

5.10.2010



# **Toxikologische Auswirkungen von Nanopartikeln – Aufnahmewege, Ausscheidung und Wirkungsweise**

**IVSS Kolloquium Nanotechnologie  
Luzern, 5.10.2010**

**Dr. Valic Eva, MTox  
HUB, AUVA  
A. Stifterstr. 65, 1200 Wien  
eva.valic@auva.at**

[www.auva.at](http://www.auva.at)

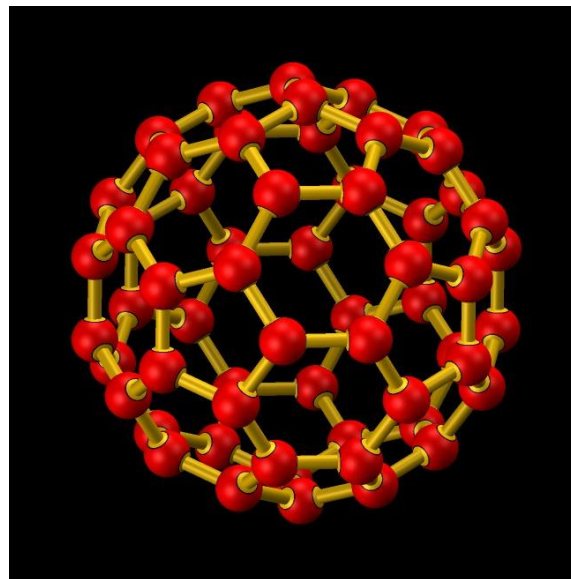
## Toxikologie von Nanopartikel

- Die gesicherten toxikologischen Daten stammen vorwiegend aus Studien mit ultrafeinen Stäuben
- Einige Eigenschaften der Nanopartikel sind besonders besorgniserregend, z.B. ausgeprägte Reaktivität, Durchgängigkeit durch die Körper- und Zellbarrieren und Unlöslichkeit (Biopersistenz)
- Verunreinigungen während des Syntheseprozesses, z.B. Schwermetalle als Katalysatoren
- Unzureichende toxikologische Daten, die Expositionszeiten für mögliche chronische Effekte sind sehr kurz, Applikationswege in Tierversuchen entsprechen nicht den realen Bedingungen in der Arbeitswelt
- Eine sichere Risiko-Extrapolation zwischen ultrafeinen Stäuben und Nanopartikel ist nicht möglich, da es sich teilweise um völlig unterschiedliche Strukturen/Eigenschaften handelt

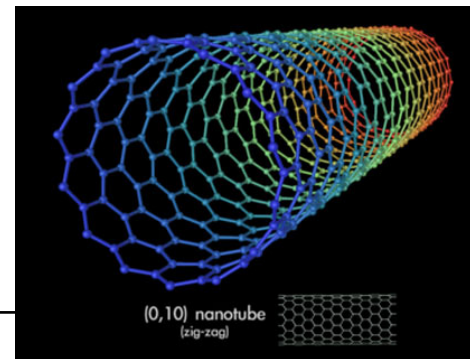
## Die gesicherten toxikologischen Daten aus Studien mit ultrafeinen Stäuben

<b>Ultrafeine Partikel</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Gesundheitseffekte Tier</b>	<b>Gesundheitseffekte Human</b>
<b>Dieselruß</b>	<b>Verbrennung von Diesel</b>	<b>Entzündung, Fibrose, Krebs</b>	<b>Entzündung, Krebs?</b>
<b>Schweißrauch</b>	<b>Schweißen</b>	<b>Entzündung, Translokation von Metallen in Zentralnervensystem</b>	<b>Metалldampffieber, Fibrose, Krebs, Bronchitis</b>
<b>Asche</b>	<b>Kohle- oder Öl Verbrennung</b>	<b>Entzündung</b>	<b>Keine Daten verfügbar</b>
<b>Carbon Black</b>	<b>Verbrennung von Heizöl</b>	<b>Entzündung, Lungenkrebs, Translokation von Partikeln in Zentralnervensystem</b>	<b>Keine Daten verfügbar</b>

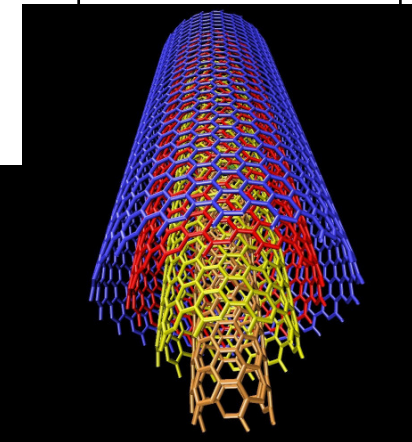
Nanoobjekt	In vitro	Tierversuch	Human
<b>Fullerene</b> (sphärische Moleküle aus Kohlenstoffatomen)	<b>Membranpassage</b> <b>Zelltoxizität</b> <b>Oxidativer Stress</b> <b>Phototoxizität</b> <b>Gentoxizität</b>	<b>Ratte: Letal Dose<sub>50</sub> = 600mg/kg i.p.</b> <b>Akute Entzündung der Lunge nach i.t.</b> <b>Instillation</b> <b>Nierenschädigend</b> <b>Zerfall von Rotblutkörperchen</b> <b>Plazentagängig, Reproduktivtoxisch</b> <b>Metallofullerene- Tod durch Thromboembolie</b> <b>Bildung von spezifischen Antikörper</b>	<b>Keine Daten verfügbar</b>



Nanoobjekt	In vitro	Tierversuch	Human
<p><b>Carbon Nanotubes</b> (Kohlenstoffröhrchen) <b>SWCNT</b>- single wall <b>MWCNT</b>- multi wall</p>	<p><b>Membranpassage</b> <b>Häufung in der Zelle und Zellkern</b> <b>Anstieg von Entzündungsmediatoren</b> <b>Zelltoxizität</b> <b>Oxidativer Stress</b> <b>Gentoxizität</b> <b>T-Lymphozyten: Zellschädigung und Zelltod</b> <b>Immunsuppression: Suppression der B-Lymphozytenfunktion</b> <b>Gefäßzellen: Anstieg der inflammatorischen Gentranskription</b> <b>Aktivierung des Komplementsystems in Humanserum (Entzündungskette)</b> <b>Hypothese: Metallgehalt von CNT (bis 50%) ist für biol. Effekte verantwortlich</b></p>	<p><b>Nach i.t. Instillation: entzündliche Reaktion der Lunge, Granulome, Fibrose</b> <b>Kanzerogene Wirkung: Mesotheliom nach Instillation in die Bauchhöhle</b> <b>Schädigung der Gefäßzellen</b> <b>Ratte: Akkumulation in den Knochen nach i.p. Gabe</b> <b>80% wird über die Niere ausgeschieden</b></p>	<p><b>Keine Hautirritation oder Allergie bei Hautapplikation</b></p>



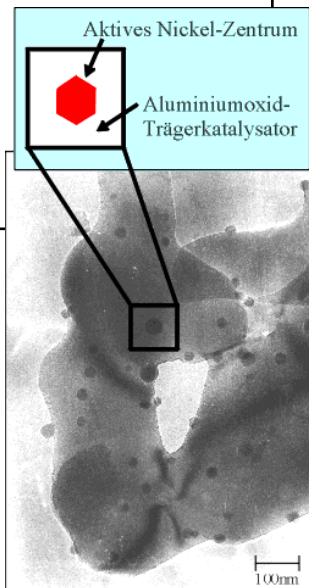
SWCNT



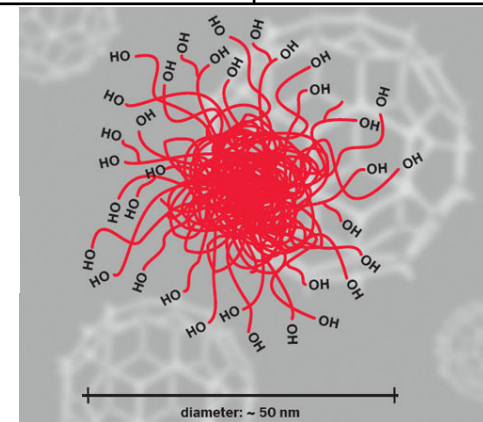
MWCNT

There are currently about 50.000 different types of carbon nanotubes due to different raw materials, production processes and catalysts (Schulte et al. 2009)

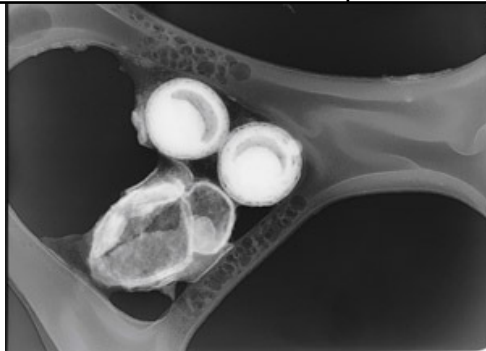
Nanoobjekt	In vitro	Tierversuch	Human
<b>Anorganische Nanopartikel (z.B. Silber, Silber/Gold, Eisen, Chrom, Cobalt, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> etc.)</b>	<b>Membranpassage Anstieg von Entzündungsmediatoren Zelltoxizität Oxidativer Stress Gentoxizität</b>	<b>Entzündliche Reaktion der Lunge, Granulome, Fibrose Gentoxizität Kanzerogenität Plazentagängig, Reproduktivtoxisch</b>	<b>Entzündliche Reaktion der Lunge, Granulome, Fibrose Gentoxizität Kanzerogenität</b>
<b>Organische Nanopartikel</b>	<b>Membranpassage Gentoxizität</b>	<b>Entzündliche Reaktion der Lunge Thromboembolie Gesteigerte IgE-Antikörperproduktion Akkumulation in Leber und Milz Passage der Blut-Hirnschänke Plazentagängig, Passage in die Embrionalzellen</b>	<b>Keine Daten verfügbar</b>



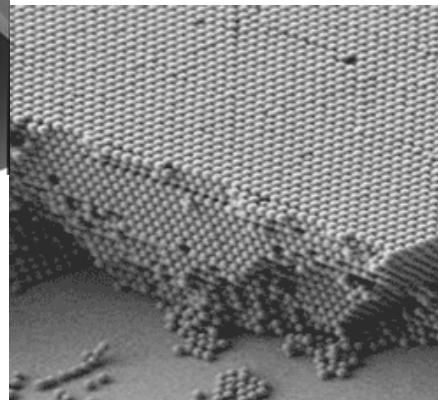
**Nanoprene - organische Nanopartikel als Kautschuk-Additiv**



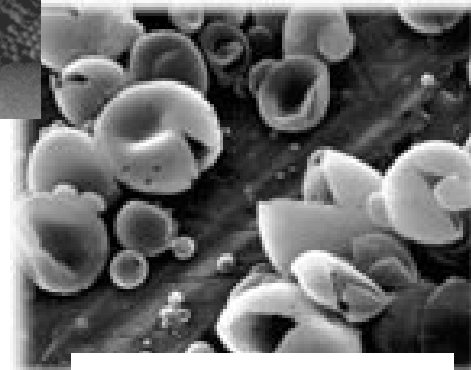
Nanoobjekt	In vitro	Tierversuch	Human
<b>Nanokapseln, Nanosphären, Nanomuscheln, Dendrimere</b> (künstliche Molekülen)	<b>Schädigung der Zellmembran, Transport in die Zelle fraglich</b>  <b>Dendrimere: Zelltoxizität</b>	<b>Schnelle Darmpassage</b> <b>Akkumulation in Leber, Magen, Darm</b> <b>Ausscheidung - Urin, Stuhl</b> <b>Entzündliche Reaktion der Lunge</b> <b>Gerinnungsneigung erhöht</b> <b>Zerfall von Rotblutkörperchen</b>	<b>Keine Daten verfügbar</b>



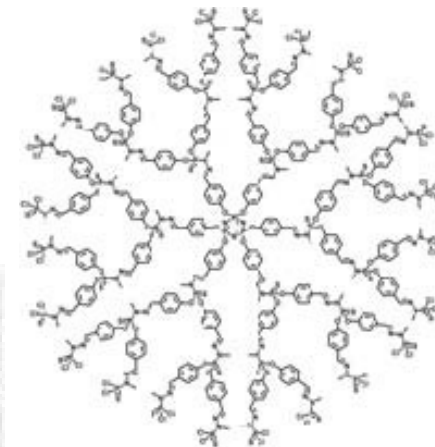
**Nanokapseln**



**Nanosphären**

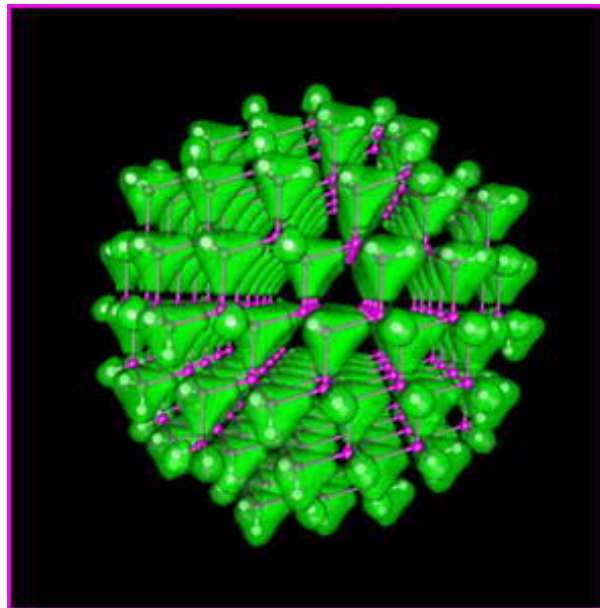


**Nanomuscheln**



**Dendrimere**

Nanoobjekt	In vitro	Tierversuch	Human
<b>Quantum dots</b> (Nanokristalle oder künstliche Atome z.B. CdSe/ZnS)	<b>Zelltoxizität auf Grund von Cd-Freilassung bei unbeschichteten Nanopartikeln</b> <b>Gentoxisch</b>	<b>Hautresorbtion in einem Schweinehaut-Model</b> <b>Akkumulation in Leber, Knochenmark, Lymphknoten</b>	<b>Keine Daten verfügbar</b>



## Aufnahme, Verteilung

### ▪ Inhalativ

#### Nase:

Riechschleimhaut → Penetration/Translokation - N. olfaktorius → Hirn

#### Lunge: - Deposition

- Translokation - systemische Aufnahme frei oder proteingebunden

- Fähigkeit durch die Körperbarrieren durchzudringen:

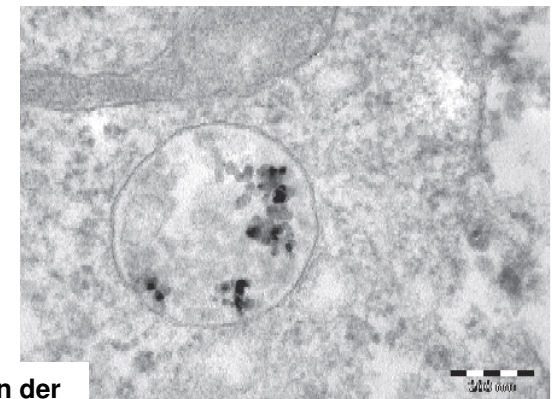
Blut-Hirn, -Plazenta, -Hoden Schranke, Zell- und Kernmembrane

### ▪ Orale

▪ Dermale\*: Hautpenetration nicht gesichert

▪ Parenteral: i.v. Gabe von Medikamenten, „targeting“  
von Organen und Gewebe (Tumor)

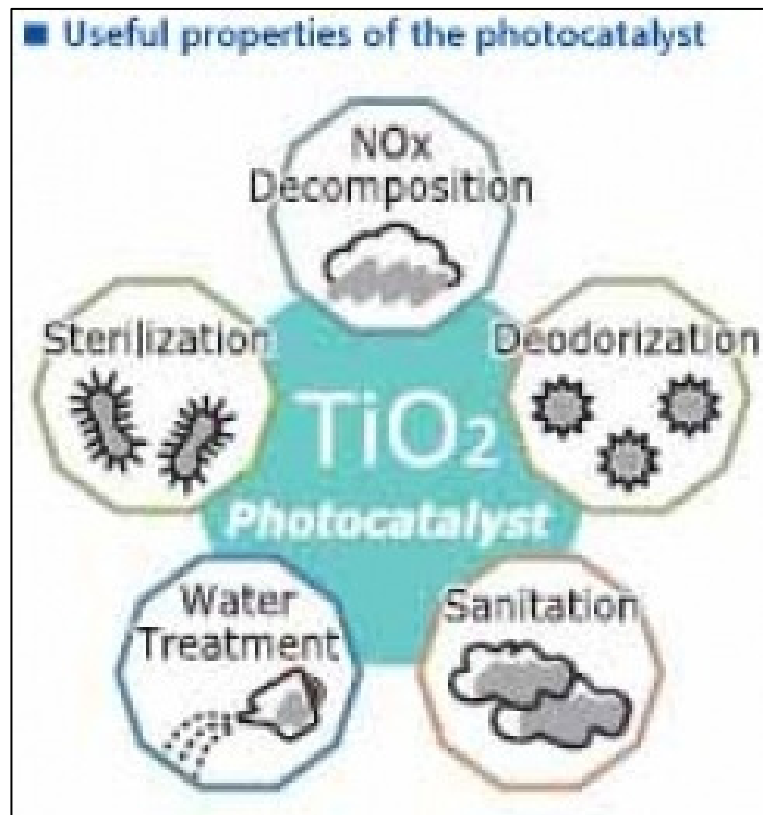
\* Widersprüchliche Datenlage



EM Aufnahme: Aluminum Nanopartikel in der Zelle nach einer in vitro Exposition

## \* Widersprüchliche Datenlage

**Photokatalytische Eigenschaft (UV Strahlen + Wasser → ROS\*) von TiO<sub>2</sub> Nanopartikel findet breite Anwendung: selbstreinigende Oberflächen (Glas, Beton), Wasserreinigung, Sterilisation, etc.**



Zwei Fragen zu TiO<sub>2</sub> :

- Hautpenetration
- Hautschädigung

\*ROS – reactive oxygen species

## \*Widersprüchliche Datenlage

Wu J et al. Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. Toxicol Lett. **2009 Dec** 1;191(1):1-8. Institute of Clinical Pharmacology, Department of Pharmacology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, PR China.

The present study investigated the penetration and potential toxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles following its dermal exposure in vitro and in vivo. **In vitro**, after exposure to isolated porcine skin for 24h, titanium dioxide nanoparticles of various sizes cannot penetrate through stratum corneum. Interestingly, when studied **in vivo**, quite different results were obtained. After topically applied on pig ear for 30 days, TiO<sub>2</sub> nanomaterials (4 nm and 60 nm) can penetrate through horny layer, and be located in deep layer of epidermis. Furthermore, after 60 days dermal exposure in hairless mice, nano-TiO<sub>2</sub> particles can penetrate through the skin, reach different tissues and induce diverse pathological lesions in several major organs. Notably, P25 (21 nm) TiO<sub>2</sub> nanomaterials shows a wider tissue distribution, and can even be found in the brain without inducing any pathological changes. Among all of the organs examined, the skin and liver displayed the most severe pathological changes that correspond to the significant changes in SOD and MDA levels. These results suggest that the pathological lesions are likely to be mediated through the oxidative stress induced by the deposited nanoparticles. Accordingly, the collagen content expressed as HYP content are also significantly reduced in mouse skin samples, indicating that topically applied nano-TiO<sub>2</sub> in skin for a prolonged time can induce skin aging. Altogether, the present study indicates that nanosize TiO<sub>2</sub> may pose a health risk to human after dermal exposure over a relative long time period.

## \*Widersprüchliche Datenlage

Nohynek GJ et al. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. Toxicol Appl Pharmacol. **2010 Mar** 1;243(2):239-59.

**L'OREAL R&D**, Global Safety Evaluation, 92600 Asnières, France.

**Ultraviolet filters have important benefits by protecting the consumer against adverse effects of UV radiation; these substances undergo a stringent safety evaluation under current international regulations prior to their marketing. Concerns were also raised about the safety of solid nanoparticles in PCP, mainly TiO(2) and ZnO in sunscreens. However, current evidence suggests that these particles are non-toxic, do not penetrate into or through normal or compromised human skin and, therefore, pose no risk to human health.**

## Ausscheidung

### ▪ Lunge

2 Reinigungsmechanismen:

- Flimmerhärchen und Schleim
- Reinigungszellen (Makrophagen)

### ▪ Blut

#### ▪ Akkumulation

- im Retikuloendothelialsystem  
(Leber, Milz, Knochenmark, Lymphknoten)

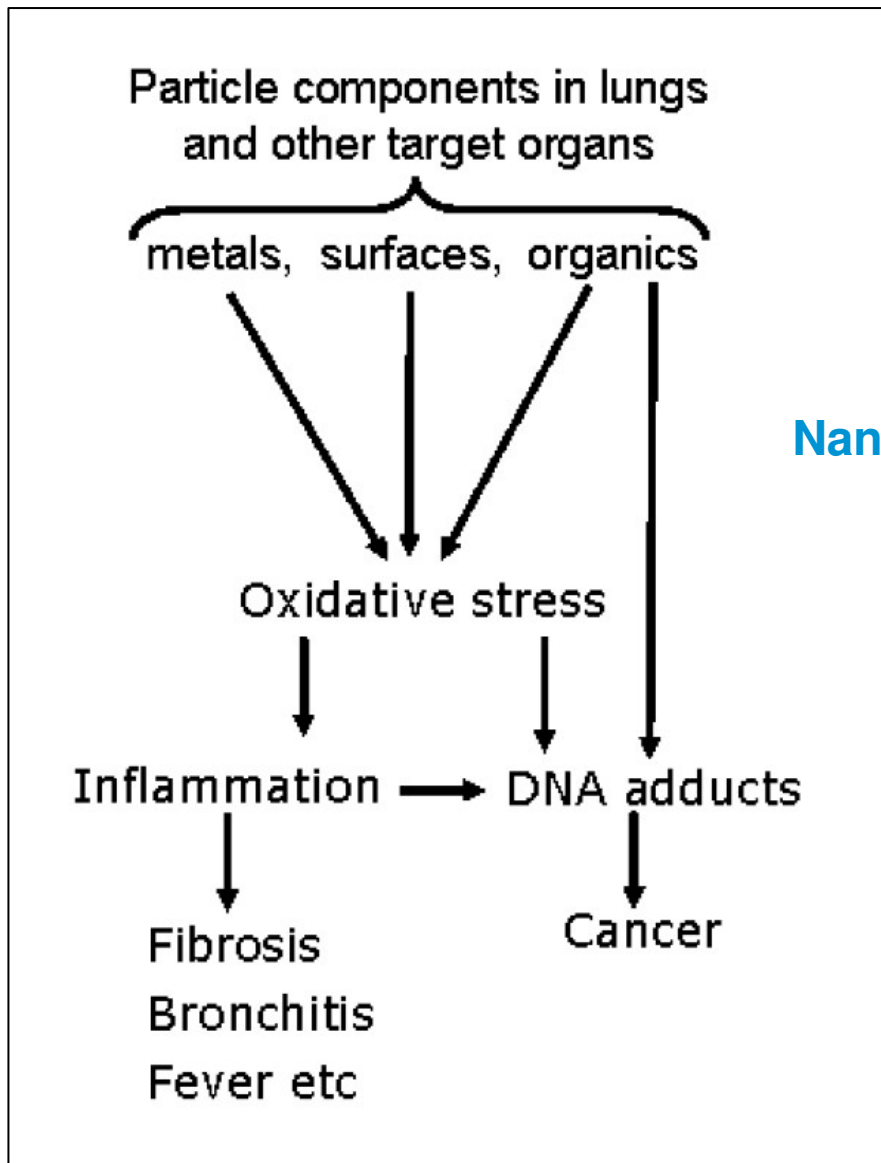
#### ▪ Ausscheidung

- Niere → Urin <5nm schnell  
> 15 nm sehr langsam oder nicht

(PAMAM- Poly (amidoamine) dendrimere, DM 5nm → Verstopfung der Nierenporen)

- Leber → Galle → Darm → Stuhl

**Besorgniserregend-  
potentielle Akkumulation und Biopersistenz**



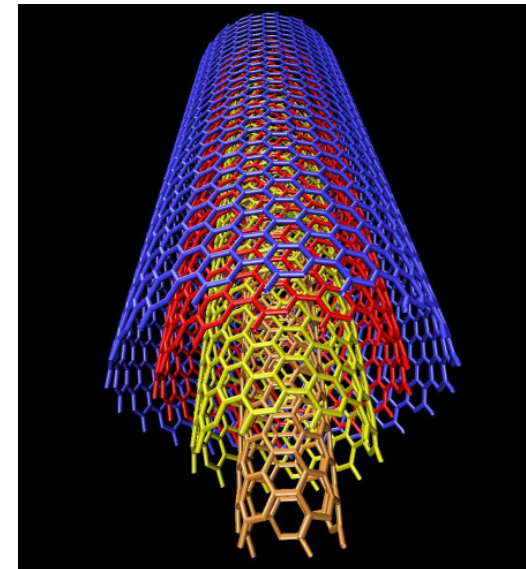
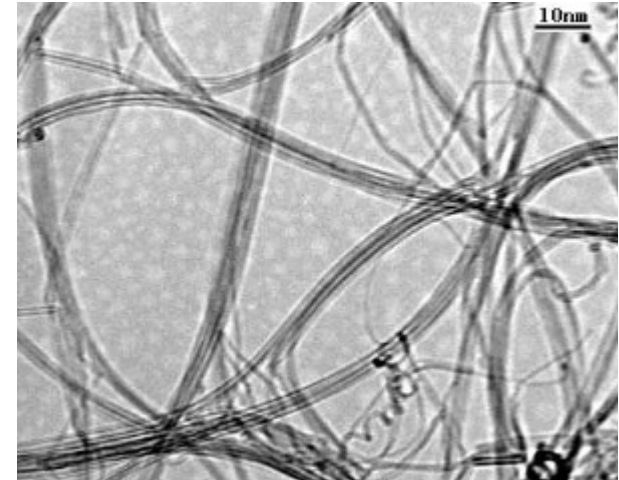
**Nanopartikeln/Nanomaterialien sind potentiell**

- zelltoxisch
- inflammatorisch
- genotoxisch
- kanzerogen

## Besonders besorgniserregend sind biopersistente Nanofasern

- **Strukturelle Ähnlichkeit mit Asbestfasern**  
(DM 0,7- 20 nm, Länge bis einige mm)
- **Carbon nanotubes (CNT)- aufgrund von Fasergeometrie und Biopersistenz bestehen Befürchtungen über fibrogene und kanzerogene Wirkung**
- **Mesotheliomnachweis im Tierversuch**

Takagi et al.: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by **intraperitoneal** application of multi-wall carbon nanotube, The Journal of Toxicological Sciences Vol. 33 (2008) , No. 1 February 105-116

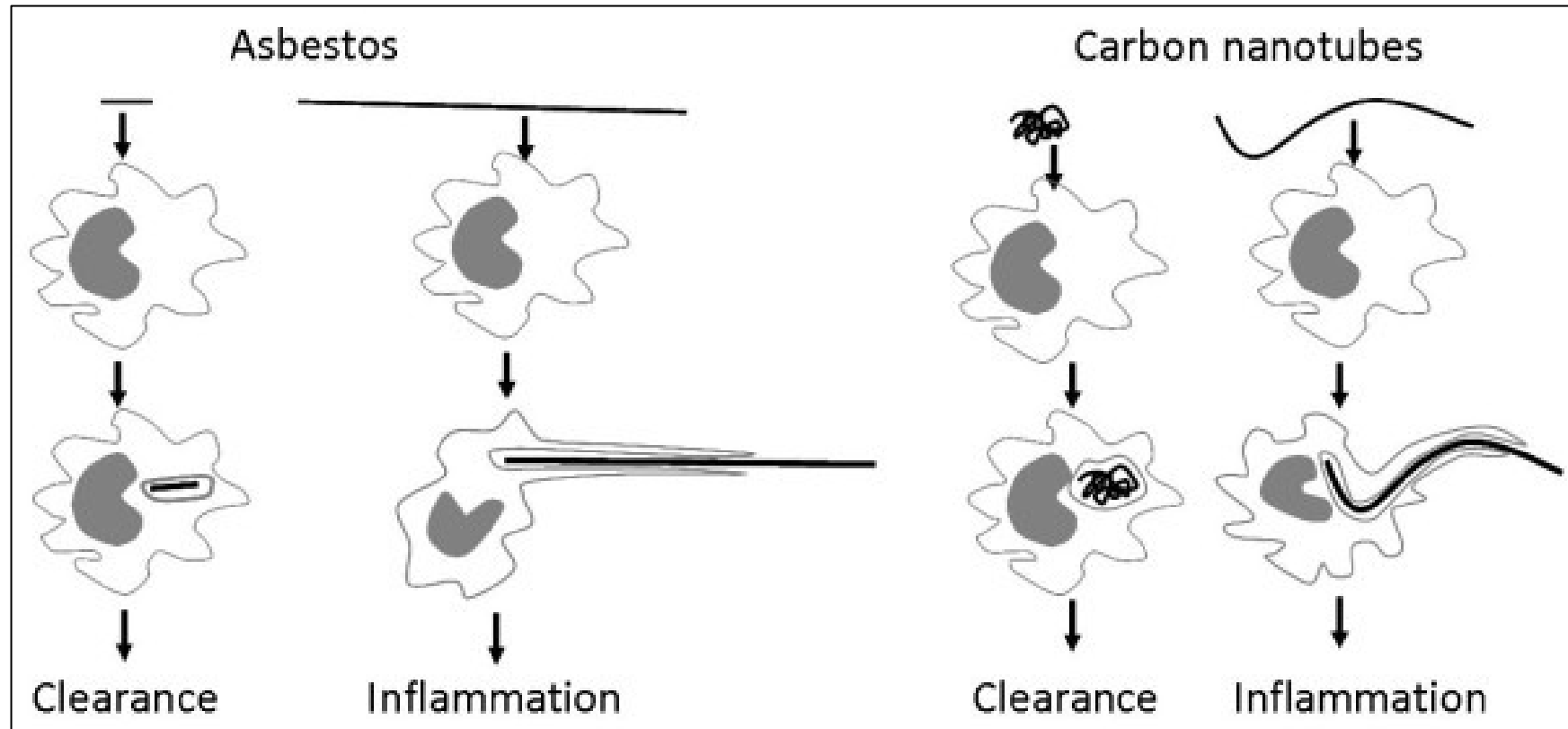


## Hypothese - potentielle CNT Kanzerogenese

1. Makrophagen sind aufgrund der Fasergeometrie nicht im Stande längere CNT zu fressen

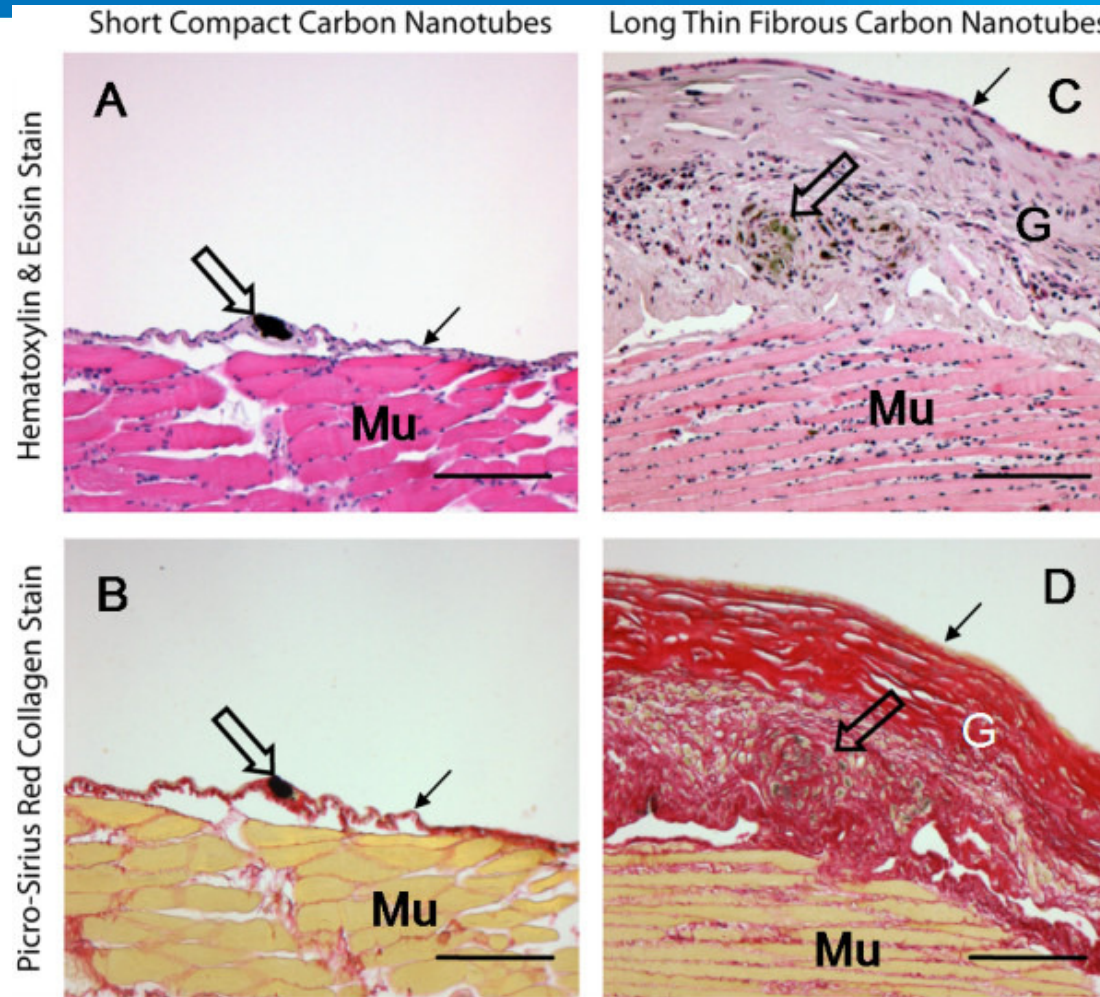


**Beispiel Asbestfaser**



Kurze Asbestfasern und kurze oder geknäuelte CNT werden von Makrophagen gefressen  
 Lange Asbestfasern und lange CNT können nicht von Makrophagen gefressen werden →Entzündung

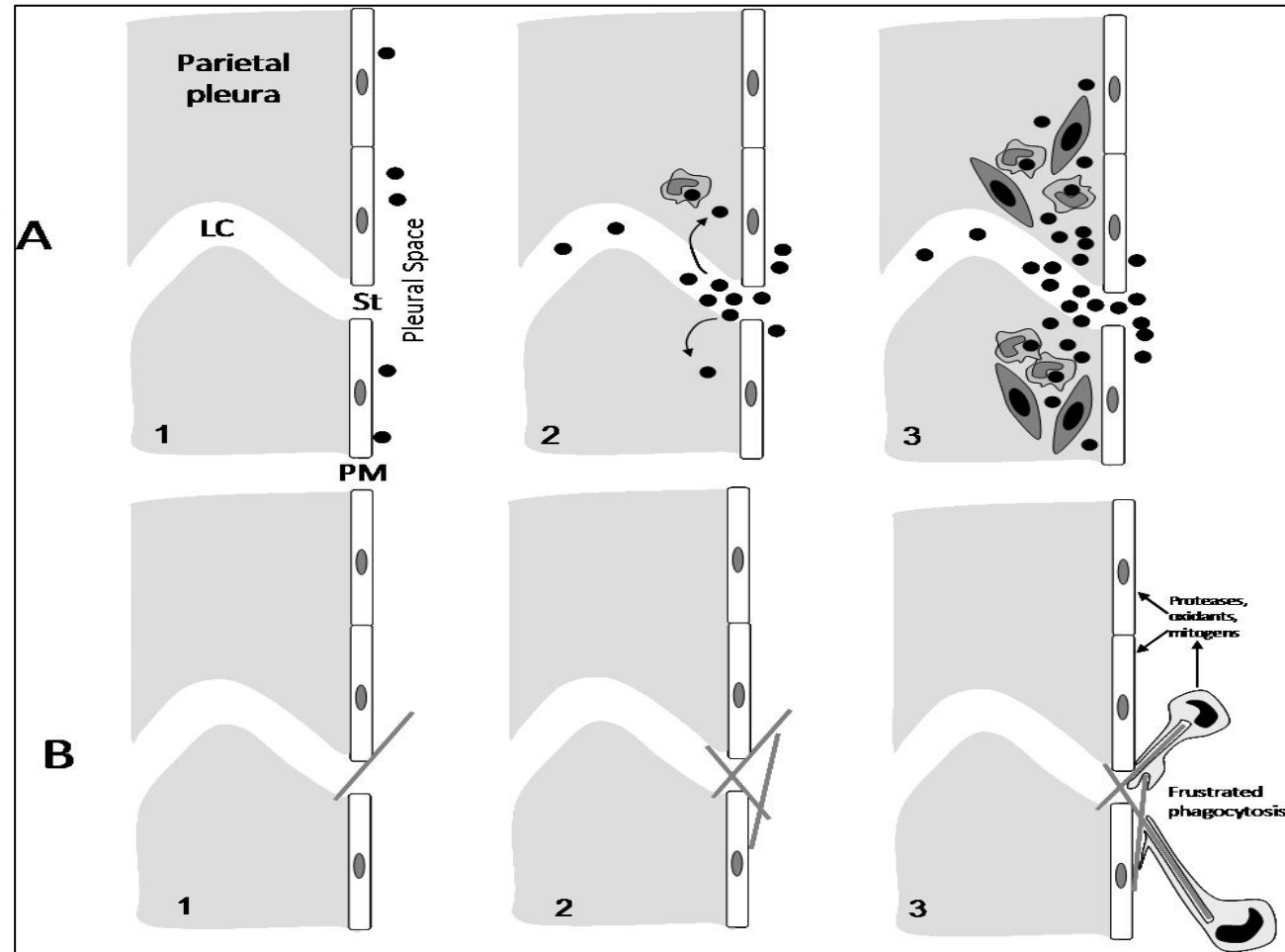
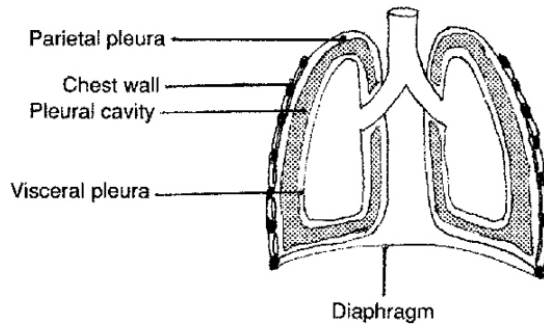
Donaldson et al. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelioma: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. Part Fibre Toxicol. 2010 Mar 22;7:5.



**Kurze oder geknäuelte CNT-  
minimale Gewebsreaktion\***

**Lange CNT- starke  
Entzündungsreaktion - Granulome\***

\* nach i.P. Gabe

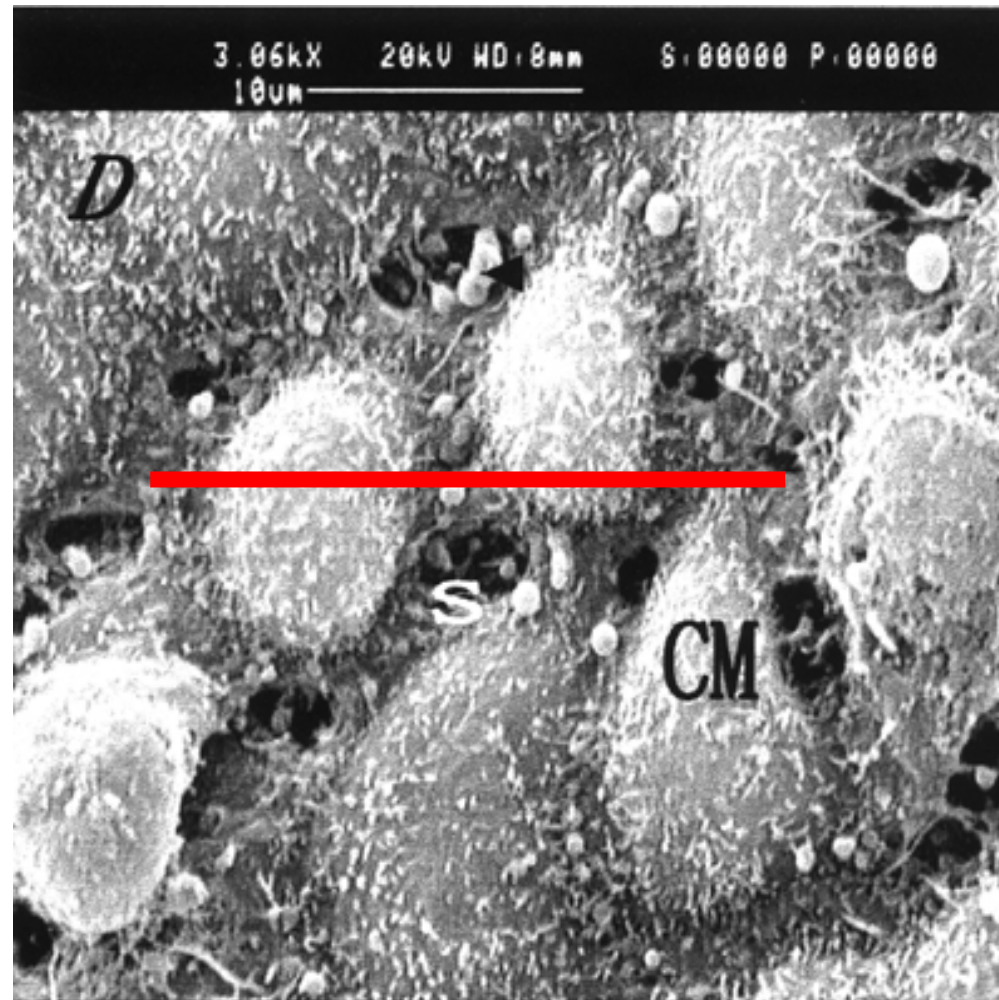


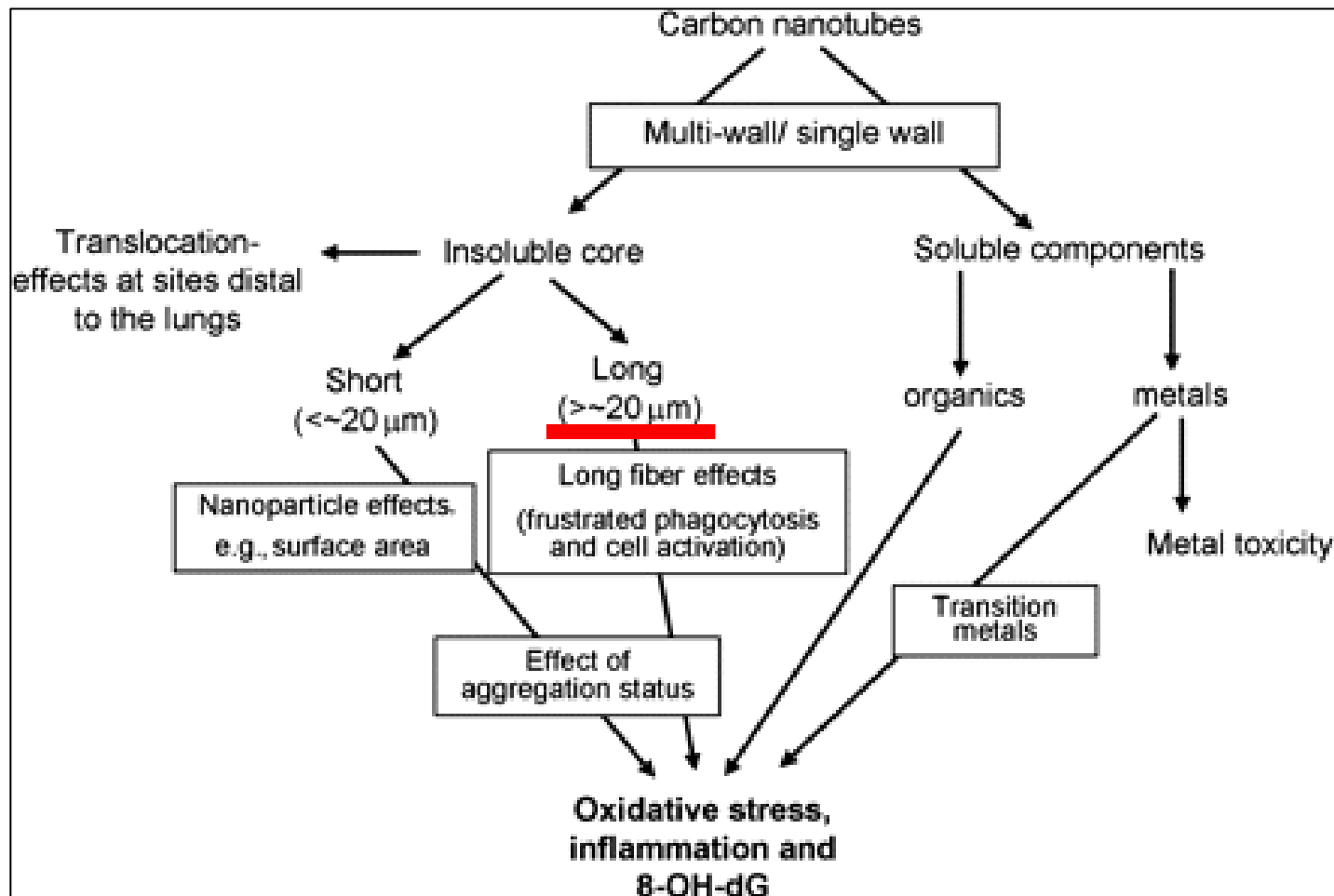
**A: Partikel werden über die Lymphwege der Parietalpleura entsorgt**

**B: Fasern bleiben im Pleuraspatium hängen → chronische Entzündung → Mesotheliom**

## Hypothese – potentielle CNT Kanzerogenese

2. Lymphstomata der Parietalpleura sind rund, Fasergeometrie erlaubt keinen Durchgang → Faserretention → chronische Entzündung → Mesotheliom





Donaldson et al. 2006: Important characteristics of nanotubes and their potential effects on processes that could impact on adverse effects.

## Studie

**Nanotechnologie: Belastungsprofile in Nanopartikel-, Nanotubes-herstellenden und bearbeitenden Industriebranchen sowie Auswirkungen auf menschliche Zellen**

**Seibersdorf Laboratories, ÖSBS, AUVA**

## Das Ziel

**Belastungsprofile in Nanopartikel-, Nanotubes-herstellenden und bearbeitenden Industriebranchen erstellen**

**Erfassung möglicher toxischer Belastungen durch partikelhaltige Arbeitsplatzatmosphäre**

# Studiendesign

## ▪ Phase 1 - im Labor

**Exposition der Lungenzellen\* mit Partikeln, die in ihrer Menge, Größe und Art genau definiert sind**

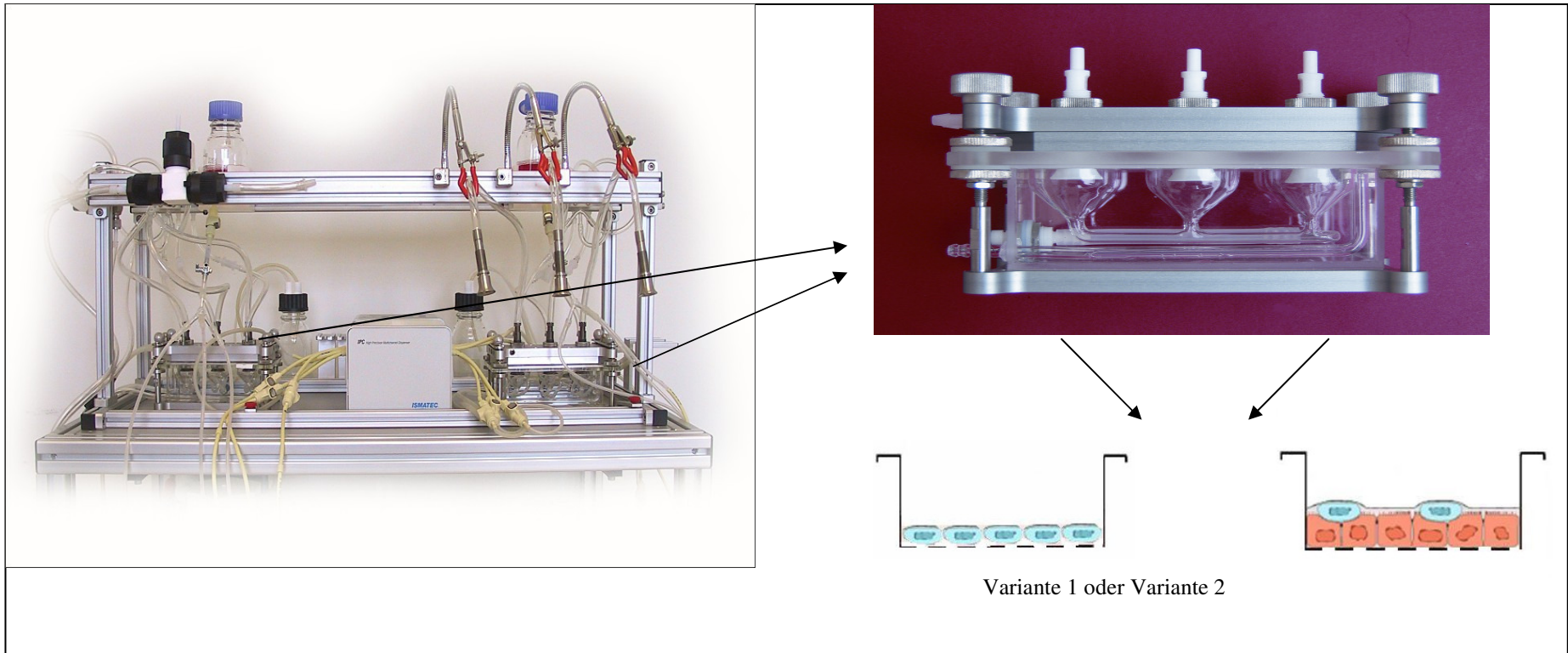
## ▪ Phase 2 - am Arbeitsplatz

**Exposition der Lungenzellen\* mit der Arbeitsplatzatmosphäre bei der MWCNT-produzierenden Firma C-Polymers GmbH**

\* Co-Kultur von humanen Lungenepithelialzellen A549 und humanen Makrophagen U937

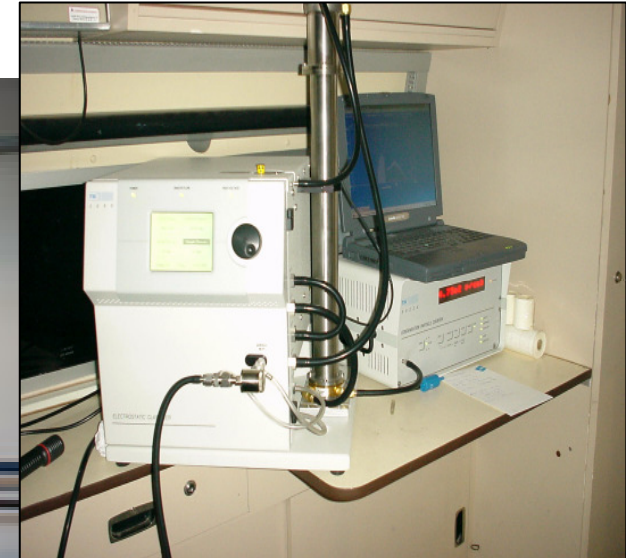
# Methode

## Phase 1 - Expositionsaufbau



**CULTEX™ System – ermöglicht Exposition der Zellkultur mit der Arbeitsplatzatmosphäre**

## Methode Phase 2



**SMPS-  
Scanning Mobility  
Particle Sizer**

## MWCNT Reaktor

## Methode Phase 2



### Versuchsaufbau bei der Firma C-Polymers - Einschaufeln

5.10.2010

Dr. Valic Eva

[www.auva.at](http://www.auva.at)

## Ergebnisse

### 21 Firmen österreichweit die Nanopartikel herstellen oder anwenden

Arbeitsplatz	Untersuchter Gefahrstoff	Konzentration [mg/m <sup>3</sup> ]	Anzahlkonzentration N/cm <sup>3</sup>
Einschaufeln, 24.03.2009	Einatembarer Staub Alveolengängiger Staub Elementarer Kohlenstoff	0,99 0,13 0,11	7.170
Betrieb Trockenofen, 24.03.2009	Einatembarer Staub Alveolengängiger Staub Elementarer Kohlenstoff	< 0,08 < 0,08 0,016	2.680
Einschaufeln, 25.03.2009	Einatembarer Staub Alveolengängiger Staub Elementarer Kohlenstoff	1,10 0,23 0,16	5.440
Betrieb Trockenofen, 25.03.2009	Einatembarer Staub Alveolengängiger Staub Elementarer Kohlenstoff	< 0,08 < 0,08 0,021	1.910
<u>Typische Umweltkonzentrationen</u> Waldrand Klimatisierte Gebäude Städtischer Hintergrund Konsum einer Zigarette Ungefiltertes Dieselabgas			3000 3.000-5.000 10.000-50.000 200.000-300.000 50.000.000

## Ergebnisse

	<b>Labor</b>	<b>Arbeitsplatz</b>
<b>Anzahlkonzentration N/cm<sup>3</sup></b>	469.000 – 7.370.000	1.910 - 7.170
<b>Zellvitalität - WST-1 Assay</b>	zytotoxisch	negativ
<b>Oxidativer Stress DHR (Dihydrorhodamin) Assay</b>	positiv	offenes Produkt an der Schnittstelle - positiv
<b>Proinflammatorische Zytokine CBA Assay (BDTM Cytometric Bead Array)</b>	negativ	negativ
<b>Comet Assay</b>	positiv	Nicht getestet

**Luftkonzentrationen von MWCNT waren in der Arbeitsplatzatmosphäre um Faktor 1000 niedriger als im Laborversuch**

### **Zusammenfassend:**

- **Labor – Beeinträchtigung der Zellvitalität, Anstieg von oxidativen Stress und DNA-Schädigung**
- **Arbeitsplatz - oxidativer Stress beim Handeln mit offenem Produkt**

## Zusammenfassend

- **Rasante Entwicklung immer neuerer Nanopartikel/Nanomaterialien**
- **Risikoeinschätzung ist derzeit erschwert, da teilweise keine oder mangelnde toxikologische Daten vorhanden sind**
- **Die toxikologischen Daten stammen vorwiegend aus Zellkultur- und Tierstudien, eine direkte Übertragung auf Menschen ist nicht immer unproblematisch**
- **Eine individuelle Expositionseinschätzung ist schwer durchführbar**
- **Starke Umwelteinflüsse**
- **Keine einheitlichen Messmethoden/Messparameter, toxikologische Tests/Endpoints → Standardisierung**
- **Ein potentiell gesundheitliches Risiko besteht, bei Menschen sind derzeit keine berufliche Erkrankungen durch Nanopartikel bekannt**
- **Eine Generalisierung der Toxizität soll vermieden werden**