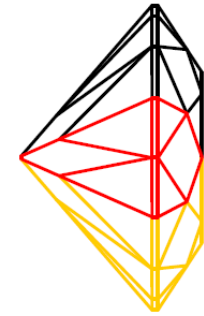


nano



G
E
M

nanoGEM Schlaglichter Nanomaterialien – Gesundheit, Exposition und Materialeigenschaften

Thomas A.J. Kuhlbusch



nanoGEM - Forschungsziele

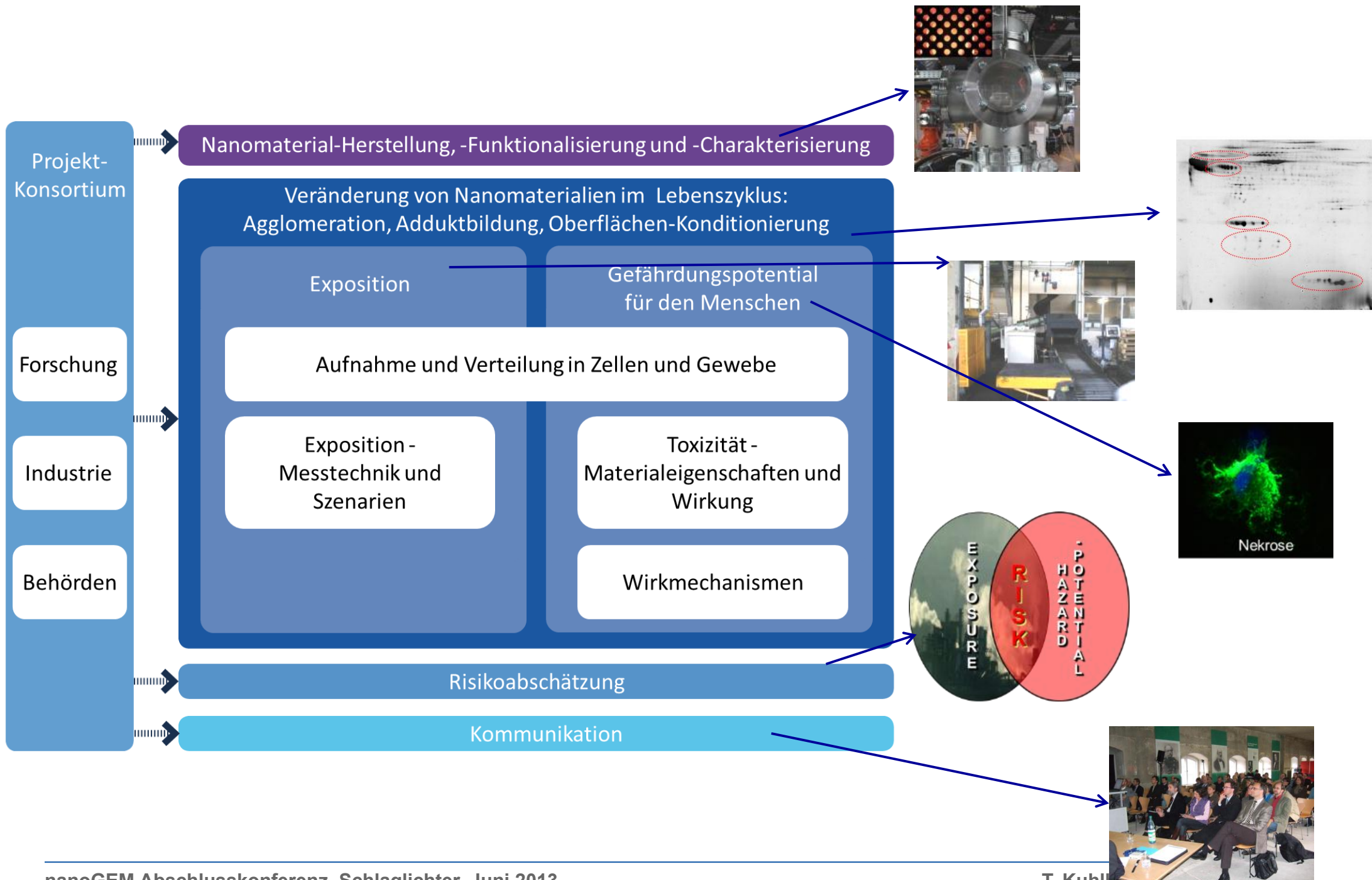
NanoGEM: Integrative Forschung zur Risikoabschätzung

- ?** 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.:

- **Harmonisierte und preiswerte Bestimmung von möglichen Expositionen an Arbeitsplätzen**
- **Detektion von Nanomaterialien in komplexen Medien**
- **Welche Wechselwirkungen bestehen zwischen Nanomaterialien und biologischen Medien?**
- **Welchen Einfluss hat die Oberfläche / Coating auf die Wirkung von Nanomaterialien?**
- **Risikoabschätzung, u.a. Arbeiter und Verbraucher**

nanoGEM – 2010-2013

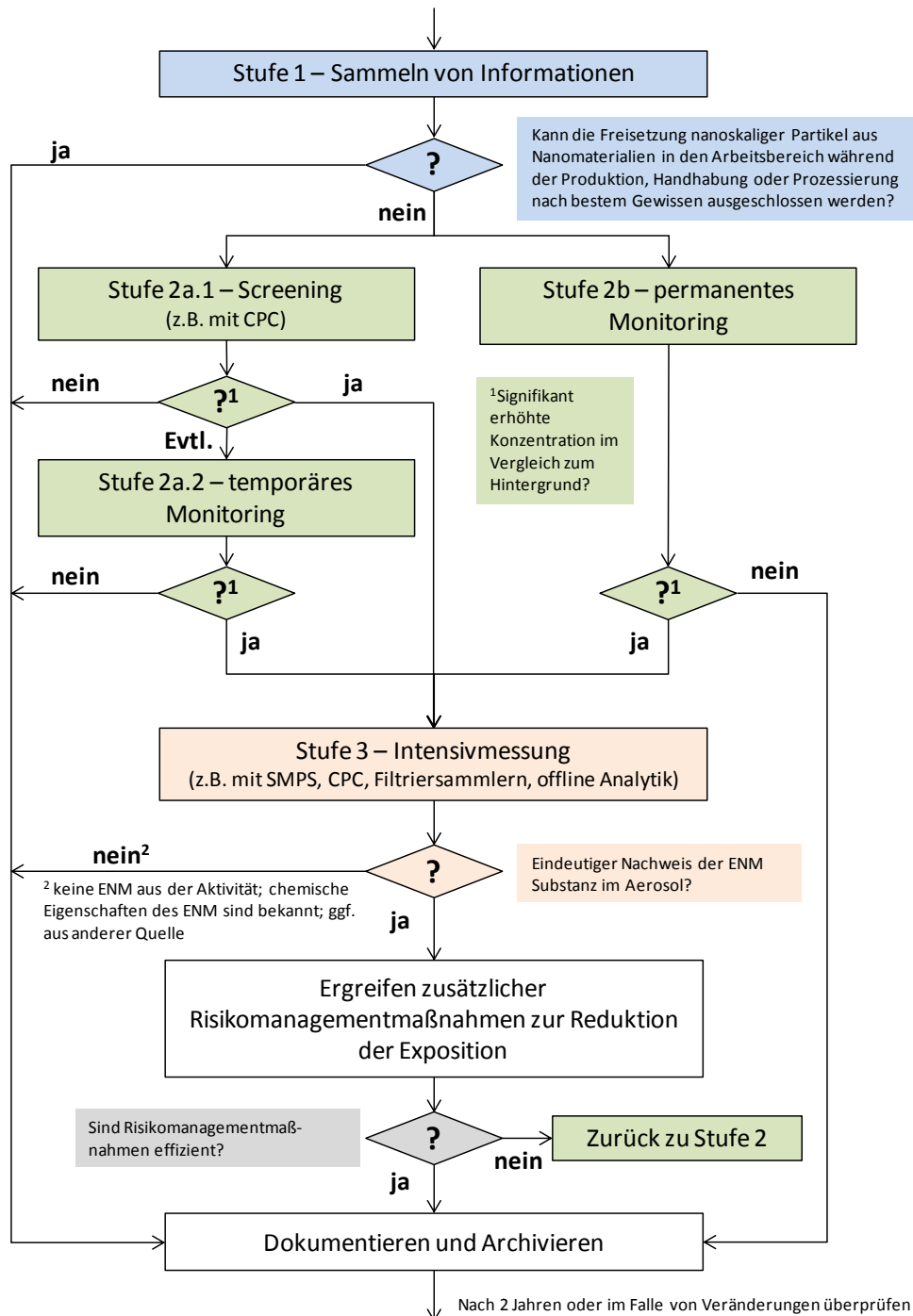


- Herausforderung - Sicherheit für neue und Nanomaterialien
- nanoGEM forscht(e) auf den Gebieten der Freisetzung, Exposition und Wirkung auf den Menschen
- nur eine kleine Auswahl, die Schlaglichter, können hier gezeigt werden!

Schlaglicht 1: Exposition

- Wie können NM von Hintergrundpartikeln unterschieden werden?
- Wie kann eine expositionsbezogene Untersuchung für alle ermöglicht werden?
- Wie reproduzierbar sind diese Messungen?
- Harmonisierung und Standardisierung!

Schlaglicht 1: Messstrategie



Allgemeine Strategie

Stufe 1:

Sammlung von Informationen zum Arbeitsplatz und zum Nanomaterial

Stufe 2:

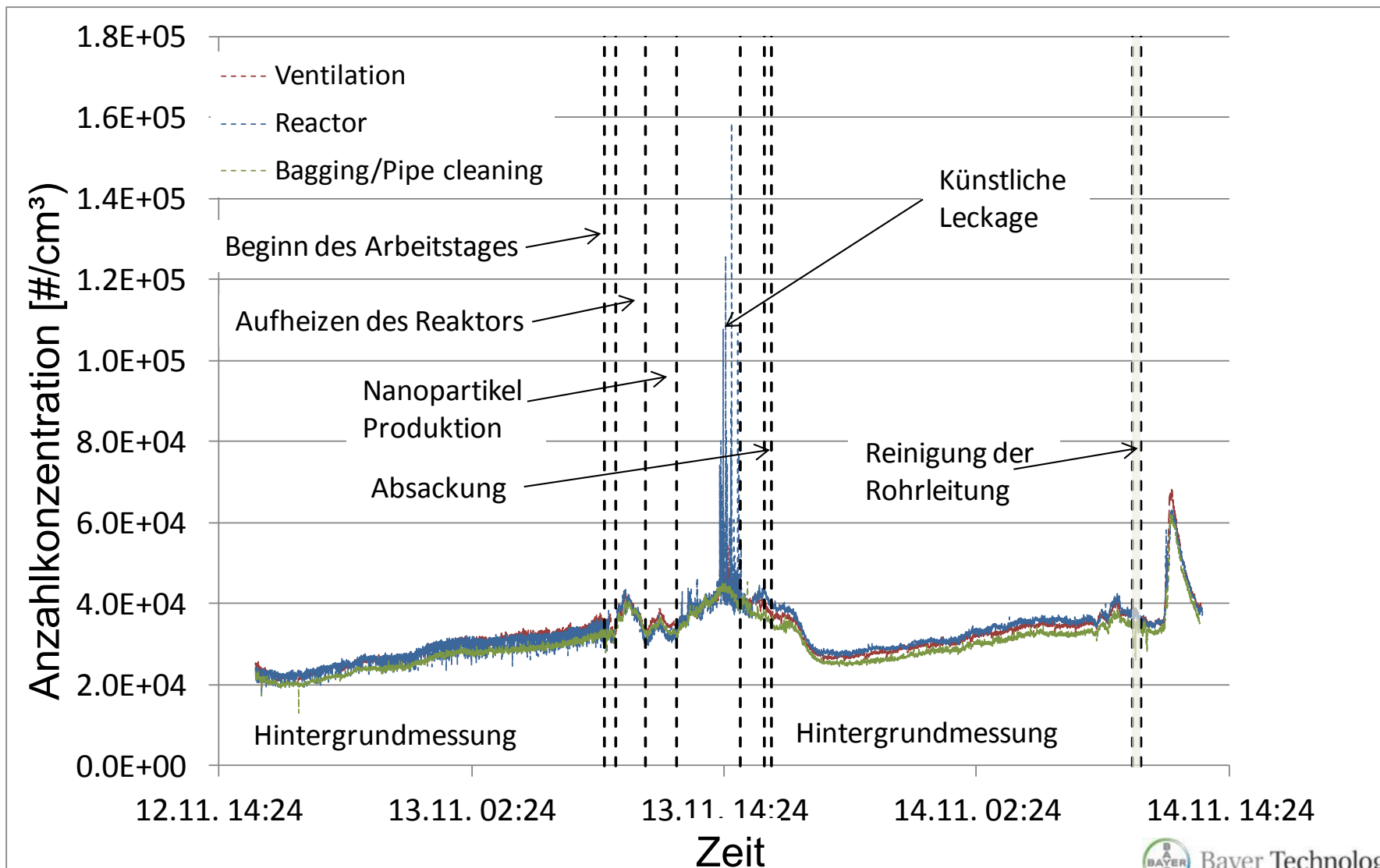
Vereinfachte Messung der Partikelkonzentration(en), entweder kurzfristig (Screening) oder lang- bzw. längerfristig (Monitoring)

Stufe 3:

Umfangreiche physikalisch/chemische Analyse der luftgetragenen Exposition zur abschließenden Beurteilung, ob eine Freisetzung stattgefunden hat.

Schlaglicht 1: Arbeitsplatzmessungen

- Messungen an Pilotanlage zur mit dreistufigen Ansatz durchgeführt
- Messung an unterschiedlichen Orten sowie Herbeiführung einer „künstlichen“ Leckage zur Validierung der Strategie



Schlaglicht 1: Exposition

- Interessensübergreifend erarbeitet von Behörden, Industrie und Forschungsinstitute
- Erstmals Ringversuche zur Evaluierung der Methodik
- Weltweit akzeptiert → CEN, MARINA, QualityNano, NanoValid, Australien.....
- Eingbracht bei der OECD WPMN Treffen in Paris 2012
- Zurzeit Basis für eine Erarbeitung eines gemeinsamen Papieres für die SG8 in der OECD WPMN

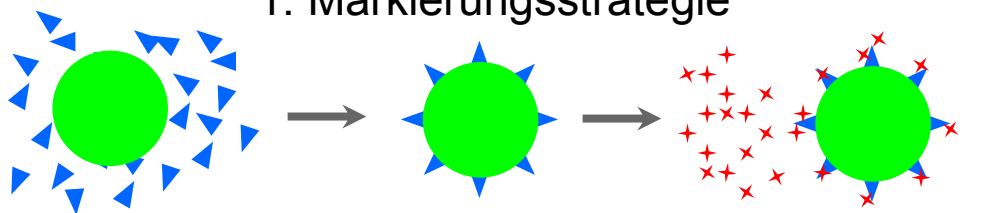
Schlaglicht 2: Detektion in komplexen Medien

- Warum müssen Nanomaterialien in komplexen Medien detektiert werden?

- Einleitung der Bedeutung der Lokalisation von NP und NM in komplexen Medien

Adsorptionsmarkierung mit Albumin: Reinigung, zelluläre Aufnahme *in vitro* + *in vivo*

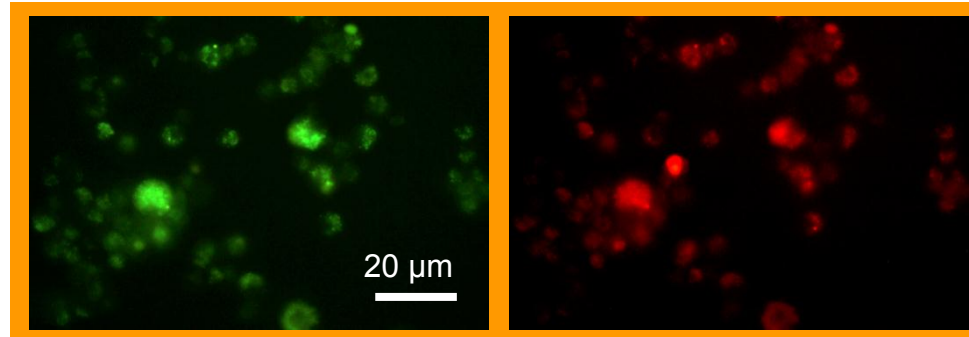
1. Markierungsstrategie



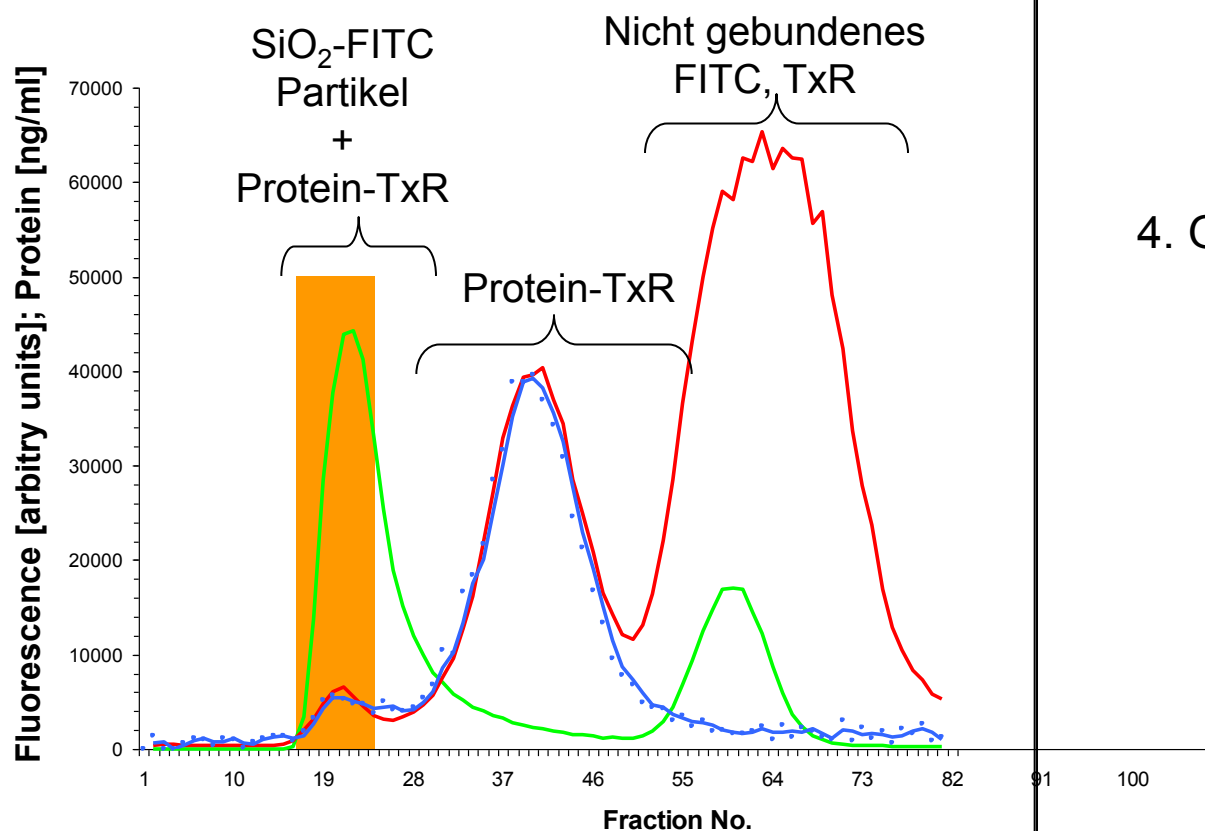
SiO₂-FITC Partikel + Albumin
→ Bildung der Proteinkorona

Kovalente
Markierung mit
TxR-NHS

3. Grüne und rote Fluoreszenz in Makrophagen



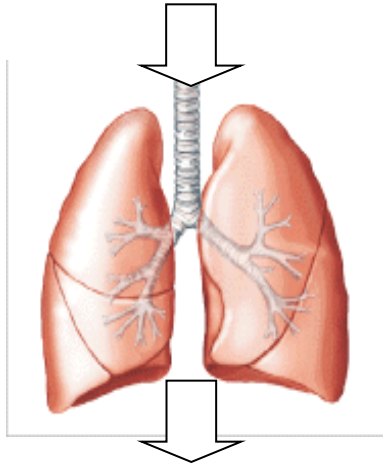
2. Reinigung der markierten Partikel



4. Grüne und rote Fluoreszenz sind auch in der Lunge co-lokalisiert (3h)

Verteilung von NP in Zellen und Geweben – ToF SIMS

Intratracheale
Instillation
Ag50-NP



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

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

3h

Silber-beladenen Makrophagen, nicht aber das Lungenepithel weisen im ToF-SIMS ein Silber-Signal auf.

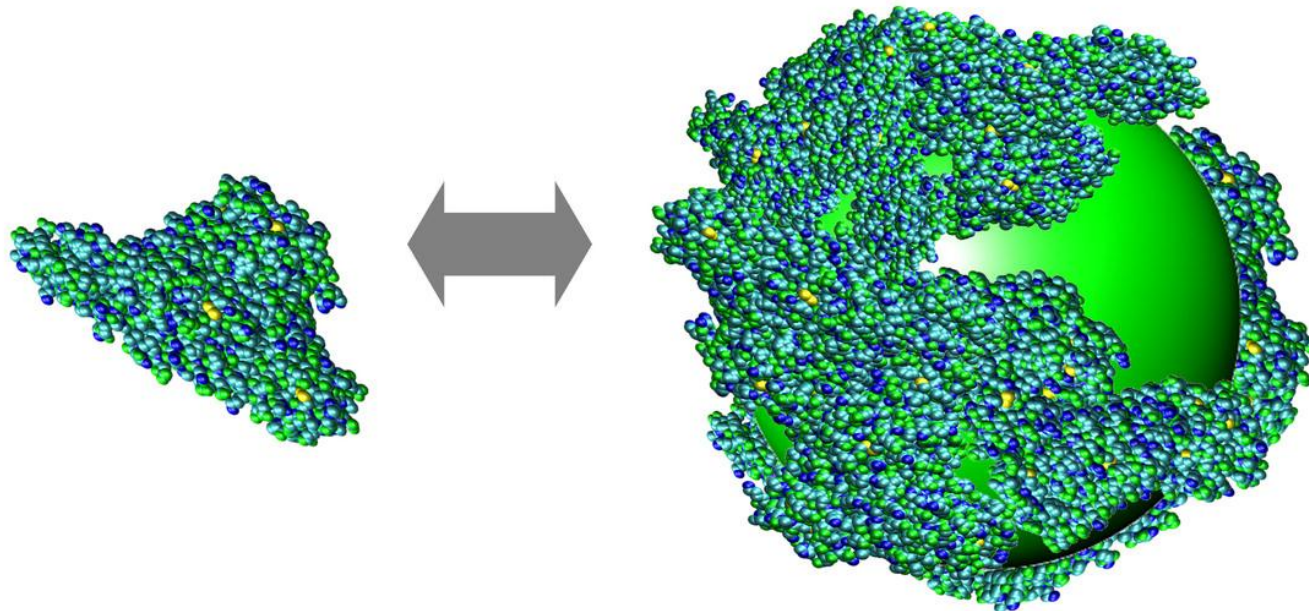
3 Tage

Lichtmikroskopie

ToF-SIMS Bild
Ag – organisch - Si

Schlaglicht 3: Proteinabsorption

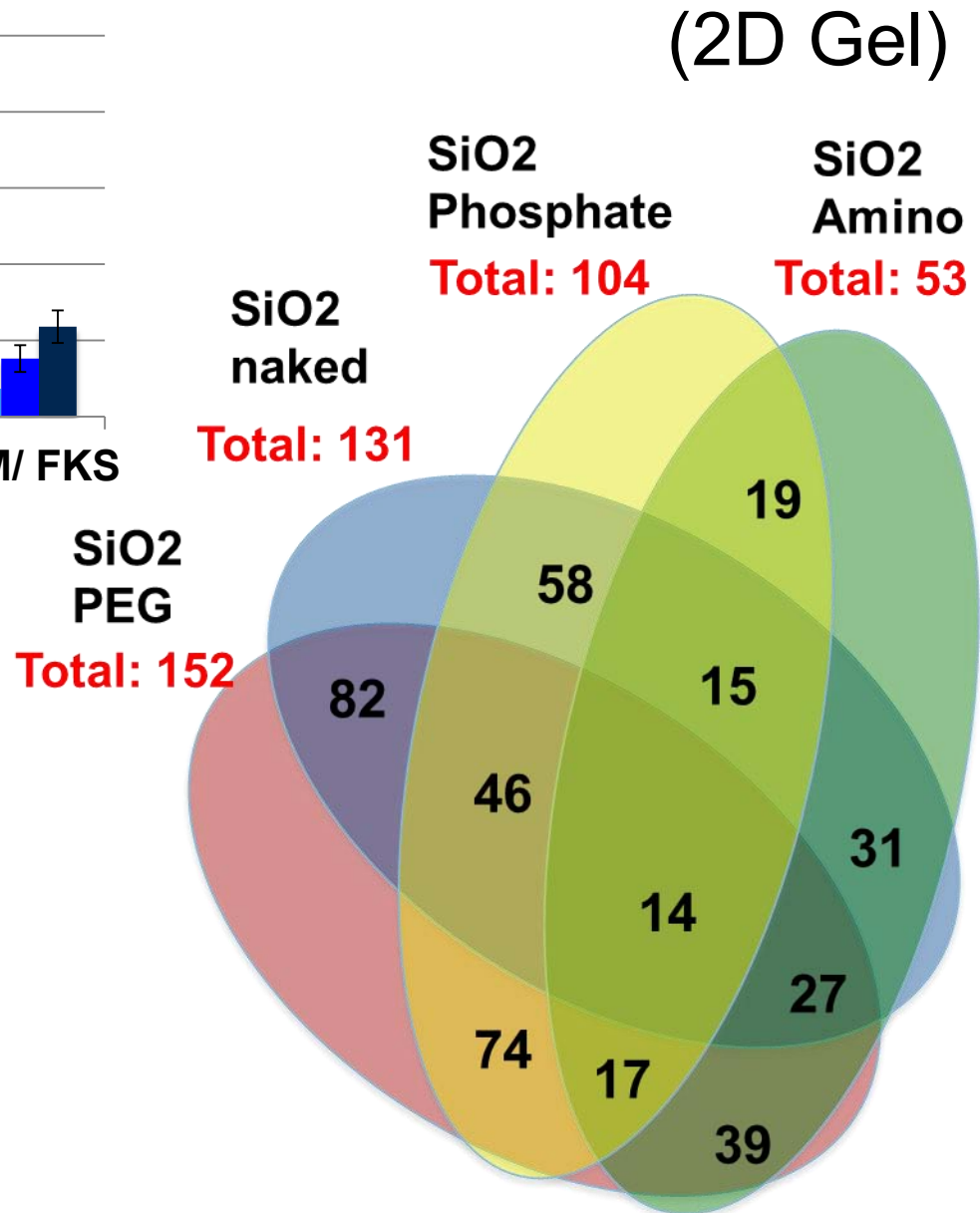
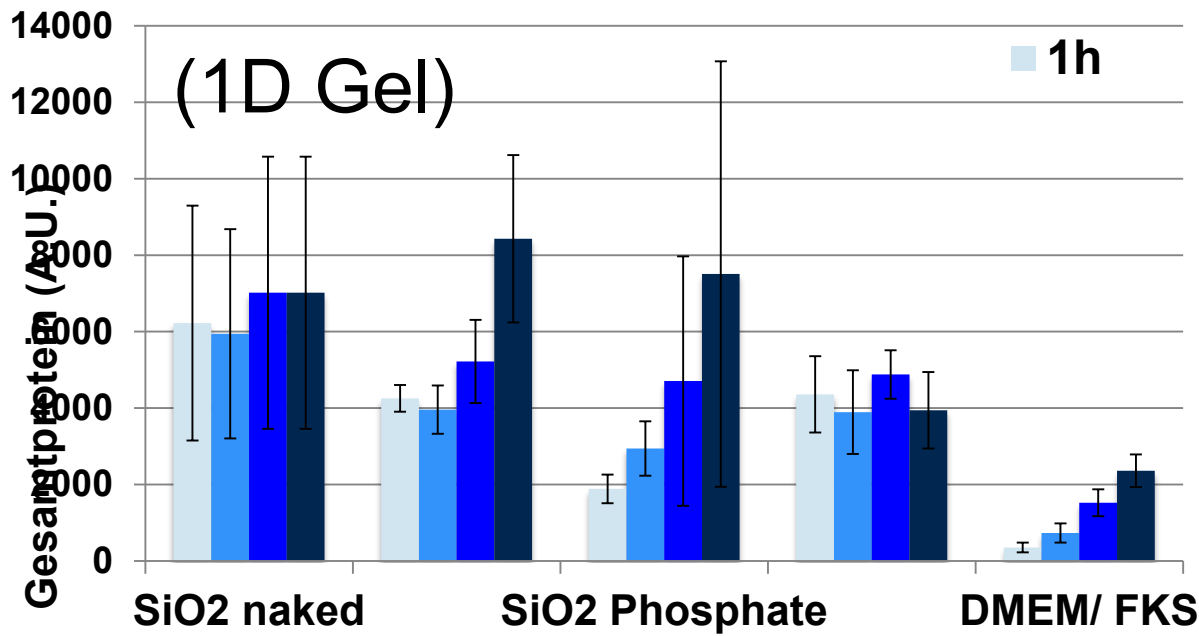
- NM, Proteinadsorption und toxikologische Wirkung



Prof. Nienhaus, KIT

Hypothese:
In situ Charakterisierung ermöglicht Beschreibung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

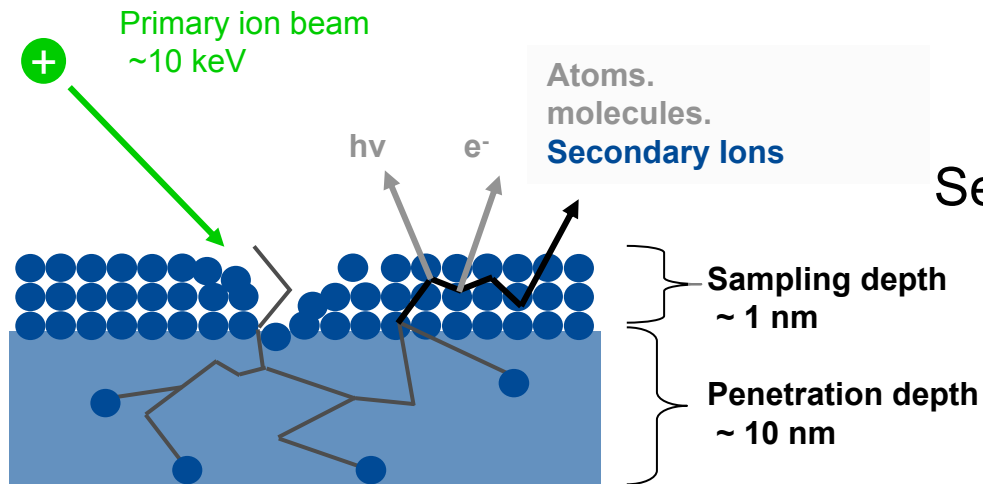
Interaktion mit Proteinen: DMEM + FKS



Lipidaffinität gering, durch Protein verstärkbar

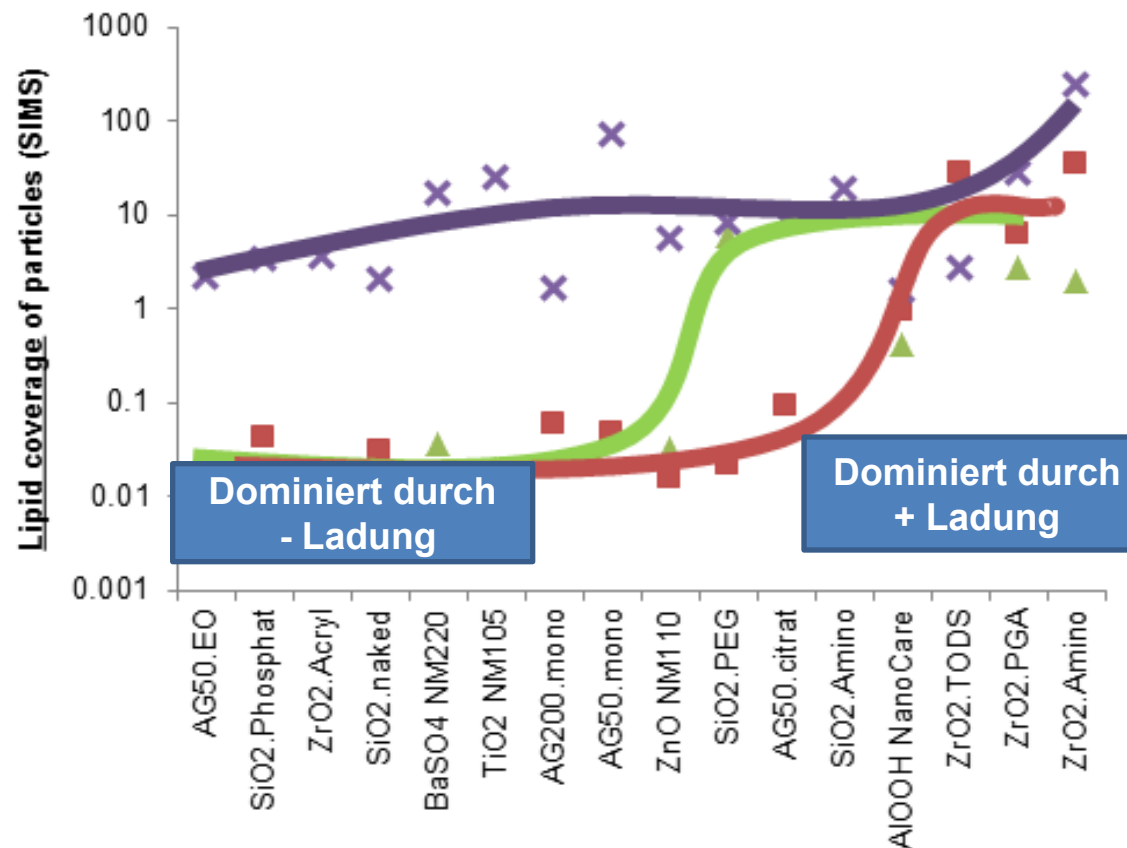
nano

BASF
The Chemical Company



SIMS

Secondary Ion Mass Spectrometry



- Lipide
- SP-A
(Natives Surfactant)
- CuroSurf
(SP-B, kein SP-A)

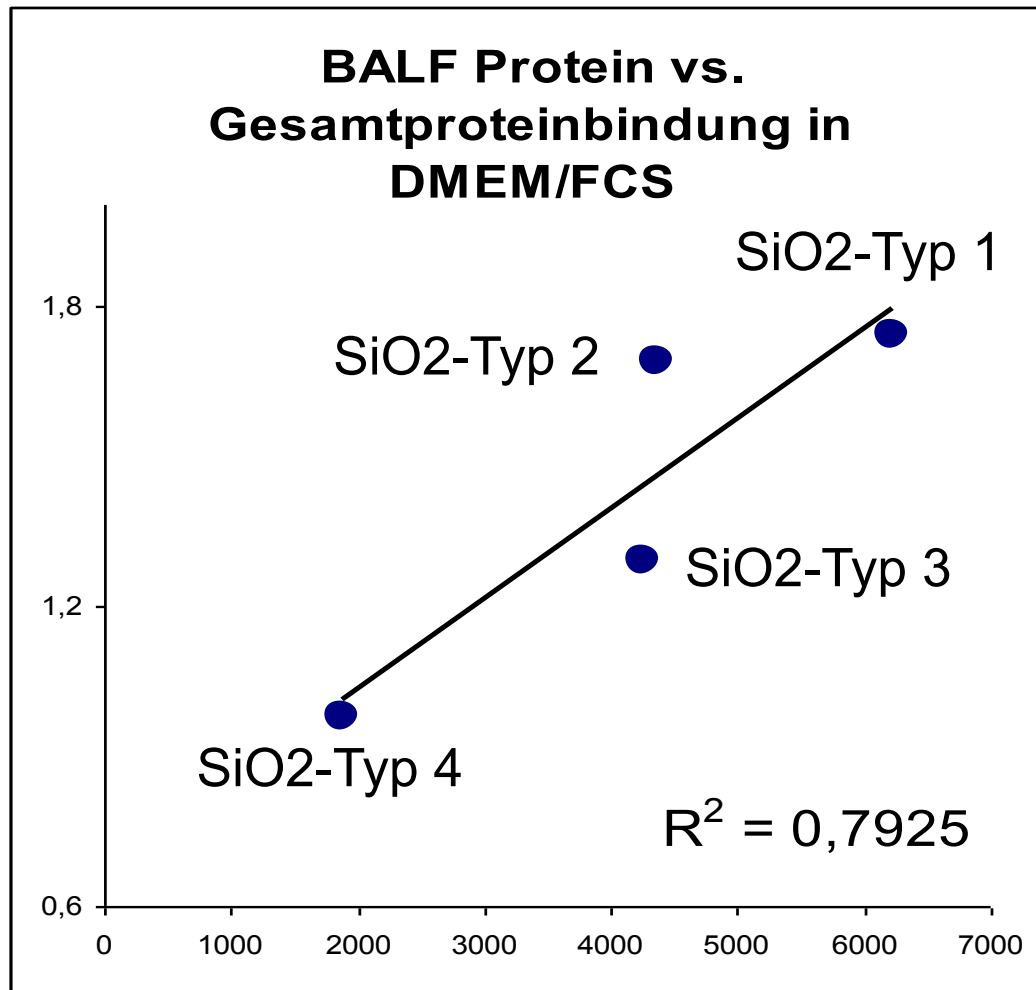
Für 11 von 16 NP: Ladung entscheidet über Lipidinteraktion

SP-A Protein kann Lipidreaktion verstärken (nicht SP-B)

Compare: Ruge, Lehr et al. on cellular uptake mediated by SP-A, PLoS 2012

Korrelation der Toxizitätsdaten Effekte in vivo und Proteinbeladung der Partikel

Proteingehalt in der Bronchio-
alveolären Lavageflüssigkeit



Je stärker die
Proteinbindung der
SiO₂-NP,
desto stärker der
schädigende Effekt in
vivo!

Gesamtproteinbindung an den
verschiedenen SiO₂-Varianten
(1h, aus 1D Gel)

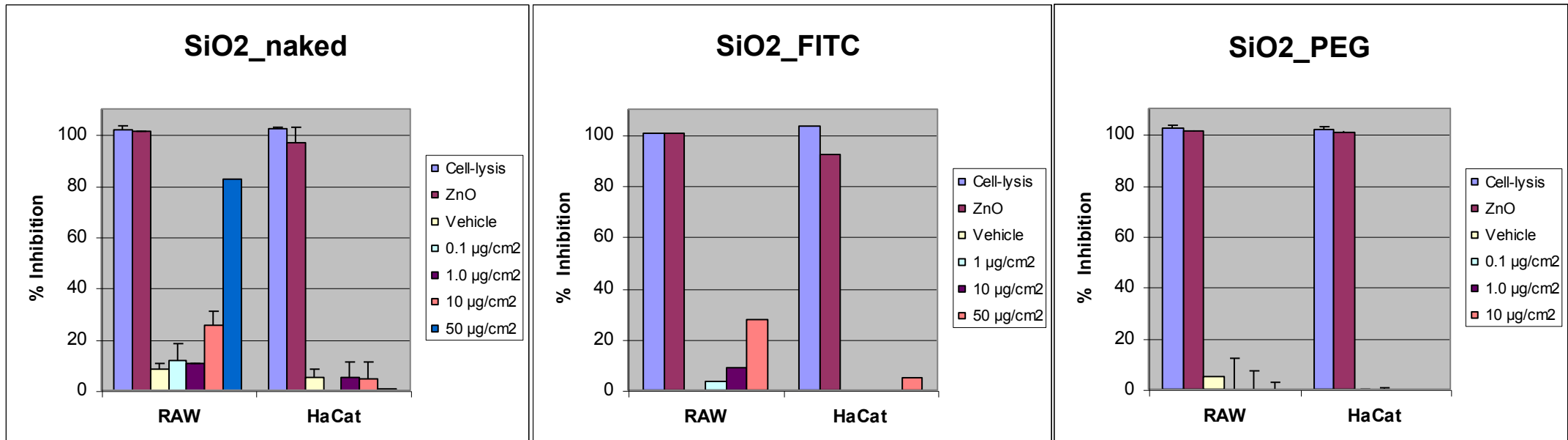
Schlaglicht 4: Oberflächenmodifikationen und Toxikologie

- Oberflächenmodifikationen und toxikologische Wirkung
- Einleitung Bedeutung dieser Ergebnisse, Bedeutung der Partikeloberfläche

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

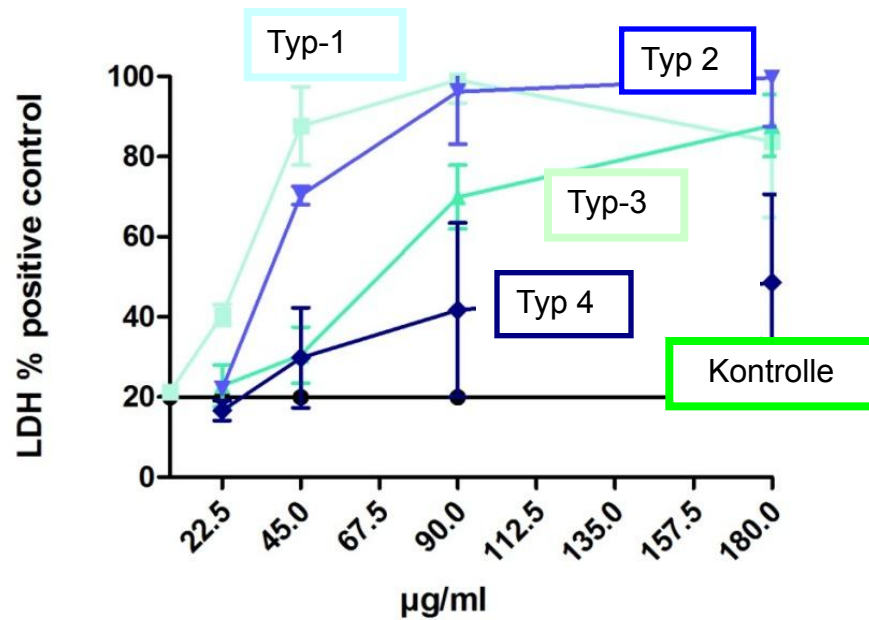
- **RAW264.7** Makrophagen werden deutlich inhibiert durch **SiO₂_naked** und **SiO₂_FITC**
- Oberflächen-Modifizierung mit PEG blockiert toxische Wirkung bei **SiO₂_PEG**
- SiO₂_Amino und SiO₂_Phosphat ebenfalls ohne Wirkung auf RAW264.7

Inhibition metabolische Zellaktivität (RAW264.7 und HaCaT)



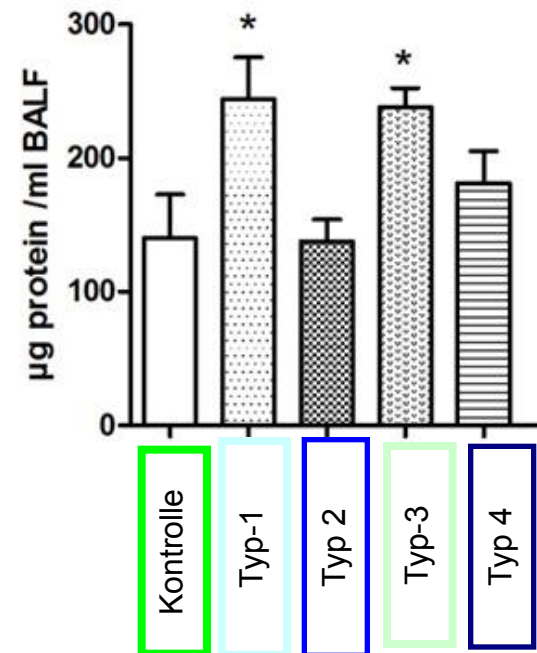
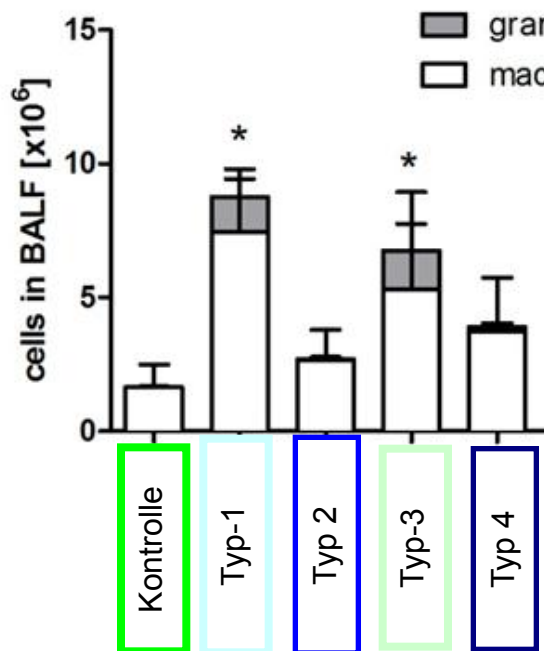
SiO₂-NP: Vergleich Makrophagenmodell vs. Instillation

in-vitro



Korrelation des toxikologischen Ranking zwischen in-vitro und in-vivo für verschieden beschichtete SiO₂

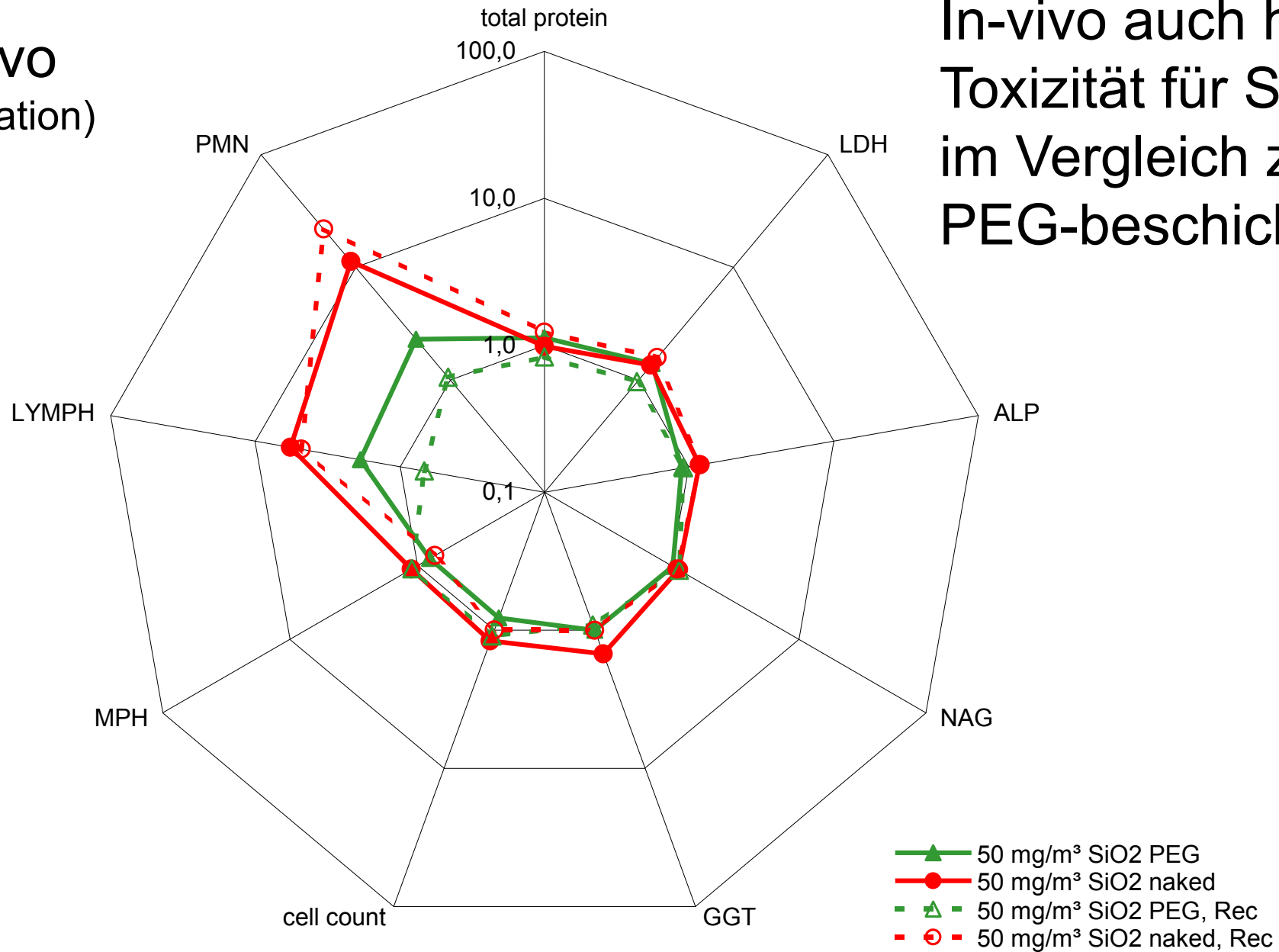
in-vivo
(Instillation)



Ergebnisse der Inhalationsversuche

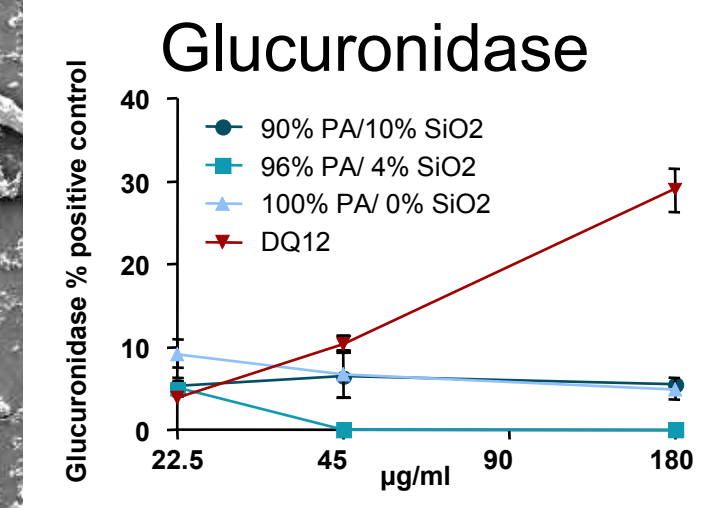
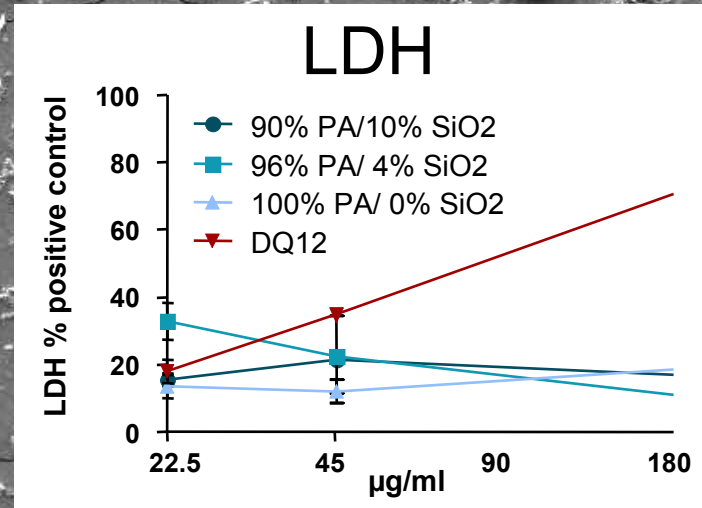
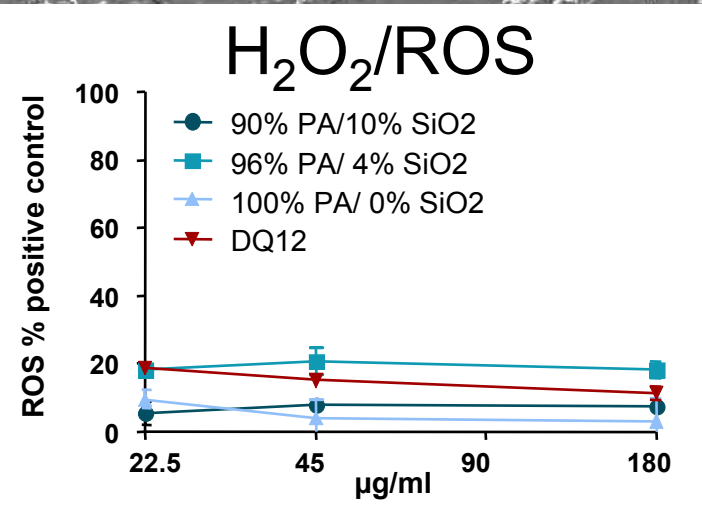
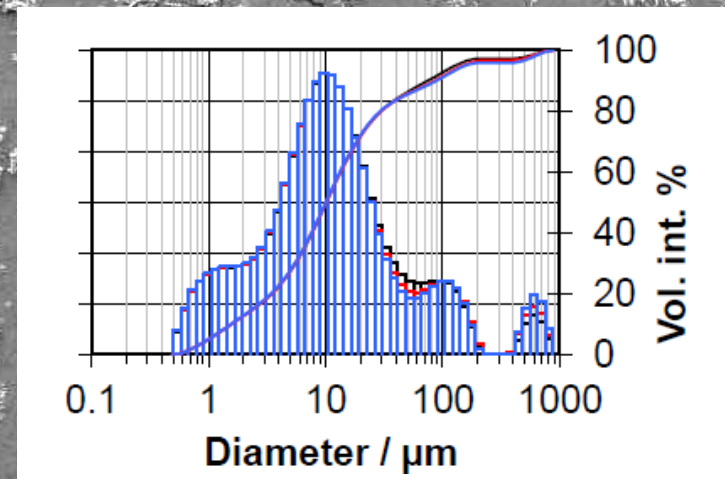
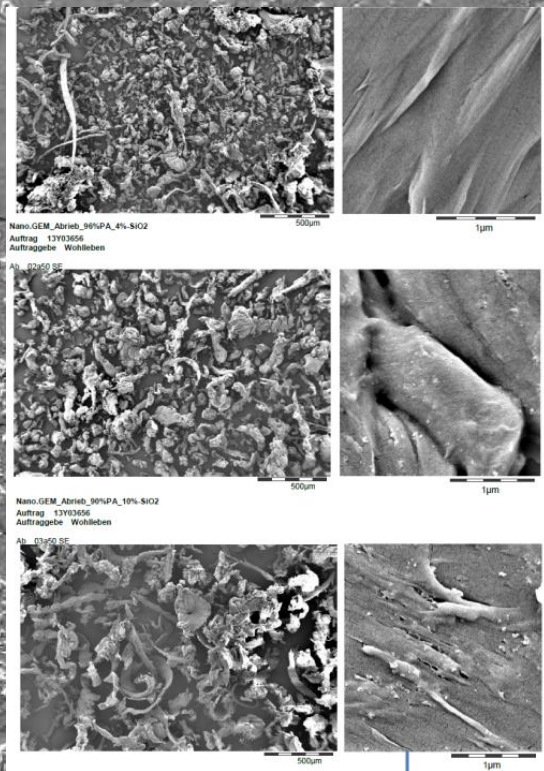
in-vivo
(Inhalation)

In-vivo auch höhere Toxizität für SiO₂ naked im Vergleich zu SiO₂ PEG-beschichtet



Polyamid-Abriebpartikel mit 0, 4 und 10% SiO₂-naked

In vitro-Test im Makrophagenmodell: keine Effekte



Ergebnisse:

- Viel erreicht
- International anerkannt (e.g. NanoSafetyCluster)
- Neue Methoden zur Detektion von NM entwickelt und evaluiert
- Interaktion NM mit Proteinen und Lipiden untersucht und Bedeutung für die Toxikologie identifiziert
- Oberfläche beeinflusst die Toxizität von Nanomaterialien
- In-vitro und in-vivo ähnliches Ranking
- Übergeordnetes Prinzip geeignet u.a. für Gruppierungen
→ vereinfachtes Testen, Möglichkeit der Modifikation der Toxizität



Danke

The bottom of the slide features a row of logos for the project's partners and funders. From left to right, the logos are: iuta (green circular logo); ZAUM TUM (blue and white text); Bayer MaterialScience, Bayer Technology Services, and Bayer HealthCare (all with Bayer logos); IBE R&D (blue and white text); Westfälische Wilhelms-Universität Münster (black and white text); BASF The Chemical Company (orange and white text); IGF (blue circular logo); Universität des Saarlandes (blue owl logo); Fachhochschule Dortmund University of Applied Sciences and Arts (orange and blue text); Partikel Analytik Meßgeräte (blue and white text); ItN/Nanovation (red and white molecular logo); Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (blue and white text); tascon Analytical Services & Consulting (grey and white text); CENIDE Center for Nanointegration Duisburg-Essen (orange and white text); Universität Duisburg-Essen (blue and white text); and Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (German eagle logo and text).