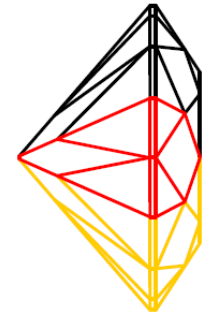


nano



G
E
M

Highlights der Forschungsergebnisse aus nanoGEM

Thomas A.J. Kuhlbusch



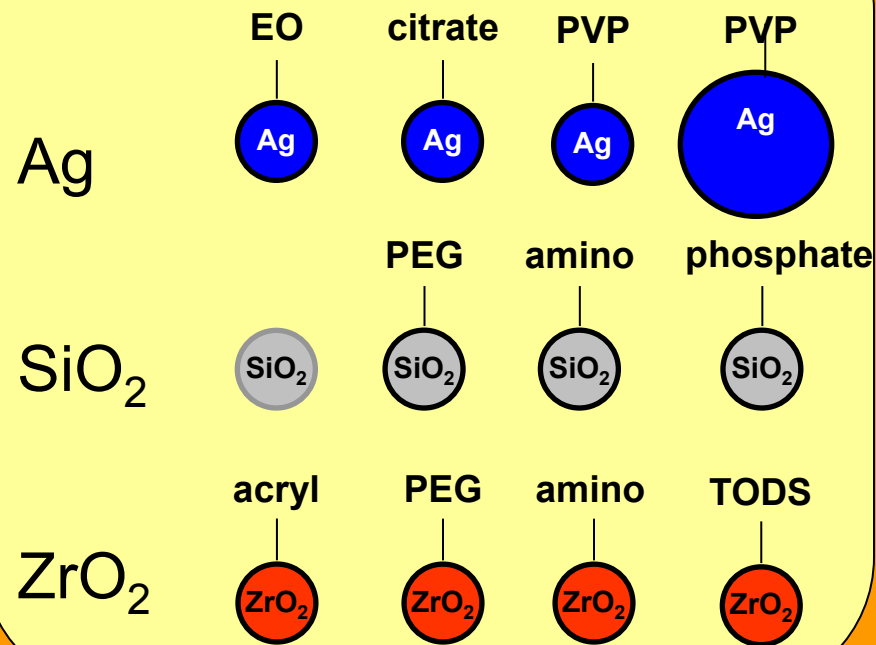
baua: BfR
Bundesanstalt für Arbeitsschutz
und Arbeitsmedizin
Risiken erkennen – Gesundheit schützen



Finanziert vom BMBF
(Förderkennzeichen 03X0105)

Systematische Matrix von Materialien

AP1.1 Synthese



TiO₂ ZnO BaSO₄ AlOOH

AP1.2 Fluo-SiO₂ Lumi-TiO₂

AP1.3 Charakterisierung

12 Nanomaterialien (nanoGEM)
+ 3 Komposite

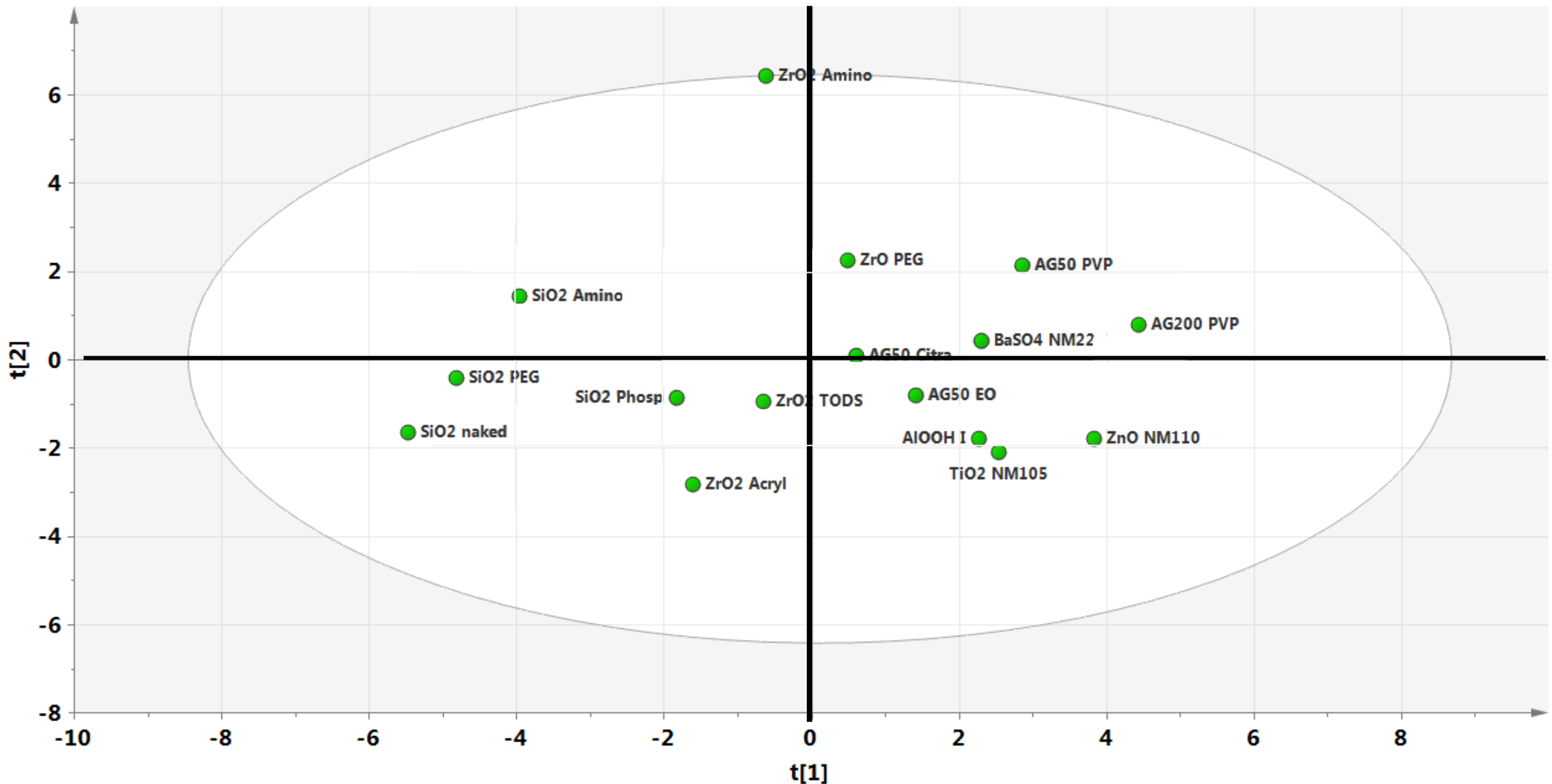
+ 4 Referenzmaterialien (OECD,
NanoCare)

+ 2 lumineszente Nanomaterialien
(nanoGEM)

Alle sterilisiert (WWU) vor Versand

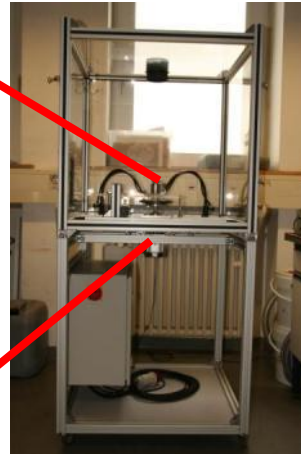
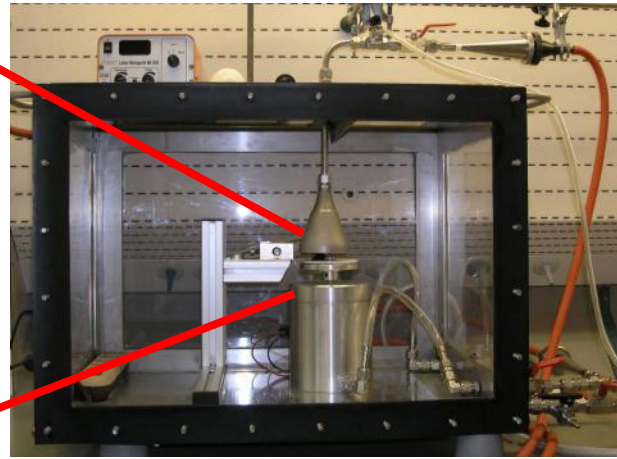
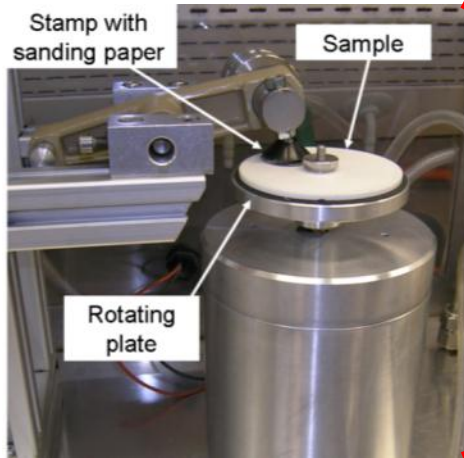
nur für AP3 **Biokinetik**

Materialdaten (APQ + AP1): PCA der Nanomaterialien



Entfernung ein Maß für die Verschiedenheit
 homogene Verteilung der nanoGEM-Materialien
 → sehr gut geeignet für Korrelationsuntersuchungen

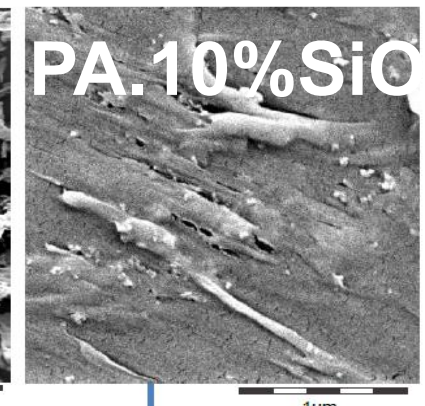
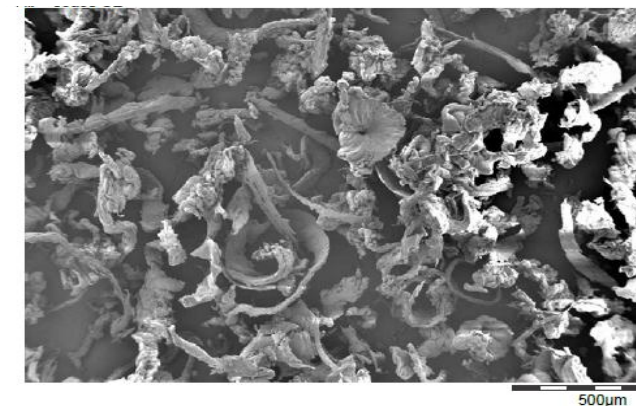
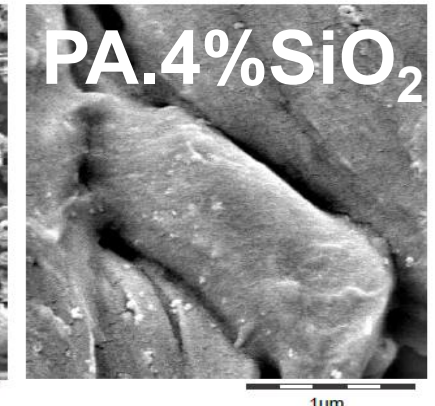
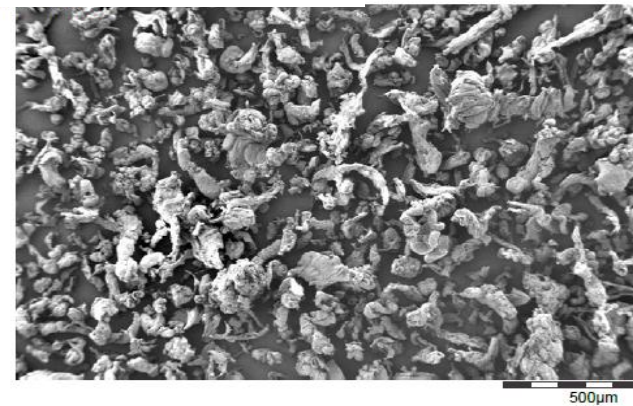
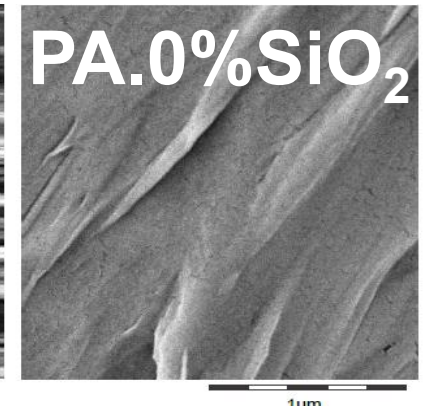
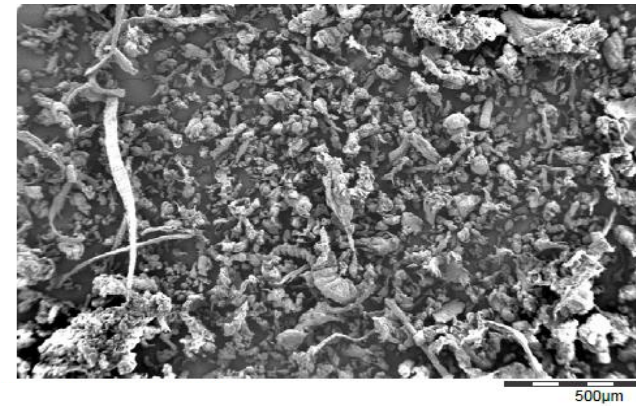
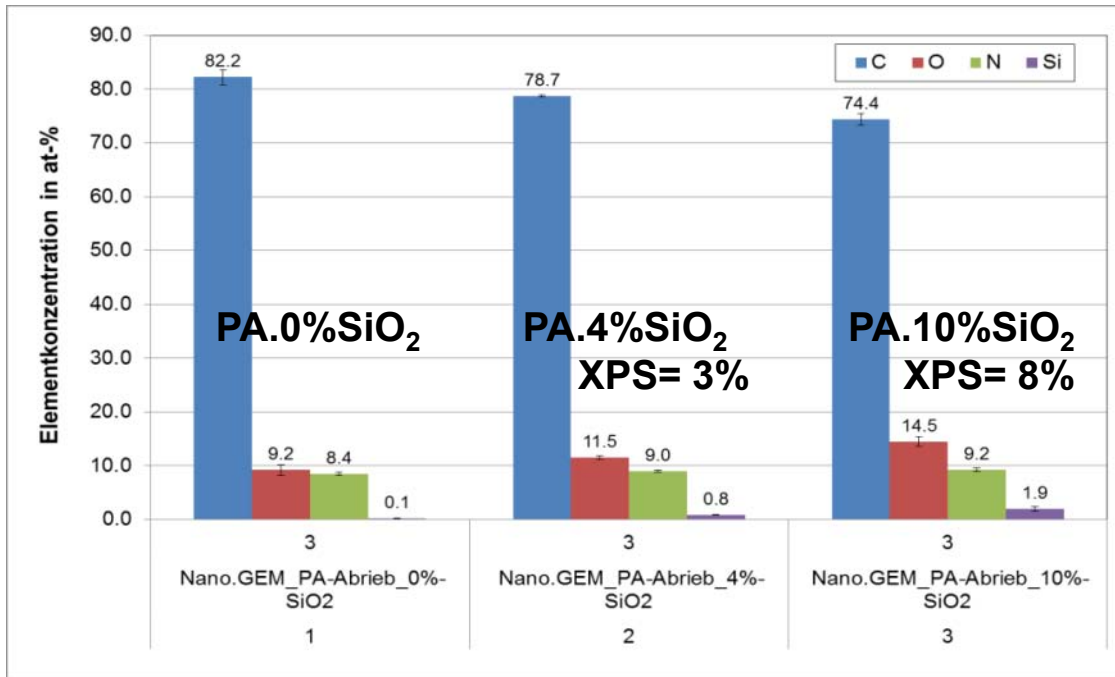
Freisetzung aus Nanokompositen (Schleifen)



Bayer Technology Services

Freisetzung aus PA.SiO₂

P80 Schleifpapier
250g Auflagegewicht
1,8 m/s Relativgeschwindigkeit

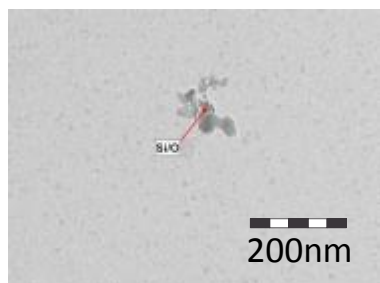
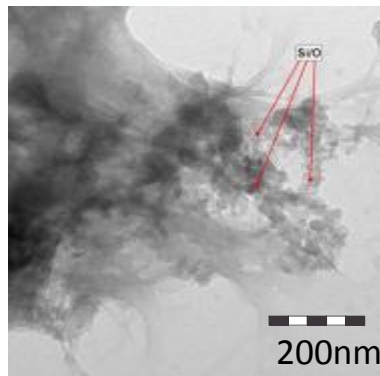
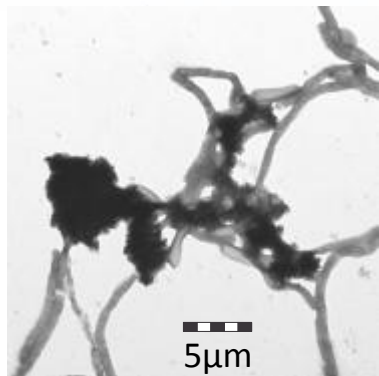
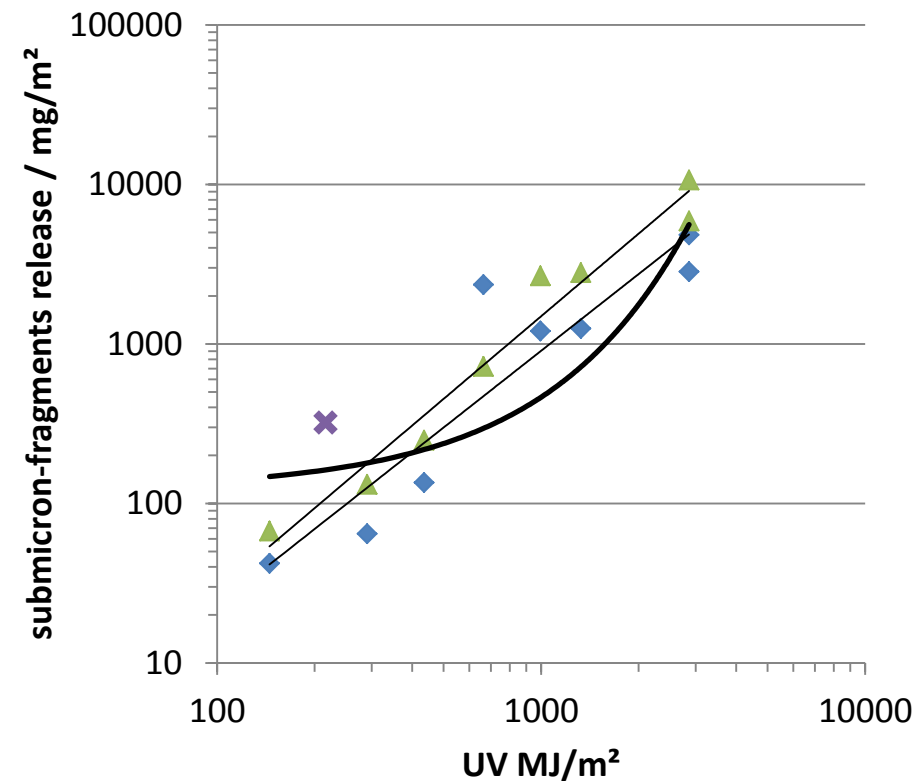
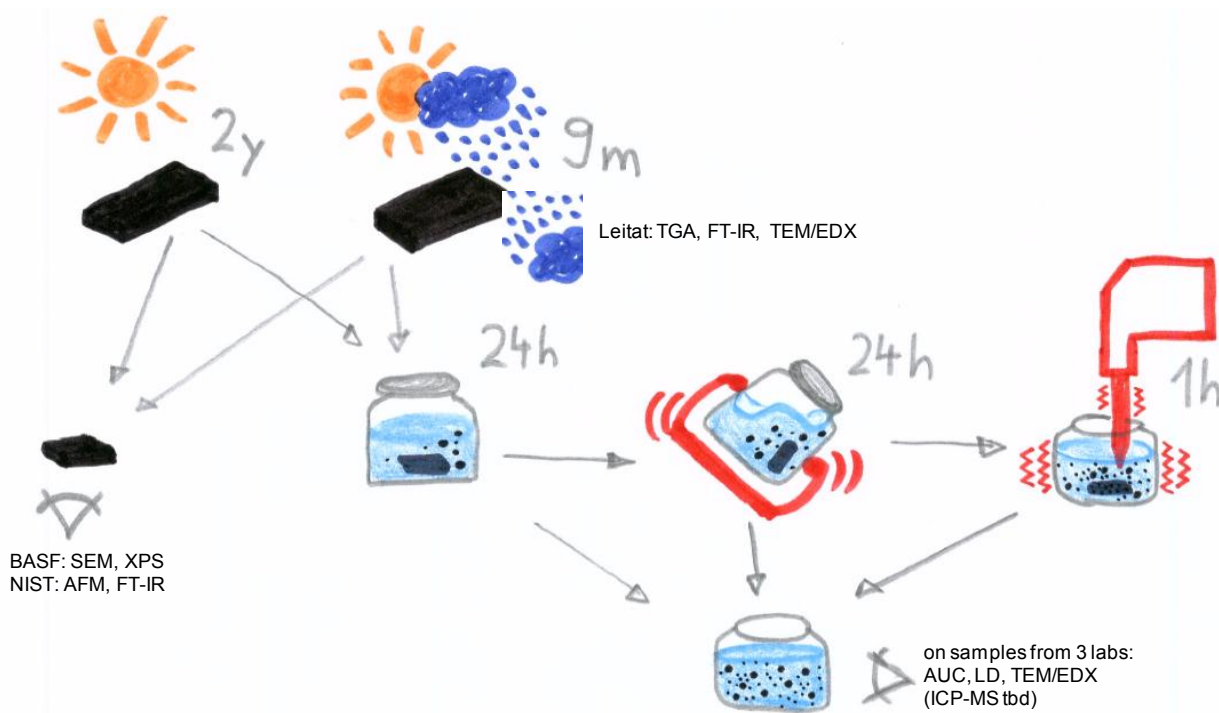


- Schleifen erzeugt 100 µm-große Polymer-Fragmente, die auf ihrer Oberfläche das originale Komposit darstellen
- Keine Hinweise auf freie SiO₂ Partikel durch Schleifen.

vergl. auch Vorbau et al. 2009, Saber et al. 2010

Verwitterung + Freisetzung

Kooperation nanoGEM – NIST (US) – NanoPolyTox (FP7)



Abgelöste Strukturen
Immersion+ Schüttler
nach UV (+Regen):
PA + 4% SiO₂

- **Qualitativ gleiche Fragmente aus spontaner Freisetzung in Regenwasser und aus Immersion: 90% Polymer**
- **Etwa 3mg / MJ, gleiche Größenordnung aber mehr durch Regen (X) statt UV+Immersion (—)**
- **Weitere Harmonisierung in EU SUN + GuideNano + ILSI NanoRelease (EPA)**

Markierung und Detektion von NM

Material	Markierung	Detektion
TiO ₂	Lumineszenz @Eu	optisch
SiO ₂	Lumineszenz @Si	optisch
	Lumineszenz @FITC	optisch
	Lumineszenz @FITC + TxR	
TiO ₂		Raman, ToF-SIMS
ZrO ₂		Raman, ToF-SIMS
Ag		Raman, ToF-SIMS

} für biokinetische Untersuchungen



Bayer Technology Services



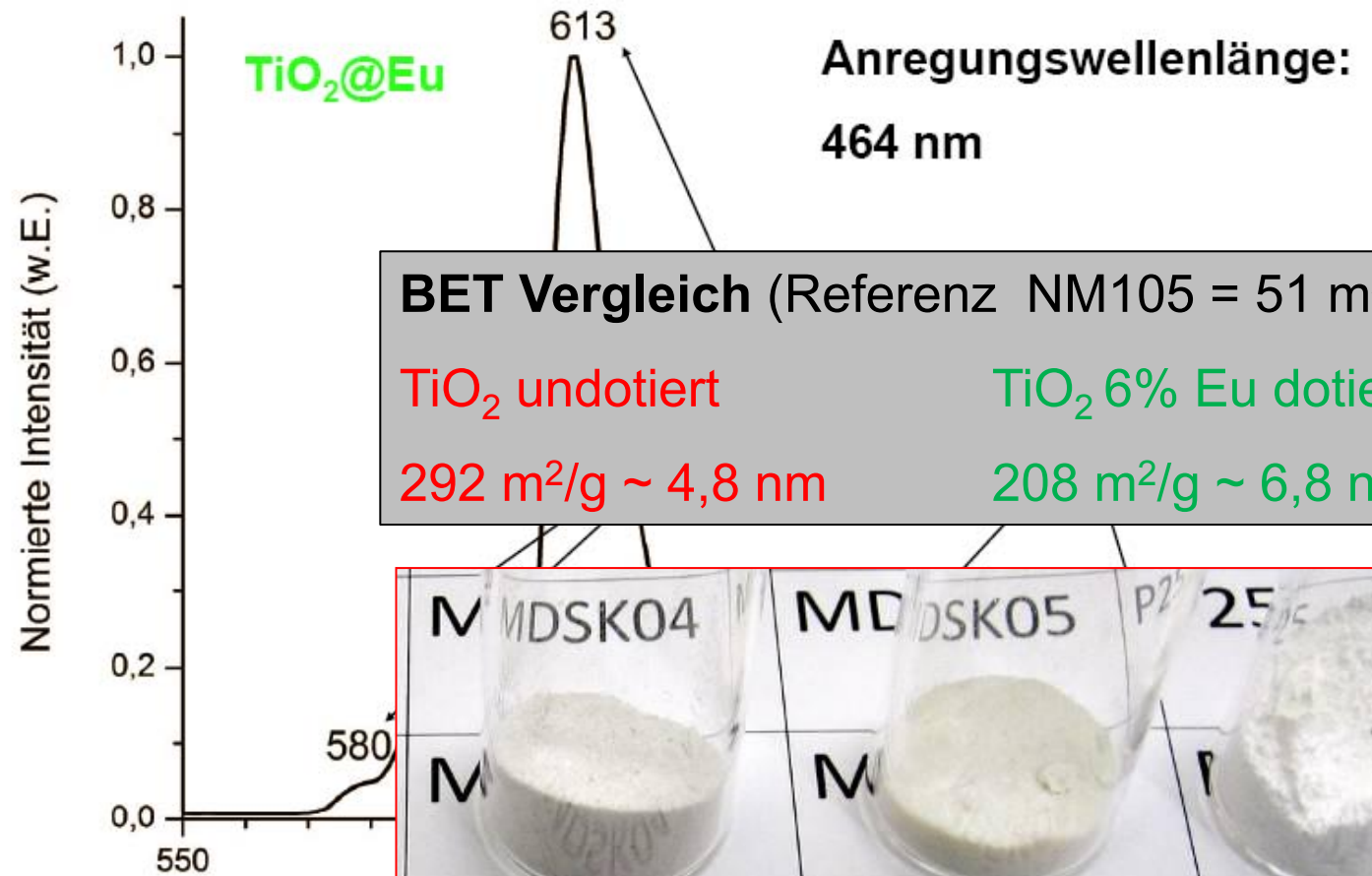
Eu-dotierte TiO_2 -Nanopartikel ($\text{TiO}_2@Eu$)

Flammenreaktor mit

Titan-Tetraisopropoxid + $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ in 2-Propanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)



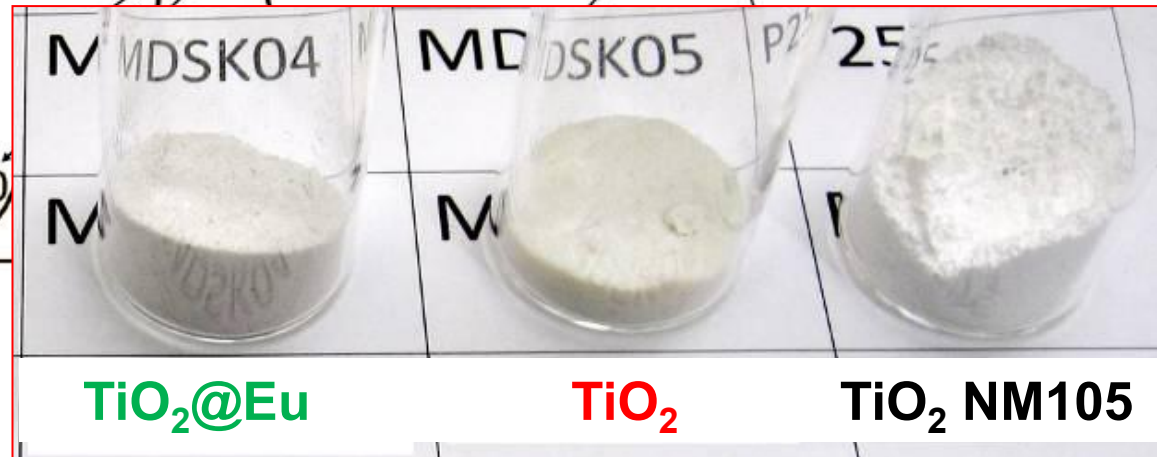
UV-Lumineszenz



BET Vergleich (Referenz NM105 = 51 m²/g)

TiO_2 undotiert
292 m²/g ~ 4,8 nm

TiO_2 6% Eu dotiert
208 m²/g ~ 6,8 nm



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

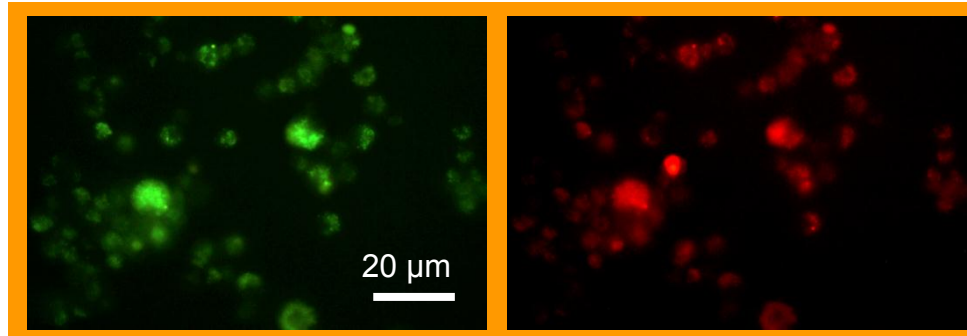
1. Markierungsstrategie



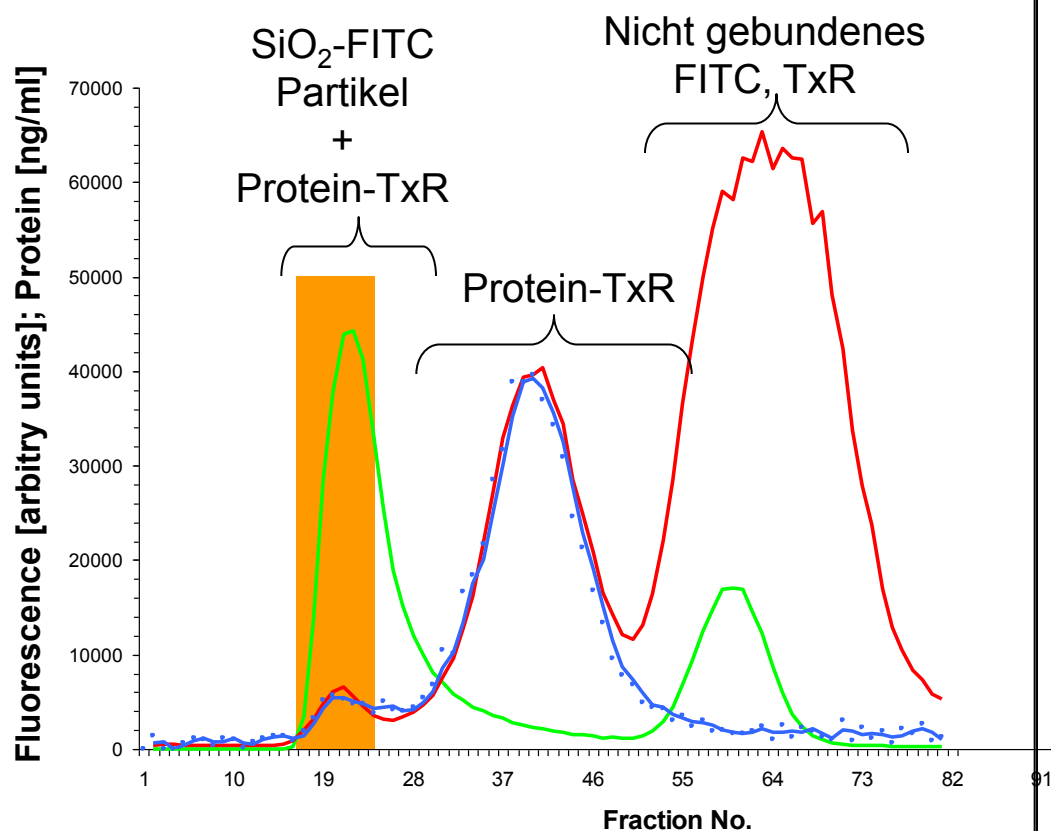
SiO₂-FITC Partikel + Albumin
→ Bildung der Proteinkorona

Kovalente
Markierung mit
TxR-NHS

3. Grüne und rote Fluoreszenz in Makrophagen



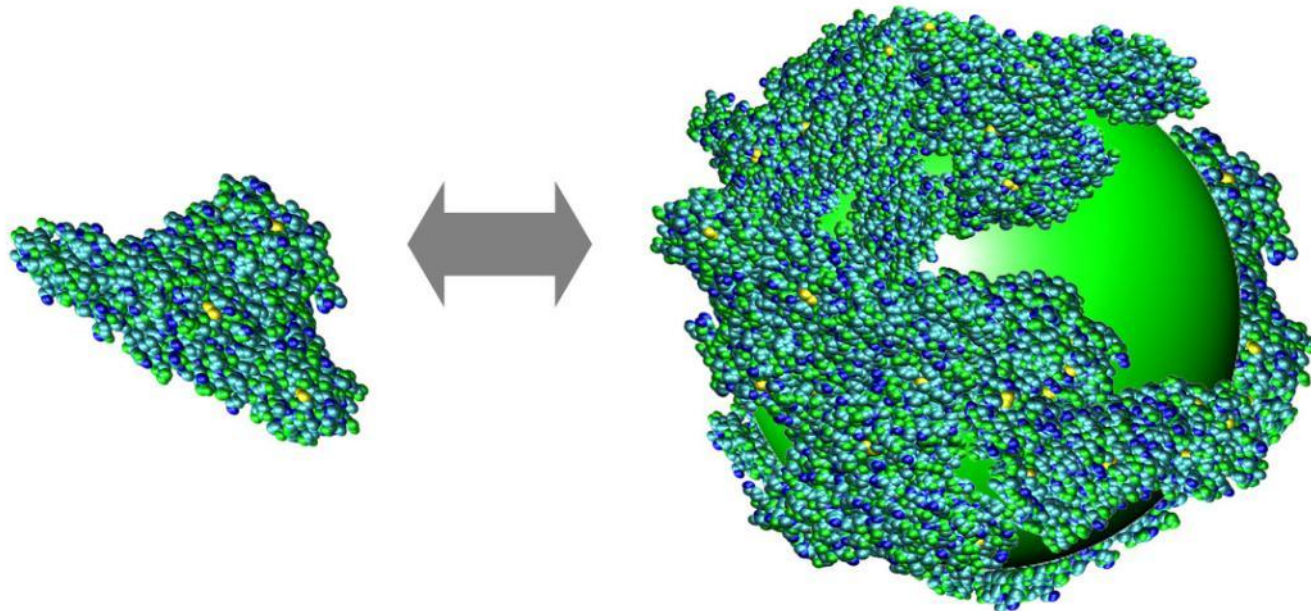
2. Reinigung der markierten Partikel



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

Proteinabsorption und Toxikologie

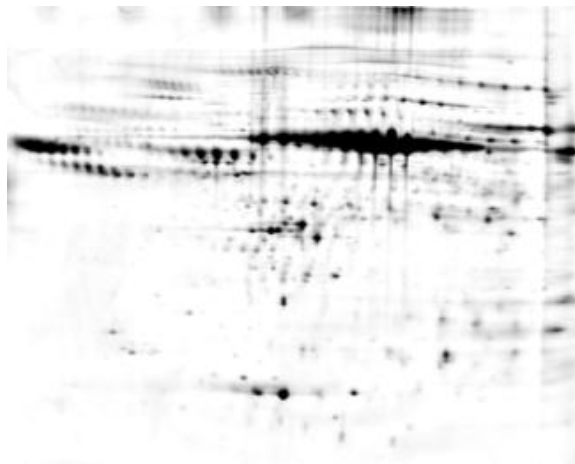
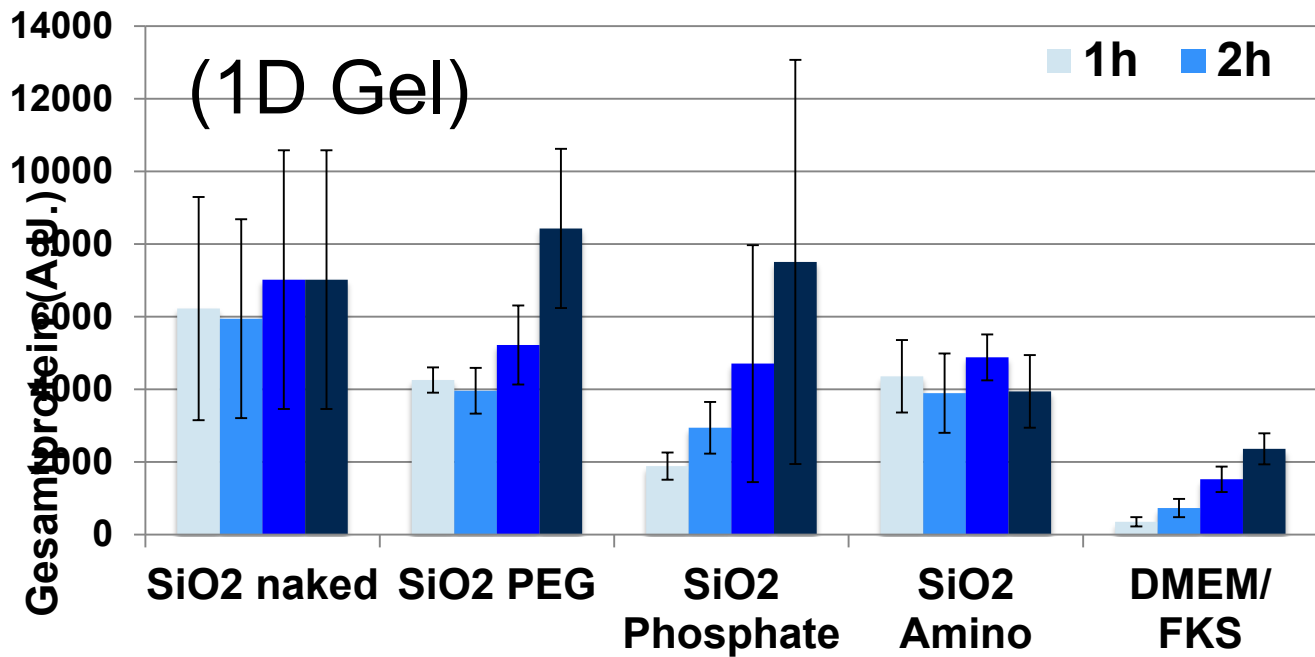
- NM, Proteinadsorption und toxikologische Wirkung



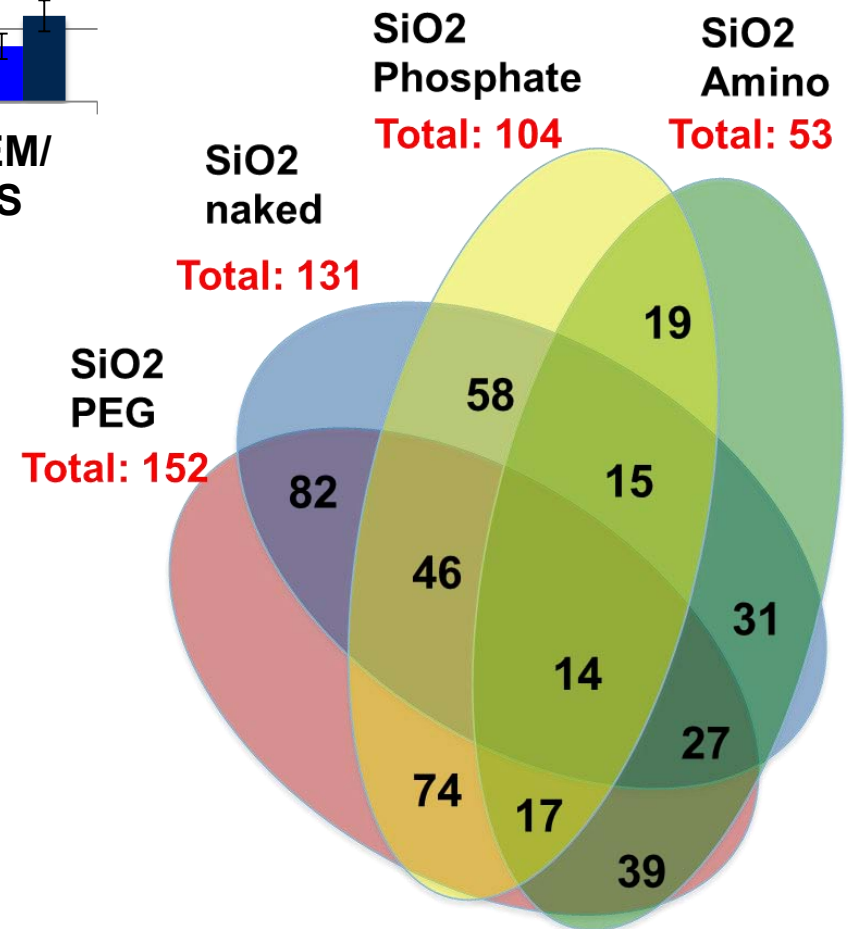
Prof. Nienhaus, KIT

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

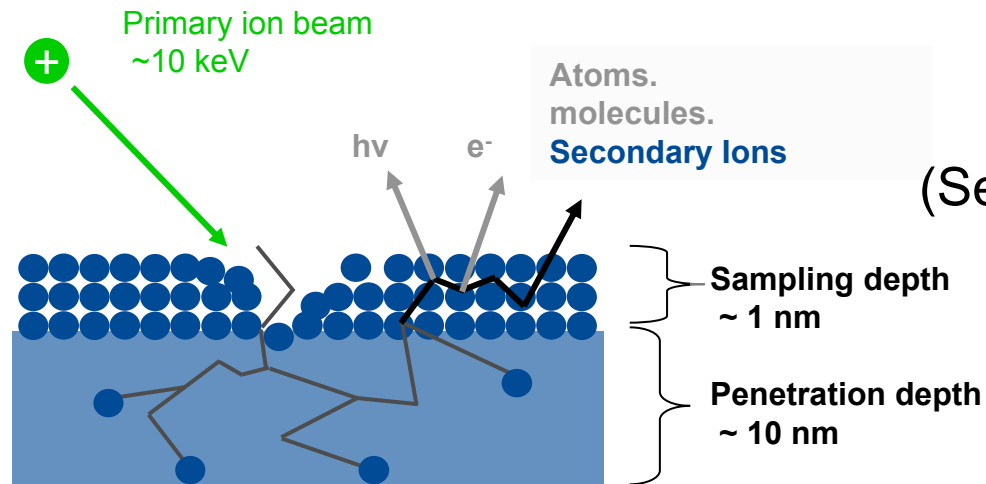
Interaktion mit Proteinen: DMEM + FKS



(2D Gel)

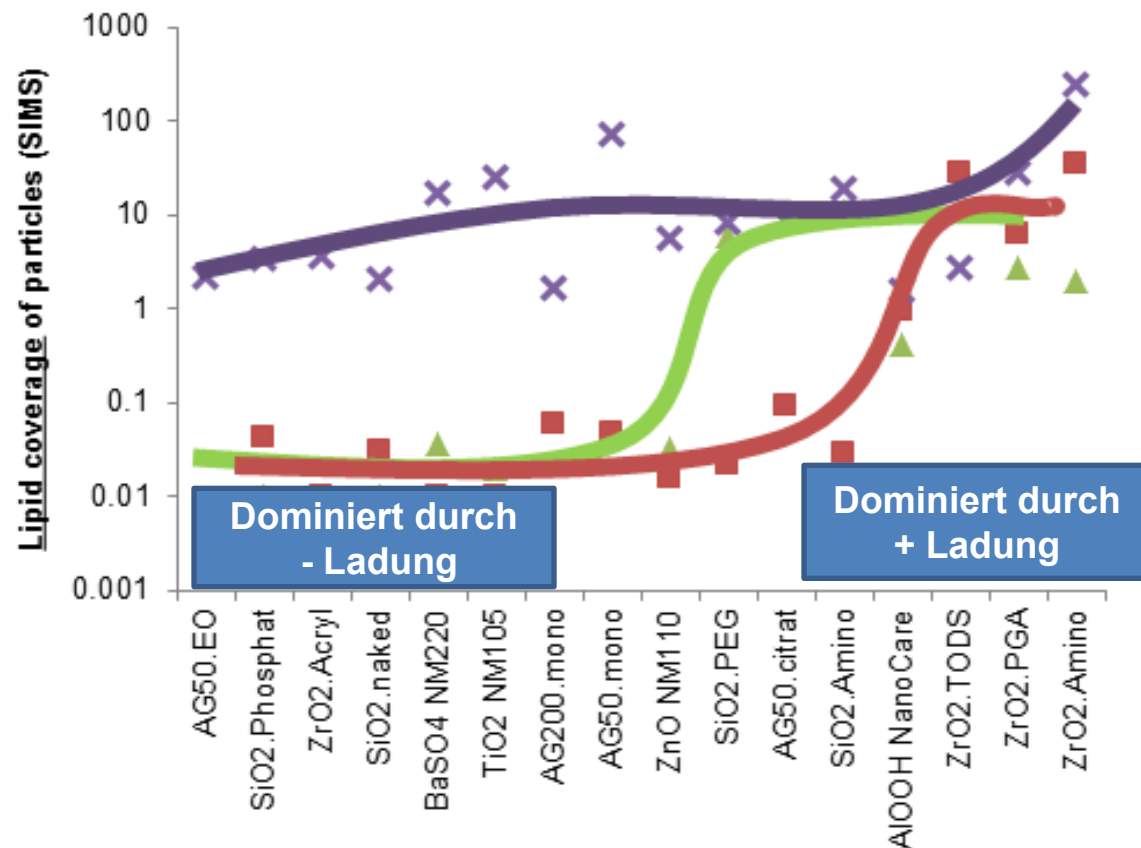


Lipidaffinität gering, durch Protein verstärkbar



SIMS

(Secondary Ion Mass Spectrometry)



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

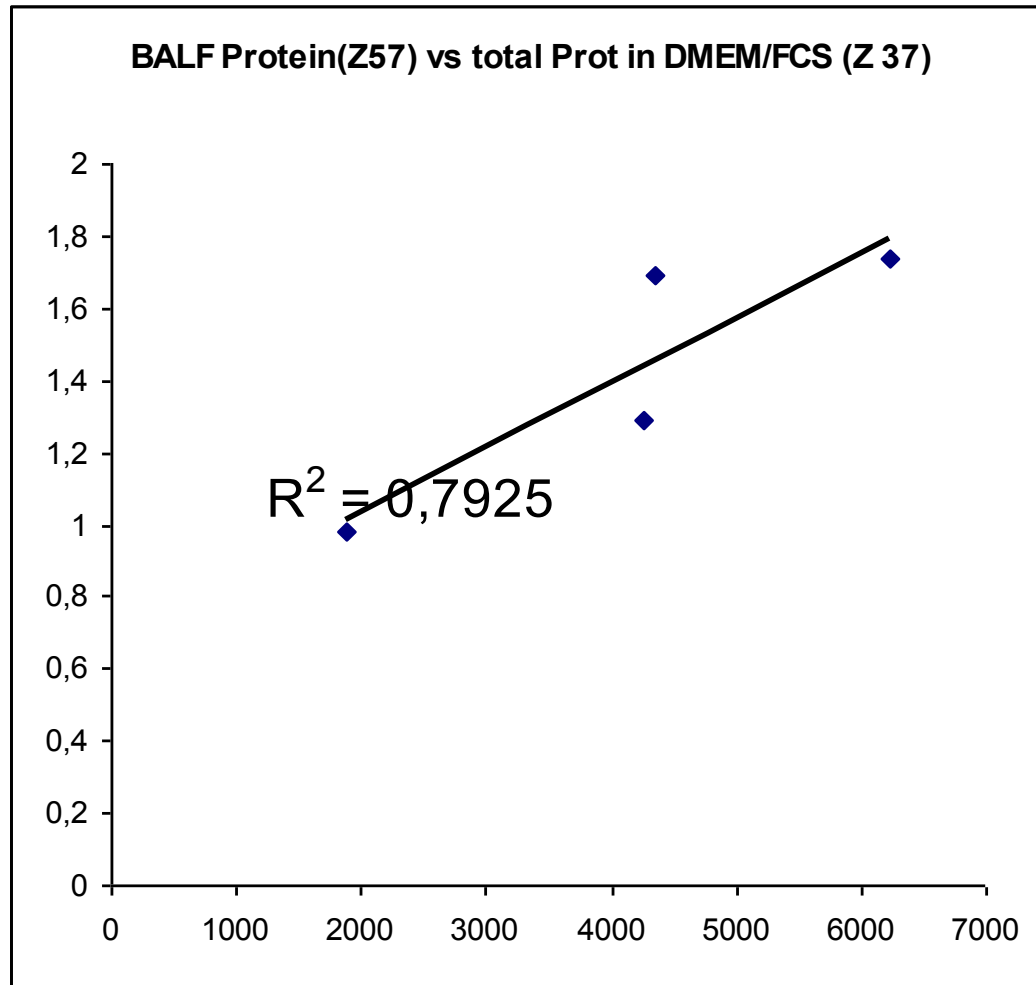
Für 11 von 16 NP: Ladung entscheidet über Lipidinteraktion

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

Vergleiche: 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 bronchial-
alveolaren Lavageflüssigkeit

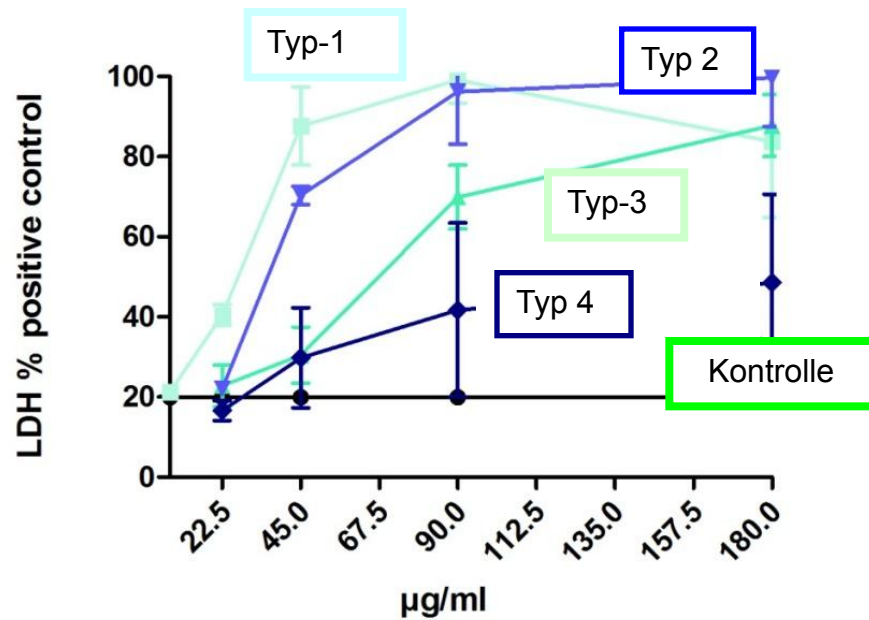


Je stärker die
Proteinbindung desto
stärker der schädigende
Effekt in vivo.

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

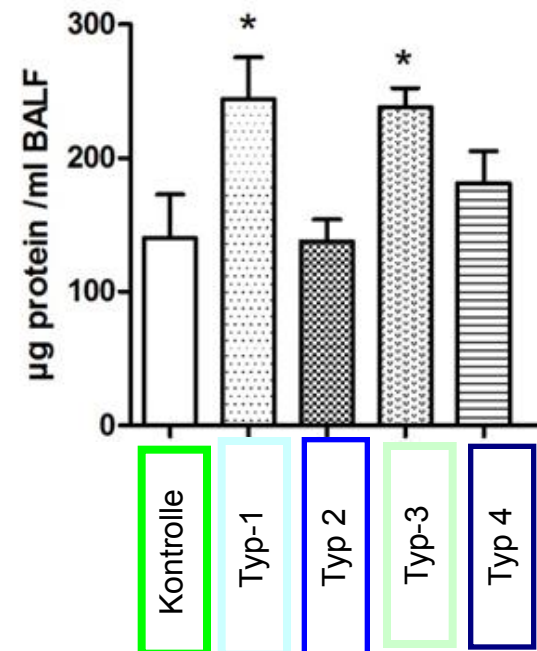
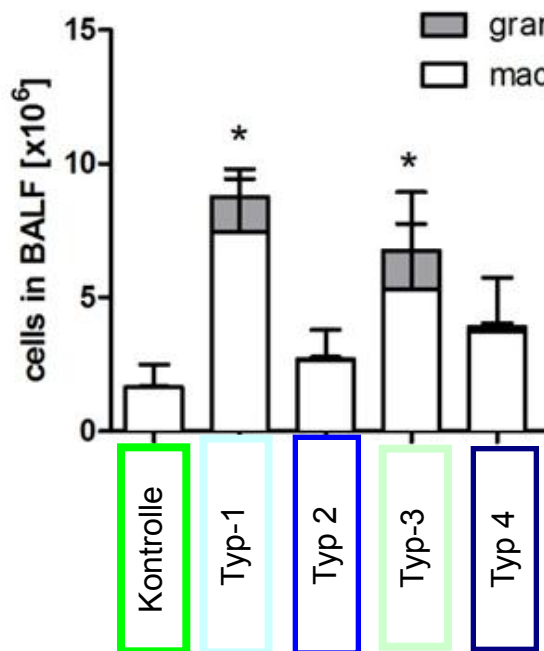
SiO₂-NP: Vergleich Makrophagenmodell vs. Instillation

in-vitro



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

in-vivo
(Instillation)



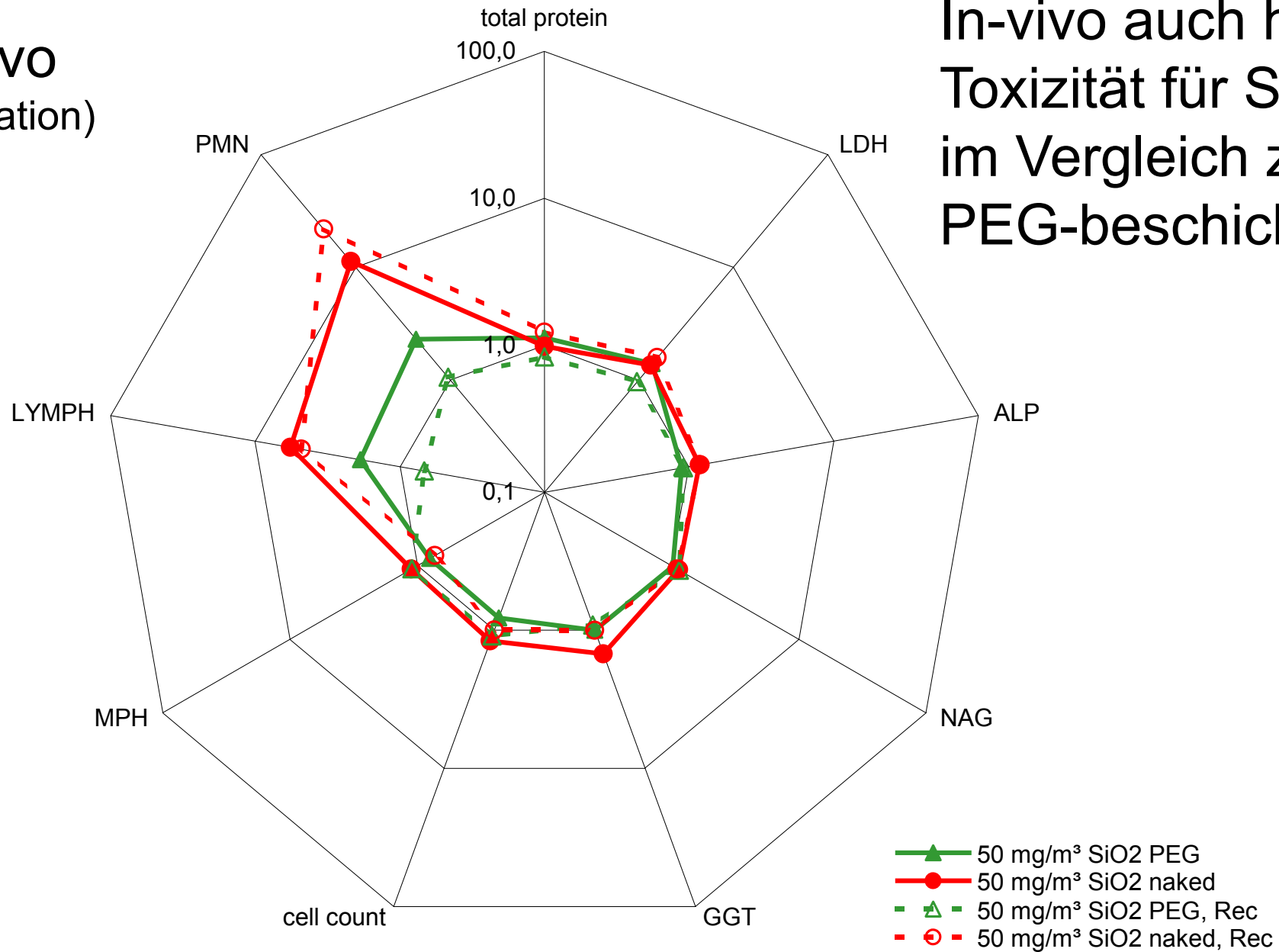
Toxizität im vorgeschädigten Organismus Instillationsstudien in der Maus



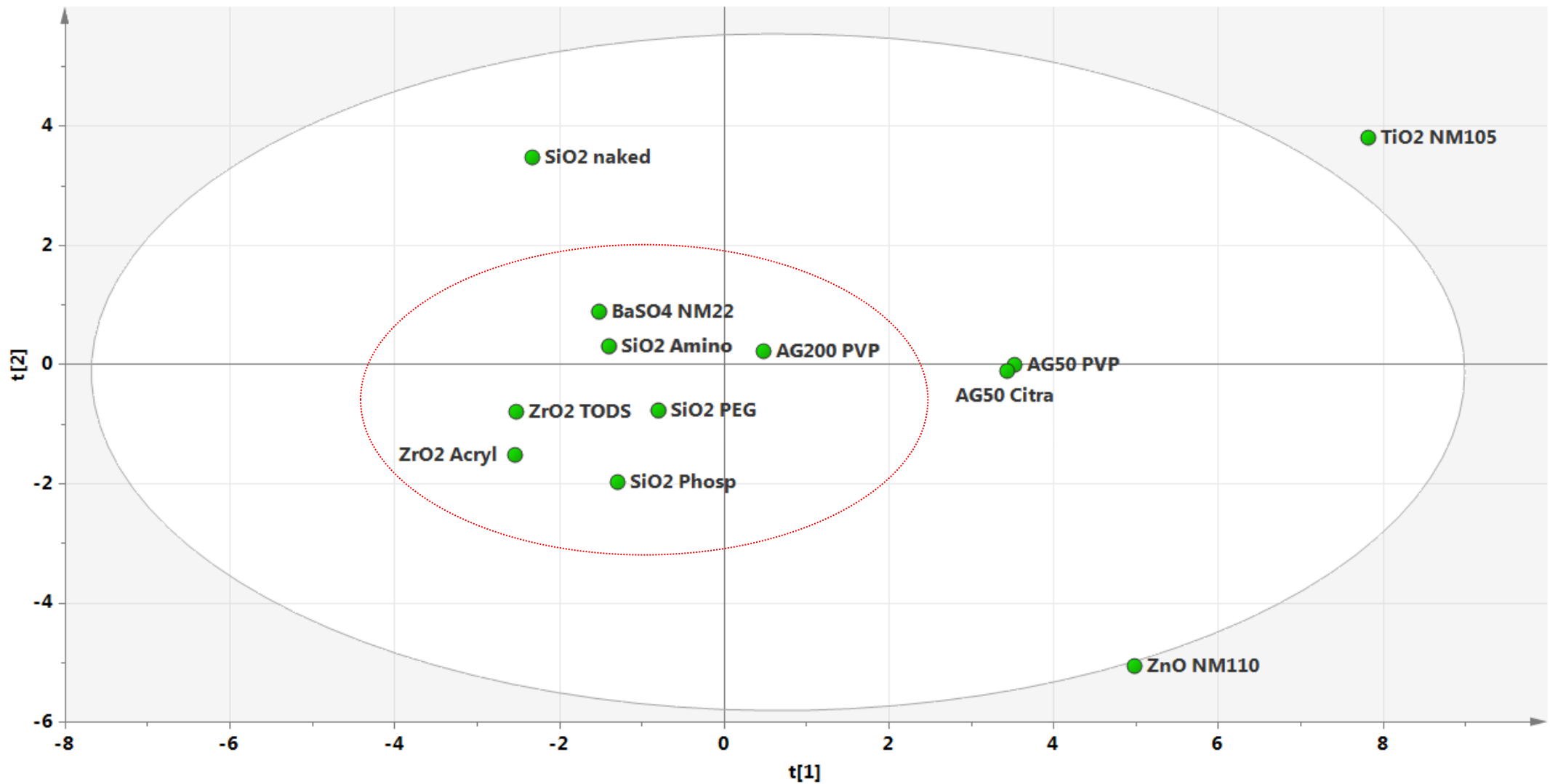
Aus Veröffentlichungsgründen
nicht gezeigt

**SiO₂ naked/ SiO₂-PEG aber nicht SiO₂-P/ SiO₂-NH₂
verschärfen allergische Atemwegsentzündungen!**

in-vivo
(Inhalation)



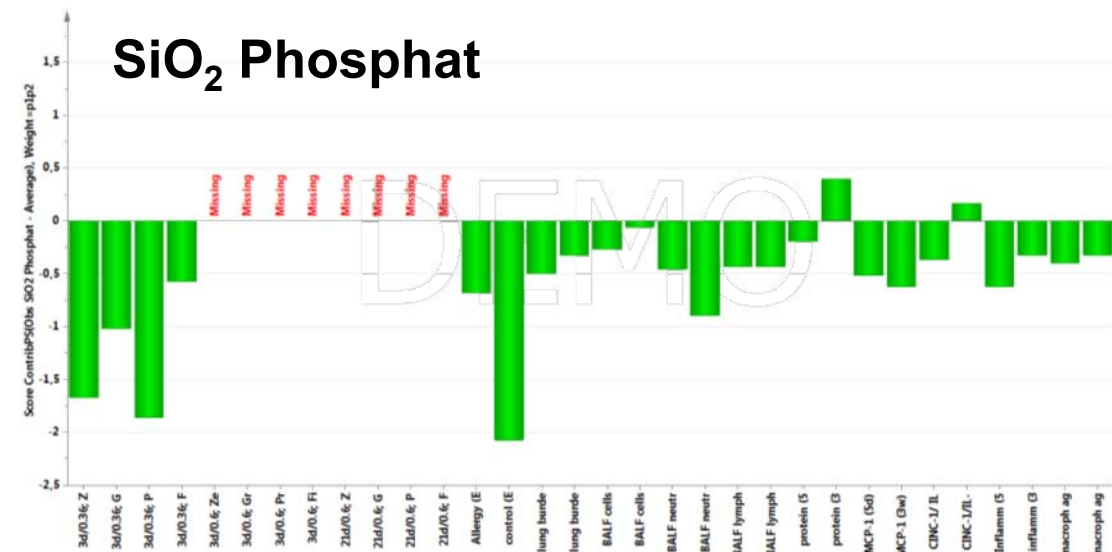
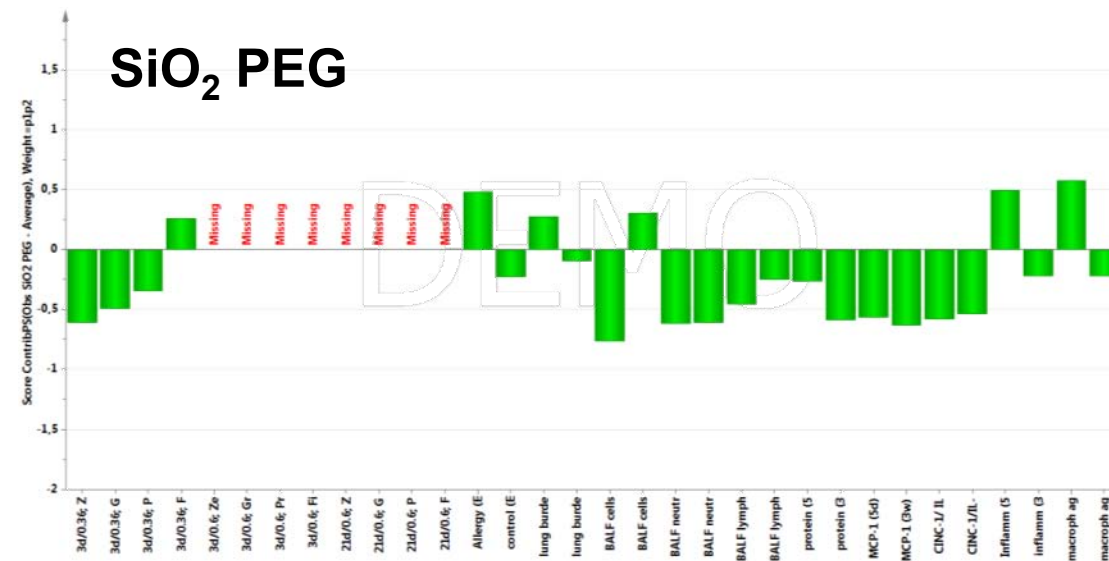
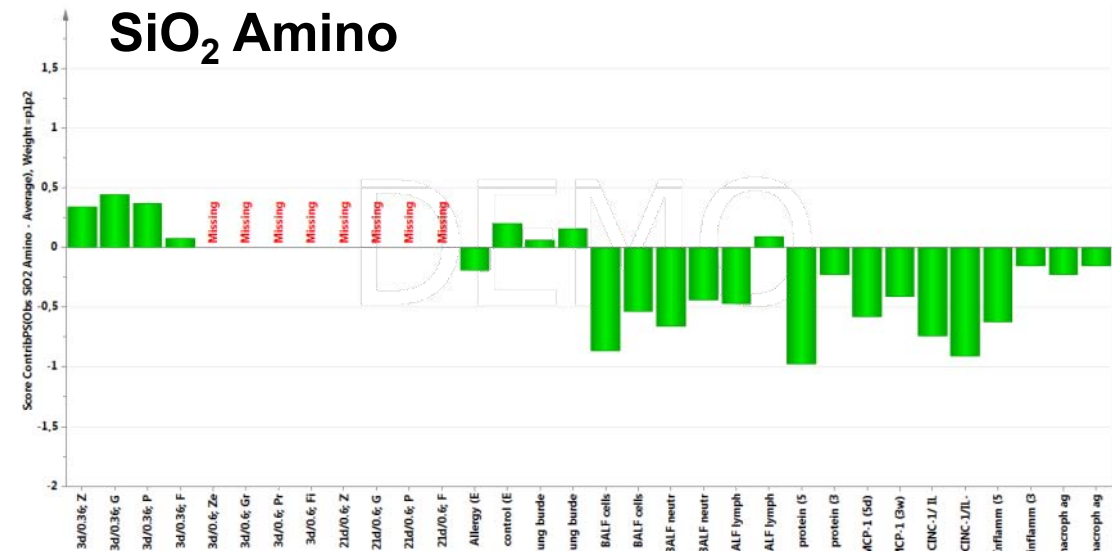
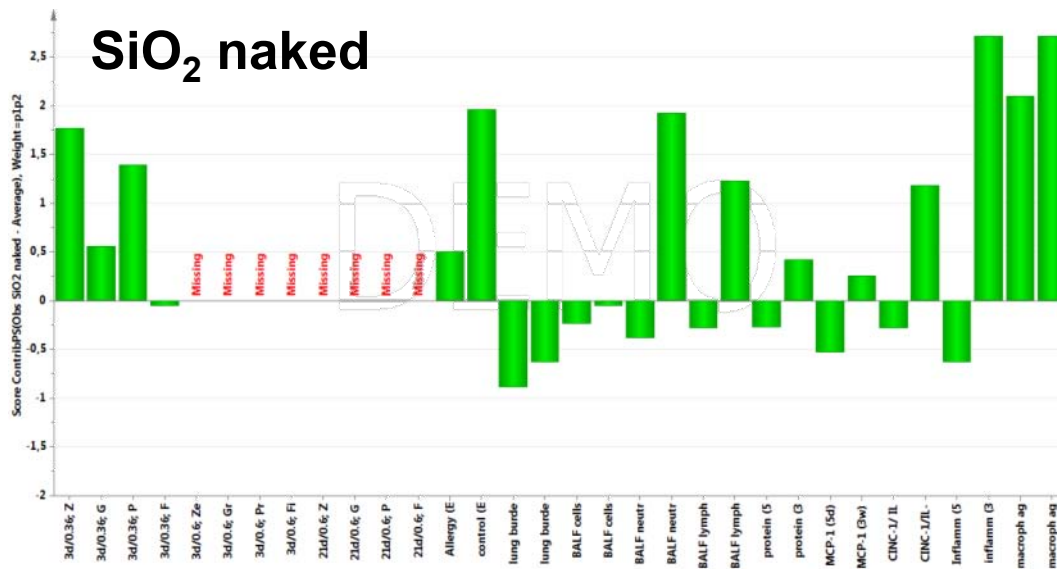
In-vivo auch höhere
Toxizität für SiO₂ naked
im Vergleich zu SiO₂
PEG-beschichtet



SIMCA 13.0 - 09.06.2013 15:17:17 (ITC-4)

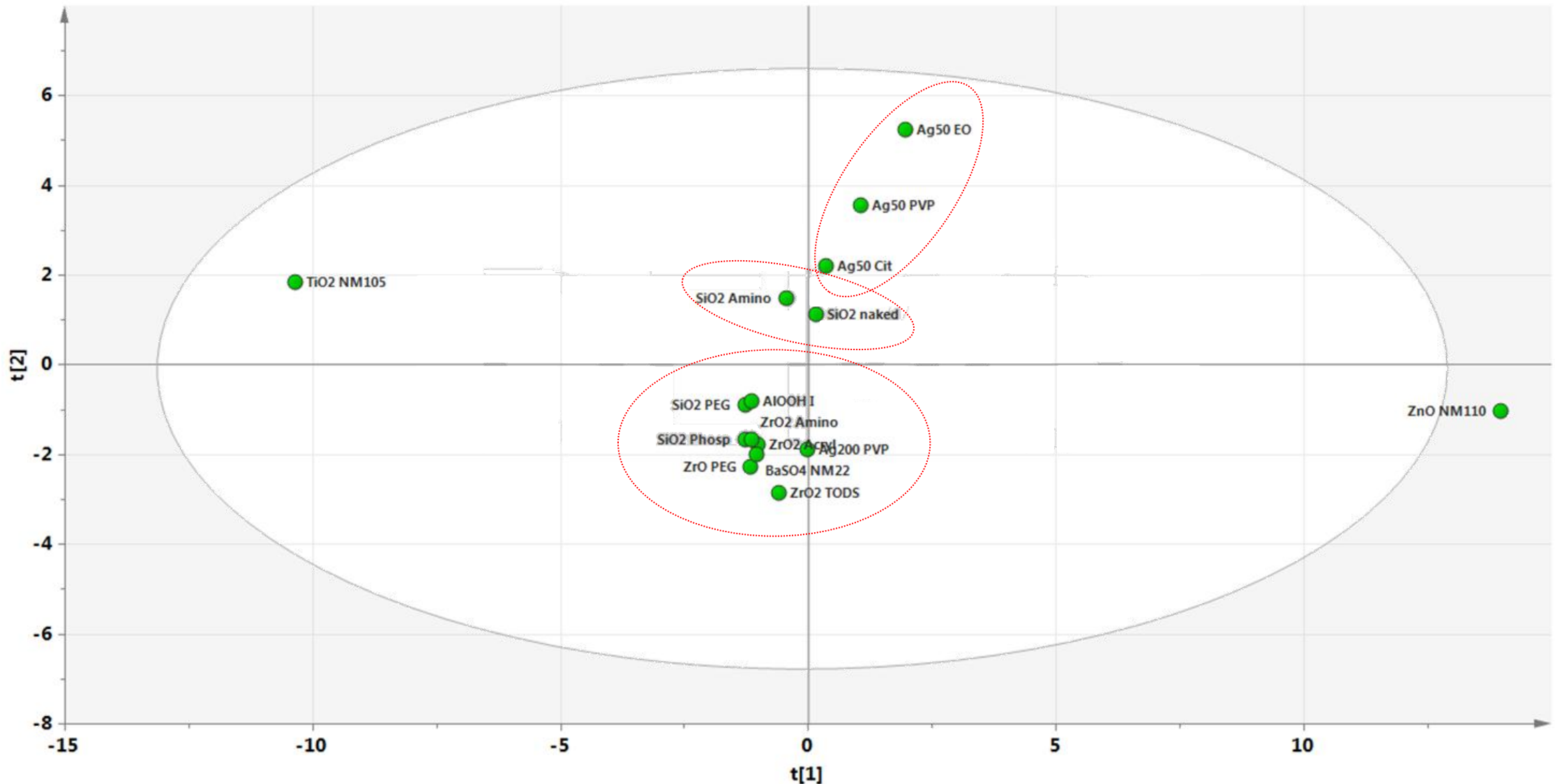
- Großes Cluster an „untoxischen“ Materialien
- Abgegrenzt davon SiO₂ naked, TiO₂, ZnO, Ag50 (NM mit Effekten)
- Aber ZnO & TiO₂ liegen nicht zusammen → unterschiedlich

In vivo Daten (PCA)



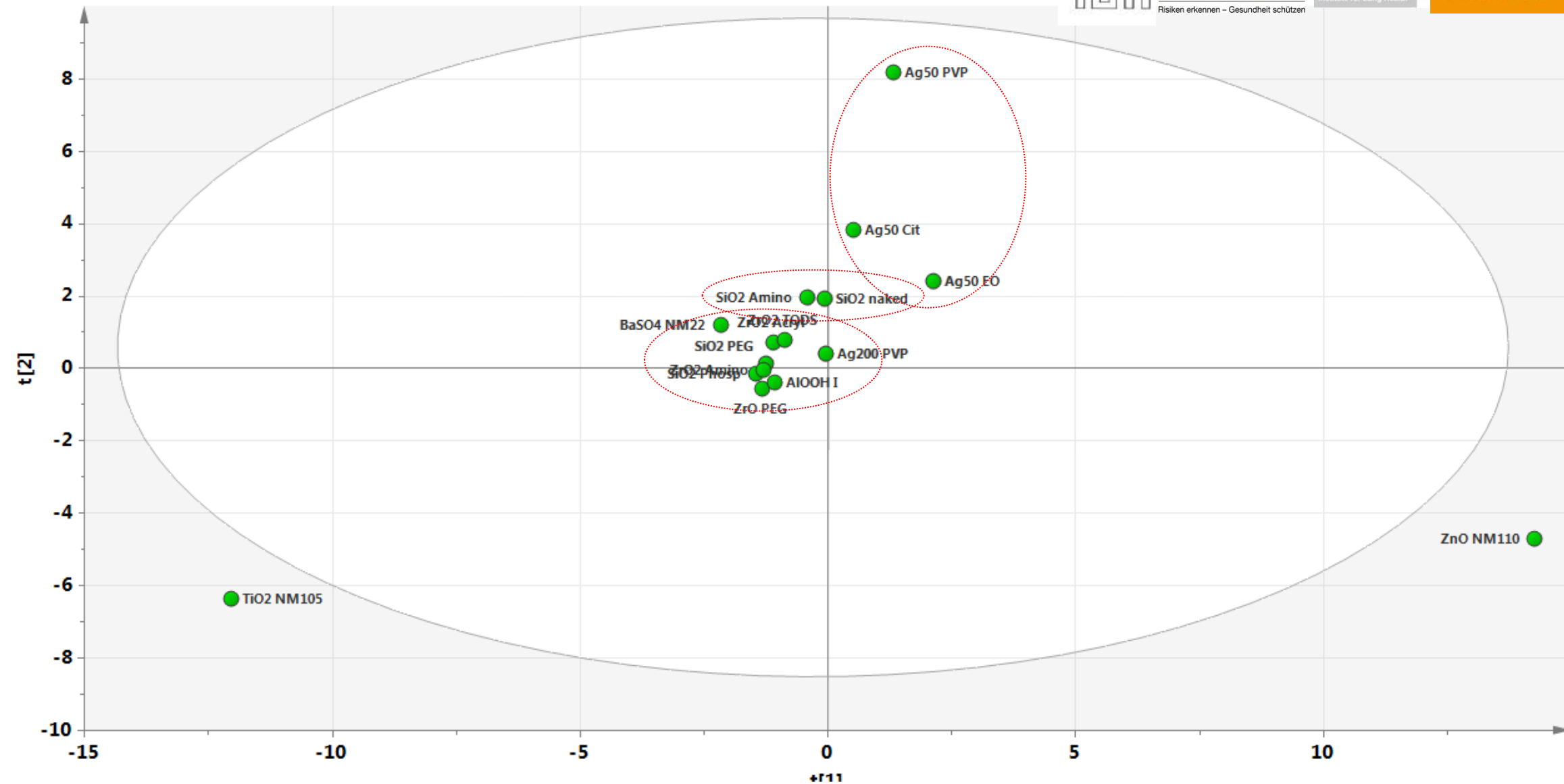
Beiträge der einzelnen Endpunkt für die PCA der jeweiligen NM SiO₂ Varianten verhalten sich unterschiedlich in den untersuchten Endpunkten

In vitro Daten (PCA)



- großes Cluster an Materialien mit geringer Toxizität (Referenz BaSO₄)
- deutlich abgegrenzt davon die NM mit Effekten

in vitro & in vivo Toxikologie (PCA)



- großes Cluster an Materialien mit geringer Toxizität (Referenz BaSO₄)
- SiO₂ Amino und Ag200 relativ nahe an BaSO₄ → geringe Toxizität
- Abgegrenzt davon die NM mit AG50, ZnO & TiO₂, weit auseinander

Risikoabschätzung: Zusammenfassung 1

- ✓ Gesundheitliche Wirkungen von Nanomaterialien sind durch bekannte Wirkprinzipien zu beschreiben
- ✓ Etablierte Bewertungsmethoden sind nutzbar
- ✓ Kategorisierender Ansatz ist möglich und erleichtert Bewertung
- ✓ Trotzdem: immer umfassende Datenbewertung nötig

Risikoabschätzung: Zusammenfassung 2

- ✓ Bisher zeigen die Daten:
Nanotoxikologie ist vor allem Staubtoxikologie
- ✓ Hier: alveolengängige, un-/schwerlösliche Stäube
- ✓ Differenzierung granuläre & faserige Stäube
 - ▶ v. a.: *Minderung Exposition gegenüber kritischen Stäuben*

Das tägliche Brot:

Es bleiben quasi immer Datenlücken und Fragen offen:

Risikobewertung/-abschätzung ist ein iterativer Prozess

Resümee

- Freisetzung von größeren Partikeln (NM + Matrix) bei Schleifen
➔ zeigten geringere Toxizität
- Verschiedene 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 zur Verringerung der Toxizität
- Interdisziplinäre und Interessensübergreifend
Zusammengearbeitet
- Viele internationale Kooperationen und Verwendung von nanoGEM-Resultaten
- Beiträge zur OECD, NanoSafetyCluster, CEN.....



Danke

The image displays a row of logos for various partner organizations and funding bodies. From left to right, the logos include: iuta (green circular logo); ZAUM TUM (blue and white text); Bayer MaterialScience, Bayer Technology Services, and Bayer HealthCare (all featuring the Bayer cross logo); IBE R&D (blue and white text); Westfälische Wilhelms-Universität Münster (black and white text); BASF (orange and white text); IGF (blue and white text); Universität des Saarlandes (blue and white owl logo); Fachhochschule Dortmund (University of Applied Sciences and Arts) and 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).