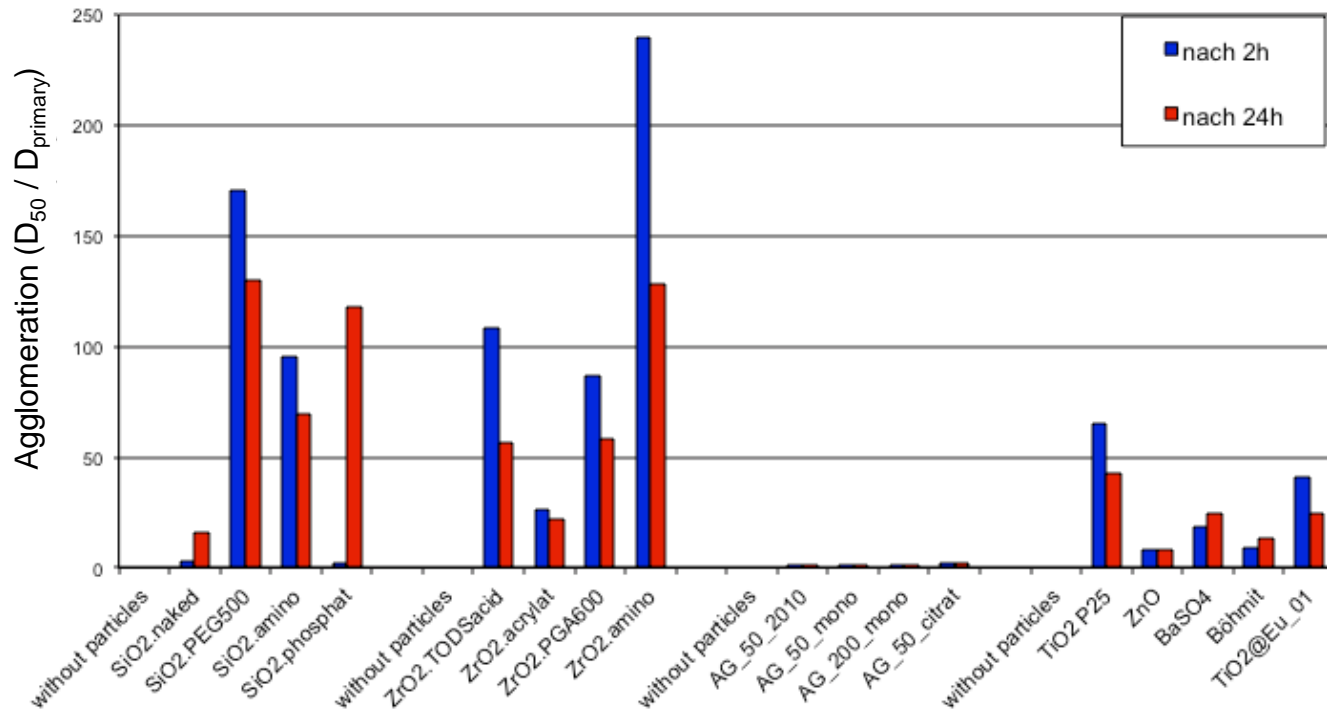
AP 2 - Staubungsneigung von Pulvern

- 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



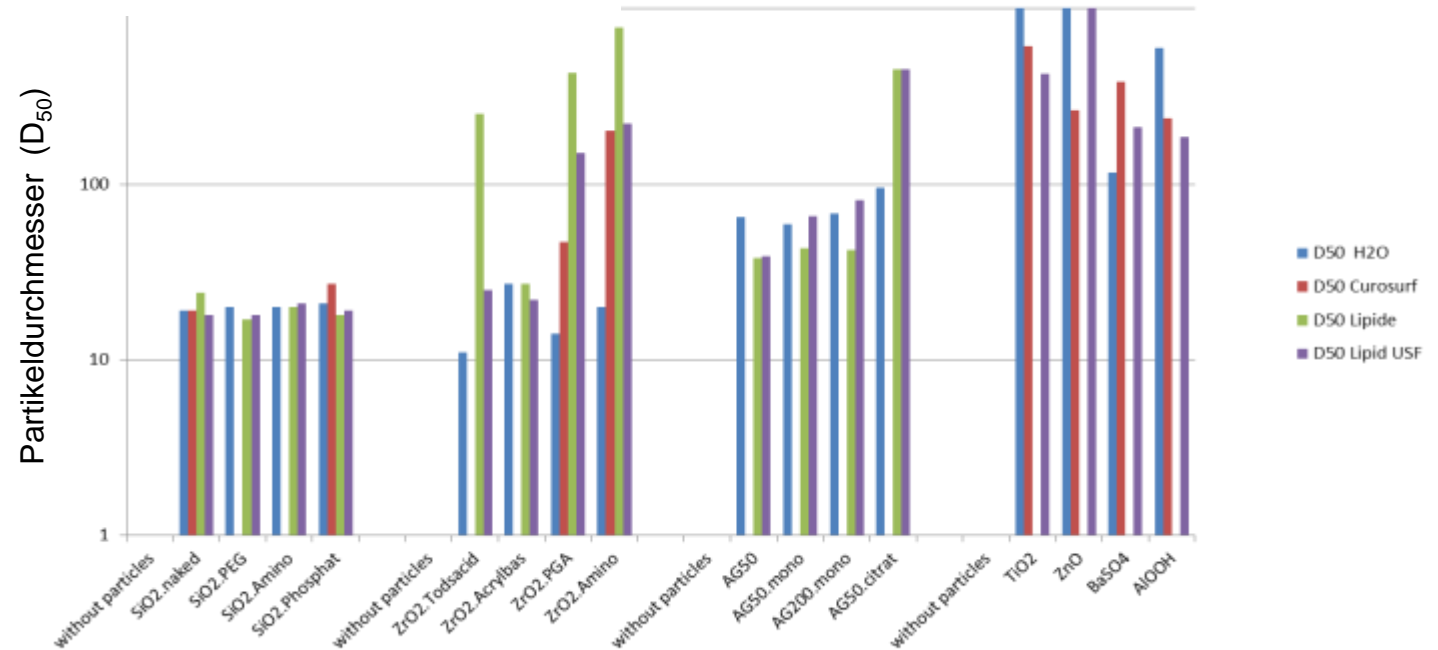
Größenverteilungen mit 350 mg ZnO

AP Q - Agglomerationsverhalten nach Dispersion



nanoGEM Partikel in Zellkulturmedium (DMEM, 10% FKS)

nanoGEM Partikel in Lipiden (CuroSurf™)



AP Q - Adsorption von Biomolekülen: Lipide (CuroSurf™)

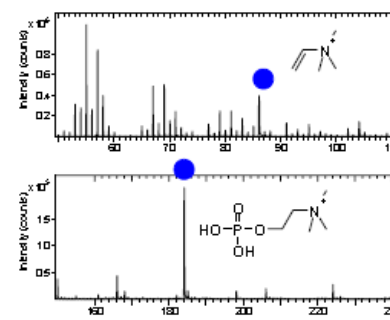
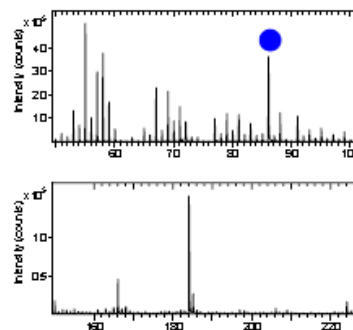
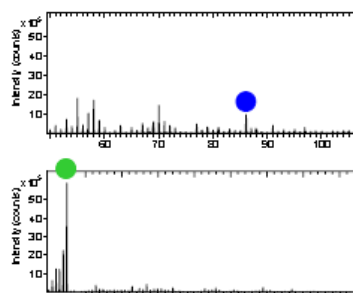
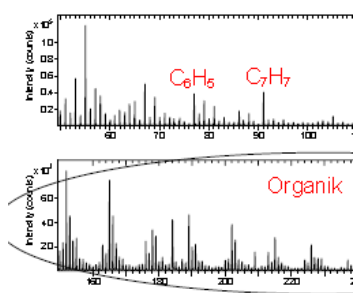
Referenzmaterialien in D₂O + Curosurf™ : Surface coverage after pelleting/washing

TiO₂ NM105

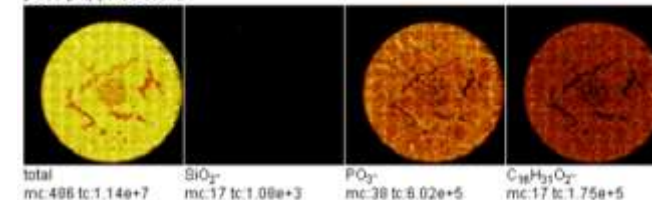
BaSO₄ NM220

Böhmit NanoCare

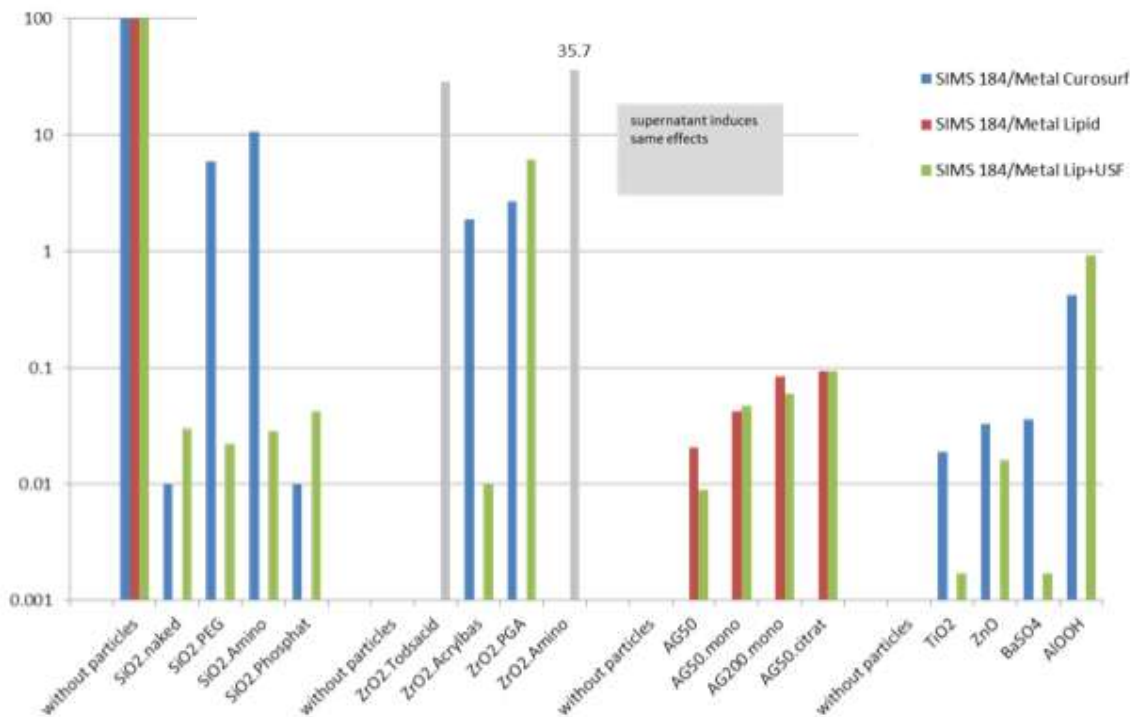
Curosurf ref



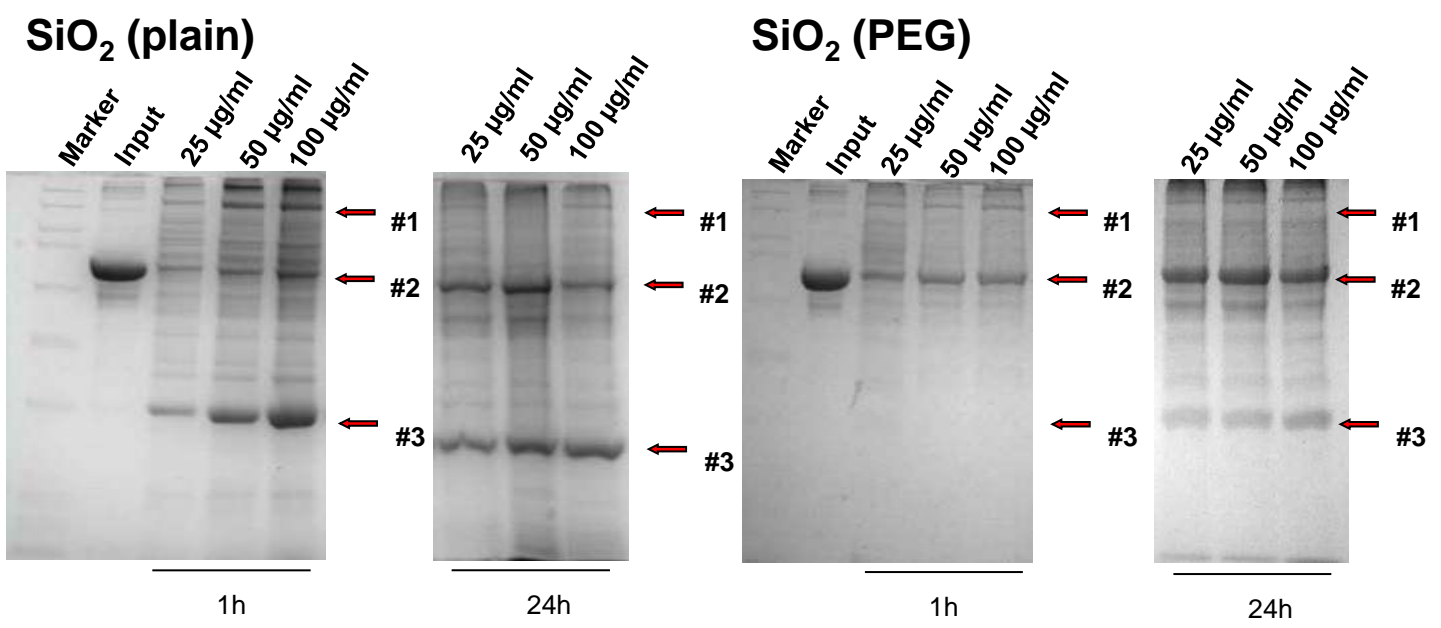
144112 Wohlleben: Curosurf in D₂O — n31390_1 (4800 μm)², 1x50 scans



Phospholipid affinity: SIMS peak ratio

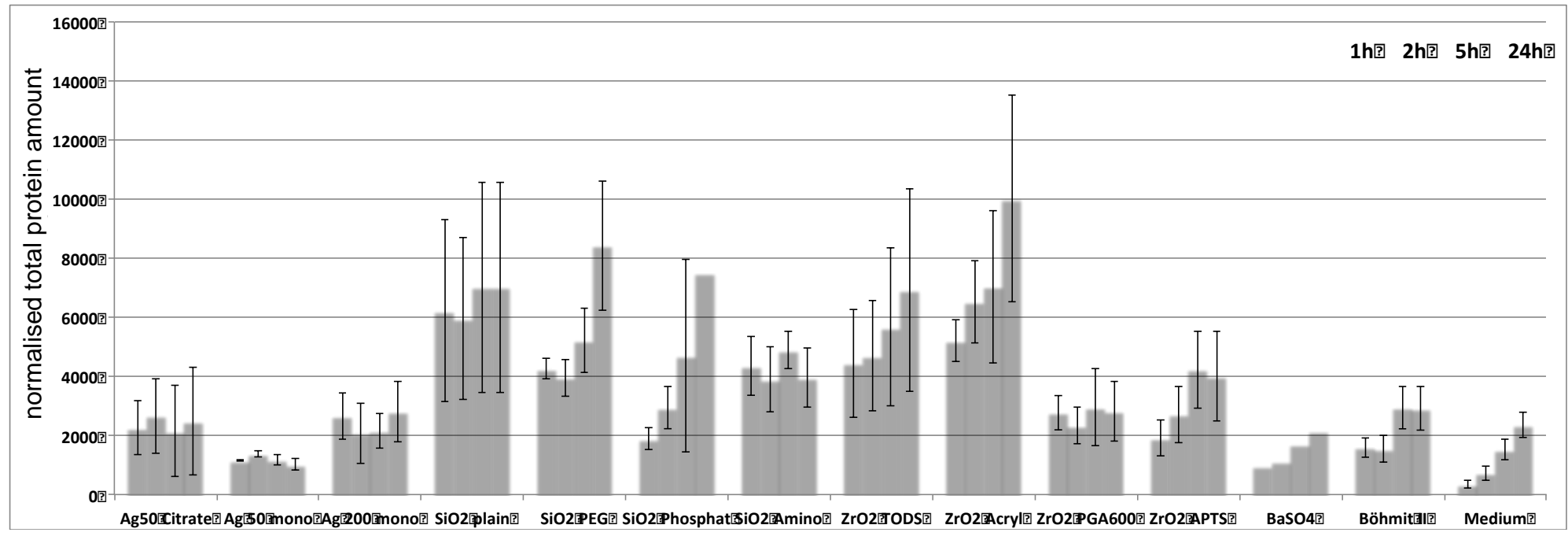


AP Q - Adsorption von Biomolekülen: Proteine (1D Gel)



Poster

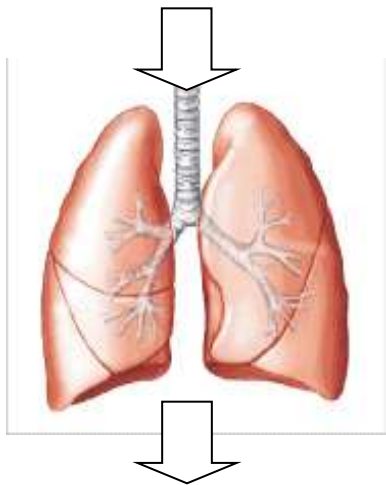
Gesamtprotein



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

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

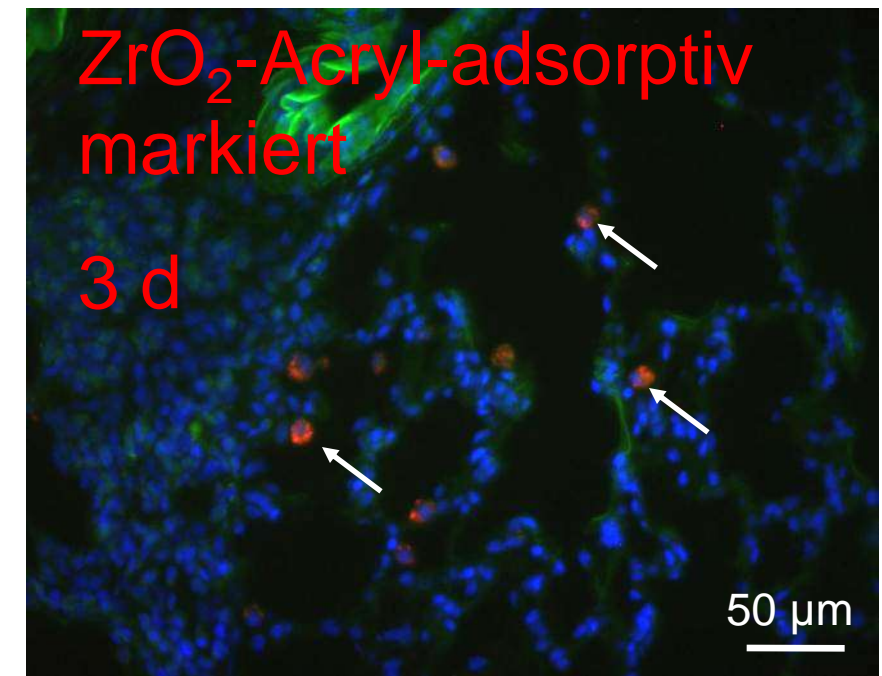
Intratracheale
Instillation



SiO₂-NP (FITC-markiert)
agglomerieren in der Lunge und
werden in Alveolarmakrophagen
(CD68+) angereichert

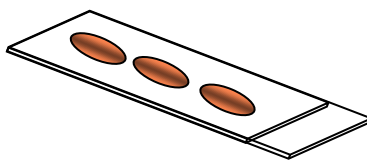


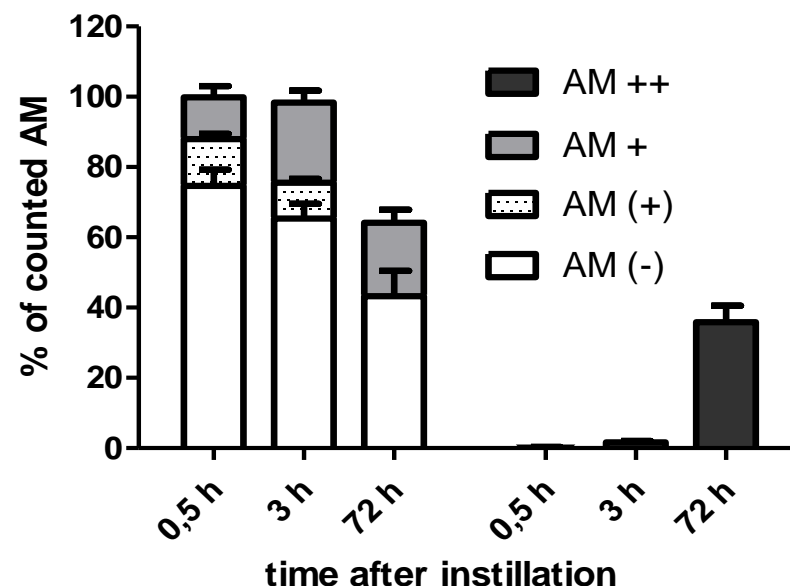
**Gleiche Befunde u.a. für adsorptiv
markiertes ZrO₂-NP (rot)**



Keine Anreicherung von SiO₂-FITC) in:

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

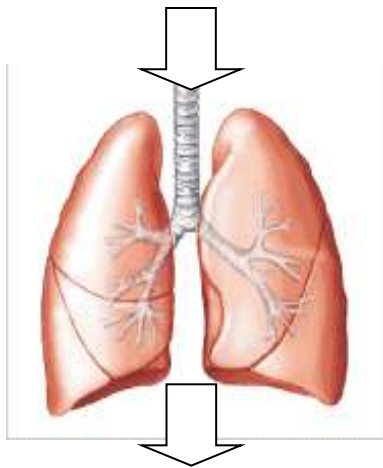
- **3 Tage**
 - Kryoschnitte
- 
- A diagram showing a slide with three orange-colored sections, representing cryosections of tissue.
- PFA-Fixierung
 - Immunhisto. (CD68)



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

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

Intratracheale
Instillation
Ag50-NP

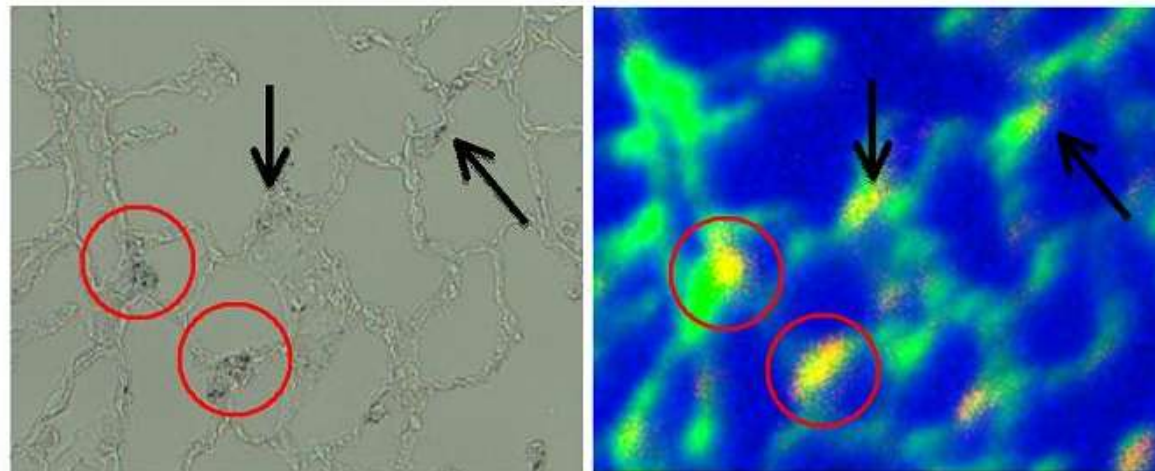


ToF-SIMS Analyse Ag50-NP behandelter Lungen: Anreicherung von Ag50 in Alveolarmakrophagen bestätigt

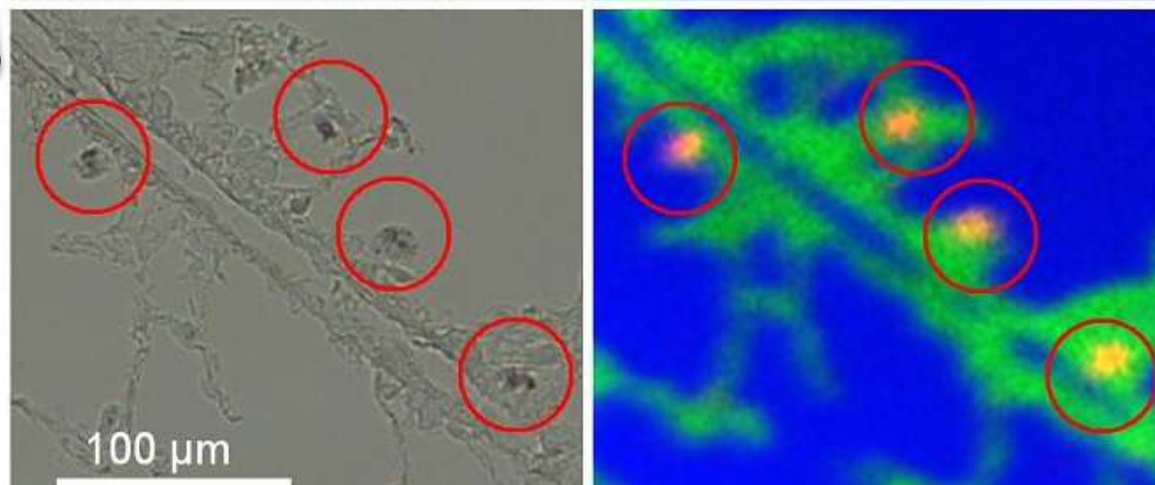
- 3 Tage
- Kryoschnitte
- PFA-Fixierung
- dH2O
- Mikroskopie
- ROI festlegen
- trocknen
- ROI übertragen
- ToF-SIMS

Poster

3h



3 Tage



Lichtmikroskopie

ToF-SIMS Bild
Ag – organische - Si

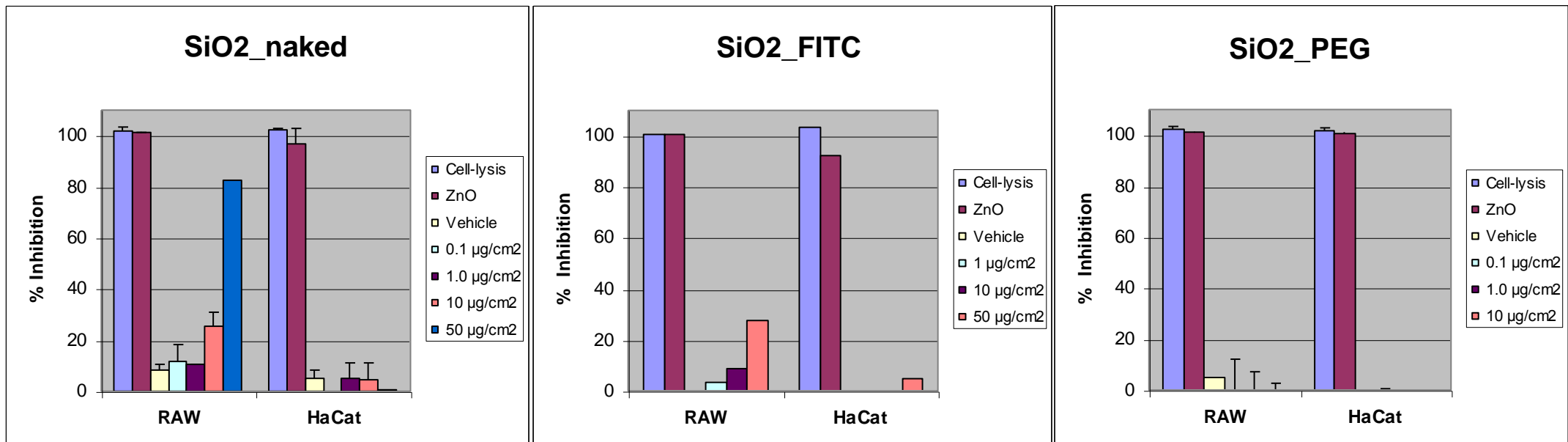


AP 4 - Nanopartikel Toxikologie in vitro

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

- **RAW264.7** Makrophagen werden deutlich inhibiert durch **SiO₂_naked** und **SiO₂_FITC**
- Oberflächen-Modifizierung mit PEG blockiert toxische Wirkung bei **SiO₂_PEG**
- SiO₂_Amino und SiO₂_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

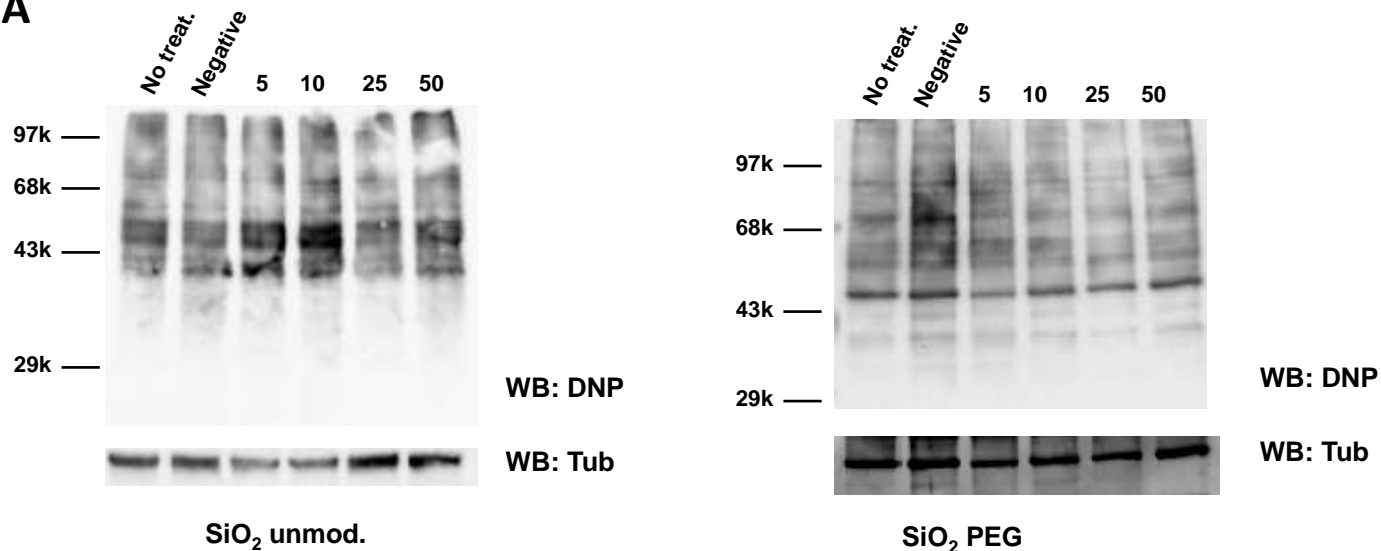
Übersicht: deutlicher toxischer Effekt auf proliferierende Zellen durch mehrere NanoGEM Materialien

	Zell-Viabilität für NanoGEM NM im WST8-Assay					
	Inhibition wurde festgestellt bei einer Dosierung von [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] :					
	RLE	RAW	HaCat	NRK	NIH	A549 Kontrolle
SiO ₂ -naked	keine	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine	keine	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (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	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine	keine	keine	keine	n.d.
ZrO ₂ -APTS	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine	keine.	keine	keine	n.d.
ZrO ₂ -PGA600	keine	keine	keine	keine	keine	n.d.
Ag50	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine	n.d.	n.d.	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine
Ag50-Citrat	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine	n.d.	n.d.	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine
Ag50-mono	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	keine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ag200-mono	keine (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	keine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

AP 5 - Nanopartikel Toxikologie: Wirkmechanismen

Identifizierung Nanopartikel induzierter Zellschädigung durch Proteinoxidation

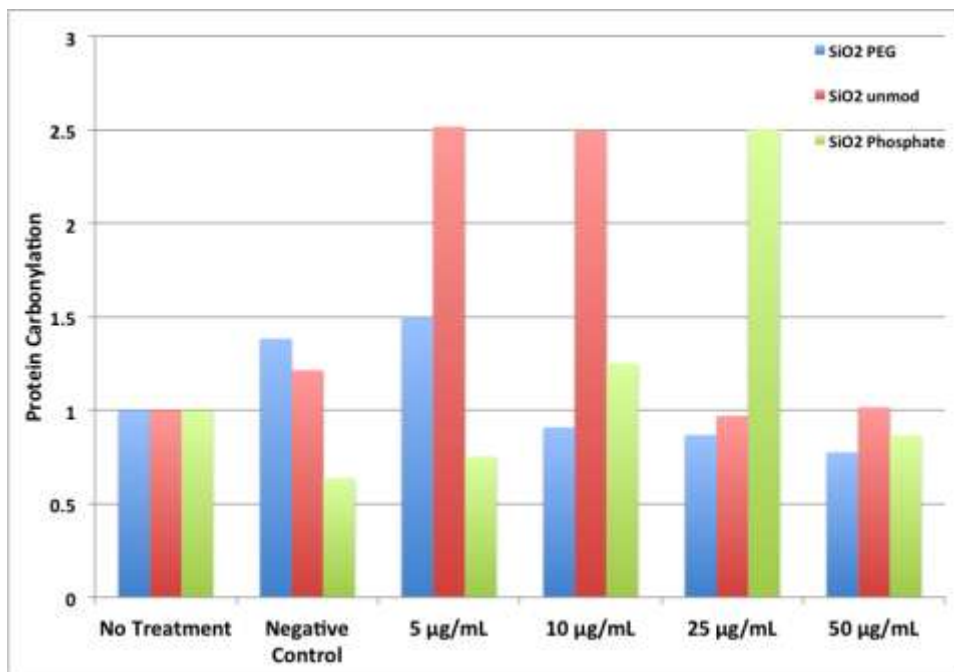
A



Quantifizierung der Proteinoxidation nach SiO₂ NM Exposition von NRK-52E Zellen.

Nacktes SiO₂ führt bei geringen Konzentrationen zur Proteinoxidation, SiO₂ Phosphate bei höheren Konzentration, SiO₂ PEG zeigt keinen signifikanten Effekt.

B



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).

AP 5 - Nanopartikel Toxikologie: Wirkmechanismen

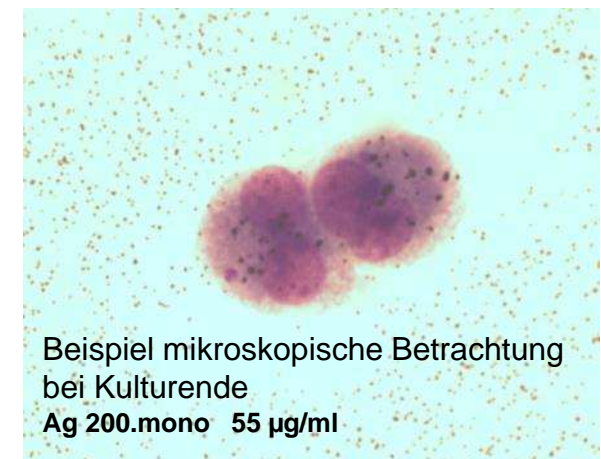
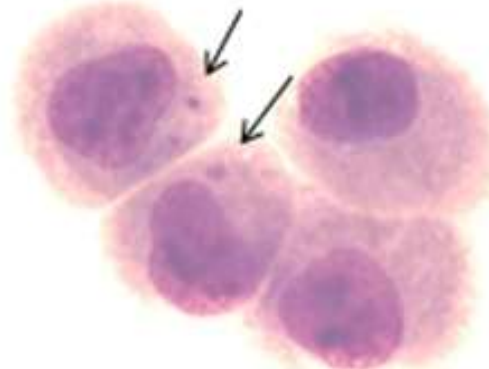
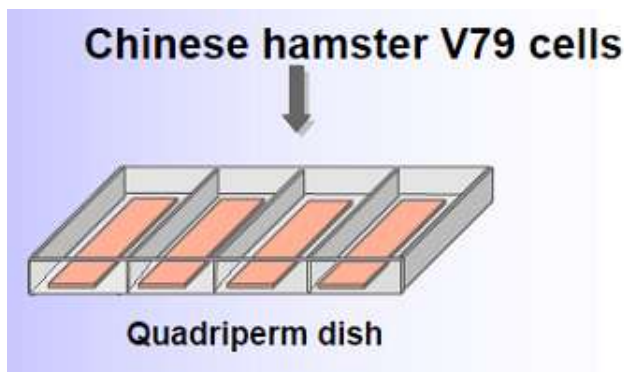
Vergleichende Untersuchungen zur *in vitro* Genotoxizität

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.



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
SiO ₂ naked	ab 500 µg/ml	nicht mutagen
SiO ₂ Phosphat	schwach ab 100 µg/ml	nicht mutagen
SiO ₂ 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 TiO₂, SiO₂ und ZrO₂ (BASF)
- Chemikaliensicherheit von NM: Fallbeispiele Böhmit und Silber (Bayer)

**Chemikaliensicherheit von NM:
Fallbeispiele TiO₂, SiO₂ und ZrO₂**

Endpunkt	Nano-TiO ₂	Nano-SiO ₂	Nano-ZrO ₂
Akute Toxizität	Yellow	Green	Yellow
Reizwirkung	Yellow	Yellow	Yellow
Sensibilisierung	Yellow	Red	Yellow
Toxizität nach wiederholter Exposition	Green	Green	Green
Gentoxizität	Green	Green	Yellow
Karzinogenität	Green	Red	Red
Reproduktionstoxizität (Fruchtbarkeit)	Red	Red	Red
Reproduktionstoxizität (Entwicklung)	Red	Yellow	Red

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

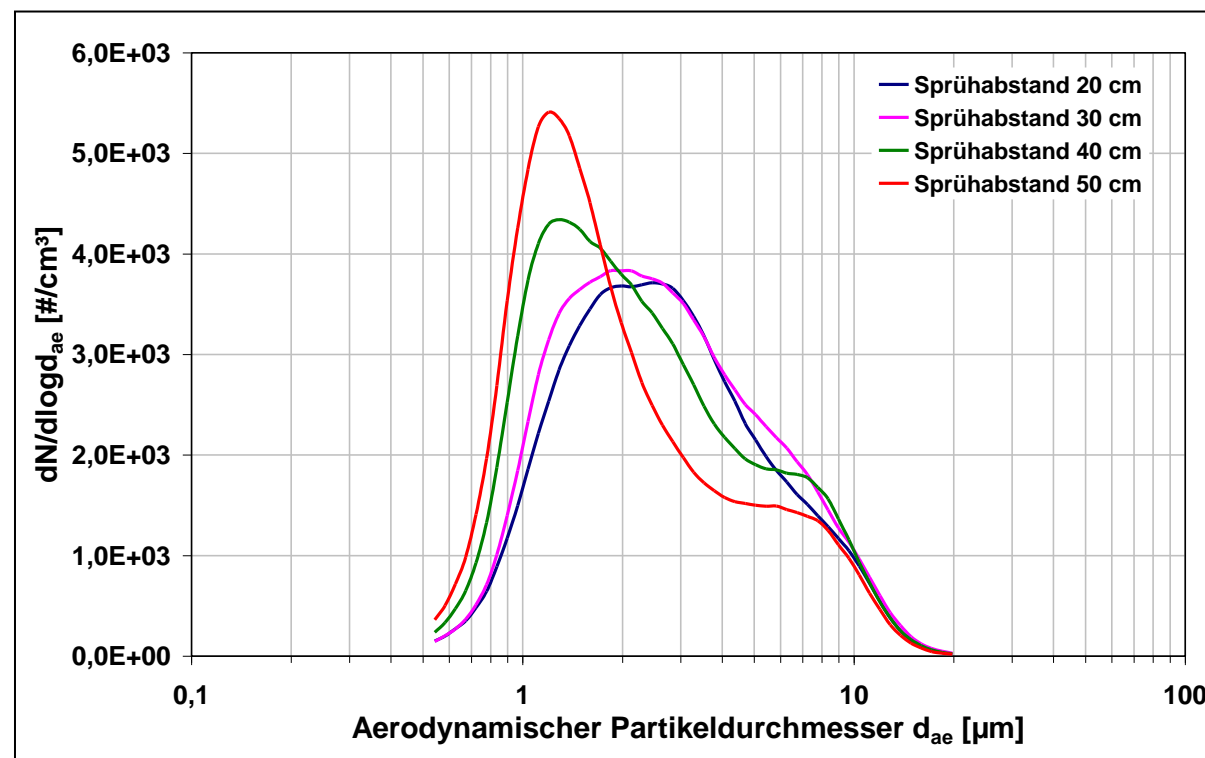
**Chemikaliensicherheit von NM:
Fallbeispiele Böhmit und Ag**

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



Danke

