

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Förderkennzeichen 3707 61 301/01
UBA-FB 001357

Quantitative Biokinetik-Analyse radioaktiv markierter inhalierter Titandioxid-Nanopartikel in einem Rattenmodell

Kurzfassung

von

**Wolfgang G. Kreyling
Alexander Wenk
Manuela Semmler-Behnke**

Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für
Gesundheit und Umwelt GmbH, Institut für Lungenbiologie und
Erkrankungen, Netzwerk Nanopartikel und Gesundheit

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

UMWELTBUNDESAMT

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-medien/mysql_medien.php?anfrage=Kennnummer&Suchwort=4022 verfügbar. Hier finden Sie auch den vollständigen Band (auf Englisch).

Die in der Studie geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 14 06
06813 Dessau-Roßlau
Tel.: 0340/2103-0
Telefax: 0340/2103 2285
E-Mail: info@umweltbundesamt.de
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet II 1.2 Toxikologie, Gesundheitsbezogene Umweltbeobachtung
Dr. Heidi Becker

Dessau-Roßlau, September 2010

Ziel dieser Studie war das biokinetische Verhalten von Nanopartikeln (NP) im unteren Nanometerbereich (< 50 nm) zu untersuchen, nachdem sie vorher entweder inhaliert oder per Instillation in die Lunge von gesunden erwachsenen weiblichen Ratten appliziert worden sind. Da es bereits zahlreiche Literatur zur Biokinetik und Toxikologie von industriell hergestellten und weit verbreiteten nanostrukturierten TiO₂ Partikelaggregaten / -agglomeraten im Submikrometerbereich (> 200 nm) gab (Ferin et al. 1992; Bermudez et al., 2002, 2004, Everitt et al. 2004), war unser Schwerpunkt die Untersuchung von TiO₂ NP im unteren Nanometerbereich. Damit unterscheiden sich unsere Studien deutlich von denen in dem BMBF Projekt NanoCare, das zur gleichen Zeit lief, und letztlich bzgl. der TiO₂ Daten lediglich eine gewisse Vertiefung und Erweiterung bereits vorhandener Daten darstellt. In den früheren und den NanoCare Untersuchungen war es das Ziel, vor allem die Retention im Atemtrakt zu bestimmen und die TiO₂ NP Anteile in ausgewählten sekundären Organen und im Gesamtkörper mit einer 1-prozentigen Genauigkeit zu ermitteln. Weil nano- und mikroskaliges TiO₂ im Bereich von 100 000 t hergestellt und verwendet wird, gehen wir von einer erheblichen Exposition der Gesamtbevölkerung, einzelner Personengruppen und insbesondere auch von suszeptiblen Einzelpersonen aus (Lomer et al., 2004), die eine präzisere Bestimmung der biokinetischen Verteilung im Organismus erfordert.

Das von uns entwickelte Verfahren der quantitativen biokinetischen Analyse radioaktiv markierter Nanopartikel erlaubt eine makroskopische Bestimmung der retinierten Fraktion von Nanopartikeln (NP) in allen ausgesuchten Organen und Geweben zum Zeitpunkt der Gewinnung der Organe (Kreyling et al., 2002; Semmler et al., 2004). Diese Fraktionen sind bezogen auf den Gesamtgehalt der NP im gesamten Organismus einschließlich der Ausscheidungen. Diese quantitative dosimetrische Methode schließt eine hocheffektive Radioanalyse der NP Fraktionen über 3-5 Größenordnungen ein, die eine wesentliche Voraussetzung ist, wenn die NP Translokation vom primären Aufnahmeorgan in die Blutzirkulation und die anschließende Akkumulation in sekundären Zielorganen in nur sehr geringem Maße auftritt, wie die bisher veröffentlichten Untersuchungen an Ratten und indirekt am Menschen bestätigen (Kreyling et al., 2002, Semmler-Behnke et al. 2004 + 2007, Wiebert et al., 2006a+b; Möller et al. 2007). Ein weiterer Vorteil ist die direkte Radioanalyse ohne vorherige präparative Schritte die zu artifiziellen Verlusten von Spurenstoffen führen können und die Tatsache, dass keine endogene Hintergrundkonzentration des Radionuklids im Körper der Tiere vorhanden ist. Die toxikokinetische Analyse ergibt sich aus Verteilungsstudien zu verschiedenen Zeitpunkten nach NP Applikation.

Bei der Verwendung von kommerziellen und somit für die Bevölkerung auch relevanteren TiO₂-NP (P25, Degussa) traten erhebliche Probleme auf, die im Zuge dieser Studie nicht befriedigend gelöst werden konnten. Hier waren eine äußerst schlechte Dispergierbarkeit der NP und eine ausgeprägte Löslichkeit des bei der Protonenaktivierung von TiO₂ entstandenen radioaktiven ⁴⁸V zu verzeichnen, so dass diese Studien Ergebnisse zeigten, die nur beschränkt interpretierbar sind und allenfalls Trends aufzeigen. Diese Trends entsprachen aber im Wesentlichen dem, was wir in den Inhalationsstudien beobachtet haben. Hier gibt es bestimmt noch Handlungsbedarf in der Zukunft. Wir haben zumindest eingegrenzt, welche Probleme zunächst gelöst werden müssen, bevor diese Studien erfolgreich durchgeführt werden können.

Weil die Anwendung von kommerziellen TiO₂ nanostrukturierten Partikeln im unteren Nanometerbereich zurzeit technisch nicht realisierbar ist, obwohl diese Partikel ursprünglich aus NP im unteren Nanometerbereich zusammengesetzt sind, haben wir die Partikel selbst frisch generiert und Ratten mit diesem NP Aerosol beatmet. Insofern haben wir die im Antrag anvisierten Ziele sehr gut erreicht, und wir haben insbesondere Inhalationsstudien an wirklich

nanoskaligen Partikeln erfolgreich durchgeführt. Wir haben diese TiO₂ NP physikalisch und chemisch sehr genau als polykristalline Anatase TiO₂ NP mit einer spezifischen Oberfläche von 270 m²/g und mit einem medianen Durchmesser von 20 nm charakterisiert. Wir haben sie für unsere quantitativen Biokinetikstudien radioaktiv mit ⁴⁸V markiert. Auch hiermit haben wir die im Antrag gesteckten Ziele sehr gut erreicht. Die auftretende Löslichkeit der radioaktiven ⁴⁸V Markierung haben wir in vitro und in vivo sorgfältig bestimmt. Weil die Löslichkeit recht gering war (< 2% pro 24 h), konnten wir unsere biokinetischen Daten entsprechend zusätzlicher biokinetischer Studien korrigieren.

Obwohl die angereicherten Fraktionen nach der 2-stündigen Inhalation sehr gering sind, konnten wir zu allen 5 Zeitpunkten in der 28-Tage Studie zeigen, dass die NP in den sekundären Zielorganen langfristig akkumuliert und retiniert werden, siehe Abbildung 1.

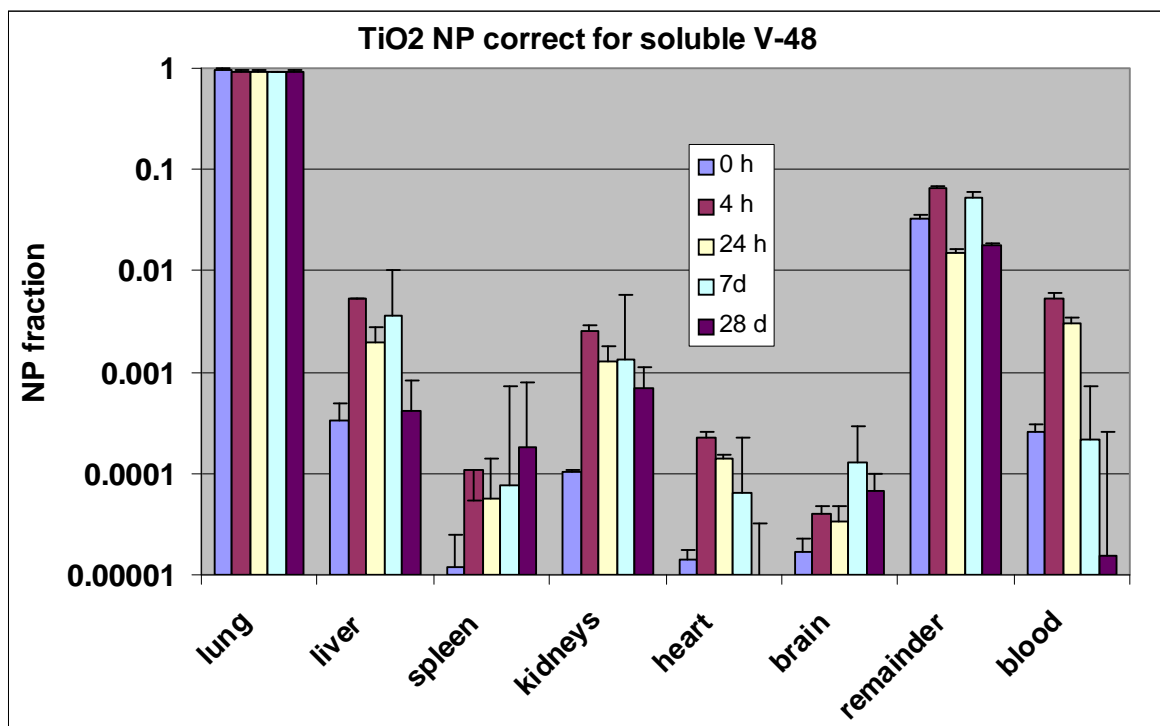


Abbildung 1: Biokinetik über einen Zeitraum von 28 Tagen nach einmaliger Inhalation von 20 nm großen Anatase TiO₂ NP, die mit ⁴⁸V radioaktiv markiert worden waren.

Eine ähnliche Langzeitretention konnten wir in allen sekundären Zielorganen bis zu 6 Monate nach einmaliger Inhalation von Ir NP zeigen (Semmler et al., 2004; Semmler-Behnke et al., 2007). Daher muss man davon ausgehen, dass bei wiederholter Inhalation bzw. chronischer Inhalation die Translokation in Abhängigkeit der in der Lunge deponierten NP Dosis akkumuliert. Daher können die Dosen in den verschiedenen sekundären Organen deutlich höher ansteigen als nach unserer 2-stündigen Inhalation. Dies sollten allerdings Nachfolgestudien exakt belegen. Außerdem scheinen uns toxikologische Studien in verschiedenen sekundären Zielorganen notwendig zu sein, bei denen z.B. die Wirkung einer Jahresdosis untersucht werden sollte. Diese Dosis lässt sich nun aufgrund unserer biokinetischen Studien unter der Annahme bestimmter Expositionsszenarien abschätzen. Mit anderen Worten: unsere biokinetischen Studien bilden nun die rationale Basis für toxikologische Studien, deren Ziel es sein sollte, die zugrundeliegenden Wechselwirkungen und Mechanismen in den einzelnen Organen zu untersuchen. Des Weiteren gibt es auch zahlreiche Hinweise, dass eine nennenswerte Aufnahme von TiO₂-NP über andere

Expositionswege wie z.B. dem Magen-Darm-Trakt nach oraler Aufnahme stattfindet, die dringender, weiterer Untersuchungen bedarf.

Mit den Ergebnissen aus den durchgeführten Experimenten, lässt sich klar die Aussage treffen, dass TiO₂-NP in der Lage sind, nach Inhalation die Blut-Luft-Schranke der Lunge zu überwinden und sich in sekundären Zielorganen sowie im Gewebe anzureichern. Die Menge der TiO₂-NP, die die Blut-Luft-Schranke der Lunge überwinden können, liegt in etwa bei 2% der in der Lunge vorhandenen NP und befinden sich fast vor allem im Restkörper. Nur geringe Mengen an TiO₂-NP werden in die anderen Organe umverteilt. Die Umverteilung der NP erfolgt in einer für jedes einzelne Organ eigenen Zeitkinetik.

Weiterhin können wir aufgrund unserer umfangreichen Untersuchungen mit verschiedenen NP Materialien folgendes schlussfolgern: Die Translokation von NP über die Blut-Luft-Schranke der Lunge in diverse Organe und Körpergewebe ist offensichtlich abhängig vom applizierten Material, so dass von unterschiedlichen Toxizitäten der einzelnen Materialien ausgegangen werden muss. Im Fall von biopersistenten NP kann man nicht ausschließen, dass bei chronischer Exposition die akkumulierten NP Dosen zu gesundheitlichen Effekten nicht nur in den Aufnahmeorganen sondern auch in den sekundären Organen führen können. Ein nächster wesentlicher Schritt müsste nun nicht nur die Biokinetik unter chronischen Expositionsbedingungen sondern auch Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen sein.

Nachdem wir zeigen konnten, dass die inhalierten TiO₂ NP nicht nur in der Lunge sondern auch im ganzen Körper akkumulieren können, ist ein nächster, sehr wichtiger Schritt die Bestimmung der Exposition der Gesamtbevölkerung bzw. bestimmter Personengruppen und eventuell suszeptibler Einzelpersonen zu bestimmen. Dies ist insofern nicht trivial, weil nanostrukturierte TiO₂ Materialien in großem Umfang unter sehr unterschiedlichen Bedingungen verwendet werden und damit auch zu unterschiedlichen Expositionen führen können. Diese Expositionsstudien sollten alle Inkorporationsrouten einschließlich der oralen Aufnahme berücksichtigen, weil zurzeit wahrscheinlich eher die orale als die inhalative Aufnahme zur höchsten Exposition führen wird.

Literatur

1. Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2002) Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 70: 86—97
2. Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 77: 347--357
3. Böckmann J, Lahl H, Unterhalt B (2000) Titan-Blutspiegel vor und nach Belastungsversuchen mit Titandioxid. *Pharmazie* 55: 140—143
4. Everitt JI, Mangum JB, Bermudez E, Wong BA, Asgharian B, Reverdy EE, Hext PM, Warheit DB (2000) Comparison of selected pulmonary responses of rats, mice, and Syrian hamsters to inhaled pigmentary titanium dioxide. *Inhalat Toxicol* 12, Suppl 3: 275--282
5. Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992) Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 535--542
6. Geiser M R-RB, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, and Gehr P. (2005) Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Non-

- Phagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ Health Perspect.* 113:1555-60.
7. Geiser M., Casaulta M., Kupferschmid B., Schulz H., Semmler-Behnke M., and Kreyling W.G. The Role of Macrophages in the Clearance of Inhaled Ultrafine Titanium Dioxide Particles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008; 38: 371-376.
 8. Kapp N., Kreyling WG, Schulz H, Im Hof V, Gehr P, Semmler M, Geiser M. Electron Energy Loss Spectroscopy for Analysis of Inhaled Ultrafine Particles in Rat Lungs. *Micr Res Tech* 63:298–305 (2004)
 9. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Oberdörster G., Ziesenis A. (2002) Ultrafine insoluble iridium particles are negligibly translocated from lung epithelium to extrapulmonary organs. *J. Tox Environ Health* Vol. 65 (No. 20): 1513-1530, 2002
 10. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Seitz J, Scymczak W, Wenk A, Mayer P, Takenaka S, Oberdörster G. Size Dependence of the Translocation of Inhaled Iridium and Carbon Nanoparticle Aggregates from the Lung of Rats to the Blood and Secondary Target Organs. *Inhalation Toxicology*, 2009; 21(S1): 55–60
 11. Lomer, M. C., C. Hutchinson, et al. (2004). "Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease." *British Journal of Nutrition* **92**(6): 947-55.
 12. Lehnert, B.E., Valdez, Y.E., Tietjen, G.L., 1989. Alveolar macrophage-particle relationships during lung clearance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1, 145-154.
 13. Möller, W., Felten, K., Sommerer, K., Scheuch, G., Meyer, G., Meyer, P., Haussinger, K., Kreyling, W.G., 2008. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 426-432.
 14. Semmler M., Seitz J., Erbe F., Mayer P., Heyder J., Oberdörster G., Kreyling W.G. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung including transient translocation into secondary organs *Inhal Toxicol.* 2004 Jun;16(6-7):453-9.
 15. Semmler-Behnke, M. Takenaka, S. Fertsch, S. Wenk, A. Seitz, J. Mayer, P. Oberdörster G., Kreyling, W. G. (2007) Efficient Elimination of Inhaled Nanoparticles from the Alveolar Region: Evidence for Interstitial Uptake and Subsequent Re-entrainment onto Airways:Epithelia. *Environ Health Perspect* 115(5): 9685.
 16. Semmler-Behnke M., Kreyling W.G., Lipka J., Fertsch S., Wenk A., Takenaka S., Schmid G., Brandau W.. Biodistribution of 1.4 nm and 18 nm Gold Particles in Rats. *Small* 2008; 4(12):2108-2111
 17. Szymczak W, Menzel N, Kreyling WG, Wittmaack K. 2006. TOF-SIMS characterisation of spark-generated nanoparticles made from pairs of Ir-Ir and Ir-C electrodes. *International Journal of Mass Spectrometry* 254(1-2):70-84.
 18. Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W. G., Lentner, B., Moller, W., Behnke-Semmler, M., Jennen, L., Walch, A., Michalke, B., Schramel, P., Heyder, J., and Schulz, H. (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* 18, 733-40.
 19. Wiebert, P., Sanchez-Crespo, A., Seitz, J., Falk, R., Philipson, K., Kreyling, W.G., Moller, W., Sommerer, K., Larsson, S., Svartengren, M., 2006. Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *Eur Respir J* 28, 286-290.

20. Wiebert, P., Sanchez-Crespo, A., Falk, R., Philipson, K., Lundin, A., Larsson, S., Moller, W., Kreyling, W.G., Svartengren, M., 2006. No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhal Toxicol* 18, 741-747.