

Ethische Fragestellungen im Zusammenhang der Nanobiotechnologie

Johann S. Ach

Centrum für Bioethik, Universität Münster, Münster

johann.ach@ukmuenster.de

Die Möglichkeit, Eigenschaften von nanoskaligen Gegenständen oder Materialien zu beobachten, zu verstehen und zu kontrollieren, führt zu einer Verbindung zwischen Wissenschaften – zum Beispiel Physik, Chemie, Biologie, Informationstechnik usw. – und ihren Gegenstandsbereichen, die früher getrennt waren, und ermöglicht Fortschritte in unterschiedlichsten Anwendungsbereichen. Von den Nano(bio)technologien werden Verbesserungen der technologischen Möglichkeiten erwartet, die fast alle Lebensbereiche betreffen. Dazu gehören z.B. leistungsfähigere Computer, selbstreinigende Oberflächen, neue Formen regenerativer Energieerzeugung, effizientere Produktionsabläufe sowie neue und bessere diagnostische und therapeutische Möglichkeiten in der Medizin. Sollten sich diese – und weitere Ziele – tatsächlich realisieren lassen, dann handelt es sich dabei zweifellos um wichtige und wünschenswerte Ziele. Ob es gelingen wird, die in die Nano(bio)technologien gesetzten Hoffnungen zu nutzen, hängt allerdings entscheidend auch von den ethischen, gesellschaftlichen und rechtlichen Rahmenbedingungen ab. Im Vortrag werden exemplarisch einige der ethischen Aspekte der Nanobiotechnologie diskutiert. Dazu gehören beispielsweise mögliche Sicherheitsprobleme, die einerseits mit der Größendimension, andererseits mit teilweise vollständig neuen Materialeigenschaften nanoskaliger Strukturen zusammenhängen könnten. Angesprochen werden aber auch weitergehende medizinethische, sozialetische und anthropologische Fragestellungen.

NanoCare – Charakterisierung und Toxikologie von Nanopartikeln

Harald F. Krug¹ Christian Göbber², Jürgen Schnekenburger³, Robert Landsiedel⁴

¹ Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Toxikologie und Genetik, Deutschland

² ItN Nanovation AG, Halberstadt, Deutschland

³ Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Medizinische Klinik und Poliklinik B, Deutschland

⁴ BASF Experimental Toxicology and Ecology, Deutschland

Das Leitprojekt NanoCare ist eine Initiative des BMBF zu den gesundheitsrelevanten Aspekten synthetischer Nanopartikel für die Schaffung einer allgemeinen Informations- und Wissensbasis als Grundlage für eine innovative Materialforschung. Das Projekt hat neben der Herstellung, Charakterisierung und Messung von möglichen Expositionen von Nanopartikeln als weiteres zentrales Thema die möglichen biologischen Effekte dieser Materialien.

Synthetische Nanopartikel werden bereits seit Jahren produziert und kommen in unterschiedlichen Anwendungen zum Einsatz. Beispiele hierfür sind Titandioxid und Carbon Black. Diese bereits intensiv untersuchten „klassischen“ Nanopartikel werden als Referenzmaterialien eingesetzt und mit einem Portfolio von verschiedenen neuen nanoskaligen Materialien (z.B. Zirkondioxid) verglichen. Das Besondere an den neuen nanoskaligen Materialien ist die Kontrolle und gezielte Einstellbarkeit der Oberflächenchemie (Dotierung, hydrophobe- bzw. hydrophile Oberfläche), so dass neuartige Eigenschaften und Anwendungen ermöglicht werden. Nanopartikel haben in Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie z.B. der Herstellungsmethode, den Ausgangsstoffen oder der chemischen Modifizierung, unterschiedliche Oberflächeneigenschaften und damit Wechselwirkungen mit anderen Stoffen. Dieses Know-how wird von den einzelnen Industriepartnern bei der Synthese der „neuen“ Nanomaterialien in das Projekt eingebracht. Ziel ist es dabei, Nanopartikel reproduzierbar in ausreichender Menge zu synthetisieren. In enger Zusammenarbeit mit den Partnern der biologisch/toxikologischen Fachrichtung werden die synthetisierten Partikel in gängige Zellmedien eingebracht und anschließend auf ihr zelltoxisches Potenzial hin untersucht. Zur Beschreibung einer biologischen Wirkung ist es unabdingbar, die Nanopartikel detailliert zu charakterisieren. Dabei liegt ein wichtiger Schwerpunkt der Analytik in der Untersuchung der Eigenschaften von Primärpartikeln, Aggregaten und Agglomeraten und deren Stabilität in biologischen Medien.

Im Projekt NanoCare werden die biologischen Wirkungen von synthetischen Nanopartikeln an unterschiedlichen in vitro Modellen untersucht. In einem generellen Ansatz werden Experimente an Zellkulturen durchgeführt, die verschiedene Zelltypen primär exponierter Organe wie Haut, Lunge und Magendarmsystem repräsentieren. Zur Einschätzung der Wirkung auf zelluläre Systeme werden kurzfristige, mittelfristige und langfristige Reaktionen untersucht. Die bisher im Rahmen von NanoCare erfolgten Untersuchungen zeigen, dass verschiedene Zelltypen durchaus unterschiedlich in diesen Testsystemen reagieren. Diese zellulären Reaktionen auf die Nanopartikel werden jedoch durch die Umgebung, in der sich die Partikel befinden (z.B. biologische Medien), stark beeinflusst. Proteine können an die Nanopartikel adsorbieren und damit zum einen die Dispergierbarkeit verbessern, andererseits aber auch die Reaktion der Zelle auf die Partikel verändern. Aufgrund der vielfältigen physiologischen Wirkungen von Proteinen an und in Zellen ist anzunehmen, dass ein solches Protein-Coating zu einer veränderten Zellreaktion auf Partikel führt. Daher sind der Nachweis und die Charakterisierung von Proteinadsorption an nanoskaliges Material von hoher Bedeutung. Mittels Ultraschall-Resonator-Technologie wurde eine Interaktion zwischen Serumalbumin und TiO₂ bzw. CeO₂ Partikeln nachgewiesen.

Die Inhalation wird allgemein als kritischster Aufnahmeweg für Nanopartikel angesehen. Die Generierung und Charakterisierung von Aerosolen wurde anhand von zehn Nanomaterialien untersucht. Die über sechzig in vivo untersuchten biologischen Parameter erlauben Vergleiche mit den in vitro Methoden, Rückschlüsse zur Wirkungsweise der Nanomaterialien und die Auswahl sensibler und prädiktiver Parameter für eine Standard-Kurzzeitinhalationsmethode für Nanomaterialien. Unsere Untersuchungen mit Titandioxid zeigen eine gute qualitative und quantitative Übereinstimmung der Ergebnisse der Standard-Kurzzeitinhalationsmethode mit veröffentlichten Ergebnissen aus subchronischen und chronischen Inhalationsstudien.

Das Projekt NanoCare wird mit diesen umfangreichen Untersuchungen zum allgemeinen Verständnis der Wirkung von synthetischen Nanopartikeln beitragen und wird die öffentliche Diskussion dazu fördern.

INOS – Identifizierung und Bewertung von Gesundheits- und Umweltauswirkungen von technischen nanoskaligen Partikeln

Beteiligte Einrichtungen:

Technische Universität Dresden

Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien (MBZ)

Med. Fakultät Carl Gustav Carus, Abteilung Neuropädiatrie

Fraunhofer Institut für keramische Technologien und Systeme (IKTS), Dresden

Namos GmbH, Dresden

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ), Leipzig

Im Rahmen des INOS-Projektes werden Methoden zur Identifizierung und Bewertung von Gesundheits- und Umweltrisiken von technischen nanoskaligen Partikeln entwickelt. Das IKTS, welches langjährige Erfahrungen im Umgang mit Nanopulvern besitzt, ist im Rahmen des Verbundes für Auswahl und Modifizierung der Nanopartikel, die Untersuchung ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften und ihres Verhaltens unter physiologischen Bedingungen zuständig. Schwerpunkt der Untersuchungen bilden das Agglomerations- und Deagglomerationsverhalten sowie die Veränderungen der Partikel und der physiologischen Medien als Folge physiko-chemischer Prozesse.

Die Nanoteilchen werden am Klinikum der TU Dresden und am UFZ mit Zellkulturen in Kontakt gebracht. Anhand von *in vitro*-Untersuchungen wird geprüft, ob die Partikel in Zellen von Haut, Lunge, Darm oder Nervensystem gelangen und dort akute oder langfristige Schädigungen der Zellen verursachen. Ebenfalls wird ein möglicher Einfluss auf aquatische Organismen am Beispiel von Fischzellen bewertet. Die zu entwickelten Analysemethoden sollen eine Bestimmung des Gefährdungspotentials von Partikeln bei weitgehendem Verzicht auf Tierversuche und ein schnelles Screening ermöglichen.

Am Max-Bergmann-Zentrum der TU Dresden wird mittels verschiedener elektronenmikroskopischer Methoden eine mögliche zelluläre Aufnahme und Verteilung der Partikel in den Zellen untersucht.

Die Firma Namos aus Dresden arbeitet an Syntheseverfahren zur Herstellung verschiedener Nanopartikel wie z.B. Platin, die ebenfalls im Rahmen des Projektes toxikologisch untersucht werden.

Der Vortrag berichtet über den aktuellen Stand des 2006 gestarteten Projekts. Im Fokus stehen dabei die Ergebnisse zum Verhalten und der Wirkung von Wolframcarbidgepartikeln mit und ohne Kobaltdotierung auf die untersuchten Zellsysteme.

Wolfgang Köck, Leipzig

Chemikalienrechtliche Stoffprüfung und Risiko von Nanopartikeln

Die Produktion, Inverkehrgabe, Nutzung und ggf. Freisetzung von Nanopartikeln unterliegen keiner spezifisch auf diese Stoffe zugeschnittenen öffentlichrechtlichen Risikokontrolle. Das Fehlen *spezifischer* Kontrollregime ist aber nicht gleichbedeutend mit dem Fehlen öffentlichrechtlicher Kontrolle im Ganzen. Allgemeine Risikokontrollsysteme, wie etwa das Kontrollsystem zur Zulassung von Industrieanlagen oder das Kontrollsystem zur Registrierung von Industriechemikalien erfassen auch Nanopartikel, weil Nanopartikel, die aus Anlagen freigesetzt werden, Luftverunreinigungen im Sinne des Immissionsschutzrechts sind (§ 3 BImSchG), und Nanopartikel, die zur Inverkehrgabe bestimmt sind, Stoffe im Sinne des Chemikalienrechts sind (Art. 3 Nr. 1 REACH-VO).

Der allgemeine Regelungsansatz der europäischen Chemikalienkontrolle erfasst daher zwar grundsätzlich auch die nano-skaligen Stoffe, passt jedoch gleichwohl nicht recht auf die Besonderheit dieser Stoffe. Dies liegt zum einen daran, dass das Kontrollregime einer „Mengenphilosophie“ verpflichtet ist und präventive Produzenten- bzw. Importeurspflichten, insbesondere die für die Generierung von Risikowissen wichtigen Stoffprüfungspflichten, von der Überschreitung bestimmter Gewichts-/Mengenschwellen (ab 1 Jahrestonne) abhängig macht, die möglicherweise auf die üblichen Mengen in der Nanotechnologie nicht zugeschnitten sind. Wichtiger noch für die Einschätzung der mangelnden Passfähigkeit ist ein zweiter Grund: Die Nanoforschung hat klar herausgearbeitet, dass nano-skalige Formate besondere Eigenschaften hervorbringen, die derselbe Stoff in einem größeren Format nicht aufweist. Dieses Wissen könnte die Annahme stützen, dass die chemikalienrechtliche Stoffprüfung mit Blick auf nano-skalige Stoffe ihre Zwecke nicht angemessen erfüllen kann. Die chemikalienrechtliche Stoffprüfung dient dazu, Informationen darüber zu generieren, ob von einem Stoff Risiken für Mensch und Umwelt ausgehen können. Ist die Stoffprüfung nicht in der Lage, die Besonderheiten nanoskaliger Formate anzuzeigen, läuft diese Prüfung ins Leere.

Jenseits der „Mengenphilosophie“ und der üblichen Stoffprüfung hat die europäische Chemikalienkontrolle mittlerweile auch eine Sensibilität für besonders besorgniserregende Stoffe entwickelt, die künftig einem Zulassungsverfahren unterworfen werden. Zu den besonders besorgniserregenden Stoffen gehören CMR-Stoffe, PBT-Stoffe, vBvP-Stoffe und sonstige vergleichbare „Risiko“-Stoffe. Nano-skalige Stoffe können allerdings nicht per se zu der Aufgangskategorie der sonstigen vergleichbaren „Risiko“-Stoffe“ gezählt werden, so dass auch dieser Zweig der Chemikalienkontrolle de lege lata noch keine besonderen Früchte für die Nano-Kontrolle abwerfen wird.

Prof. Dr. Wolfgang Köck
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ
Department Umwelt- und Planungsrecht
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig
Email: wolfgang.koeck@ufz.de

Nanotechnologien– Aktivitäten in der EU und im internationalen Rahmen

Dr. Achim Boenke¹

Europäische Kommission (EK), GD Industrie und Unternehmen, Abteilung G2 Chemikalien – Umwelt & Ökonomie Team, B-1049 Brüssel, e-mail: achim.boenke@ec.europa.eu

Die Nanotechnologie besitzt ein wichtiges Potential für die Verbesserung der Lebensqualität und der Wettbewerbsfähigkeit. Ihre Entwicklung und Anwendung soll nicht verzögert oder dem Zufall überlassen werden. Dem „integrierten, sicheren und verantwortlichen Ansatz“ vorgeschlagen von der EK in 2004² ist zugestimmt worden. Er ist der Kern der EU-Nanotechnologiepolitik. Der Aktionsplan² bietet die treibende Kraft für deren Entwicklung, und Fortschritte³ wurden in beinahe jedem Bereich erreicht. Das übergreifende Ziel der Kommissionsarbeit⁴ in den Bereichen Gesundheit, Sicherheit und Umwelt ist es, die sichere Entwicklung und Verwendung der Nanotechnologie zu ermöglichen sowie sicherzustellen, dass der Öffentlichkeit von ihr Vorteile erwachsen sie aber gleichzeitig vor unerwünschten Effekten geschützt ist. Unterschiedliche Ansätze, sowohl regulatorischer als auch nicht-regulatorischer Art, werden hierbei verfolgt: (a) Prüfen ob die jetzigen rechtlichen Rahmenregelungen ausreichend Sicherheit erlauben^{3,4}; (b) Verbesserung der Wissensbasis; (c) Einbeziehung der Öffentlichkeit durch Dialoge mit beteiligten Gruppen, freiwilligen Initiativen, etc.^{3,4}. Bezüglich (a) tragen die geltenden Rechtsvorschriften im großen Umfang vornehmlichen Bedenken über gesundheitliche und umweltrelevante Auswirkungen Rechnung. Auf der Basis der wissenschaftlichen Entwicklungen oder der Regulierungsanforderungen in spezifischen Bereichen könnten gesetzgeberische Änderungen vorgeschlagen werden. Nichtsdestotrotz bleibt das vorrangige Mittel zum Schutz der Gesundheit, zur Gewährleistung der Sicherheit und zum Schutz der Umwelt die zugeschnittene Durchführung der geltenden Vorschriften. Nationale Behörden und die Kommission müssen sich daher als erstes vergewissern, ob es notwendig ist, geltenden Bestimmungen, wie z.B., Normen und technische Leitlinien, besonders im Hinblick auf die Risikobewertung auf einen neuen Stand zu bringen. Besonderes Augenmerk ist auch auf die verschiedenen Mechanismen zu richten, die den für die Durchführung der Rechtsvorschriften zuständigen Behörden und Aufsichtsorganen ein Eingreifen ermöglichen mit Maßnahmen wie Schutzklauseln und Warnsystemen für den Fall, dass bei bereits auf dem Markt befindlichen Erzeugnissen Risiken erkennbar werden. Bezüglich (b) sind Wissenslücken in den folgenden Bereichen bestätigt worden: Nanopartikelcharakterisierung, Detektion und Messungen sowie allen Aspekten bezüglich der Öko- und allgemeinen Toxikologie. Diese werden zurzeit auf nationaler, Europäischer (hier auch im Rahmen von CEN⁴ und verschiedenen ETPs⁴) und internationaler Ebene (hier: OECD⁴ und ISO⁴) bearbeitet, um eine zugeschnittene Risikobewertung zu erlauben. In den kommenden Jahren sollen die Aktivitäten konsolidiert, interdisziplinäre Infrastrukturen entwickelt, die Konditionen für eine sichere und effektive Nutzung der Nanotechnologie geschaffen, und ein besseres Verständnis der Verantwortlichkeiten der Forscher innerhalb eines ethischen Rahmens erreicht werden. Letzteres ist kürzlich durch die Veröffentlichung der Empfehlung der Kommission für einen Verhaltenskodex⁵ für verantwortungsvolle Forschung im Bereich der Nanowissenschaften und –technologien unterstrichen worden.

¹ Die ausgeführten Ansichten in dieser Publikation sind persönlich and reflektieren nicht notwendigerweise diese der Europäischen Kommission.

² *Towards a European Strategy for Nanotechnology*, COM(2004)338; *Nanosciences and nanotechnologies: An action plan for Europe 2005-2009*, COM(2005)243.

³ COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL, THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE - Nanosciences and Nanotechnologies: An action plan for Europe 2005-2009. First Implementation Report 2005-2007, COM(2007)505.

⁴ Siehe folgende Web-Seite: http://ec.europa.eu/nanotechnology/index_en.html sowie deren ‚hyperlinks‘ (für OECD siehe http://www.oecd.org/departement/0,2688,en_2649_34365_1_1_1_1_1,00.html; für CEN siehe <http://www.cen.eu/CENORM/BusinessDomains/TechnicalCommitteesWorkshops/CENTechnicalCommittees/CENTechnicalCommittees.asp?param=508478&title=CEN%2FTFC+352%20>; für ISO siehe http://www.iso.org/iso/standards_development/technical_committees/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=381983 & verschiedene ‚European Technology Platforms (ETPs)‘ siehe: http://ec.europa.eu/nanotechnology/links_en.html und <ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/final-version.pdf> wo eine Übersicht über die jetzigen, relevanten sowie laufenden Europäischen als auch nationalen Projekte zu finden ist).

⁵ COMMISSION RECOMMENDATION of 07/02/2008 on a code of conduct for responsible nanosciences and nanotechnologies research, C(2008) 424 final.

Kalibrierung von Nanopartikelzählern für Aerosole – aktueller Stand und Anwendungen

Juergen Spielvogel

Grimm Aerosol Technik GmbH & Co. KG, D – 83404 Ainring, Germany

Thema dieses Vortrages ist der gegenwärtige Stand der PMP-Initiative zur Standardisierung der Messvorschriften für Abgasmessungen zur EURO V im Automobilbereich.

Im Automobilbereich hat damit ein Übergang vom Wiegen von Partikeln zum Zählen stattgefunden. Der Autor erwartet, dass damit Zeichen gesetzt werden für weitere Fragestellungen, z.B. Aerosolmessungen in der Umwelt oder am Arbeitsplatz.

Die Messmethoden werden kurz vorgestellt; damit verbundene Problematiken der Kalibrierung der Messsysteme werden im Detail behandelt.

Von einer kürzlich durchgeführten Messinitiative bei JRC (Joint Research Centre) Ispra, bei der sechs verschiedene Generatoren vermessen wurden, werden Daten gezeigt und diskutiert.

Ende

Testung von nanoskaligen Materialien mit dem Vektorenmodell

Prof Dr. Martin Wiemann; Prof. Dr. Joachim Bruch

IBE gGmbH, Elbestr. 10 45768 Marl

Die IBE hat mit dem Standardverfahren der in vitro Testung an primären Alveolarmakrophagen (Vektormodell) die überwiegende Anzahl (15) der Proben des NanoCare-Projekts geprüft. Die Materialien wurden zuvor nach NanoCare Kriterien charakterisiert. Dem Zellkulturmedium wurde kein fetales Kälberserum, wohl aber Dipalmytoylphosphatidylcholin (PC) zugesetzt, um die Verhältnisse der inneren Lungenoberfläche nachzustellen. Die Konzentration des PC wurde dabei auf 0,025 mg/ml begrenzt, um die Diskriminierungsfähigkeit des Makrophagen-Modells zu erhalten. Die Größenverteilung der Partikeln wurde unter den gewählten Bedingungen mittels dynamischer Lichtstreuung und Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestimmt. Alle Proben wurden im Konzentrationsbereich von 15 bis 120 $\mu\text{g}/10^6$ AM eingesetzt. Für den oberen Dosisbereich zeigte sich eine relative hohe biologische Aktivität der meisten getesteten Proben, während im unteren Bereich keine oder eine schwache Aktivität nachweisbar war. Dotierungen mit Na, Al oder Mg hatten geringe Auswirkungen, so dass wir insbesondere der Oberfläche der Materialien eine große Bedeutung beimessen. Mittels time lapse video Mikroskopie wurde die Aufnahme der sedimentierten Partikelfraktion durch AM über 24 h dargestellt. Weitere Untersuchungen zielen auf die Erfassung biologischer Effekte der nanoskaligen, unter Zellkulturbedingungen innerhalb von 24 h nicht-sedimentierenden Fraktion der Proben. REM-Aufnahmen zeigen, dass die Anreicherung von nanoskaligen Partikeln (50–150 nm) auf zellkulturkompatiblen Trägermaterialien gelingt. Für weiterführende Test wird derzeit eine standardisierte Exposition entwickelt, so dass das eine modifizierte Form des Vektormodells für die Testung nicht sedimentierender Partikel eingesetzt werden kann.

Zell- und gewebebasierte in vitro Testsysteme zur Untersuchung der Wechselwirkungen von (Nano)partikeln mit den biologischen Barrieren der Lunge

Claus-Michael Lehr, Christine Schulze, Andreas Henning, Marc Schneider, Ulrich Schäfer, Michael Bur

Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlandes, 66123 Saarbrücken

Email: lehr@mx.uni-saarland.de

Thema: Aufnahme, Verteilung und Wirkung von Nanomaterialien (in vivo/in vitro)

Abstract:

Zell- und gewebebasierte in vitro Testsysteme sind zur Abschätzung der Sicherheit bzw. Wirksamkeit von Nanopartikeln von großem Interesse, sowohl bei Verwendung als neuartige Werkstoffe aber auch als Arzneimittel (Drug Delivery Systeme). Allerdings weist die sog. Luft-Blut-Schranke des Respirationstraktes einige Besonderheiten auf. Im Gegensatz zu den beiden anderen großen Kontaktflächen des Menschen mit seiner Umwelt - Darm und Haut - ist die Lunge mit funktionalisierten Flüssigkeitsschichten - Surfactant und Mucus - ausgestattet. Interaktionen zwischen diesen pulmonalen Flüssigkeiten und Partikeln sind deshalb von wesentlicher Bedeutung.

So konnte gezeigt werden, dass verschiedene Arten von Nanopartikeln in physiologischen Medien zunächst agglomerieren, jedoch durch die Zugabe von Serum Albumin wieder desagglomeriert werden können (Schulze et al, Nanotoxicology, in press). Neben der Zusammensetzung hat auch das Volumen der apikalen Flüssigkeit enormen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen (Nano)partikeln und den pulmonalen Epithelien. In vivo werden die alveolaren Bereiche der Lunge lediglich von wenigen Nanometern Flüssigkeit bedeckt. Die geringen Flüssigkeitsmengen führen zu steilen Konzentrationsgradienten, die sich auf die Invasion von Substanz direkt auswirken kann. So konnte eine direkte Korrelation zwischen den Flüssigkeitsmengen in den apikalen Kompartimenten von Zellkulturen und der Absorptionsgeschwindigkeit partikulär applizierter Arzneistoffe gezeigt werden (Bur et al., submitted).

Neben der Absorption über das Epithel ergeben sich zusätzliche Besonderheiten durch die speziellen Clearancemechanismen der Lunge: Die mucoziliäre Clearance in den bronchialen Bereichen der Lunge, simuliert durch embryonale Hühner-Trachea, transportiert – unabhängig von Durchmesser, im Bereich zwischen 55nm und 6µm – alle Partikel aus dem gleichen Material mit der gleichen Geschwindigkeit von ~3mm/min ab (Henning et al, AAPS PharmSciTec, in press). Alveolare Makrophagen hingegen nehmen Polystyren Partikel mit einem Durchmesser von mehr als 10µm kaum auf, während Nanopartikel unter Versuchsbedingungen, welche eine aktive Phagozytose ausschließen, auch im Innern von Makrophagen nachgewiesen werden konnten.

Diese Besonderheiten der Luft-Blutshranke des Respirationstraktes müssen bei der Etablierung von gewebe- und zellbasierten in vitro Testsystemen berücksichtigt werden, um eine adäquate Beurteilung eventueller Risiken bzw. des therapeutischen Potentials von Nanopartikeln in der Lunge zu ermöglichen.

Characterisation of Nanoparticle Size and State Prior to Nanotoxicological Studies

Patrick Hole, Andrew Malloy, Jonathan Smith, Iker Montes-Burgos*, Iseult Lynch*, Kenneth Dawson* and Bob Carr

NanoSight Limited, 2 Centre One, Lysander Way, Salisbury, SP4 6BU, UK

(*) School of Chemistry & Chemical Biology, University College Dublin, Dublin 4, Ireland

Abstract

Before commencing any nanotoxicological study, it is imperative to know the state of the nanoparticles that are to be used in the study. It is often the case that particles satisfying standards can be commercially purchased. However, these can be in a form incompatible with the intended study. Examples of this would be where the nanoparticles will be required to be dispersed in a solvent (if in powder form), have their solvent modified (for example changing to a physiological solution), a change in container material or a change in temperature or concentration. Any of these changes can lead to dissolution, aggregation or plating out which can have a significant effect on the interpretation of any results obtained thereafter.

NanoSight's nanoparticle characterisation instruments size nanoparticles based on their Brownian motion in suspension. Unlike other light scattering techniques, the NanoSight technology uniquely allows nanoparticles to be sized in suspension on a *particle-by-particle* basis allowing higher resolution than ensemble methods.

Results will be presented from both silica and gold nanoparticles that will emphasise the importance of characterisation prior to exposure to cells. Results will also be presented demonstrating recent developments that demonstrate the ability, in principle, of the technique to be used as a measurement of the zeta potential of particles, again on a particle-by-particle basis. Results presented will include the latest results both from NanoSight's research and development department and from selected nanotoxicological researchers using the NanoSight system.

Einfluss der Oberflächeneigenschaften von Kohlenstoffnanotubes auf ihr Verhalten in der Umwelt

A. Schierz, H. Zänker und G. Bernhard

Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, Bautzner Landstraße 128, 01328
Dresden, Tel.: 0341 260 3209 , e-mail: a.schierz@fzd.de

Kohlenstoffnanotubes (CNTs) weisen einzigartige mechanische, elektronische und chemische Eigenschaften auf. Mit dem zunehmendem Einsatz dieser Materialien in Industrie- und Konsumgütern kann, realistisch betrachtet, ein unbeabsichtigter Eintrag in die Umwelt nicht ausgeschlossen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist nur wenig über das Verhalten und den Lebenszyklus von CNTs in der Umwelt bekannt.

Im Rahmen der Arbeit wird der Zusammenhang zwischen Oberflächeneigenschaften, Suspensionsstabilität und Sorptionseigenschaften von CNTs diskutiert, um Vorhersagen über das Verhalten dieser Materialien in der Umwelt zu treffen. Für die folgenden Untersuchungen wurden zwei Materialien, unbehandelte und durch eine oxidative Säurewäsche ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$) modifizierte Multiwall CNTs, eingesetzt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Oberflächenoxidation die Eigenschaften von CNTs in wässrigen Systemen maßgeblich beeinflusst. Der Ladungsnulldpunkt (PZC) der modifizierten CNTs wird gegenüber dem der unbehandelten (PZC ~ 8) in den sauren pH-Wert-Bereich verschoben. Im Bezug auf die kolloidchemischen Eigenschaften erweisen sich die modifizierten CNTs über einen weiten Bereich ($c_{\text{CNT}} \leq 10 \text{ mg/l}$, $\text{pH} = 6 - 11$, $c_{\text{Ca}^{2+}} \leq 1 \text{ mM}$ oder $c_{\text{Na}^+} \leq 10 \text{ mM}$, $t_{\text{Sed}} > 31 \text{ d}$) als stabil, während die unbehandelten unter vergleichbaren Bedingungen innerhalb von 24 h agglomerieren und sedimentieren. Die Abhängigkeit des Sedimentationsverhaltens der modifizierten CNTs von der Ionenstärke deutet auf eine elektrostatische Stabilisierung hin. Erwartungsgemäß sind die modifizierten Materialien effektivere Sorbenzien für den Modellschadstoff Uran(VI): Erhöhung der Adsorptionskapazität um ca. 1 Größenordnung. Als Sorptionsmechanismus für das Uran wird die Bildung von Oberflächenkomplexen über Carboxylgruppen angenommen. Diese wurden mittels IR-spektroskopischer Untersuchungen als die vorliegenden Oberflächengruppen der modifizierten CNTs identifiziert. Der Bindungsmechanismus soll mit Hilfe von spektroskopischen Methoden (ATR-IR sowie TRLFS) aufgeklärt werden.

Die Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass CNTs in aquatischen Systemen sowohl mobil sind als auch potenzielle Träger für Schwermetalle darstellen. Dieser Aspekt soll deshalb in Säulenversuchen unter Einsatz von nativen Sedimentmaterialien untersucht werden.

Transfer pulverförmiger Nanopartikel in die Gasphase und Charakterisierung der Größenverteilung mittels Mobilitätsanalysator

K. Wittmaack und J. Spielvogel

Grimm Aerosol Technik GmbH, 83404 Ainring

Laborstudien zur inflammatorischen oder toxischen Wirkung von Nanopartikeln (NPn) wurden bisher vornehmlich mit Materialien gemacht, die als Suspension in biologisch relevanten Flüssigkeiten appliziert wurden. Die Ergebnisse derartiger Untersuchungen sind nur bedingt geeignet, die Wirkung abzuschätzen, die von NPn hervorgerufen wird, wenn diese nach Inhalation in der Lunge abgeschieden werden. Zur Durchführung einschlägiger Experimente benötigt man mit NPn geeigneter Konzentration angereicherte Luft. Der Transfer von NPn aus pulverförmigen Proben in die Luft wurde bisher jedoch noch nicht im Detail untersucht. Die zu erwartenden Schwierigkeiten bestehen darin, dass industriell hergestellte NP häufig zur Agglomeration neigen, und zwar sowohl in Pulverform als auch in der Gasphase.

In diesem Beitrag wird über erfolgreiche Versuche zum Transfer von Eisenoxid-NP in die Luft berichtet. Die nominelle Größe der in Pulverform gelieferten NP-Materialien lag zwischen 20 und 70 nm. Die wichtigsten Komponenten der experimentellen Anordnung sind der sogenannte Disperser, die Expansionskammer und der Partikelanalysator. Im Disperser wird die NP-Probe durch pulsartigen Einlass einer kleinen Menge komprimierten Stickstoffs intensiv aufgewirbelt. Die suspendierten Partikel werden in die Expansionskammer überführt und von dort mit dem Strom gereinigter Laborluft in den differentiellen Mobilitätsanalysator geleitet. Der Lufttransport (0.3 L/min) wird durch eine Pumpe bewirkt, die Bestandteil des nachfolgenden Kondensations-Partikelzählers ist.

In ersten Experimenten konnten Partikelkonzentrationen bis zu $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-3}$ erreicht werden. Das entspricht dem Zwanzig- bis Hundertfachen der Aerosol-Konzentration in der Luft verkehrsnaher Zonen. Die beobachteten Größenverteilungen sind jedoch gegenüber den nominalen Durchmessern zu höheren Werten verschoben. Die bisherigen Untersuchungen stützen die Vermutung, dass das Ausmaß der Verschiebung mit der relativen Luftfeuchtigkeit korreliert ist. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Primärpartikel z.T. zu Aggregaten zusammengelagert sind. Luftgetragene NP wurden auch bereits erfolgreich auf klebrigen Substraten abgeschieden und mittels Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert.

Gefördert im Rahmen des DIPNA-Projekts der EU (Contract # STRP 032131)

Untersuchungen zur Wirkung von Wolframcarbide- und Wolframcarbide-Kobalt- Nanopartikeln auf humane und Fischzellen *in vitro*

Wibke Busch¹, Dana Kühnel¹, Armin Springer², Stefan Scholz¹, Michael Gelinsky²,
Kristin Schirmer³

¹ Department Zelltoxikologie, Helmholtz - Zentrum für Umweltforschung - UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Deutschland

² Max Bergmann Zentrum für Biomaterialien, TU Dresden, Budapester Strasse 27, 01069 Dresden, Deutschland

³ Eawag, Department Umwelttoxikologie, Überlandstrasse 133, 8600 Dübendorf, Schweiz

E-Mail Kontakt: wibke.busch@ufz.de

Nanopartikel sind aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften für Industrie und Wissenschaft von wachsendem Interesse. Aufgrund dieser speziellen Eigenschaften ergeben sich aber auch Fragen zum Gefährdungspotential von technischen Nanopartikeln. Dazu ist immer noch sehr wenig bekannt. Um die Wirkung von technischen Nanopartikeln auf Mensch und Umwelt zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien von Mensch und Fisch als *in vitro* Modelle verwendet. Es wurde die Wirkung von Wolframcarbide (WC) - und Wolframcarbide-Kobalt (WC-Co) – Nanopartikeln untersucht. Diese finden im großen Maßstab Anwendung in der Hardmetall-Industrie. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit den Partikeln über verschiedene Zeiträume inkubiert, anschließend erfolgten Untersuchungen zur Veränderung der Zellvitalität sowie zur Lokalisation der Partikel in die Zellen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten die Aufnahme beider Partikeltypen (WC und WC-Co) in alle untersuchten Zellen. Aggregate und einzelne Partikel konnten im Zellplasma, aber nicht im Zellkern nachgewiesen werden. Der Einfluss der Nanopartikel auf die Zellvitalität wurde mit Hilfe von Indikator-Fluoreszenzfarbstoffen für die metabolische Aktivität sowie die Membranintegrität untersucht. Es zeigte sich eine leicht erhöhte toxische Wirkung für die WC-Co Partikel im Vergleich zum WC nach 3 Tagen Exposition. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Reaktion nicht allein auf das Vorhandensein von Kobalt zurückzuführen ist. In weiteren Untersuchungen sollen die Wirkungsweise und die Mechanismen zur Aufnahme der Partikel in die Zellen mit Hilfe von Gen- und Proteinexpressionsstudien analysiert werden.

POSTERABSTRACT NANOTOX 2008 (2. - 3.4.2008 in Leipzig)

Thema 2: Toxikologische Analysen technischer Nanopartikel, geeignete Testmethoden

***In vitro* Untersuchungen zu toxikologischen Aspekten synthetischer Nanopartikel**

Dominik Geiger^{1,*}, Jana Schubert¹, Katja Nau¹, Harald F. Krug^{1,2}

¹ Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Institut für Toxikologie und Genetik, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen

² EMPA, Abteilung Materials-Biology Interactions, CH-9014 St. Gallen

* Email: Dominik.Geiger@itg.fzk.de

Das Projekt „NanoCare“ befasst sich mit gesundheitlichen Aspekten synthetischer Nanopartikel. Im Arbeitspaket „Zelltypen und zelluläre Reaktionen *in vitro*“ werden die toxikologischen Auswirkungen von synthetischen Nanopartikeln auf Säugerzelllinien untersucht. Im Zentrum der Analysen stehen hierbei Lungenzellen.

Als Standardzelllinie wurde die humane Lungenepithelzelllinie A549 ausgewählt. Zur Bestimmung der biologischen Messpunkte Vitalität, Entzündung und oxidativer Stress wurden verschiedene Messmethoden (WST-1-Test, LDH-Test, IL-8-ELISA, H₂DCF-Test, Immunoblot oxidativer Stressproteine) etabliert und gegebenenfalls modifiziert, um die zellulären Reaktionen nach Exposition mit Nanopartikeln zu untersuchen. Dabei kamen folgende Nanomaterialien des Projekts zum Einsatz, die seitens der Hersteller auf ihre physikochemischen Eigenschaften charakterisiert wurden: die Referenzmaterialien TiO₂-P25 und Carbon Black (CB14), sowie AIOOH, CeO₂ und ZrO₂.

Die Exposition von A549-Zellen mit CB14 und DQ12 resultierte in einem dosisabhängigen Verlust der Vitalität, TiO₂-P25 führte erst in einer Konzentration von 100 µg/cm² zu einem Vitalitätsverlust, AIOOH, CeO₂ und ZrO₂ zeigten keine Effekte.

Im H₂DCF-Test zur Analyse intrazellulärer Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) induzierten CB14 und TiO₂-P25 oxidativen Stress in A549-Zellen (CB14>>TiO₂-P25), AIOOH, CeO₂ und ZrO₂ führten nicht zur Bildung intrazellulärer Radikale und ROS.

Zur Untersuchung der Expression oxidativer Stressproteine (Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Hämoxygenase-1 (HO-1)) mittels Immunoblot wurde die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 verwendet. Die Exposition der Zellen mit TiO₂-P25, CB14, CeO₂ und ZrO₂ resultierte in einer erhöhten COX-2-Expression, AIOOH induzierte keine COX-2-Expression. Eine erhöhte HO-1-Expression wurde nach Inkubation der Zellen mit TiO₂-P25 und CB14 nachgewiesen, AIOOH, CeO₂ und ZrO₂ führten nicht zu einer erhöhten Synthese von HO-1.

Alle untersuchten Nanomaterialien außer ZrO₂ führten nach submerser Exposition von A549-Zellen zu einer erhöhten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-8, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (CB14>TiO₂-P25>CeO₂>AIOOH).

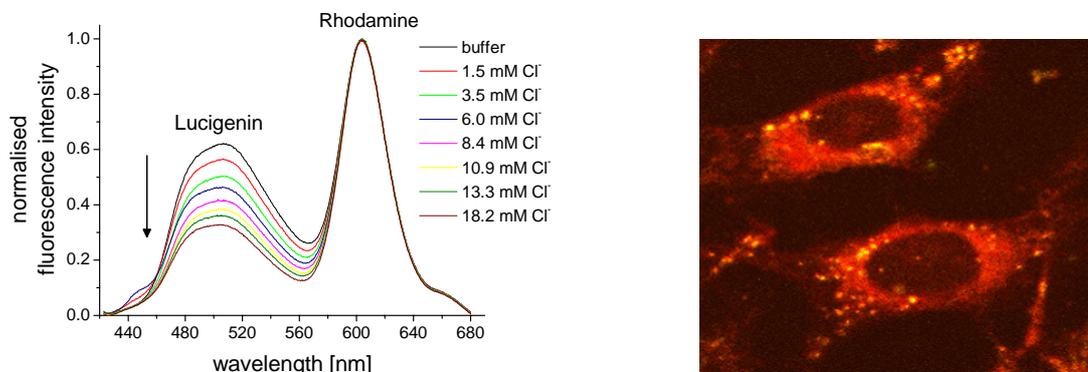
Die beschriebenen zellulären Effekte nach submerser Exposition mit synthetischen Nanomaterialien sind dosis- und zeitabhängig. Während ein Vitalitätsverlust von A549-Zellen erst bei sehr hohen Partikelkonzentrationen eintritt, sind die Bildung intrazellulärer Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies und eine erhöhte Ausschüttung von IL-8 schon bei niedrigen Partikelkonzentrationen des untersuchten Dosisbereichs zu beobachten. Auch die Synthese der oxidativen Stressproteine HO-1 und COX-2 in RAW 264.7-Zellen wird bereits bei niedrigen Partikelkonzentrationen induziert.

Fluorescent sensor nanoparticles for intracellular chloride determination

Gräfe, A., Mohr, G. J.

Institute of Physical Chemistry, Friedrich-Schiller University Jena, Lessing St. 10,
D-07743 Jena, Germany, E-mail: anja.graefe@uni-jena.de

New sensor nanoparticles were prepared, containing both a chloride sensitive dye (lucigenin) and a reference dye (sulforhodamine derivative) for ratiometric measurement of chloride concentrations in living cells. The fluorescence intensity of lucigenin ($\lambda_{em} = 505$ nm) reversibly decreases in the presence of chloride ions due to a collisional quenching process, which can be described by the Stern-Volmer equation. However, the fluorescence intensity of the rhodamine reference dye ($\lambda_{em} = 605$ nm) is not affected by chloride. Both dyes were incorporated in polyacrylamide nanoparticles via inverse microemulsion polymerisation.



Immobilisation of the fluorescence dyes inside the polymer matrix protects the dyes from interaction with intracellular proteins and other cell components. However, the interaction of lucigenin with chloride inside the nanoparticles remains possible. Furthermore, the cells are protected from the mostly toxic organic fluorophores.

The response of the fluorescent particles to different concentrations of chloride was first investigated in buffered suspensions using fluorescence spectrometry. Afterwards, the response of the nanosensors inside living chinese hamster ovary cells was monitored via confocal laser scanning microscopy.

Autoren: Stephan Hackmann, Oliver Wetjen, Wolfgang Heyser
Institution: Universität Bremen, FB 2 (Biologie), UFT, Abteilung Physiologische Pflanzenanatomie
Email: st_ha2@uni-bremen.de, owetjen@uni-bremen.de, heyser@uft.uni-bremen.de

Thema: Visualisierung der Wirkungsweise der Nanopartikeln Chitosan und Silber auf zwei Bakterienarten mithilfe des TEM

Nanopartikel kommen in unserer Umwelt sowohl als natürliche aber auch als synthetisch hergestellte Produkte vor. Sie entstehen z.B. bei Vulkanausbrüchen oder Waldbränden. Als Nebenprodukt entstehen sie bei technischen Verbrennungsprozessen. Für synthetisch produzierte nanoskalige Substanzen finden sich zahlreiche Anwendungsbereiche in Medizin, Kosmetik, Farben und Werkstoffen, als Nahrungsmittelzusätze, Oberflächenimprägnierung u.v.m.

Neben dem praktischen Nutzen für den Menschen sind negative Effekte auf die Umwelt und die daran beteiligten Organismen bislang eher schlecht untersucht. Mit dieser speziellen Problematik beschäftigt sich die Ökotoxikologie. Z.B. besitzt Chitosan eine antimikrobielle Wirkung und findet daher vor allem in der Medizin und der Lebensmittelindustrie Anwendung. Dahingegen ist seine Wirkungsweise auf verschiedene Organismen, sowie seine Persistenz in der Umwelt noch nicht ausreichend abgeschätzt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Visualisierung der Aufnahmewege und des intrazellulären Schicksals von Chitosan und seinem synthetischen Podon, dem Silbernanopartikel mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

1. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung von Chitosan auf *Escherichia coli* unter verschiedenen Einwirkzeiten.
2. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung von Silbernanopartikeln auf *Arthrobacter globiformis*.

Des Weiteren wird ein Ausblick auf die momentan vorhandenen elektronenmikroskopischen Möglichkeiten zur Visualisierung von Nanopartikeln anhand aktueller Literatur gegeben.

Autoren: Stephan Hackmann, Oliver Wetjen, Juliane Filser
Institution: Universität Bremen, FB 2 (Biologie), UFT, Abteilung Physiologische Pflanzenanatomie
Email: st_ha2@uni-bremen.de, owetjen@uni-bremen.de, heyser@uft.uni-bremen.de

Thema: Nanopartikel und ihre ökotoxikologische Bedeutung im Vergleich

Antimikrobielle Beschichtungen oder Bestandteile sind weit verbreitet, z.B. in Wundverbänden, auf medizinischen Instrumenten und Oberflächen, in Farben, Kosmetika, Kleidung und Schuhen oder auch in Saatgut. Zunehmend kommen dabei Produkte sowohl aus der Biotechnologie als auch der Nanotechnologie zum Einsatz, häufig mit dem Argument der Umweltentlastung (Ähnlichkeit mit Naturstoffen oder geringerer Rohstoffverbrauch). Für beide Technologien gilt, dass der Stand der Risikoabschätzung unzureichend ist: für nanoskalige Produkte gibt es bis jetzt noch keine hinreichenden regulatorischen Verfahren, und bei aus Naturstoffen gewonnenen Produkten wird häufig davon ausgegangen, dass sie allein aufgrund ihrer Herkunft keine bedenklichen negativen Effekte in Ökosystemen auslösen können. Zudem sind auch in der Sanierung von z.B. kontaminierten Böden in vermehrtem Maße Nanopartikel als Wunderheiler im Gespräch.

Diese Arbeit stellt praktische Modelle der Ökotoxikologie dar, mit deren Hilfe die Wirkung von nanopartikulärem Chitosan und Silber, sowie von Eisenoxid ermöglichen werden sollen.

Anhand des Sedimentkontakttests mit *Arthrobacter globiformis* soll neben der cytotoxischen Wirkung auch die Möglichkeit überprüft werden, ob für nicht nanoskalige Substanzen standardisierte Risikobewertungsverfahren auch auf Nanopartikel anwendbar sind.

Maria Iwe, Susanne Bastian
Technische Universität Dresden, Abteilung Neuropädiatrie

Die Wechselwirkung von nanoskaligen Nanopartikeln mit Oligodendrogliazellen

Ziel dieser Studie ist die Charakterisierung gliotoxischer Wirkungen von Nanopartikeln in *in vitro* Systemen. Durch medizinische Anwendungen, Produktionsprozesse oder die Nutzung nanopartikelhaltiger Produkte können Menschen Nanopartikeln ausgesetzt sein. Anhand von *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass ultrafeine Partikel ins Gehirn von Ratten gelangen und sich dort ansammeln. Bisher ist wenig bekannt zu den Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen mit Nanopartikeln.

In dieser Studie wurden nanoskaliges Wolframcarbid (WC) und Wolframcarbid Cobalt (WC-Co) sowie Diamant-Nanopartikel untersucht, die während des Herstellungsprozesses von Werkzeugen auftreten sowie einwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWCNT), die in der Zukunft in der medizinischen Forschung eine Rolle spielen werden.

Als Zellmodell diente die Oligodendrozytenzelllinie OLN 93 der Ratte. Oligodendrozyten sind Gliazellen des Zentralen Nervensystems, die für die Myelinisierung verantwortlich sind. Ihre Zellfortsätze umgeben die Axone der Nervenzellen und isolieren sie gegenüber der Umgebung. Der Einfluss der verschiedenen Nanopartikel auf die Oligodendrozyten wurde in zeit- und konzentrationsabhängigen Experimenten untersucht. Es wurden die Wirkungen der Nanopartikel auf die Zellen anhand relevanter Endpunkte betrachtet: Vitalität, Stressantwort und oxidativer Stress, die Aktivität des mitochondrialen Membranpotentials, das Proliferationsverhalten sowie das Adhäsionsverhalten der Zellen nach Exposition mit Nanopartikeln.

Die untersuchten Oligodendrogliazellen reagierten mit unterschiedlicher Sensitivität auf die Exposition mit den Nanopartikeln, wobei aber durch alle untersuchten Partikel die Vitalität verringert wurde. Dabei hatten WC-Co und SWCNT den höchsten toxischen Effekt.

Zum Vergleich und zum Ausschluss von Wechselwirkung zwischen Partikeln und Testreagenz wurden verschiedene Vitalitätstest eingesetzt. Eine Exposition mit einigen Partikeln (WC, SWCNT) bewirkte ebenfalls eine reduzierte Adhäsion der Zellen und es konnten auch Änderungen im mitochondrialen Membranpotential nachgewiesen werden.

Eine verminderte Vitalität und Proliferation sowie ein verringertes Adhäsionsverhalten der Oligodendrozyten könnte dazu führen, dass sie in ihrer Funktion gestört werden und somit die Signalübertragung zwischen den betroffenen Zellen des Nervensystems unterbrechen.

NanoBioEthics – an interdisciplinary research initiative

Dana Kühnel¹, Wibke Busch¹, Alexandra Kroll², Kristin Schirmer³, Johann Ach⁴

¹ UFZ - Helmholtz-Centre for Environmental Research, Department of Cell Toxicology, Leipzig, Germany

² Department of Medicine B, Gastroenterological Molecular Cell Biology, University of Münster, Germany

³ Eawag, Department of Environmental Toxicology, Dübendorf, Switzerland

⁴ Centre for Bioethics, University of Münster, Germany

The term “nano” does not only have a strong impact on technology and the natural sciences, but also leaves its footprint in disciplines like philosophy and ethics, social sciences and jurisprudence.

Especially nanobiotechnology and nanomedicine represent “borderline disciplines” between technology and biology and many questions arise from the usage of biological components for technical applications or vice versa from the combination of technical devices with the human body.

These developments raise hope for rapid progress in the field of disease prevention and therapy. More futuristic scenarios promise the enhancement of human capabilities such as intelligence or extension of the normal life span. But also concerns about negative impacts arise. Present and future applications of nanobiotechnology entail questions and challenges for diverse disciplines. Is there a need for nano-specific legislation? Does the application of nanotechnology change today's societies?

Trans-disciplinary communication and communication between scientists and other publics are essential to efficiently deal with these problems. The possible chances and risks of nanotechnology, its impact on science, society, ethics, and legislation can only be dealt with in a proper way, when scientists from different disciplines find a common language.

To work on trans-disciplinary communication is the aim of a group of young scientists from disciplines as different as biology, jurisprudence, philosophy and sociology and involved in different aspects of nanotechnology. People from different European countries have joined in the research initiative NanoBioEthics to observe the impact of new technologies on their respective discipline and communicate their findings to each other and to the public through joint publications. NanoBioEthics also focuses on trans-disciplinary communication, its chances and pitfalls. These efforts will result into a self-propagating feedback loop of information within the individual sciences and between the scientists and other publics involved.

We as toxicologists provide data on potential hazardous effects of nanoparticles to contribute to social, legal and philosophical discussions and thereby accompanying responsible innovation in new technologies.

Partikelcharakterisierung als Voraussetzung für die Interpretation von In-vitro-Studien

Tobias Meißner, Annegret Potthoff, Volkmar Richter

Fraunhofer Institut für Keramische Technologien und Systeme, Winterbergstraße 28, 01277 Dresden

Nach ISO/TC 229 stellen Nanomaterialien Strukturen dar, deren Grundeinheiten in der Regel kleiner als 100 nm sind. Um größenbedingte Risiken dieser neuen Materialien frühzeitig zu erkennen, müssen toxikologische Studien an Nanopartikeln durchgeführt werden. Eine für die Interpretation dieser Untersuchungen relevante Bewertung erfordert die umfassende chemisch-physikalische Charakterisierung der eingesetzten Pulver inklusive der Erfassung der chemischen Zusammensetzung, der Partikel- und Agglomeratgröße sowie der spezifischen Oberfläche.

Um Veränderungen der Partikeleigenschaften beim Vorliegen in physiologischen Flüssigkeiten quantifizieren zu können, müssen darüber hinaus das Agglomerationsverhalten der Partikel sowie die Wechselwirkungen mit Proteinen, die einen wesentlichen Bestandteil von Körperflüssigkeiten darstellen, bewertet werden.

Ziel der Arbeiten ist die Entwicklung von Messmethoden zur Charakterisierung von Nanopartikeln zur Evaluierung toxikologischer Studien.

Es wurden zwei Wolframcarbidpulver (WC 100na und WC 10n) untersucht, die sich hinsichtlich Primärpartikelgröße und spezifischer Oberfläche deutlich voneinander unterscheiden. Nach der Ultraschall-Dispergierung der WC-Partikel in wässrigem Medium ist die erreichbare mittlere Partikelgröße jedoch von beiden Pulvern annähernd gleich. Dies zeigt, dass die Primärpartikel des feineren Pulvers WC 10n feste Aggregate bilden, die unter den gegebenen Randbedingungen nicht mehr zerstörbar sind. Die gemessene Partikelgröße des WC 100na entspricht dagegen der über REM-Aufnahmen quantifizierten Primärpartikelgröße.

Im Puffersystem PBS wurden Agglomerationskinetiken für beide WC-Pulver aufgenommen. Die Agglomeration des feineren WC 10n erfolgte dabei deutlich schneller als die des gröberen WC 100na, obwohl die Massenkonzentration identisch war und beide Stoffe fast die gleiche Ausgangsagglomeratgröße besitzen. Da die Oberfläche von Nanomaterialien ein ausschlaggebendes Kriterium für deren Eigenschaften darstellen kann, wurde die spezifische Oberfläche als Berechnungsgröße für das Konzentrationsmaß berücksichtigt. Interessanterweise ergibt sich nunmehr eine identische Kinetik bei gleicher Oberflächenkonzentration von WC 100na und WC 10n. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Angabe einer oberflächenspezifischen Dosierung von Nanopartikeln im Vergleich zu bisher genutzten massespezifischen Angaben für die Interpretation toxikologischer Wirkungen sinnvoll ist. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Agglomeration der WC-Partikel in mit Serum versetzten Nährmedien wirksam verhindert wird. Die Serumproteine stabilisieren die physiologische Suspension.

Poster

Visualisierung der Anlagerung, Aufnahme und Verteilung von technischen Nanopartikeln in und an *in vitro* Zellkulturen mit elektronenmikroskopischen Methoden

Armin Springer, Wolfgang Pompe, Michael Gelinsky

Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien, Institut für Werkstoffwissenschaft, Technische Universität Dresden

e-mail: armin.springer@nano.tu-dresden.de

Ziel des an der TU Dresden angesiedelten Teilprojektes des vom BMBF geförderten Verbundes „I-NOS“ ist es, die Anlagerung, mögliche Aufnahmewege sowie die subzelluläre Verteilung von Nanopartikel in unterschiedlichen Zellen aufzuklären.

Um nanoskalige Partikel an und auch innerhalb von Zellen einwandfrei identifizieren zu können, reicht eine einfache morphologische Charakterisierung und Analyse mittels konventioneller elektronenmikroskopischer Methoden meist nicht aus. Neben der rein morphologischen Untersuchung, die ein gewisses Potential der Missinterpretation birgt, ist somit eine weitere, verlässliche Identifikationsmethode für nanoskalige Partikel notwendig. Eine Methode, die eine eindeutige Identifikation v. a. der Nanopartikel mit metallischem oder keramischem Charakter ermöglicht, ist die Elementanalyse mittels Energie-dispersiver Röntgenstrahlanalyse (EDX). Dieses Verfahren ermöglicht – bei geeigneter Probenpräparation – eine einwandfreie Lokalisation und Analyse von Nanopartikeln bzw. deren Agglomeraten sowohl außerhalb, als auch innerhalb von Zellen. Eine weitergehende Aufklärung der Verteilung der Nanopartikeln und deren Agglomeraten in Kompartimenten und/oder Organellen der untersuchten Zellen sind mit den vorangestellten REM-Methoden jedoch nur in sehr begrenztem Umfang möglich. Daher wurden Ultradünnschnitte von in Kunstharz eingebetteten Proben, wie sie normalerweise bei TEM-Untersuchungen Verwendung finden, im REM im STEM-Modus (*Scanning Transmission Electron Microscope*) analysiert. Durch die bessere Auflösung dieses speziellen Detektortyps ist eine genauere Lokalisation der Nanopartikel innerhalb der Zellen möglich.

Untersuchungen an *in vitro*-Zellkulturen zeigen tatsächlich eine diskontinuierliche Anhäufung von WC- (Wolframcarbide-) und WC/Co-Nanopartikeln bzw. dessen Agglomeraten innerhalb der damit inkubierten Zellen. Diese Nanopartikel/Agglomerate enthaltenen Zellkompartimente scheinen hierbei, zumindest zum Teil, von einer Biomembran umgeben zu sein. Ein Eindringen von WC- und WC/Co-Nanopartikel in den Zellkern konnte bisher noch bei keiner der untersuchten Zelltypen beobachtet werden.

Abstract for Conference: Nanotox Symposium

Contact: kai.kraemer@uniklinikum-dresden.de

Topic: “Aufnahme, Verteilung und Wirkung von Nanomaterialien (*in vivo/in vitro*)“

**Iron Filled Carbon Nanotubes for Medical Applications:
an Assessment of the Biocompatibility *in vitro***

Arthur Taylor¹, Kai Krämer¹, Silke Hampel², Susanne Füssel¹, Rüdiger Klingeler²,
Manfred Ritschel², Bernd Büchner², Manfred Wirth¹

¹ Department of Urology, Medical Faculty, Technical University Dresden, Dresden, Germany

² Institute for Solid State and Materials Research (IFW), Dresden, Germany

Due to their stability and shape, carbon nanotubes (CNTs) can be explored as “nanocontainers” for the delivery of different materials and molecules to biological systems. Recently, the feasibility of filling CNTs with iron has been shown opening the possibility of using these materials as agents for magnetic resonance, hyperthermia and magnetically targeted drug delivery. In this work, we explore the biocompatibility of these structures in comparison to empty nanotubes in order to observe potential toxic effects of this filling.

Empty and iron filled multiwalled CNTs grown by chemical vapor deposition were dispersed by means of ultrasonication in a PBS solution containing albumin in a 1:1 weight ratio in respect to the nanotubes. Fibroblasts and a human prostate cancer cells (PC-3) were incubated for 4h with nanotubes to allow cellular association and uptake. Biocompatibility was evaluated on a dosage (3.2-100µg/ml) and time (24, 48 and 72h) dependent manner by measuring cell viability, cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution.

Both types of nanotubes were found to strongly associate with cells. At high concentrations, empty nanotubes showed a slight decrease in the viability of fibroblasts after 48h only, whereas PC-3 cells were not negatively affected. In contrast to the empty nanotubes, iron filled ones induced a not significant but concentration dependant decrease of viability in both cell lines after 24h. After 48h the viability was recovered and cells remained viable up to 72h, when confluence was reached. Cell proliferation, apoptosis rate and cell cycle distribution were not impaired by the nanotubes.

In summary, the presence of CNTs associated with cells posed no major cytotoxic effects in malignant and non-malignant cell lines. The results obtained encourage the possibility of using multiwalled carbon nanotubes as intracellular carriers. In particular, it shows the potential of using iron filled carbon nanotubes in medicine. Future studies will focus on the magnetic properties and heat generation of filled nanotubes inside of cells.

Quantification of nanoparticle releases from surfaces

Michael Stintz¹, Lars Hillemann¹, Mario Heinemann²

¹ Institute of Process Engineering and Environmental Technology, TU Dresden, D-01062 Dresden, Germany

² Wacker-Chemie AG, Werk Burghausen, Johannes-Hess-Str. 24, D-84480 Burghausen, Germany

Keywords: ultrafine particles, nanoparticles, release, modelling

Modelling fine and ultrafine particles in urban air requires quantification of particle releases from environmental or industrial surfaces under relevant conditions.

In many fields of application ultrafine particles or nanoparticles are employed to improve the properties of surfaces. Easy-to-clean coatings, corrosion protection and fiber reinforcing are some examples. Unfortunately, particles in this size range may be harmful to health if inhaled and deposited in the respiratory tract.

For the resuspension of particles in gas flows, the ratio of the drag force to adhesion force is the determining criterion. Larger particles easily detach from surfaces, but with decreasing particle size the decrease in drag force is larger than the decrease in adhesion force. Furthermore even when using a turbulent airflow, there is a laminar sublayer at the surface, reducing the effective drag force on the particles. Consequently, particles smaller than 10 μm are usually not removed from a surface by air currents. For new nanoparticle-dotted products this has to be proven by the manufacturer.

In the presented project, a test device that quantifies nanoparticle releases from surfaces has been developed. It focuses on the particle reentrainment by drag force into an air flow. Furthermore it can be adapted to assess textile samples like gas filters or clothes with regard to particles released from the filter material.

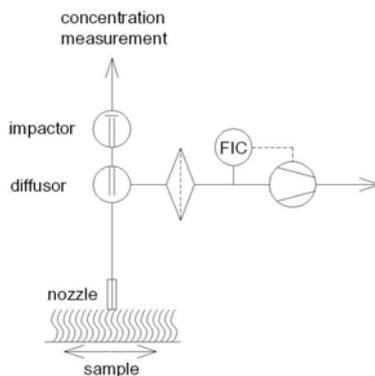


Figure 1. Scheme of the test device, a sample can be moved in two directions under the nozzle

The device consists of a nozzle and a sample carrier which can be moved in two directions. Through the nozzle, a controlled side channel blower draws a flow rate of up to 20 l/min. The nozzle has a

diameter of 5 mm. This narrow bore hole is necessary to attain large shear stresses at low flow rates. Therefore, it becomes possible to avoid unacceptably high dilution ratios. The examined sample can have a maximum area of 100 x 100 mm. It can be moved at a feed rate of 0 – 5 mm/s by a stepping motor. A controller enables the coverage of a selectable number of tracks. Consequently, a well-defined scanning of a surface sample can be achieved.

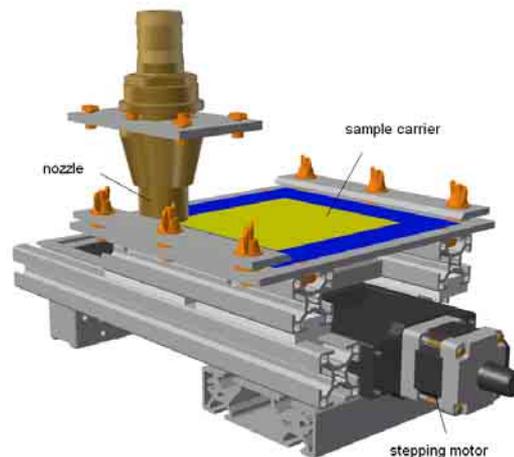


Figure 2. Test device to quantify particle releases from surfaces

The detection of the released particles is done by Condensation Particle Counter and a light scattering technique. Due to the different detection limits of the particle detectors, a distinction between particles in the nanometer and the submicron range at low concentrations is possible.

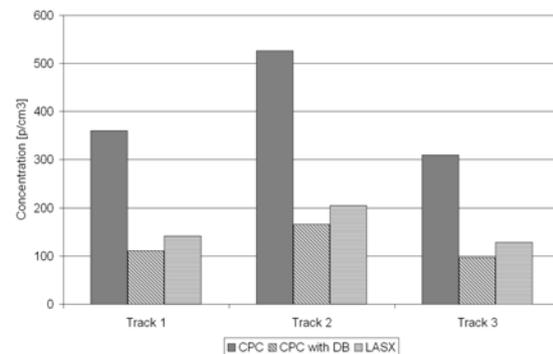


Figure 2. From the differences between the number concentration of both particle counters the release rate of particles < 100 nm can be calculated.