

## **Wissensstand bezüglich möglicher Wirkprinzipien und Gesundheitsgefahren durch Exposition mit arbeitsplatzrelevanten Nanomaterialien**

### **Vorbemerkung**

Dieser Bericht hat nicht zum Ziel, einen umfassenden Übersichtsartikel über alle Veröffentlichungen zu möglichen Gesundheitsgefahren aller Nanomaterialien darzustellen. Der Schwerpunkt lag darauf, eine Übersicht zu geben und auf Möglichkeiten der Gruppenbildung bei bestimmten Nanomaterialien auf der Basis wahrscheinlicher gemeinsamer Wirkprinzipien hinzuweisen. Dazu musste nicht generell auf eine umfassende Darstellung der Originalliteratur zurückgegriffen werden. In Bezug auf mögliche systemische Wirkungen von Nanomaterialien war eine Prüfung der Originalliteratur allerdings notwendig, da nicht auf vorliegende Bewertungen Bezug genommen werden konnte. Damit lag der Schwerpunkt dieses Berichtes auf einer kritischen Analyse dieser Studien, die mögliche systemische Wirkungen von GBS-Nanomaterialien beschreiben.

### **1 Zusammenfassung**

Gegenstand dieses Berichtes sind Nanomaterialien, die technisch gezielt hergestellt sind und in Form von Stäuben vorkommen. Für diese Nanomaterialien ist aus der Sicht des Arbeitsschutzes in Bezug auf mögliche Gesundheitsgefahren maßgeblich der inhalative Expositionsweg zu berücksichtigen. Grundsätzlich sind bei der toxikologischen Bewertung verschiedene Wirkprinzipien zu betrachten: (a) Nanomaterialien können toxische Stoffe beziehungsweise Ionen freisetzen, chemisch funktionelle Gruppen besitzen oder chemisch funktionalisierte Oberflächen (katalytische Wirkung) haben. Für diese Nanomaterialien ist die Toxizität durch die freigesetzten Stoffe unter Berücksichtigung der Freisetzungsrates und/oder durch die spezifische vermittelte chemische Reaktion bestimmt. Nanomaterialien, die unter diese Wirkprinzipien fallen, können nur im Rahmen einer Einzelfallbetrachtung bewertet werden. (b) Einige Nanomaterialien sind als faserförmige Stäube zu beschreiben. Für diese Stäube ist mittels Einzelfallbetrachtung zu prüfen, ob das jeweilige Nanomaterial unter das sogenannte Faserprinzip fällt und eine asbestartige Wirkung hat. Hier sind die Parameter Dimension und Biobeständigkeit zu berücksichtigen. (c) Weiter sind Nanomaterialien daraufhin zu prüfen, ob sie als alveolengängige granuläre biobeständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (GBS) zu beschreiben sind. GBS besitzen keine über die Partikelwirkung hinausgehende stoffspezifische Toxizität. Diese Nanomaterialien können als GBS-Nanomaterialien bezeichnet werden. Unter diese Gruppe fallen zum Beispiel gezielt hergestellte Nanomaterialien der Stoffe Titandioxid oder Industrieruß. GBS-Stäube sind im biologischen Milieu beständig und zeichnen sich dadurch aus, dass ihnen keine signifikante spezifische Toxizität zugeschrieben wird, die durch die Oberflächenbeschaffenheit oder eine Freisetzung spezifisch toxischer Stoffe vermittelt wird. Diese Stäube sind durch einen aerodynamischen Durchmesser von bis etwa 10 µm zu charakterisieren (alveolengängige Fraktion nach DIN EN 481). Sie können bis in die tiefen Atemwege des Menschen gelangen und verursachen dort entzündliche Prozesse. Bei der Bewertung der Gesundheitsgefahren dieser GBS-Nanomaterialien steht eine mutmaßliche Karzinogenität in der Lunge im Vordergrund. Dermale und orale Exposition und daraus resultierende Toxizität sind nach bisheriger Kenntnis generell nicht von

hervorgehobener Bedeutung. Der Schwerpunkt dieses Berichtes lag auf einer Analyse von Studien, die systemische Wirkungen von GBS-Nanomaterialien berichten. Aus diesen Studien ergaben sich keine generellen Hinweise auf systemische Toxizität. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um mögliche systemische Wirkungen abschließend bewerten zu können.

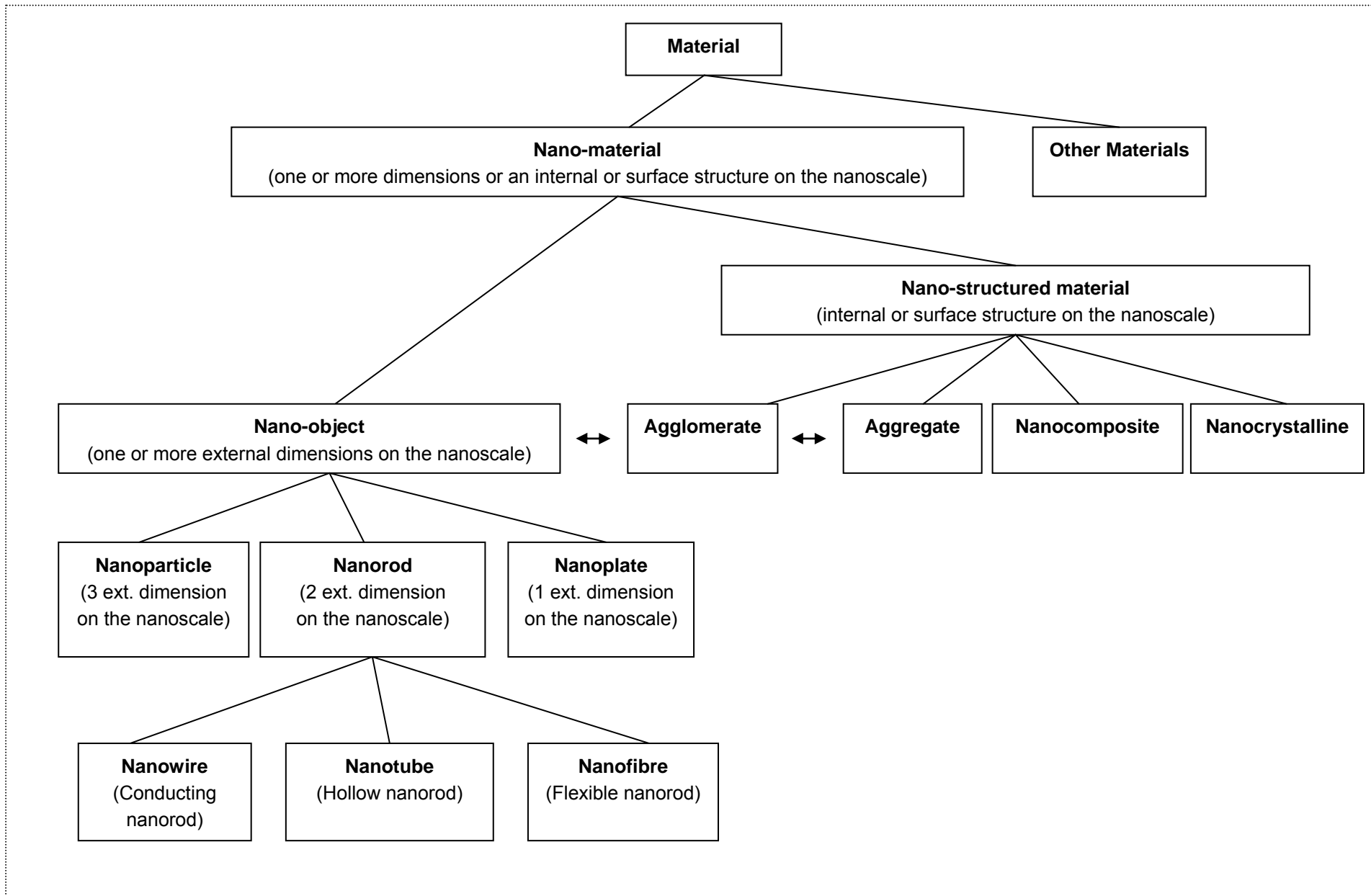
## 2 Begrifflichkeiten in der Nanotechnologie

Von ISO/OECD wurden Definitionen zu verschiedenen Begriffen der Nanotechnologie entwickelt (ISO, 2008; OECD, 2007) (Abbildung 1). Die OECD-Definition von Nanomaterialien ist weit gefasst und wurde unabhängig von der Stoffidentität gewählt. Die OECD sieht Nanomaterial als eine Struktur, die in einer oder mehr Dimensionen nanoskalig (Größenbereich 1-100 nm) ist oder aber an der Oberfläche beziehungsweise einer inneren Oberfläche nanoskalige Strukturierung besitzt. Damit werden Erzeugnisse im Sinne des Chemikalienrechtes nicht klar aus der Begriffsdefinition für Nanomaterialien ausgegrenzt. Die Begrifflichkeit Nanomaterial setzt eine beabsichtigte Herstellung voraus und schließt auch größere Agglomerate und Aggregate von Nanoobjekten (Nanopartikeln, -stäbchen, -röhren, -platten) ein. Die enthaltenen Nanoobjekte müssen in 1-3 Dimensionen größer 1 und kleiner 100 nm sein, um der Definition zu entsprechen. Nanopartikel sind nach ISO-OECD-Definition Partikel mit einem Durchmesser kleiner 100 nm in 3 Dimensionen. Agglomerate sind durch schwächere Bindungskräfte ihrer Primärpartikel charakterisiert (z.B. van der Waals-Kräfte), Aggregate durch festere Bindungskräfte, die zum Beispiel aus Sinterungsprozessen resultieren. Diese Agglomerate oder Aggregate sind im Sinne der OECD auch als Nano-strukturierte Materialien zu beschreiben. Die Aggregation und Agglomeration der Nanopartikel (der Primärpartikel) sowie deren unterschiedliches Verhalten der Desagglomeration/Dispergierung stellt eine wesentliche Frage bei der Charakterisierung von Nanomaterialien dar. So zählen auch Produkte zu Nanomaterialien, die nur während der unmittelbaren Entstehungsphase als freie Nanopartikel vorlagen und sich sofort zu größeren (>100 nm Durchmesser) Aggregaten zusammenlagern und oberflächlich verschmelzen, freie nanoskalige sphärische Strukturen jedoch noch erkennen lassen. Derartige Materialien zeigen oft eine stark vergrößerte Oberfläche und können besondere Eigenschaften aufweisen. Eine Freisetzung von Primärpartikeln aus Aggregaten wird aufgrund der festen Bindung als unwahrscheinlich eingeschätzt. Agglomerate werden durch deutlich schwächere Bindungskräfte zusammengehalten und können beispielsweise aus zusammen gelagerten Aggregaten bestehen. Agglomerate können durch Scherkräfte oder wässrige Lösungen leichter desagglomeriert bzw. dispergiert werden. In welchem Maße Agglomerate und gegebenenfalls Aggregate im Organismus zu Primärpartikeln zerfallen, ist bisher nicht umfassend untersucht und kann materialabhängig sein. Daher können zur Zeit keine abschließenden Aussagen getroffen werden, ob und in welchem Ausmaß Primärpartikel aus Agglomeraten und Aggregaten freigesetzt werden.

Reale Nanomaterialien werden über Beschreibung der Größenverteilungen der enthaltenen Primärpartikeln, Aggregate und Agglomerate charakterisiert. Eine abgestimmte Definition, die den minimalen Anteil an nanoskaligen Bestandteilen festsetzt, liegt nicht vor. Freie Nanopartikel haben die Tendenz, sowohl in Luft als auch in Flüssigkeiten zu agglomerieren (Preining, 1998). Die Halbwertszeit der freien Partikel ist proportional zu Partikelgröße und umgekehrt proportional zur Partikelkonzentration (Preining, 1998). Eine Exposition gegenüber luftgetragenen freien Nanopartikeln (<100

nm Durchmesser) ist auf der Basis des bisherigen Kenntnisstandes daher eher selten beziehungsweise kommen freie Nanopartikel nur zu geringen Anteilen in Stäuben aus Nanomaterialien vor (Plitzko, 2009; Plitzko, mdl., Mitteilung; Schneider et al. 2007).

Abbildung 1: Gliederung der Begrifflichkeiten gemäß ISO/OECD



### 3 Mögliche Prinzipien der toxischen Wirkung von Nanomaterialien

Im Hinblick auf eine Beschreibung von Gesundheitsgefahren werden im Sinne der obigen Definitionen diejenigen Nanomaterialien betrachtet, die nicht als Erzeugnisse, sondern als Stoffe oder Gemische anzusehen sind und unter die Chemikaliengesetzgebung fallen. Laut bisheriger Kenntnisse spielt hauptsächlich eine inhalative Exposition bei der Bewertung eine Rolle. Dabei müssen maßgeblich Nanomaterialien betrachtet werden, die alveolengängig<sup>1</sup> sind. Der Schwerpunkt dieses Berichtes liegt auf einer Analyse von Studien, die systemische Wirkungen von GBS-Nanomaterialien berichten. Diesbezüglich lag bisher keine Gesamtbewertung vor. Andere Endpunkte werden lediglich zusammenfassend beschrieben.

#### 3.1 Allgemeine mögliche Wirkprinzipien

Auf der Basis der vorliegenden Daten wird die toxikologische Wirkung von Nanomaterialien durch die physikalische Form und/oder die chemische Beschaffenheit der jeweiligen Nanomaterialien bestimmt. Bei der Bewertung sind die folgenden Wirkprinzipien zu berücksichtigen:

- a) Nanomaterialien können eine begrenzte Biopersistenz besitzen oder löslich im biologischen Milieu sein, was einen Einfluss auf Verteilung, Verweilzeit und Wirkung im Organismus hat. Mit abnehmender Biopersistenz ist das toxikologische Wirkprofil zunehmend durch die freigesetzten Stoffe unter Berücksichtigung ihrer Freisetzungsrates bestimmt und nicht durch eine partikelbedingte Toxizität. Eine Einzelfallbetrachtung basierend auf der (bekannten) Toxizität des gelösten Stoffes notwendig.
- b) Biopersistente Nanomaterialien können unter anderem chemische funktionelle Gruppen haben oder katalytisch wirken. In diesem Fall ist die Toxizität durch die spezifische vermittelte chemische Reaktion bestimmt. Nanomaterialien, die unter diese Wirkprinzipien fallen, müssen im Rahmen einer Einzelfallbetrachtung bewertet werden.
- c) Für biopersistente Nanoröhren oder Nanostäbchen ist bei entsprechender Geometrie das Faserprinzip und eine daraus resultierende asbestartige Wirkung zu berücksichtigen. Es sind Nanomaterialien bekannt, die aufgrund ihrer Dimension und Biopersistenz unter das Faserprinzip fallen und damit wie Asbest als kanzerogen zu bewerten sind. Die geometrischen Dimensionen bekannter faseriger Nanomaterialien variieren erheblich, so dass hier eine Einzelfallbetrachtung notwendig ist, ob das Faserprinzip anzuwenden ist oder nicht. Ist dies der Fall, ist eine mutmaßliche Kanzerogenität sowie die kanzerogene Wirkstärke durch die Parameter Dimension und Biopersistenz bestimmt.

---

<sup>1</sup> Eine Alveolengängigkeit von Stäuben ist bestimmt durch einen maximalen aerodynamischen Durchmesser von etwa 10 µm. Dies betrifft auch agglomerierte und aggregierte Nanopartikel. Die Deposition von in der Praxis sehr selten vorkommenden luftgetragenen freien nicht agglomerierten oder aggregierten Nanopartikeln ist je kleiner die Teilchen sind zunehmend durch die Brownsche Molekularbewegung bestimmt. Daher können diese Teilchen prinzipiell in allen Bereichen des Atemtraktes deponieren. In der Praxis bedeutet dies eine mit geringerer Teilchengröße höhere Depositionsrate im nasalen Bereich.

- d) Nanomaterialien können zu den alveolengängigen granulären biobeständigen Stäuben ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität gehören („GBS-Nanomaterialien“). Eine Alveolengängigkeit wird durch einen maximalen aerodynamischen Durchmesser von etwa 10 µm beschrieben. Diese Stäube sind dadurch gekennzeichnet, dass sie generell aus Agglomeraten oder Aggregaten von Nanopartikeln bestehen beziehungsweise Nanopartikel enthalten. Der aerodynamische Durchmesser dieser Agglomerate/Aggregate liegt in der Regel oberhalb von 100 nm. Die toxikologische Wirkung der GBS-Nanomaterialien kann auf der Basis des aktuellen Kenntnisstandes durch ein einheitliches Wirkprinzip (Verursachung von Entzündung im Atemtrakt) beschrieben werden. Eine relevante Anzahl von verschiedenen Nanomaterialien fällt unter dieses Wirkprinzip.

Der Schwerpunkt der folgenden Beschreibung liegt auf Studien, die GBS-Nanomaterialien betreffen. Im Einzelfall werden tierexperimentelle Studien beschrieben, in denen die Aufnahme und Verteilung des jeweiligen Materials durch die Nanostrukturierung (z.B. Nanoprimärpartikelstruktur) bestimmt ist.

### **3.2 Weitere die Toxizität beeinflussende Faktoren**

- a) Größe, Oberfläche und Oberflächeneigenschaften

Es liegen Hinweise aus subchronischen Studien sowie aus Karzinogenitätsstudien vor, dass Nanomaterialien im Vergleich zu mikroskaligen Materialien eine höhere Wirkstärke im Hinblick auf die inflammatorische beziehungsweise kanzerogene Wirkung besitzen könnten. Diese These basiert maßgeblich auf der Untersuchung verschiedener Formen von Titandioxid (Lee et al. 1985 vs. Heinrich et al. 1995; Bermudez et al. 2002 vs. 2004; Oberdörster et al. 1994 und Ferin et al. 1992). Es liegen ebenfalls gewisse analoge Hinweise aus Studien mit Industrieruß vor (Stöger et al. 2006). In Bezug auf Titandioxid hatte die nanoskalige Form gleichzeitig auch überwiegend eine andere Kristallstruktur (Anatas) als die feine Variante (Rutil), so dass diese Befunde - zumindest teilweise - durch eine höhere Toxizität der Anatas-Variante erklärt werden könnte. Dies wird zum Beispiel bekräftigt durch eine Studie, in der vergleichend nanoskaliges Titandioxid beider Kristallformen untersucht worden war und die Anatas-Form eine höhere inflammatorische Potenz zeigte (Warheit et al. 2007).

Dieser Wirkstärkevergleich basiert auf der Massenkonzentration als Dosismaß. Es ist zur Zeit nicht klar, welches Dosismaß die Wirkungen von GBS-Nanomaterialien am besten beschreibt. Diskutiert werden insbesondere Oberflächenkonzentration und Agglomeratvolumen. Gemäß dieser Thesen sind die Primärpartikel in den Agglomeraten für eine Beschreibung der Wirkstärke relevant. Eine höhere Wirkstärke träte damit bei gleichem aerodynamischem Durchmesser der Agglomerate, aber kleineren Primärpartikeln auf.

Ein Teil der Studien zur Untersuchung der Wirkung von GBS-Nanomaterialien haben den Verlauf einer entstandenen Entzündung in einer expositionsfreien Phase der Nachbeobachtung von bis zu 3 Monaten oder mehr untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Entzündung in der Regel abschwächt. Die Rückläufigkeit kann allerdings materialabhängig von unterschiedlichem Verlauf und Ausmaß sein. Dieser Verlauf wurde in einer Reihe von Studien nicht untersucht (z.B. Stöger et al. 2006), scheint aber für die Beschreibung der Wirkstärke des jeweiligen Materials von Bedeutung zu sein. Generell weisen die Daten darauf hin, dass die Wirkstärke

toxischer Partikel durch verschiedene Faktoren beeinflusst sein könnte (Warheit et al. 2009). Darunter werden neben der Größe die Oberflächeneigenschaften bzw. –beschaffenheit (z.B. Kristalltyp, Beschichtung) diskutiert. Eine abschließende Bewertung aller relevanten Daten zum Einfluss der Primärpartikelgröße, der Oberflächeneigenschaften bzw. –beschaffenheit auf die Wirkstärke der Toxizität von alveolengängigen granulären biopersistenten Nanomaterialien ohne bekannte signifikante Toxizität konnte bisher nicht vorgenommen werden.

#### b) Systemische Verfügbarkeit

Eine gewisse systemische Verfügbarkeit dürfte prinzipiell für Partikel gegeben sein. So liegen Befunde vor, dass Partikel in verschiedene Körperorgane gelangen können. So wurden zum Beispiel Kohlepartikel in Proben aus Leber (10,4% der Proben) und Milz (19,5 % der Proben) verstorbener Kohlengrubenarbeiter gefunden (LeFevre et al., 1982).

Sung et al. (2009) führten eine subchronische Inhalationsstudie mit Silberpartikeln an Sprague-Dawley Ratten beider Geschlechter durch. Silberpartikel sind nicht zu den GBS-Nanomaterialien zu zählen, da von einer gewissen Bioverfügbarkeit von Silberionen aus den Partikeln auszugehen ist. Diese Studie wird hier beschrieben, um exemplarisch das Ausmaß einer systemischen Partikeltranslokation nach wiederholter Exposition aufzuzeigen. Die Ganzkörperexposition erfolgte dabei für 13 Wochen, 6h/d und 5d/Woche gegenüber 49, 133, oder 515  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  Silberpartikeln (medianer Partikeldurchmesser 18-19 nm in der Expositionsatmosphäre, differential mobility analyzing system). Die Untersuchung der Tiere erfolgte einen Tag nach Ende der Expositionsphase. Neben der Lunge wurden Niere, Blut, Bulbus olfactorius, Gehirn und Leber auf Silbergehalte über Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) analysiert. Die Silbergehalte im Bulbus olfactorius lagen expositionsabhängig zwischen 6,4 und 30,5 ng/g, im Gehirn etwa jeweils um den Faktor 2 niedriger. In der Leber wurden die höchsten Gehalte an Silber nachgewiesen. Bei der hohen Expositionskonzentration lagen die Silbergehalte in der Leber um etwa Faktor 4 höher als im Bulbus olfactorius, bei den niedrigen Konzentrationen lagen sie um maximal den Faktor 2 höher als im Bulbus olfactorius. In den Lungen lagen die Silbergehalte abhängig von der Expositionshöhe um 2-3 Größenordnungen höher als in den anderen untersuchten Organen. In einer 28-Tage-Inhalationsstudie mit Aluminiumoxyhydroxid (Expositionskonzentrationen 0,4; 3, 28  $\text{mg}/\text{m}^3$ , 6 h/d, 5d/Woche) hingegen konnte keine signifikante Erhöhung der Aluminiumgehalte in Gehirn, Niere und Leber nachgewiesen werden (Pauluhn, 2009b).

In einer Studie von Fabian et al. (2008) beziehungsweise van Ravenzwaay et al. (2009) wurden männliche Wistar Ratten mit Titandioxid (Primärpartikeldurchmesser 20-30 nm, Anatas/Rutil 70:30) über einmalige intravenöse Applikation behandelt. Die Dosis betrug 5 mg/kg Körpergewicht. Die Studie wurde unter anderem konform zu Prüfrichtlinien der OECD und der EU durchgeführt. Nach 1, 14 und 28 Tagen ließ sich kein Titandioxid (Nachweisgrenze  $<0,5 \mu\text{g}/\text{Organ}$ ) in Blutzellen, Plasma, Gehirn oder verschiedenen Lymphknoten nachweisen. Die höchsten Gehalte an Titandioxid fanden sich generell an Tag 1 in der Leber ( $\sim 134 \mu\text{g}/\text{g}$ ), gefolgt von Milz, Lunge und Niere ( $\sim 0,67 \mu\text{g}/\text{g}$ ), danach waren die Gehalte rückläufig. An Tag 14 lagen in Lunge und Niere keine erhöhten Titandioxid-Spiegel mehr vor. Nach fünftägiger Inhalation (oronasal, 6 h/d) von 100  $\text{mg}/\text{m}^3$  Titandioxid (gleiche Spezifikation, MMAD/GSD 1,0/2,2) fand sich keine Erhöhung der Gehalte an Titandioxid in Leber, Niere, Milz und Bulbus olfactorius (Ravenzwaay et al. , 2009).

Es liegen verschiedene Hinweise vor, dass Nanomaterialien in partikulärer Form in den Riechnerven aufgenommen werden und über diesen Weg in das Gehirn gelangen können (Oberdörster et al. 2004; Elder et al. 2006 (genauere Beschreibung dieser Studie weiter unten)).

## **Bewertung**

Die untersuchten Silberpartikel (Sung et al. 2009) zählen nicht zu den GBS-Nanomaterialien, da in einem gewissen Ausmaß Silberionen aus den Silberpartikeln im biologischen System freigesetzt werden und die Ergebnisse beeinflusst haben. Es wurde in der vorliegenden Studie nicht auf ein erhöhtes systemisches Vorkommen von Silberpartikeln analysiert, sondern per AAS auf eine Erhöhung der Silbergehalte (Metall und Ionen) untersucht. Weiter lag eine Ganzkörperexposition vor, was eine gleichzeitige orale Exposition mit Silberpartikeln (Säuberung durch Fell ablecken) bedingt. Damit überschätzen die Ergebnisse das tatsächliche Ausmaß einer systemischen Verteilung von GBS-Nanomaterialien gegebenenfalls sehr stark. Es ist möglich, dass die systemischen Silbergehalte fast ausschließlich durch die systemische Verfügbarkeit von Silberionen verursacht war. Die Studie ist einbezogen worden, da sie als subchronische Inhalationsstudie vergleichsweise aussagekräftig ist und verschiedene Organe einbezogen hat.

Im Gegensatz dazu konnte selbst bei maximal hoher Verfügbarkeit an Titandioxid durch intravenöse Applikation bei Fabian et al. (2008) keine Erhöhung der Gehalte an Titandioxid im Gehirn nachgewiesen werden. Nach fünftägiger Inhalation sind für den Bulbus olfactorius ebenfalls negative Befunde dokumentiert (Ravenzwaay et al. 2009).

Insgesamt scheint die systemische Verfügbarkeit der untersuchten GBS-Nanomaterialien relativ gering zu sein. Ein Transport über den Riechnerv in das Gehirn nach inhalativer Exposition könnte theoretisch für mögliche Effekte im Gehirn von Bedeutung sein. Dieser Aufnahmeweg wird seit längerem neben Partikeln auch zum Beispiel für Polioviren untersucht und diskutiert. Aufgetretene Wirkungen im Gehirn nach mutmaßlicher Aufnahme von Partikeln über den Riechnerv werden unter Abschnitt 4.3 bewertet.

## **4 Toxische Wirkungen**

### **4.1 Allgemeines**

Eine relevante Toxizität nach dermalen oder oraler Exposition scheint für Nanomaterialien von untergeordneter Bedeutung zu sein (siehe Abschnitt 4.3). Studien, die auf eine systemische Wirkung von Nanomaterialien hinweisen, sind weiter unten beschrieben und bewertet. Ein relevanter Anteil der am Arbeitsplatz vorkommenden Nanomaterialien ist den alveolengängigen granulären biobeständigen Stäuben ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität („GBS-Nanomaterialien“) zuzuordnen. Dabei sind die im Vordergrund stehenden Wirkungen lokal und betreffen eine Verursachung einer chronischen Entzündung in den tiefen Atemwegen sowie ein mögliches kanzerogenes Wirkpotential. Im folgenden werden maßgeblich Daten beschrieben, die für GBS-Nanomaterialien bedeutsam sind. Typen von Nanomaterialien, für die andere toxikologische Wirkprinzipien gelten, sind einer Einzelfallbetrachtung zu unterziehen und sind im folgenden nicht das Ziel der Betrachtung.



## **4.2 Lokale Entzündung nach wiederholter inhalativer Applikation, lokale Karzinogenität und Genotoxizität**

### **4.2.1 Lokale Entzündung nach wiederholter inhalativer Applikation**

Es liegt eine Reihe von subakuten und subchronischen Inhalationsstudien vor, die Entzündungseffekte in der Lunge durch GBS-Nanomaterialien nachgewiesen haben (z.B. Ferin et al. 1992; Oberdörster et al., 1994, Bermudez et al., 2004; Pauluhn 2009b). Diese Studien werden hier nicht im Detail ausgewertet. Oft wurden dazu verschiedene Entzündungsparameter in Lungenspülflüssigkeit (bronchioalveolärer Lavage) untersucht. Einige dieser Studien wurden vergleichend mit Quarz durchgeführt, wobei sich für diesen Stoff eine höhere inflammatorische Wirkstärke als bei GBS-Nanomaterialien zeigte. Für Quarz (DQ12) zum Beispiel lag in einer dreimonatigen Postexpositionsphase nach einmonatiger inhalativer Exposition eine eher fortschreitende Entzündung vor, bei Industrieruß war diese geringer und in der Postexpositionsphase in Bezug auf verschiedene Entzündungsparameter rückläufig (Pauluhn, 2009a).

#### **Bewertung**

Zur Ableitung von Maßnahmen zur Expositionsbeschränkung für GBS-Nanomaterialien sind diese inflammatorischen Effekte wie für Stäube im Allgemeinen zu berücksichtigen.

### **4.2.2 Lokale Karzinogenität**

Eine Beschreibung der relevanten chronischen Inhalationsstudien findet sich in Roller (2008, 2009).

#### **Bewertung**

GBS-Nanomaterialien, die in die tiefen Atemwege gelangen können, sind auf Basis der vorliegenden Daten als möglicherweise krebserzeugend nach Inhalation anzusehen. Diese Einschätzung beruht auf dem Nachweis einer kanzerogenen Wirkung von Titandioxid und Industrieruß in zwei beziehungsweise mehreren unabhängigen Studien an der Ratte. Die in den Tierexperimenten aufgetretenen Tumore werden als für den Menschen relevant angesehen. Die Relevanz der im Tierexperiment beobachteten Lungentumore für den Menschen wird gestützt durch die epidemiologischen Befunde zu Dieselrußpartikeln. Diese Bewertung kann generell auf alveolengängige GBS-Nanomaterialien übertragen werden. Für GBS-Nanomaterialien selbst liegen keine epidemiologischen Hinweise hinsichtlich einer kanzerogenen Wirkung vor.

### **4.2.3 Genotoxizität**

Es liegen eine Reihe von positiven tierexperimentellen Studien vor, die unter bestimmten Versuchsbedingungen eine genotoxische Wirkung von GBS-Nanomaterialien (Titandioxid, Industrieruß, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) belegen (Driscoll et al., 1996, 1997; Gallagher et al. 2003; Saber et al. 2005; Shelby et al. 1993; Totsuka et al. 2009; Trouiller et al. 2009), allerdings auch eine Reihe von negativen Befunden (Übersichten in Gonzalez et al., 2008; Landsiedel et al.,

2009), darunter auch nach OECD-Prüfrichtlinien durchgeführte Studien (z.B. Landsiedel et al., 2010). Genotoxizität trat in diesen Studien assoziiert mit Entzündung auf. Positive Befunde in Zellen des Atemwegs (Typ-II-Pneumozyten) wurden nach Instillation oder subchronischer Inhalation erzielt (Driscoll et al. 1996; 1997).

## **Bewertung**

Eine abschließende Bewertung hinsichtlich des Stellenwertes der Genotoxizität insbesondere im Hinblick auf die Karzinogenität von GBS-Nanomaterialien kann zur Zeit nicht vorgenommen werden.

## **4.3 Systemische Toxizität**

### **Mögliche Wirkungen in verschiedenen Organen**

Sung et al. (2009) führten eine subchronische Inhalationsstudie mit Sprague-Dawley Ratten beider Geschlechter durch. Diese Studie ist weiter oben bereits detaillierter beschrieben. Es traten hauptsächlich bei der hohen Exposition mit Silberpartikeln Gallengangshyperplasien auf, diese waren von generell minimaler Ausprägung bei 13/20 Tieren. In der Kontrolle lag die Inzidenz für Gallengangshyperplasien minimaler Ausprägung bei 3/20 Tieren. Es wurden keine weiteren systemischen Effekte festgestellt.

Wu et al. (2009) führten verschiedene Experimente durch, bei denen männliche Schweine (4 Wochen alt, keine weiteren Angaben, n=3 pro Gruppe) und 7-8 Wochen alte Nacktmäuse (BALB/c nu/nu, Geschlecht nicht spezifiziert, n=6 pro Gruppe) dermal mit Titandioxid für 30 Tage (Schweine) beziehungsweise 60 Tage (Mäuse) behandelt wurden. Dabei wurden verschiedene 5%(w/w) Titandioxid-Suspensionen mit 1% Tween 80 und 20% Kokosölfettsäure („caprylic/capric acid“) eingesetzt. Es wurden verschiedene Spezifikationen von Titandioxid untersucht. Die untersuchten Materialien umfassten Anatas (Primärpartikelgröße 4 oder 10 nm) oder Rutil (Primärpartikelgröße 25, 60 oder 90 nm) sowie Degussa P25 (25% Rutil/75% Anatas; Primärpartikelgröße ~21 nm). Eine Analyse der Primärpartikelgrößen erfolgte über TEM. Die Reinheitsgrade der eingesetzten Proben wurden mit 99,5-99,6% angegeben. In den Untersuchungen an den Schweinen wurde Titandioxid mit 4 und 60 nm Primärpartikelgröße auf die Ohren appliziert. Dabei wurden je 24 mg Testsuspension auf eine Fläche von 3 cm<sup>2</sup> gegeben. In Epidermisbiopsien wurden Erweiterungen des Interzellularraums, Beeinträchtigungen von Desmosomen und perinukleäre Vakuolen in Basalzellen beschrieben, die nur über einzelne Fotos dokumentiert sind. Erytheme oder Ödeme wurden nicht gefunden.

Bei den Mäusen wurden die täglichen Behandlungen für eine Dauer von 3 Stunden dorsal mittels einer selbstgemachten Plastikmanschette („plastic collar“) vorgenommen. Dabei war die Applikationsfläche wie bei den Versuchen mit den Schweinen 3 cm<sup>2</sup> und es wurden je 24 mg der oben genannten Testsuspensionen appliziert. Am Applikationsort zeigten sich nach der 60-tägigen Behandlung Anzeichen einer Hautschädigung, die als Hautalterung beschrieben wurde. Diese äußerte sich in Faltenbildung, starker Keratinisierung und Dermisatrophie. In der Leber wurden fokale und Kondensationsnekrosen beschrieben. In der Milz fand sich eine erhöhte Proliferation lokaler Makrophagen, in der Lunge leichte alveoläre Verdickungen. In den Nieren fand sich „subkutan“ ‚saccus lymphaticus‘ in allen Behandlungsgruppen. Alle diese Veränderungen sind ausschließlich qualitativ ohne systematische Auswertung von Schweregraden beschrieben und über maximal je ein Foto dokumentiert. In Haut und

Leber zeigten sich uneinheitliche signifikante Veränderungen der Gehalte an Malondialdehyd und Hydroxyprolin (nur Haut) sowie der SOD-Aktivität. Die genannten Befunde bei den Mäusen sind fast ausnahmslos nicht für das Titandioxid-Material von 90 nm (Rutil) aufgetreten.

In einer Studie wurde die akute Toxizität von drei verschiedenen Formen Titandioxid (Primärpartikelgrößen 25, 80 und 155 nm, k.w. A.) an Mäusen (CD-1 (ICR)) beider Geschlechter untersucht (Wang et al. 2007). Es wurde jeweils 5 g/kg Körpergewicht einmal per Schlundsonde verabreicht. Die Untersuchungen wurden nach den Angaben der Autoren gemäß der Festdosismethode (OECD 420) durchgeführt. Für die 25 nm- und 80 nm-Titandioxid-Materialien fanden sich im Serum bei den männlichen Mäusen höhere Werte an Harnstoff-Stickstoff (blood urea nitrogen, BUN) und an Kreatinin. Diese Befunde waren vermutlich nicht statistisch signifikant (keine Angaben). Bei den weiblichen Tieren zeigten sich für diese Titandioxidformen signifikant erhöhte Aktivitäten von LDH und  $\alpha$ -HBDH ( $\alpha$ -Hydroxybutyratdehydrogenase). Für das 155nm-Titandioxid traten in keinem Fall signifikante Effekte bei diesen Parametern auf. Hinsichtlich der histopathologischen Befunde wurden laut der Autoren in beiden Geschlechtern ähnliche Beobachtungen gemacht. Die Befunde sind in der Veröffentlichung rein qualitativ beschrieben und nur über einzelne Fotos dokumentiert. Es liegen keine Angaben einer systematischen Auswertung unter Angabe von Schweregraden der Befunde vor. Für die 80nm- und 155nm-Titandioxid-Materialien traten Veränderungen im Gehirn auf (erhöhtes Auftreten von Vakuolen in Hippocampus-Neuronen). Ebenfalls wurden in der Leber hydropische Degeneration um die Zentralvene sowie fokale Nekrose bei Hepatozyten festgestellt. Alle diese Befunde wurden nicht für die 25nm-Form gemacht. In Bezug auf das Herz lagen keine histopathologischen Schäden vor, obwohl eine Erhöhung von LDH und  $\alpha$ -HBDH im Serum laut der Autoren als Indikator eines kardiovaskulären Schadens angesehen wird.

In der bereits oben beschriebenen Studie von Fabian et al. (2008) fanden sich nach einmaliger intravenöser Applikation von Titandioxid (5 mg/kg Körpergewicht) keine Hinweise auf systemische entzündliche Effekte. Es waren insgesamt 67 verschiedene Parameter in Blutproben (Zytokine und Enzyme) erfasst worden.

## **Bewertung**

Die bei Sung et al. (2009) aufgetretenen Gallengangshyperplasien bei 13/20 Tieren waren von generell minimaler Ausprägung. Weiter ist für Silber von einer gewissen Bioverfügbarkeit von Silberionen auszugehen, so dass die Wirkungen durch ionisches Silber mitbedingt bis zu gänzlich verursacht sein können. Aus den unzureichenden Beschreibungen der histopathologischen Befunde von Wu et al. (2009) können keine Schlüsse auf Relevanz und Schweregrad der Effekte gezogen werden, da keine systematische Beschreibung der Befunde vorliegt. Die stärkeren Effekte bei den Nacktmäusen können unter anderem dadurch erklärt werden, dass die Barrierefunktion der Haut bei diesen Tieren vergleichsweise gering ausgeprägt ist. Die dermalen Befunde bei den Nacktmäusen scheinen eher auf eine unspezifische Hautschädigung durch die 60-tägige dermale Behandlung hinzudeuten als auf einen spezifischen Effekt durch Nanomaterialien. Inwiefern die aufgetretenen biochemischen hepatischen Veränderungen einen adversen Effekt darstellen, ist unklar, weil die Effekte inkonsistent auftraten und keine Dosis-Wirkungsbeziehungen untersucht wurden.

Die Befunde in der Arbeit von Wang et al. (2007) treten nicht konsistent in beiden Geschlechtern, in Bezug auf die verschiedenen Formen an untersuchtem Titandioxid sowie im Vergleich der Befunde in Serum und der Histologie in Bezug auf das Herz auf.

Es wurden keine Dosis-Wirkungsbeziehungen untersucht. Weiter wurde keine systematische histopathologische Auswertung vorgenommen. Die Befunde sind daher von ihrem Stellenwert in Bezug auf adverse Wirkungen als zweifelhaft einzuordnen.

### Mögliche Wirkungen im Gehirn

Tin-Tin-Win-Shwe et al. (2006) behandelten männliche Mäuse (BALB/c) mit je 125 µg Industrieruß (Printex 90, Primärpartikeldurchmesser 14 nm oder Flammruß 101, Primärpartikeldurchmesser 95 nm, keine weiteren Angaben zur Partikelcharakterisierung). Die Applikation erfolgte über eine viermalige intranasale Instillation im Abstand von je einer Woche. Nur bei den mit Printex 90 behandelten Tieren zeigte sich im Bulbus olfactorius, jedoch nicht im Hippocampus, eine maximal um den Faktor 3 erhöhte RNA-Expression proinflammatorischer (Interleukin-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) und chemotaktischer Zytokine (MCP-1/CCL2 und MIP-1/CCL3 und Interferon- $\gamma$ /CXCL9). Diese Effekte waren im Vergleich zur Kontrolle nur im Falle von MIP-1/CCL3 statistisch signifikant. Eine Aufnahme von Industrieruß in den Bulbus olfactorius wurde nicht untersucht. Hinweise auf eine Aufnahme von Industrieruß-Nanopartikeln (Primärpartikeldurchmesser 36 nm, Eigenherstellung, Funkengenerator) in den Bulbus olfactorius liegen aus einer anderen Inhalationsstudie mit einmaliger 6-stündiger Inhalation vor (Oberdörster et al. 2004).

Elder et al. (2006) behandelten männliche Ratten (F344) mit Mangandioxid (500 µg/m<sup>3</sup>; Primärpartikeldurchmesser 3-8 nm; medianer Agglomeratdurchmesser 30 nm, Analyse durch TEM und scanning mobility particle sizer). Es wurden Versuche mit Ganzkörperexposition (6h/d; 5d/Woche; 11-12 Tage insgesamt) durchgeführt. In bronchioalveolärer Lavage fanden sich keine Hinweise auf Entzündung. Die Gehalte an Mangan stiegen im Bulbus olfactorius um den Faktor 3,5, in der Lunge um den Faktor 2,5. In verschiedenen weiteren Teilen des Gehirns wurden ebenfalls statistisch erhöhte Gehalte an Mangan gefunden, wenn auch in weit geringerem Ausmaß (maximal etwa 50% Erhöhung) als im Bulbus olfactorius. Es zeigten sich im Gehirn vor allem Effekte auf die TNF- $\alpha$ -Expression. Diese war im Bulbus olfactorius für TNF- $\alpha$ -mRNA um den Faktor 8, für TNF- $\alpha$ -Protein um den Faktor 30 erhöht. In anderen Teilen des Gehirns bewegten sich die Induktionsfaktoren für mRNA und Protein von TNF- $\alpha$  etwa zwischen 2 und 7. In weiteren parallelen Versuchen mit intranasaler Instillation von Mangandioxid und löslichem Manganchlorid zeigte sich eine vergleichbare Erhöhung der Mangangehalte im Bulbus olfactorius. Daraus schlossen die Autoren, dass Mangandioxid auch in partikulärer Form über den Riechnerven aufgenommen worden sein musste. Laut der Autoren konnte die Konzentration an Mangan im Bulbus olfactorius nach Behandlung mit Mangandioxid nicht über ausschließliche Aufnahme an löslichem Mangan erklärt werden. Die in physiologischer Kochsalzlösung untersuchte Löslichkeit des eingesetzten Mangandioxids lag bei 1-1,5%/Tag. Mangandioxid zählt damit nicht zu den GBS-Nanomaterialien. Diese Ergebnisse werden dennoch hier beschrieben, weil aus der Studie selbst nicht klar hervorgeht, dass die gefundenen Effekte nicht spezifisch für nicht lösliche partikuläre Nanomaterialien sind.

In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe um Wang (Wang et al., 2008a,b) wurden zwei verschiedene Formen von Titandioxid (jeweils Primärpartikelgrößen 80 nm und 155 nm) eingesetzt. Da Primärpartikelgrößen und Lieferant identisch wie in Wang et al. 2007 waren, ist anzunehmen, dass die gleichen Materialien eingesetzt wurden. Bei Wang et al. 2008b wird die 80nm-Form als Rutil beschrieben und die 155nm-Form als Anatas. Es wurden wiederum CD-1 (ICR) Mäuse eingesetzt, allerdings nur weiblichen Geschlechts. Den Tieren wurde jeden zweiten Tag für 30 Tage 500 µg Titandioxid intranasal appliziert.

Ziel der Studie war die Beschreibung möglicher adverser Effekte im Gehirn. Im Hippocampus korrelierten laut der Autoren höhere Titangehalte mit Anzeichen auf oxidativen Stress. Diese zeigten sich in histologischen Veränderungen in Neuronen wie verstreute („scatter“) Nissl-Schollen sowie einer um 38% erhöhten Zahl an GFAP („glial fibrillary acidic protein“)-positiven Astrozyten in der CA4-Region des Hippocampus (nur für 155nm-Anatas angegeben). Astrozyten spielen eine Rolle bei Reparaturprozessen im Gehirn und GFAP wird laut der Autoren „oftmals“ als Biomarker einer Aktivierung von Astrozyten angesehen („often considered as“). Die histologischen Befunde sind lediglich über einzelne Fotos dokumentiert. Für beide Formen Titandioxid fanden sich signifikant niedrigere Zellzahlen im Hippocampus (etwa 25-30%) (nur Region CA1 nicht CA4). Die Gehalte von GFAP im Hippocampus (keine Region spezifiziert) waren für 80nm-Rutil beziehungsweise 155nm-Anatas signifikant jeweils um die Faktoren 1,5 und 2,5 erhöht. Weiter zeigten sich in Proben aus Gesamtgewebe (Gehirn) Erhöhungen der Gehalte an Glutaminsäure und Stickstoffmonoxid sowie bei den Aktivitäten von Acetylcholinesterase und Katalase. Diese Erhöhungen betragen mit Ausnahme für die Katalase (dort 80%) maximal etwa 50% und waren generell für 155nm-Anatas stärker ausgeprägt. Die Karbonylierung von Proteinen sowie die Peroxidation von Fettsäuren war um maximal 20% erhöht. In Bezug auf die Glutathiongehalte und Aktivitäten der GST und GSH-Peroxidase zeigten sich keine Effekte.

Eine Studie von Ma et al. (2010) hatte zum Ziel, Wirkungen von Titandioxid am Gehirn von weiblichen Mäusen (CD-1(ICR)) zu untersuchen. Andere Organe wurden nicht einbezogen. Dazu wurde Titandioxid (Anatas) aus Eigenherstellung mit einer angegebenen Primärpartikelgröße von 5 nm verwendet. Die Angaben zur Primärpartikelgröße stammen laut der Autoren aus eigenen Röntgendiffraktometrie(XRD)-Analysen. Dieses Titandioxid wurde täglich in Konzentrationen von 0, 5, 10, 50, 100 und 150 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal für eine Dauer von 14 Tagen verabreicht. Parallel wurde käufliches erworbenes mikrostrukturiertes Titandioxid (Primärpartikelgröße 10-15 µm, keine weiteren Angaben) in einer Konzentration von 150 mg/kg Körpergewicht untersucht. Bei den mit nanostrukturiertem Titandioxid behandelten Mäusen ließ sich eine dosisabhängige Erniedrigung der absoluten Gehirngewichte feststellen, die ab 50 mg/kg statistisch signifikant war und aus den Daten abgeleitet bei der höchsten Dosis 40% betrug. Aus den Daten kann ebenfalls abgeleitet werden, dass nach Behandlung mit mikrostrukturiertem Titandioxid die Erniedrigung der absoluten Gehirngewichte 32% betrug. Bei den mit nanostrukturiertem Titandioxid behandelten Tieren zeigten sich in den beiden höheren Dosen laut der Autoren histopathologische Effekte in Form von lokalen Umbildungen von Neuronen in eine filamentöse Form. Nur bei der höchsten Dosis wurden in diesen Regionen Entzündungszellen (keine weiteren Angaben) gefunden. Die Befunde sind in der Veröffentlichung rein qualitativ beschrieben und nur über einzelne Fotos dokumentiert. Ob bei mikrostrukturiertem Titandioxid ähnliche Befunde gemacht wurden, ist nicht beschrieben.

Aus den angegebenen Daten kann weiter abgeleitet werden, dass im Mittel bei allen Dosisgruppen etwa 1/25000 der Masse des verabreichten Titandioxids inklusive der mikrostrukturierten Form im Gehirn nachgewiesen wurde (108-500 ng/g). Nur bei der höchsten Dosierung von 150 mg/kg ist ein Vergleich der anteiligen Gehalte von nanostrukturiertem und mikrostrukturiertem Titandioxid im Gehirn möglich. So fanden sich für die nanostrukturierte Form 1/30000 der Masse des verabreichten Titandioxids im Gehirn, für die mikrostrukturierte Form waren es 1/43000. An den Gehirnproben wurden eine Reihe von verschiedenen Untersuchungen vorgenommen. Darunter wurden die Parameter Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Malondialdehyd, Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, Glutathion (auch in oxidierten Form) und Glutamat erfasst wie auch Superoxiddismutase, Katalase, Ascorbinsäureperoxidase, Glutathionperoxidase, Stickoxidsynthase, Acetylcholinesterase sowie Gesamtantioxidationskapazität. Es zeigten

sich zum Teil mehr oder weniger ausgeprägte Effekte, die zum Teil dosisabhängig waren. Alle Wirkungen wurden auch mit mikrostrukturiertem Titandioxid in starker Ausprägung festgestellt.

## **Bewertung**

In der Studie von Wang et al. (2008a,b) wurden im Vergleich zu den Arbeiten von Tin-Tin-Win-Shwe et al. (2006) und Elder et al. (2006) sehr häufige intranasale Applikationen bei sehr hohen Stoffdosen vorgenommen. So wurden zum Beispiel bei Tin-Tin-Win-Shwe et al. (2006) über 4 Wochen einmal wöchentlich 0,25 mg instilliert, bei Wang et al. fünfzehnmal für 30 Tage 0,5 mg. Die histologischen Befunde der Studie von Wang et al. (2008a,b) sind rein qualitativ beschrieben und über beispielhafte Fotos dokumentiert. Es liegen keine Angaben einer systematischen Auswertung vor. Generell ist bei allen Befunden dieser Studie nicht zu bewerten, ob die Ergebnisse als advers zu bewerten sind oder ob sie adaptive Reaktionen darstellen.

Die von Ma et al. (2010) dokumentierten Wirkungen wurden auch mit mikrostrukturiertem Titandioxid in starker Ausprägung festgestellt. Es ist unwahrscheinlich, dass die Effekte durch die vergleichsweise geringen Gehalte an Titandioxid im Gehirn zu erklären sind. Sie stellen vermutlich eher unspezifische systemische Konsequenzen der Hochdosisbehandlung dar. Die gefundenen Effekte im Gehirn sind nicht spezifisch für nanostrukturiertes Titandioxid. Ein Teil der in der Studie von Ma et al. (2010) gemachten Befunde ist weiter nicht eindeutig als advers zu bewerten.

Aus in vivo Studien ergeben sich insgesamt Hinweise auf eine Aufnahme von Nanomaterialien über den Riechnerven in den Bulbus olfactorius und weitere Teile des Gehirns. Weiter scheinen Nano- und Mikromaterialien in sehr geringem Ausmaß auch über die Blutbahn in das Gehirn gelangen zu können. Es liegen Hinweise darauf vor, dass dies mit einer Induktion von Entzündungsparametern in diesen Geweben assoziiert sein könnte. Ob es sich hier um einen adversen Effekt handelt, der auch für GBS-Nanomaterialien relevant ist, kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht abschließend bewertet werden. Bei den Versuchen mit Mangandioxid ist zu berücksichtigen, dass die Wirkungen im Gehirn wohl nicht durch Mangandioxid-Partikel, sondern durch freigesetzte Manganionen verursacht wurden. Diese Befunde sind nicht spezifisch für Partikel und lassen sich daher nicht auf GBS-Nanomaterialien übertragen. Aus subchronischer inhalativer Exposition gegenüber Silberstäuben aus nanoskaligen Primärpartikeln ergab sich (Sung et al. 2009), dass Silber sich zwar im Gehirn nachweisen ließ, jedoch in vergleichsweise niedriger Konzentration. Unklar ist, ob und in welchem Ausmaß es sich hier um partikuläres Silber handelte und Wirkungen sind nicht dokumentiert. Es liegen bisher keine Studien vor, die nach längerfristiger Inhalation eindeutig adverse Effekte im Gehirn nach Exposition gegenüber GBS-Nanomaterialien nachgewiesen haben. Insgesamt ergibt sich zur Ermöglichung einer abschließenden Bewertung weiterer Untersuchungsbedarf.

## **Mögliche Wirkungen auf die postnatale Entwicklung nach pränataler Behandlung**

Shimizu et al. (2009) behandelten trächtige Mäuse (ICR) an den Gestationstagen 6, 9, 12 und 15 mit 100 µg TiO<sub>2</sub> (Anatas, Primärpartikeldurchmesser 25-70 nm, spezifische Oberfläche 20-25 m<sup>2</sup>/g, Sigma-Aldrich, keine weiteren Angaben) subkutan. Von männlichen Feten bzw. Nachkommen wurde an Gestationstag 16 sowie postnatal an den Tagen 2, 7, 14 und 21 Gehirngewebe gesammelt. Diese Proben wurden mittels cDNA

Mikrorarray-Methodik auf Veränderungen in der Genexpression untersucht. Es zeigte sich, dass abhängig vom Probenahmezeitpunkt die Genexpression bei 229-613 Genen erhöht und bei 66-1274 Genen erniedrigt war. Diese Gene wurden mittels einer Datenbankrecherche zu verschiedenen funktionellen Gruppen zusammengefasst. Dies waren zum Beispiel Gene für Apoptose, Anti-Apoptose, Apoptoseinduktion, Gehirnentwicklung, Zelltod, motorische Aktivität und SOD-Aktivität. In der Auswertung wurden diejenigen Gengruppen angegeben, für die signifikant erhöhte Expressionen (Faktoren von 1,04 bis zu 5,14) im Vergleich zur Kontrollgruppe vorlagen. Die Veränderungen traten nicht konsistent auf, an verschiedenen Gestationstagen waren verschiedene Gengruppen induziert.

Aus derselben Arbeitsgruppe liegt eine weitere Studie vor. Takeda et al. (2009) behandelten trächtige Mäuse (ICR) an den Gestationstagen 3, 7, 10 und 14 mit 100 µg TiO<sub>2</sub> (Anatas, Primärpartikeldurchmesser 25-70 nm, spezifische Oberfläche 20-25 m<sup>2</sup>/g, Sigma-Aldrich, keine weiteren Angaben) subkutan. Die männlichen Nachkommen, die einer Untersuchung unterzogen wurden, wurden im Alter von 6 Wochen getötet. Die Testesmorphologie dieser Tiere wurde als anormal beschrieben, einige Samenleiter erschienen laut der Autoren desorganisiert („disorganized“) und unterbrochen, es wurden weniger reife Spermien in den Samenleitern vorgefunden. Die tägliche Spermienproduktion (ca. 65% der Kontrolle) und die Anzahl der Sertolizellen (ca. 40% der Kontrolle) waren signifikant erniedrigt. Die Anzahl von Sertolizellen mit geschädigten Mitochondrien war von 15% in der Kontrolle auf 55% signifikant erhöht. Im Bulbus olfactorius wurden im Vergleich zur Kontrolle vermehrt („numerous“) Kaspase-3 positive Zellen gefunden, Okklusionen kleiner Gefäße sowie perivaskuläre Ödeme. Es liegt keine quantitative Beschreibung dieser Befunde vor.

Li et al. (2009) verglichen die Effekte von gefilterten und ungefilterten Dieselmotoremissionen auf die Testes von Ratten (F344), deren Muttertiere pränatal exponiert worden waren. In Bezug auf Dieselrußpartikel betrug die Exposition 149 µg/m<sup>3</sup> über die Gestationstage 1-19. Die männlichen Nachkommen wurden am Tag 28 einer Histopathologie der Testes unterzogen. Bei den mit den von Partikeln befreiten Dieselmotoremissionen exponierten Tieren zeigten sich die gleichen Effekte wie bei den mit ungefilterten Dieselmotoremissionen behandelten Tieren. Dies war ein Verlust an Keimzellen in den Samenleitern. Quantitative Angaben wurden nicht gemacht, weitere Befunde aus der Testeshistopathologie sind nicht beschrieben.

Trächtige Mäuse (C57/BL) wurden an den Gestationstagen 7-19 täglich 1h mit Dieselrußpartikeln (Standardreferenzmaterial (SRM) 2975; Konzentration 20 mg/m<sup>3</sup>; Inhalation bei Ganzkörperexposition) behandelt (Hemmingsen et al. 2009). Deren männliche Nachkommen wurden postnatal an Tag 170 untersucht und wiesen eine signifikante um 33% reduzierte tägliche Spermienproduktion auf.

## **Bewertung**

Die Charakterisierung des untersuchten Materials sowie die Dokumentation und Beschreibung der Ergebnisse der beiden Studien sind unzureichend.

Die subkutane Behandlung führt zu einer höheren internen Exposition und systemischen Verfügbarkeit von Titandioxid als die Applikation über einen physiologischen Expositionsweg. Damit ist fraglich, welche Relevanz die Befunde von Shimizu et al. (2009) und Takeda et al. (2009) haben. Die Studie von Shimizu et al. (2009) findet in Bezug auf den Probenahmezeitpunkt inkonsistente Veränderungen in der Genexpression. Eine veränderte Genexpression ist nicht unbedingt als adverser Effekt anzusehen. Die Befunde dieser Studien sind daher insgesamt wahrscheinlich als nicht relevant für eine

systemische Toxizität von Titandioxid zu werten.

Die Befunde von Takeda et al. (2009) an den Testes männlicher Nachkommen, deren Muttertiere subkutan mit Titandioxid behandelt worden waren, stehen ähnlichen Befunden von Hemmingsen et al. (2009) mit Dieselrußpartikeln nach Inhalation gegenüber. Inwiefern diese Funde spezifisch für GBS-Nanomaterialien sein könnten, ist vor den nicht übereinstimmenden Befunden von Li et al. (2009) nicht abschließend zu bewerten. Die Befunde weisen auf die Notwendigkeit weiterer Studien mit GBS-Nanomaterialien hin. Einschränkend ist allerdings zu bemerken, dass eine spezifische Testtoxizität von GBS-Nanomaterialien biologisch wenig plausibel erscheint.

### **Möglicher Einfluss auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Aus epidemiologischen Studien liegen Hinweise vor, dass die Exposition gegenüber Umweltfeinstaub mit einer erhöhten Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen und einer erhöhten Inzidenz an Arteriosklerose assoziiert ist. Im Tierexperiment ließen sich Hinweise auf eine derartige Wirkung bisher nur an bestimmten für diese Fragestellungen besonders empfindlichen Stämmen der Maus und des Kaninchens (z.B. mit bestimmten Gendefekten) nachstellen. In einigen Studien waren diese Hinweise auch nur bei paralleler Gabe einer hochfett- oder hochcholesterinhaltigen Ernährung nachzuweisen (Suwa et al 2002; Sun et al., 2005). Ähnliche Befunde wurden auch nach Gabe von Industrieruß erzielt (Niwa et al. 2007). In dieser Studie wurde 2 Gruppen von Mäusen, die als Gendefekt keinen LDL-Rezeptor exprimierten, Futter gleichen Energiegehaltes jedoch jeweils mit oder ohne 0,51% Cholesterin verabreicht. Den Tieren wurde Industrieruß (1 mg/Woche, mittlerer Partikeldurchmesser 120,7 nm) für 10 Wochen intratracheal appliziert. Nur bei der Gruppe mit hohem Cholesteringehalt im Futter zeigte sich eine erhöhte Inzidenz fettreicher Läsionen in der Aorta, die als Hinweis auf Arteriosklerose gewertet wurden.

### **Bewertung**

Inwieweit diese Befunde auf Expositionen gegenüber GBS-Nanomaterialien am Arbeitsplatz übertragen werden können, ist unklar. Möglicherweise ist der Effekt von Feinstäuben und GBS-Nanomaterialien auf die Genese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen nicht als alleiniger Faktor ursächlich. Dies kann zur Zeit nicht abschließend beurteilt werden.

### **Literatur**

- [1] Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* 2004; 77(2):347-57.
- [2] Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* 2002;70(1):86-97.
- [3] Festlegung der Teilchengrößenverteilung zur Messung luftgetragener Partikel; Deutsche Fassung EN 481: 1993.
- [4] Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB,



- Oberdörster G. Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;136(2):372-80.
- [5] Driscoll KE, Deyo LC, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Bertram TA. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1997;18(2):423-30.
- [6] Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 2006 Aug;114(8):1172-8. Erratum in: *Environ Health Perspect.* 2006;114(8):1178.
- [7] Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol.* 2008;82(3):151-7.
- [8] Ferin J, Oberdörster G, Penney DP. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;6(5):535-42.
- [9] Gallagher J, Sams R 2nd, Inmon J, Gelein R, Elder A, Oberdörster G, Prahalad AK. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;190(3):224-31.
- [10] Gonzalez, L, Lison, D, Kirsch-Volders, M. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review, *Nanotoxicology*, 2008; 2:4,252-273
- [11] Hemmingsen JG, Hougaard KS, Talsness C, Wellejus A, Loft S, Wallin H, Møller P. Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice. *Toxicology.* 2009;264(1-2):61-8.
- [12] ISO/TS 27687:2008. Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.
- [13] Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A.* 2002 25;65(20):1513-30.
- [14] Landsiedel R, Ma-Hock L, Van Ravenzwaay B, Schulz M, Wiench K, Champ S, Schulte S, Wohlleben W, Oesch F. Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology.* 2010:364-81.
- [15] Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers. *Mutat Res.* 2009;681(2-3):241-58.
- [16] LeFevre ME, Green FH, Joel DD, Laqueur W. Frequency of black pigment in livers and spleens of coal workers: correlation with pulmonary pathology and occupational information. *Hum Pathol.* 1982;13(12):1121-6.
- [17] Li C, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Li X, Fujitani Y, Nakajima T, Suzuki AK. Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. *Toxicol Lett.* 2009 25;185(1):1-8.
- [18] Linglan Ma, Jie Liu, Na Li, Jue Wang, Yanmei Duan, Jinying Yan, Huiting Liu, Han Wang, Fashui Hong, Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated

- nanoparticulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity, *Biomaterials*, 31(1), Issue 1, 2010, 99-105.
- [19] Madl AK, Pinkerton KE. Health effects of inhaled engineered and incidental nanoparticles. *Crit Rev Toxicol*. 2009;39(8):629-58.
- [20] Niwa Y, Hiura Y, Murayama T, Yokode M, Iwai N. Nano-sized carbon black exposure exacerbates atherosclerosis in LDL-receptor knockout mice. *Circ J*. 2007 71(7):1157-61.
- [21] Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*. 1994;102 Suppl 5:173-9.
- [22] Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. 2004; 16(6-7):437-45.
- [23] OECD, 2007. Tentative working definition on manufactured nanomaterials proposed by WG1/CSG meeting (February 13/14, 2007, Washington DC).
- [24] Pauluhn J. Comparative pulmonary response to inhaled nanostructures: considerations on test design and endpoints. *Inhal Toxicol*. 2009a;21(S1):40-54.
- [25] Pauluhn J. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminium oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci*. 2009b;109(1):152-67.
- [26] Plitzko S. Workplace exposure to engineered nanoparticles. *Inhal Toxicol*. 2009; 21 Suppl 1:25-9.
- [27] Preining O. The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *Journal of Aerosol Science* 29(5-6), 1998, 481-95.
- [28] van Ravenzwaay B, Landsiedel R, Fabian E, Burkhardt S, Strauss V, Ma-Hock L. Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO<sub>2</sub>, pigmentary TiO<sub>2</sub> and quartz. *Toxicol Lett*. 2009;186(3):152-9.
- [29] Roller M. Carcinogenicity of inhaled nanoparticles. *Inhal Toxicol*. 2009;21(S1):144-157.
- [30] Roller, M: Untersuchungen zur krebserzeugenden Wirkung von Nanopartikeln und anderen Stäuben 1. Auflage. Dortmund: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 2008. ISBN: 978-3-88261-069-7.
- [31] Saber AT, Bornholdt J, Dybdahl M, Sharma AK, Loft S, Vogel U, Wallin H. Tumor necrosis factor is not required for particle-induced genotoxicity and pulmonary inflammation. *Arch Toxicol*. 2005;79(3):177-82.
- [32] Schneider et al. 2007 Evaluation and control of occupational health risks from nanoparticles. TemaNord:581. <http://www.norden.org/en/publications/publications/2007-581> ISBN 978-92-893-1563-0.
- [33] Shelby MD, Erexson GL, Hook GJ, Tice RR. Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. *Environ Mol Mutagen*. 1993; 21(2):160-79.

- [34] Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicol.* 2009 Jul 29;6:20.
- [35] Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroepfel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, Schulz H. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(3):328-33.
- [36] Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, Aguinaldo JG, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA.* 2005; 294(23):3003-10.
- [37] Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, Song MY, Jeong J, Han BS, Han JH, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Cho MH, Kelman BJ, Yu IJ. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):452-61.
- [38] Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39(6):935-42.
- [39] Takeda et al.: Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems, *Journal of Health Science*, 55(1) 95-102 (2009), [http://jhs.pharm.or.jp/data/55\(1\)/55\\_95.pdf](http://jhs.pharm.or.jp/data/55(1)/55_95.pdf)
- [40] Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Lett.* 2006 25;163(2):153-60.
- [41] Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinoshita N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol.* 2009; 6:23.
- [42] Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 2009; 69(22):8784-9.
- [43] Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett.* 2007 30; 168(2):176-85.
- [44] Wang J, Chen C, Liu Y, Jiao F, Li W, Lao F, Li Y, Li B, Ge C, Zhou G, Gao Y, Zhao Y, Chai Z. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett.* 2008a 15; 183(1-3):72-80.
- [45] Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology.* 2008b 5; 254(1-2):82-90.
- [46] Warheit DB, Webb TR, Reed KL. Pulmonary toxicity screening studies in male rats with M5 respirable fibers and particulates. *Inhal Toxicol.* 2007;19(11):951-63.
- [47] Warheit DB, Reed KL, Sayes CM. A role for nanoparticle surface reactivity in facilitating pulmonary toxicity and development of a base set of hazard assays as a

component of nanoparticle risk management. *Inhal Toxicol.* 2009 Suppl 1:61-7.

- [48] Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD. Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett.* 2009;191(1):1-8.