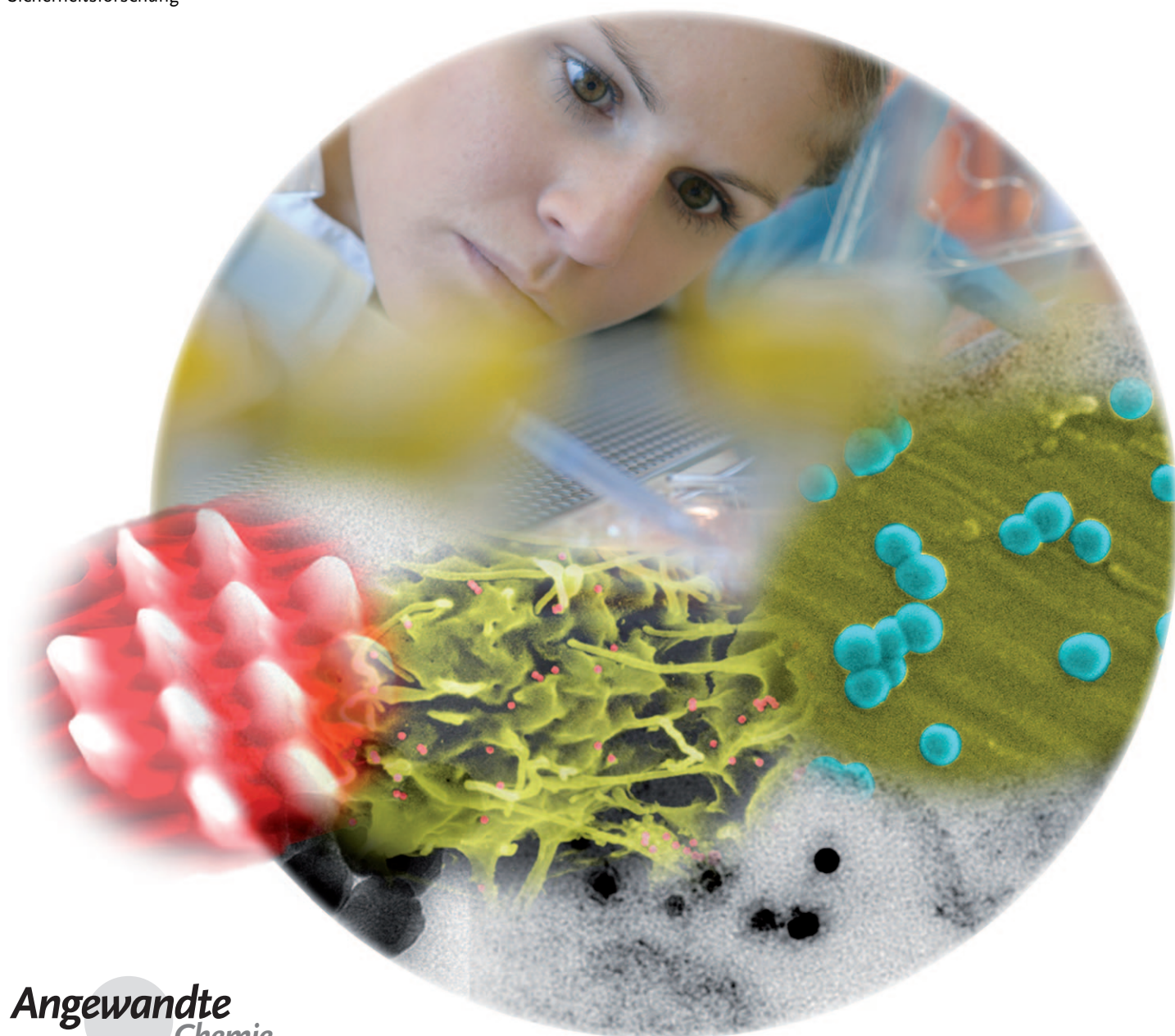


Nanotoxikologie – eine interdisziplinäre Herausforderung

Harald F. Krug und Peter Wick*

Stichwörter:

Biologische Wirkungen ·
Nanotechnologie ·
Nanotoxikologie ·
Sicherheitsforschung



Der aktuelle Anstieg bei den Verbraucherprodukten, die Nanomaterialien enthalten, als auch die Prognose zu den neuen Entwicklungen zu Anwendungen mit Nanopartikeln oder anderen Nanostrukturen bringt bei verschiedenen Organisationen, aber auch bei der Bevölkerung die Befürchtung auf, dass hier auch neue gesundheitliche Risiken entstehen können. Mit den Erfahrungen aus früheren Technologieentwicklungen sind solche Befürchtungen nicht ganz unbegründet, aber sind diese auch berechtigt? Ist es außerdem begründet, von der „Nanotoxikologie“ als einer neuen Disziplin zu sprechen? Dieser Aufsatz soll die Besonderheiten beleuchten, die bei der Interaktion von Nanoobjekten mit Zellen, Geweben und Organismen auftreten können. Insbesondere wollen wir darauf aufmerksam machen, dass zwar viele Daten zu den biologischen Wirkungen von Nanomaterialien vorhanden sind, aber eine Reihe dieser Studien nicht verlässlich sind. Dies soll dabei hauptsächlich an Beispielen aus aktuellen Publikationen versucht werden, als dass wir direkt auf konkrete Materialien eingehen. Mit dem Verweis auf methodische Unzulänglichkeiten sowie Empfehlungen am Schluss des Aufsatzes, wie diese vermieden werden können, wollen wir außerdem zu einer nachhaltigen Verbesserung der Datenlage beitragen.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1295
2. Risiko – bedeutet toxisch auch immer gleich risikoreich?	1298
3. Expositionsszenarien – mögliche Aufnahmewege	1299
4. Gefährdungsnachweis – biologische Wirkung von Nanoobjekten	1301
5. Die drei Prinzipien der Nanotoxikologie	1304
6. Nationale und internationale Aktivitäten zur Sicherheitsforschung	1307
7. Schlussfolgerungen und Empfehlungen	1308

1. Einleitung

Seit wir begonnen haben, die Chemie zu verstehen und die Synthesewege aufzuklären und zu kontrollieren, sind immer wieder Bedenken geäußert worden, was Chemikalien und Materialien mit lebenden Organismen oder der Umwelt anzustellen vermögen. In der Vergangenheit haben immer wieder schwerwiegende Fälle von Umweltschädigungen zu starken Beeinträchtigung von Umwelt und Gesundheit geführt,^[1] was zu einer erhöhten Aufmerksamkeit gegenüber negativen Technologiefolgen in der Öffentlichkeit geführt hat. So ist es verständlich und auch notwendig, dass bei der jüngsten Schlüsseltechnologie, der Nanotechnologie, genauer hingeschaut wird. Bevor wir uns allerdings diesem Thema im Detail widmen, muss erst einmal definiert werden, womit man sich hier eigentlich befassen muss. Noch vor wenigen Jahren wurde der Begriff „Nano“ eher willkürlich verwendet, und es gibt passende Beispiele, in denen mikrometergroße Partikel mit „nano“ bezeichnet wurden.^[2]

Inzwischen haben sich nationale und internationale Institutionen und Organisationen dieser Aufgabe angenommen und dazu auch entsprechende Publikationen herausgegeben (ISO, OECD, BSI, DIN), die im Prinzip den Bereich zwischen 1 nm und 100 nm als relevant definiert haben (Abbildung 1). Es ist zwar geklärt, was nun unter den Begriff „Nano“ fällt, und dennoch ist seine Verwendung nicht einheitlich. So geht der Schweizerische Aktionsplan im Sinne der Vorsorge (siehe Anhang, Liste von Internetseiten) davon aus, dass für eine biologische Wirkung von „kleinsten Partikeln, die eventuell überall im Körper hingleben können“ auch Partikel bis 300 oder gar 500 nm wichtig sein könnten. Andererseits wird auch darüber spekuliert, dass die für den „Nanoeffekt“ spezifische

Größe von Partikeln meist unter 30 nm liegt,^[3] dort nämlich, wo physikalische und chemische Prozesse neue und teilweise unvermutete Eigenschaften des Materials hervorbringen. Sicher liegen hier alle beteiligten Diskutanten ein wenig richtig, aber für die Biologie ist eine scharfe Grenze, ob bei 30, 100 oder bei 300 nm, nicht sinnvoll und scheint auch für chemische und physikalische Effekte nicht immer im unteren Nanometerbereich zu liegen.^[4] Denn abhängig von dem jeweiligen Reaktionspartner in einer Zelle oder der biologischen Struktur, mit der die neuen Materialien interagieren könnten, ist durchaus ein größerer Bereich betroffen, als ihn die engere materialwissenschaftliche Definition vorgibt (Abbildung 1).

Es gibt ein stilles Übereinkommen unter den Biologen und Toxikologen, dass diejenigen Partikel, die verschiedene, teilweise noch nicht definierte Wege in Organismen gehen können, unter den Begriff „Nano“ fallen, und damit wäre eine Größe unter ca. 250 nm gemeint. Hierzu zählen häufig auch Strukturen, die etwa in der Medizin als Wirkstofftransportsysteme eingesetzt werden sollen, Materialien also, die nicht wegen ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften Verwendung finden, sondern die speziell hergestellt werden, um andere Substanzen in einem Organismus zielgerichtet transportieren zu können,^[5] was grundsätzlich etwas größere Par-

[*] Prof. Dr. H. F. Krug, P. Wick
Empa – Materials Science & Technology
Department Materials Meet Life
Lerchenfeldstrasse 5, 9014 St. Gallen (Schweiz)
Fax: (+41) 71-274-7161
E-Mail: harald.krug@empa.ch
Homepage: <http://www.empa.ch/abt274>

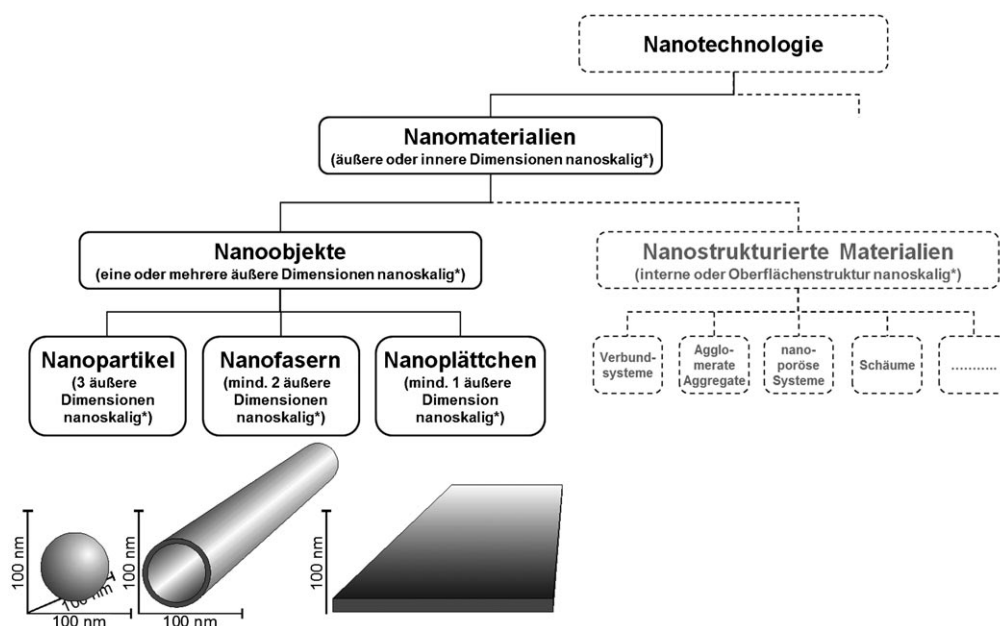


Abbildung 1. Schematische Darstellung der ISO-Definition von Nanoobjekten. Dazu gehören Nanopartikel, die in allen drei Dimensionen nanoskalig sind, Nanostäbchen oder Nanoröhren, die in mindestens zwei Dimensionen nanoskalig sind, und Nanoplättchen oder Schichten, die nur in einer Dimension nanoskalig sein müssen.
*: nanoskalig = zwischen 1 und 100 nm.

tikel benötigt (zwischen 40 und 200 nm, teilweise auch darüber). Warum sollten Toxikologen aber diese Materialien getrennt von den größeren, chemisch identischen Pendants betrachten? Die Antwort auf diese Frage findet sich im weiteren Verlauf dieses Aufsatzes. Dabei ist es in erster Linie unerheblich, um welche Art bzw. welches Material es sich handelt, da wir an dieser Stelle auf die generellen Gesetzmäßigkeiten eingehen möchten. In den wenigen Beispielen in diesem Aufsatz gehen wir daher meist auf bekannte, gut untersuchte Materialien ein,^[6] während Materialien, die eine intrinsische Toxizität aufweisen, wie die Halbleiter-Quantenpunkte, oder sehr aktuelle Materialien, wie die Kohlenstoff-Quantenpunkte,^[7] zu denen es noch keinerlei biologische Untersuchungen gibt, unberücksichtigt bleiben sollen.

Nicht nur Experten sind der Meinung, dass wir uns erneut an einer technologischen Schwelle befinden, die uns völlig neue Chancen mit Bezug auf die Lösung dringender Probleme

me verheißt, z.B. im Energiesektor (Energieproduktion und -speicherung), der Optik, der Elektronik, in der Mechanik und Keramik wie auch dem Bausektor, neue Anwendungen im Bereich der Verkehrstechnik, aber auch der Umwelttechnologie (z.B. Reinigung von Abwasser, Boden und Luft) und nicht zuletzt viele verbrauchernahe Anwendungen von der Kosmetik bis zur Medizin, vom Mobiltelefon bis zum Flachbildschirm. Alle diese Beispiele zeigen deutlich, dass wir exakt zwischen zwei verschiedenen Ansichten unterscheiden müssen, wenn es um die möglichen gesundheitlichen Gefährdungen geht, die mit den Nanotechnologien einhergehen

könnten. Der Einsatz der Technik an sich, die Verwendung neuer Materialien mit „Nanoeffekten“ in festen Verbünden, Kompositen oder Keramiken ist nur von geringer Bedeutung, wenn es um die gesundheitlichen Folgen geht, während der Einsatz von Nanopartikeln, Nanofasern oder -stäbchen in einer mehr oder weniger freien Form (z.B. in Kosmetika, Medikamenten, auf Oberflächen oder anderen Anwendungen, die z.B. einen direkten Hautkontakt zulassen) unter diesem Aspekt sicher erheblich kritischer zu sehen ist. Daher sind vor allem die Arbeitsplätze im besonderen Interesse von Studien^[8,9] und Projekten (siehe NanoCare und Tracer), aber auch die Öffentlichkeit hat inzwischen realisiert, dass es Produkte oder Bereiche gibt (z.B. Kosmetika), in denen der Einsatz von Nanomaterialien bereits üblich ist. Bevor im Detail auf die spezifisch nanotoxikologischen Aspekte eingegangen werden soll, müssen noch einige wichtige Tatsachen erläutert werden.



Harald F. Krug ist Leiter des Departments „Materials meet Life“ und Mitglied des Direktoriums der Empa in der Schweiz und ist im Rahmen einer Titularprofessur an der Universität Bern in der Lehre tätig. Er ist Mitglied im Lenkungsgremium des DECHEMA-AK zum verantwortungsvollen Umgang mit Nanomaterialien und in vielen weiteren Expertengruppen zu diesem Thema und berät Bundesministerien in Deutschland als auch Bundesämter der Schweiz zur Nanotechnologie. 2006 erhielt er den cwi-Award der Deutschen Keramischen Gesellschaft und 2007 den Forschungspreis des Landes Baden-Württemberg zu „Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch“.



Peter Wick ist Abteilungsleiter für Materials–Biology Interactions an der Eidgenössischen Materialprüfungs- und Forschungsanstalt Empa in St. Gallen. Er studierte und promovierte an der Universität Freiburg (Schweiz) in Zell- und Molekularbiologie. 2002 wechselte er an die Empa und bearbeitete bis heute unter anderem das nationale Projekt NanoRisk. Er ist außerdem in mehreren Projekten des 6. und 7. Rahmenprogramms der EU wie CANAPE, NANOMMUNE und NANOHOUSE aktiv und ist Mitglied der Begleitgruppe des schweizerischen Aktionsplans für synthetische Nanomaterialien sowie des Redaktionsbeirats von Nanotoxicology.

Zuerst sollte festgestellt werden, dass eine Exposition gegenüber Nanopartikeln nicht eine moderne Erfindung der vergangenen 10 oder 20 Jahre ist. Ultrafeine Partikel in der Größenordnung von einigen hundert Nanometern im Durchmesser und kleiner werden bei allen Verbrennungsprozessen freigesetzt und entstehen auch in der Natur bei den verschiedensten Vorgängen. Technisch hergestellt bzw. genutzt werden solch kleinste Teilchen, seit Höhlenmenschen mit Ruß die Wände ihrer Behausung bemalt haben, Kirchenfenster seit dem Mittelalter mit Nano-Goldpartikeln rot eingefärbt wurden, was ihnen bis in die heutige Zeit ihren Glanz und ihre Farbe verleiht. Neu ist die Vielzahl der zusätzlichen Materialien und Mischungen sowie die Zahl der möglichen Anwendungen. Dies führt in naher Zukunft zu einer Situation, in der die mögliche Belastung von Mensch, Tier, Pflanzen und Umweltkompartimenten ebenfalls stark zunehmen wird. Hier stellt sich die Frage nach einem Risiko (R), das sich einerseits aus der Exposition gegenüber den neuen Materialien ergibt (E), andererseits besteht aber nur dann ein Risiko, wenn die Nanomaterialien auch eine biologische Wirkung haben (H ; für engl. „hazard“). Das Ganze ist aber gleichzeitig eine Funktion der Wahrscheinlichkeit (P ; für engl. „probability“), da ein Risiko nur dann besteht, wenn eine gewisse Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung eines biologischen Effektes gegeben ist.

$$R = f_P\{E, H\}$$

An einem einfachen Beispiel sei diese Funktion erläutert. TiO_2 ist mit einer Primärpartikelgröße von 25 nm in kosmetischen Sonnenschutzcremes enthalten, um möglichst hohe UV-Schutzfaktoren zu erreichen. Eine Exposition ist immer dann gegeben, wenn man sich damit eincremt, E ist also relativ hoch. Ein Risiko besteht aber nur dann, wenn TiO_2 auch eine biologische Wirkung hat und an den Wirkort gelangt. Mittlerweile haben mehr als 40 Studien zeigen können (z.B. das europäische Projekt NanoDerm), dass TiO_2 nicht durch die Haut in den Körper gelangt und generell biologische Wirkungen eher gering ausfallen. Daraus folgt, dass H sehr klein und damit auch R für den Menschen niedrig ist. Bleibt die Umwelt, in die alle Bestandteile der Sonnenschutzcremes letztlich gelangen. Die Vielzahl der Anwendungen mit TiO_2 kann tatsächlich zu einer lokalen Erhöhung der Konzentration führen, wie kürzlich berechnet wurde,^[10] jedoch ist nach wie vor nicht klar, ob das auch eine Folge für die dort lebenden Organismen hat, da Titan zu den zehn häufigsten Elementen der Erdkruste gehört und der natürliche Hintergrund sehr hoch ist (Abbildung 2) und verschiedene Mineralien und Metalloxide in natürlicher Umgebung durchaus nanoskalig vorliegen können.^[11–14]

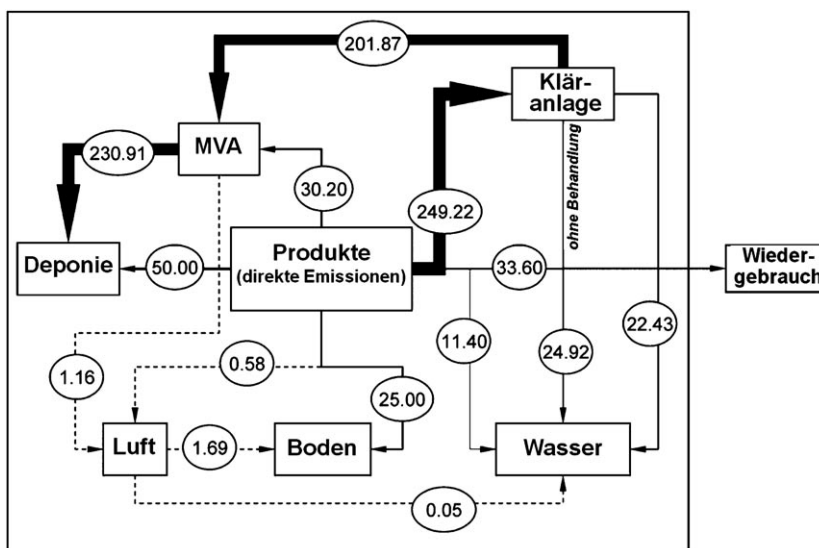


Abbildung 2. Flussdiagramm für Nano- TiO_2 -Stoffflüsse vom Produkt bis zu den verschiedenen Umweltkompartimenten. Alle Stoffflüsse in Tonnen/Jahr bei höchster anzunehmender Exposition. MVA=Müllverbrennungsanlage. Die Dicke der Pfeile ist proportional zur Menge des Nano- TiO_2 zwischen den verschiedenen Kompartimenten. Gestrichelte Linien repräsentieren die niedrigsten Volumina. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [10], Copyright 2008 American Chemical Society.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass es keine genügend standardisierten Methoden gibt, die für die Erfassung biologischer Effekte von Nanomaterialien geeignet sind. Am Beispiel der Nanotoxikologie hat Hartung gerade gefordert, dass die Toxikologen in drei wichtigen Schritten ein neues System der Toxikologie erreichen müssen (Abbildung 3). Das sieht einfacher aus, als es letztlich ist, da hierfür ein Satz evaluierter In-vitro-Systeme zur Verfügung stehen muss, die für die neuen Materialien geeignet sind, passende biologische Endpunkte erfassen und ungestörte Testparameter beinhalten, sodass ein ausreichender Datensatz erzeugt wird, der robust und möglichst genau eine toxische Antwort im lebenden Organismus vorhersagen sollte. Wie in Abbildung 3 dargestellt, bedeutet dies zuerst, die bestehenden Testsysteme zu überprüfen, inwieweit diese für eine Testung von Nanoobjekten geeignet sind. Aufbauend auf dieser Prüfung und der Adaptation der bestehenden OECD-Richtlinien muss eine neue Strategie entwickelt werden, die z.B. berücksichtigt, dass für jeden biologischen Endpunkt mindestens zwei verschiedene Tests verwendet werden sollten, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Darüber hinaus ist es wichtig, neue Methoden zu entwickeln und zusammen mit den bestehenden z.B. in internationalen Ringversuchen zu validieren (IANH; siehe Anhang, Projekte). Dieses Vorgehen ist aber nicht einfach und erfordert einen langen Atem seitens der durchführenden Institute und Labors, wie die folgenden Abschnitte aufzeigen werden.

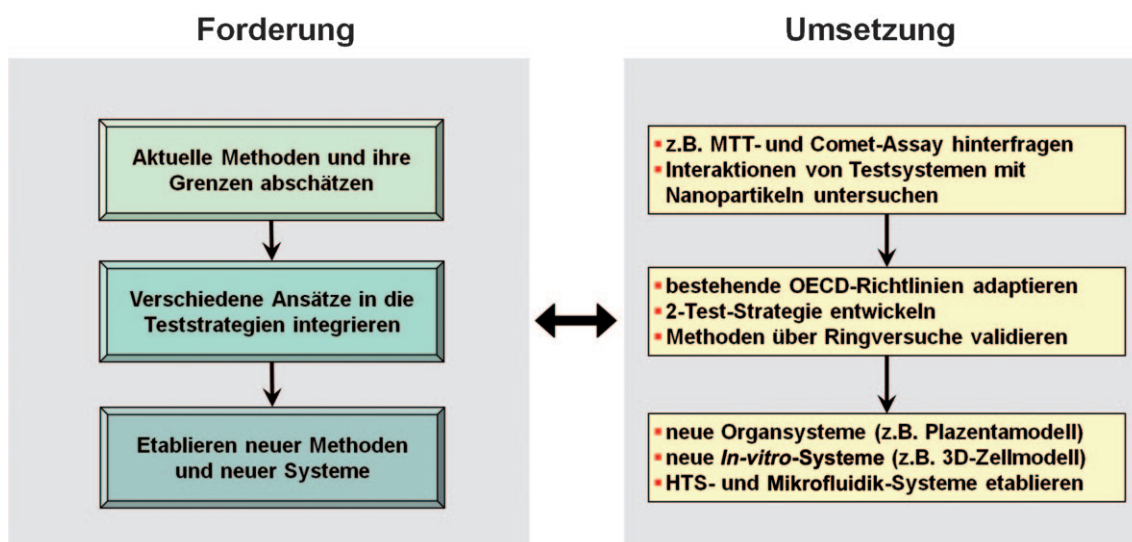


Abbildung 3. Drei Forderungen für die Etablierung einer neuen Toxikologie (linke Seite; Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [15], Copyright 2009 Macmillan Publishers Ltd). Für die Nanotoxikologie bedeutet dies das Hinterfragen bestehender Testmethoden, die Etablierung neuer Strategien sowie die Einführung und Validierung neuer Entwicklungen (rechte Seite).

2. Risiko – bedeutet toxisch auch immer gleich risikoreich?

Wie stets bei neuen technologischen Entwicklungen werden die Möglichkeiten anfangs stark überbewertet, kritische Aspekte noch weitgehend ausgeblendet. Jedoch deutlich früher als bei anderen Technologieentwicklungen kam die Diskussion um die möglichen Risiken der Nanotechnologie auf.^[16–20] Dabei sollte klar sein, dass neue Technologien und ihre Entwicklungen immer auch Risiken bergen, die sowohl die Gesellschaft, die Ökonomie aber auch Gesundheit und Umwelt betreffen können. In diesem Aufsatz zur Nanotoxikologie werden wir uns auf den Bereich „Gesundheit“ konzentrieren, daher ist es notwendig, die möglichen negativen Einflüsse auf biologische Systeme genauer zu betrachten. Oben haben wir bereits eine Definition des Risikos angegeben, die aus toxikologischer Sicht die beiden wichtigen Kriterien der Exposition (*E*) und der biologischen Wirkung (*H*) beinhaltet. Nur wenn beides gegeben ist, ist überhaupt davon auszugehen, dass es nachteilige Folgen geben kann. Allerdings ist auch die Wahrscheinlichkeit von Bedeutung, ob das eine oder andere tatsächlich relevant wird bzw. eintritt.

Als Beispiel greifen wir hier nochmals TiO_2 auf. Wie oben bereits erwähnt, wird es nanoskalig in verschiedensten Produkten zum UV-Schutz eingesetzt, der Aufnahmepfad Haut ist hier aber schon ausreichend abgeklärt. TiO_2 ist jedoch auch ein seit 2 Jahrzehnten zugelassener Nahrungsmittelzusatzstoff (E 171) (wobei hier zu erwähnen ist, dass es sich hier um ein Gemisch aus mikro- und nanoskaligem TiO_2 handelt). Nun wird seitens der Verbraucherschutzorganisationen befürchtet, dass nanoskaliges Titandioxid auch in der Nahrung enthalten ist und über den Magen-Darm-Trakt in den Körper gelangen und dort nachteilige Folgen haben könnte. Zum Szenario Magen-Darm-Trakt gibt es aber nur wenige Studien, die zumindest für die akute Wirkung bisher keinen Anlass zu

Befürchtungen geben. So haben Wang und Mitarbeiter gezeigt,^[21] dass nur eine ausgesprochen hohe Dosis bei einmaliger Gabe einen leichten Effekt auslöste. Diese Dosis lag bei 5 g kg^{-1} Körpergewicht der Versuchstiere, was bedeutet, dass ein erwachsener Mensch (Normgewicht 60 kg) mindestens 300 g auf einmal schlucken müsste. Eine enorme Dosis, die sogar über der akut-toxischen Dosis von NaCl (250 g) liegt. Wir salzen aber dennoch unsere Speisen mit Natriumchlorid, ohne wirklich über dieses „Risiko“ nachzudenken.

Ein Risiko ist sicher nur dann gegeben, wenn zum einen die Konzentrationen, denen wir ausgesetzt sind, auch relevant sind und in unserem täglichen Leben eine Rolle spielen. Zum anderen ist nicht jede biologische Auswirkung auch gleich mit einem Risiko verbunden, da viele Vorgänge in unserem Körper entweder selbstheilend sein können oder zum „normalen“ Reaktionspotenzial der Zellen bzw. der Organe gehören. Daher sind die Wahrscheinlichkeit des Erreichens einer biologisch wirksamen Konzentration in unserem Körper sowie die Auslösung eines ernststen biologischen Schadens zwei wichtige Punkte bei der Charakterisierung des Risikos, insbesondere bei Substanzen, die persistent sind und im Organismus akkumulieren können. Die dadurch möglichen Langzeiteffekte sind eine besondere methodische Herausforderung und für stabile Nanopartikel eine bedeutende Fragestellung. Es gilt daher bei Substanzen oder Materialien, deren Wirkung man nicht ausreichend kennt oder bestimmt hat (große Unsicherheit), der Grundsatz, dass die Exposition weitestgehend zu vermeiden ist, während dort, wo genügend Daten vorhanden sind (hoher Kenntnisstand), durch ein gutes Risikomanagement das Risiko ebenfalls weitestgehend vermieden bzw. deutlich reduziert werden kann. Für die neuen Materialien, die in nanotechnologischen Entwicklungen ihren Einsatz finden, ist es also wichtig, von Beginn an das Wissen zu möglichen biologischen Effekten zu erhöhen und Messungen als auch Modellberechnungen durchzuführen, die

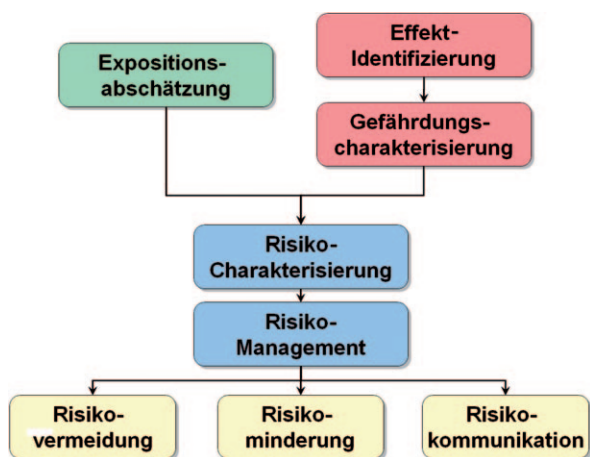


Abbildung 4. Risikoabschätzung und Risikomanagement im Zusammenhang mit gesundheitlich bedenklichen Substanzen oder Materialien.

eine Einschätzung der Exposition zulassen. Nur mit diesem Wissen ist es möglich, Risiken zu charakterisieren und, wenn nötig, zu managen (Abbildung 4).

In den folgenden Abschnitten sollen die verschiedenen Aspekte der Expositionen und biologischen Wirkungen aufgezeigt werden. Vor allem das „Besondere“ der Nanomaterialien wollen wir herausstellen, denn es bleibt nach wie vor die Frage offen: Gibt es eigentlich eine spezielle „Nanotoxikologie“?

3. Expositionsszenarien – mögliche Aufnahmewege

Durch die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von Nanomaterialien kommen die Menschen auf unterschiedlichste Weise mit ihnen in Berührung. In diesem Abschnitt soll darauf eingegangen werden, über welche Aufnahmewege synthetische und freie Nanopartikel in den menschlichen Körper gelangen können.

Auf den ersten Blick offensichtlich erscheint eine Exposition am Arbeitsplatz. Um diese Expositionsszenarios zu verstehen, können entweder direkte Messungen am Arbeitsplatz durchgeführt werden^[9] oder die Partikelverteilungen mit Computermodellen simuliert werden, wie dies im Projekt NanoCare unternommen wurde.^[22] Die Messung von synthetischen Nanopartikeln am Arbeitsplatz ist eine Herausforderung, da diese von den immer präsenten Hintergrundbelastungen unterschieden werden müssen. Dazu müssen Messstrategien entwickelt und Online-Charakterisierungen ermöglicht werden. Jedoch soll dies hier nicht im Detail dargestellt werden, vielmehr sollen die für die Toxikologie wichtigen Eintrittspforten in den menschlichen Organismus genauer erläutert werden.

3.1. Die Lunge – Haupteintrittspforte für Nanoobjekte

Die Lunge ist das Organ, welches die Luft über die Atemwege zu den Alveolen führt, wo Sauerstoff und Koh-

lendioxid mit der Umwelt ausgetauscht werden. Dieser Gasaustausch findet in den 300 Millionen Alveolen auf einer Fläche von ungefähr 140 m² mittels Diffusion statt.^[23] Die Luft im Lumen der Alveolen ist meist nur einige hundert Nanometer vom fließenden Blut entfernt, und beide sind durch eine Epithel- und eine Endothelschicht voneinander getrennt.^[24]

Fremdkörper inklusive Nanoobjekte, die in die Lunge gelangen, werden teilweise schon in den Atemwegen oder Bronchien mittels mukoziliärem Transport aus der Lunge entfernt. Feine Partikel (< 2.5 µm) können mit dem Luftstrom bis in die Alveolen transportiert werden (Abbildung 5).

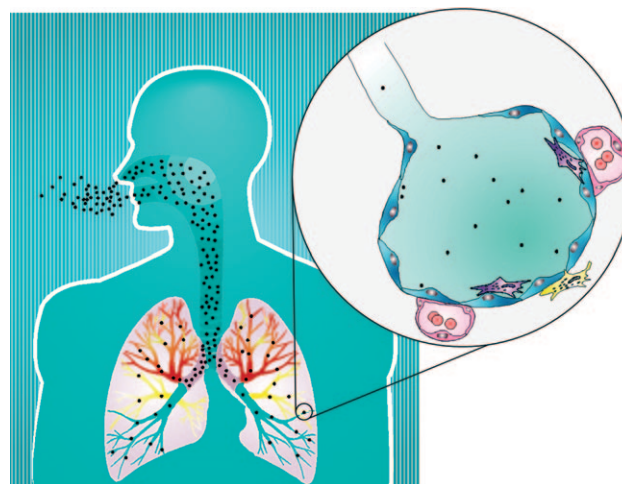


Abbildung 5. Inhalierbare Partikel, die kleiner als 2.5 µm sind (PM_{2.5}), gelangen in die alveolären Strukturen der Lunge und können in hohen Dosen zu Entzündungsreaktionen im Gewebe führen. Ein kleiner Anteil der verabreichten Dosis kann die Luft-Blut-Barriere durchqueren und ins Blut gelangen. Im vergrößerten Bereich ist ein Alveolus dargestellt, der von Epithelzellen (blau) ausgekleidet ist. Die Partikel (Punkte) können von Makrophagen (violett) oder auch dendritischen Zellen (gelb) aufgenommen werden oder auch durch die sehr schmale Barriere in die Blutgefäße (rot) gelangen.

Da in den Alveolen kein mukoziliärer Reinigungsmechanismus vorhanden ist, übernehmen Makrophagen die Fremdkörperentfernung. Sie „fressen“ alle partikulären Fremdkörper, die in den Alveolen deponiert werden, und transportieren diese in den bronchialen Bereich, wo sie mithilfe der mukoziliären Clearance aus der Lunge entfernt werden. Diese über die Evolution entwickelten Reinigungsmechanismen funktionieren sehr effizient, solange sie nicht chronisch überbelastet werden, wie z. B. bei starken Rauchern oder an staubbelasteten Arbeitsplätzen. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass nanoskalige Partikel, verabreicht in hohen Dosen, durchaus in der Lage sind, die dünne Luft-Blut-Schranke zu überwinden und dadurch ins Blut zu gelangen.^[25] Die Menge an Nanopartikeln, welche durch Inhalation in den Blutkreislauf gelangen, ist ein Bruchteil dessen (< 0.05 %) was ursprünglich verabreicht wurde^[26] und ist zusätzlich abhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Partikel.

Die Lunge ist das Organ, über das am häufigsten Fremdstoffe, Feinstäube oder Dämpfe aufgenommen

werden; es ist als der wahrscheinlichste Fall einer Exposition anzusehen. Daher verwundert es nicht, dass sich sehr viele geförderte Projekte zu den Auswirkungen von synthetischen Nanopartikeln auf die Atemwege konzentrieren (siehe Anhang, Datenbanken und Projekte).

3.2. Nanopartikelaufnahme über den Riechnerv – Umgehung der Blut-Hirn-Schranke

Die geringe Größe nanoskaliger Objekte eröffnet ihnen noch einen weiteren Aufnahmepfad von besonderer Bedeutung. Sie können im Bereich des Riechepithels über Nervenfasern inkorporiert werden. Nach Instillation oder Inhalation bei Nagetieren mit verschiedenen Partikeln konnte gezeigt werden, dass der sogenannte transsynaptische Transport für nanoskalige Kohlenstoffpartikel, Goldpartikel, Manganoxid und andere möglich ist.^[27–30] Über das olfaktorische Epithel und *Nervus olfactorius* im Nasendach können Nanopartikel direkt ins Gehirn gelangen.^[28] Daneben sind systemische Aufnahmen über *Nervus trigeminus* (Drillingsnerv) und sensorische Nervenfasern im Tracheobronchialtrakt denkbar.^[31] Der Mengenanteil, der über den olfaktorischen Nerv in das Hirn gelangt, ist sehr gering, aber er umgeht die Blut-Hirn-Schranke.^[32]

3.3. Die gesunde Haut – eine effektive Barriere für viele Nanomaterialien

Die gesunde Haut des Menschen ist mit 1.5–2 m² Fläche das Organ, welches den Organismus vor Umwelteinflüssen und Krankheitserregern schützt und gleichzeitig Flüssigkeits- und Wärmeverlust verhindert. Die menschliche Haut gliedert sich in drei Hauptschichten: die Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis). Die äußerste Schicht der Epidermis ist die Hornschicht (*Stratum corneum* und *stratum corneum disjunction*), bei der es sich um eine durchschnittlich 5–20 µm dicke Schicht aus toten Plattenepithelzellen (Keratinocyten) handelt, die eine erste mechanische Barriere für alle Nanopartikel darstellt. Diese ist sehr viel dicker als die der Lunge. Darunter liegen die Stachelzell (*Stratum spinosum*) und Basalzellschicht (*Stratum basale*), die aus lebenden Zellen bestehen. Die abgestorbenen Zellen dieser beiden Schichten bilden die Hornschicht und erneuern damit kontinuierlich von innen heraus die äußerste Schicht der Haut. In die Dermis sind Haarfollikel mit Talgdrüsen (15–20 cm² Haut) sowie Schweißdrüsen (ungefähr 150 cm² Haut) eingebettet. Darunter befinden sich Kapillargefäße, und die sogenannten Lamellenkörperchen (Mechanorezeptoren der Haut), eingebettet in lockeres Binde- und subkutanes Fettgewebe.^[33]

Schon der anatomische Aufbau sowie die stetige Erneuerung der menschlichen Haut von innen heraus erschweren die Aufnahme von Nanopartikeln, vor allem von nicht-lipophilen, wie sie vorzugsweise in Kosmetika und Sonnencreme vorkommen. In verschiedenen Expositionsversuchen, auch im Rahmen des 6th FP EU-Projektes NANODERM (NanoDerm, 2008), konnte gezeigt werden, dass verschiedenen

modifiziertes TiO₂ nur auf der Hornhaut bzw. in den obersten drei bis fünf Corneozytenschichten des *Stratum corneum disjunctum* oder in den Haarfollikeln und Hautfurchen abgelagert wird, aber nicht in den tieferen Regionen der Haut nachweisbar ist. Dabei wurden keinerlei akute Reaktionen der Haut auf die Nanopartikel beobachtet (NanoDerm, 2008).^[34,35] Allerdings wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass sehr kleine Partikel (< 10 nm) durchaus die Möglichkeit haben, in die Epidermis oder Dermis vorzudringen.^[36] Beschichtungen und/oder Funktionalisierungen der Partikeloberfläche, welche vielfach eingesetzt werden, um Agglomeration zu verhindern, können das Penetrationsverhalten stark beeinflussen.^[36–40] Gestresste oder kranke Haut ist von Fall zu Fall zu betrachten, hat aber in der Regel eine höhere Durchlässigkeit für alle Arten von Partikeln, da die Hornschicht verletzt ist.^[41]

3.3.1. Franz-Zellen und „Tape stripping“ – zwei standardisierte Methoden zur Partikel-Durchlässigkeitsbestimmung

In der Franz-Zelle können intakte Hautbiopsien auf ihre Durchlässigkeit von aktiven Molekülen oder Nanoobjekten bestimmt werden.^[42] Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass es keine Rückschlüsse über den Penetrationsweg zulässt. Eine alternative und viel verwendete Methode ist das „Tape Stripping“. Hier wird immer an der gleichen Stelle mittels Klebeband die Haut nach Auftragen der Nanoobjekte schichtweise abgetragen und kann Schicht per Schicht analysiert werden. Die Interpretation dieser Daten ist nicht immer ganz einfach, denn Hautfurchen und Haarfollikel sind verantwortlich, dass nach Abtragen der Hornschicht immer noch Partikel gefunden werden können, die dann fälschlicherweise der Dermis zugeordnet werden. Diese möglichen Artefakte wurden detailliert vom Projektkonsortium NanoDerm beschrieben (NanoDerm, 2008), neue Methoden zu ihrer Erfassung entwickelt und im Schlussbericht publiziert. Während plausibel gezeigt wurde, dass Metalloxide in Nanogröße die Haut nicht durchdringen, liegen auch Hinweise vor, dass eher lipophile oder instabile (lösliche) Partikel die gestresste Haut (Dehnungsversuche) penetrieren können^[39,40] oder durch Lösungsmittel angegriffene Haut eher durchlässig wird.^[43] Welche Auswirkungen die Nanopartikel auf die darunterliegenden Zellen haben können, sofern sie die Hornschicht penetrieren, wird im Abschnitt 4 diskutiert.

3.4. Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt ist von geringerer Bedeutung

Der Magen-Darm-Trakt ist ein komplexes Barrieregewebe mit einer Fläche von nahezu 2000 m², mit unterschiedlichen Funktionen. Im Magen wird die Nahrung bei einem pH-Wert von ungefähr 2 aufgeschlossen. Die Nährstoffe werden im Dünn- und Dickdarm über das Darmepithel aufgenommen und über den Blutkreislauf im Körper verteilt. Die Blutgefäße liegen aber eine bis mehrere Zellschichten unterhalb des Darmepithels, sodass Makromoleküle oder Nanopartikel nicht ohne weiteres in den Blutkreislauf gelangen können.^[33]

Nanoobjekte können durch Nahrungsmittel (als Nahrungsmittelergänzungstoffe), aber auch nach dem Einatmen über den mukoziliären Rücktransport aus den Bronchien unbewusst verschluckt werden und so in den Magen-Darm-Trakt gelangen. Es besteht kein Konsens darüber, wie sich Nanomaterialien im Magen-Darm-Trakt verhalten. So sollen Polystyrolpartikel von 50 und 100 nm im Tierversuch die Darmwand durchqueren und ins Lymphsystem gelangen,^[44] andere Studien zeigen hingegen keine Aufnahme.^[45,46] Im Vergleich zu intravenös verabreichten Nanopartikeln im Tierversuch werden 98 % der oral verabreichten Partikel ausgeschieden, während sich das intravenöse Material nach einer Woche zu ca. 80 % in der Leber angereichert hat.^[29] Die Aufnahme von Nanopartikeln über den Darm könnte eher von geringerer Bedeutung sein, aber wegen der sehr geringen Datenlage ist eine Bewertung derzeit nicht möglich.

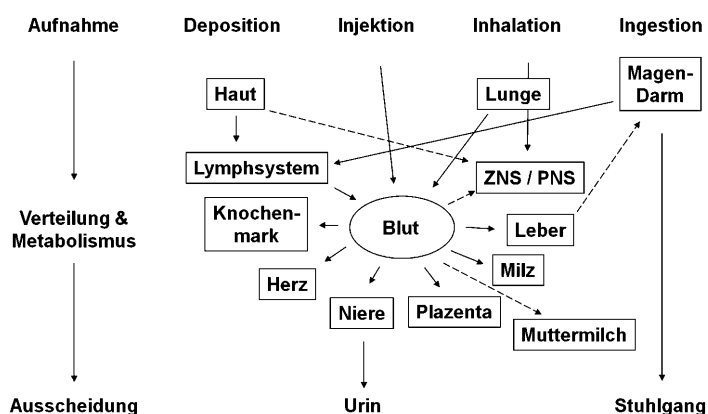


Abbildung 6. Übersicht der nachgewiesenen (durchgezogene Pfeile) und möglichen (gestrichelte Pfeile) Transportwege von Nanoobjekten im menschlichen Körper. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [29].

3.5. Injizierte Nanopartikel umgehen wichtige Barrieregewebe

Auch wenn viele Entwicklungen der Nanotechnologie noch am Anfang stehen, ist absehbar, dass sie vor allem in der Medizin, sowohl für Diagnostik als auch Therapie, eine große Zukunft haben werden.^[5] Derzeit werden Nanomaterialien als Kontrastmittel erprobt, um in neuen bildgebenden Verfahren (Röntgendiagnostik oder Kernspintomographie) Strukturen und Funktionen des Körpers besser darstellen zu können.^[47] Es werden neue Vakzine entwickelt, welche in oder gebunden an Nanoobjekte effizienter immunisieren als konventionelle Produkte und Adjuvantien.^[48] In der Krebsbekämpfung stehen speziell beschichtete Eisenoxidpartikel kurz vor der klinischen Zulassung,^[49] welche die Krebstherapie revolutionieren sollen. Diese Anwendungen haben eines gemeinsam: Die Nanopartikel müssen entweder in das Zielgewebe oder in den Blutkreislauf eingespritzt werden, um den erwünschten Effekt zu erzielen. Durch die Injektion werden natürliche Barrieren wie die Haut oder das Darmepithel umgangen und andere Barrieregewebe wie die Blut-Hirn-Schranke^[20] oder bei schwangeren Frauen das Plazentagewebe relevant.^[50] Alle möglichen Aufnahme- und Transportwege sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

4. Gefährdungsnachweis – biologische Wirkung von Nanoobjekten

Verschiedene biologische Modelle werden für die Bestimmung der Exposition und Toxizität von Nanomaterialien verwendet, um eine möglichst genaue Voraussage der Gefährdung durch diese neuen Materialien für den Menschen machen zu können.

Die Beziehung von in vitro ↔ in vivo und deren Extrapolation auf den Menschen ist in Abbildung 7 abgebildet. In-vitro-Studien sind sehr vereinfachte biologische Modelle, die eine schnelle und kostengünstige Abschätzung der Wirkung von xenobiotischen Substanzen oder Nanomaterialien ermöglichen. Der Vergleich von verschiedenen Zelltypen, die aus unterschiedlichen Geweben oder Organismen isoliert werden, ermöglicht eine Evaluation über gewebe- oder art-spezifische Wirkungen hinaus. Komplexe Fragestellungen zur Aufnahme, Verteilung (distribution), Metabolisierung und Ausscheidung (exkretion) (ADME) können nur in Tierstudien (in vivo) ausreichend beantwortet werden. Die stetige Verbesserung von In-vitro-Modellen hin zu komplexen, mehrzelligen Systemen^[51–54] oder ganzen Organen^[55] erlauben

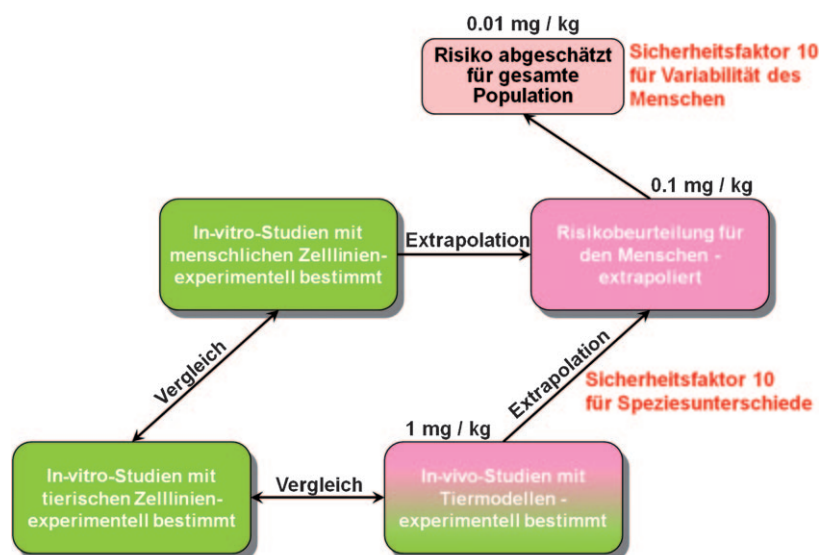


Abbildung 7. Vorgehen bei der Evaluation der Toxizität von Nanoobjekten für den Menschen. Dabei wird deutlich, dass die im Versuch erhaltenen Grenzwerte (hier mit 1 mg kg^{-1} angenommen) durch die Sicherheitsfaktoren (zum einen der Speziesunterschied zwischen Tier und Mensch und zum anderen die interindividuellen Unterschiede beim Menschen) um den Faktor 100 herabgesetzt werden, um Grenzwerte beim Menschen zu fixieren.

jedoch eine immer differenziertere Betrachtung möglicher Wirkungsmechanismen und führen langfristig auch zu einer Verringerung der Anzahl von Tierversuchen.

4.1. Nanopartikeleffekte in der Lunge

Epidemiologische Untersuchungen von (Ultra-)Feinstäuben ergaben, dass inhalierbare Nanomaterialien Auslöser für verschiedenste Lungen-, Herz-Kreislauf- und Nervensystemerkrankungen sind.^[56–60] Auch wenn es vergleichbare Studien zu synthetischen Nanopartikeln nicht gibt, da es an den entsprechend exponierten Kollektiven fehlt, gibt es derzeit keinen Grund anzunehmen, dass für synthetische Nanopartikel gleicher Größe grundsätzlich andere Auswirkungen angenommen werden sollten. Allerdings könnten die gleichen, neuen Eigenschaften, welche die Nanopartikel für die Nanotechnologie so attraktiv machen, auch Grund für mögliche neue toxische Wirkungen sein. Nanopartikel müssen daher im Vorfeld einer großtechnischen Anwendung sorgfältig auf ihre biologischen Wirkungen hin untersucht werden.

4.1.1. Oxidativer Stress, Entzündungen und Genotoxizität

Obwohl der genaue Wirkmechanismus von Nanopartikeln, Nanofasern oder Nanoplättchen noch nicht vollständig verstanden ist, erscheint es plausibel, dass die spezifische Oberfläche des Nanomaterials, die bei kleineren Partikeln erheblich größer ist als bei größeren Partikeln, ein Schlüsselfaktor bei der Bildung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) ist (siehe Abschnitt 5.2 und Abbildung 13). Freie Radikale können, wenn sie in großer Menge in Zellen vorhanden sind, unkontrolliert mit Zellkomponenten (Lipiden, Proteinen und DNA) interagieren und so die Zellen schädigen. Dies wurde *in vitro* als auch *in vivo* für unterschiedliche Typen von Nanopartikeln und Nanofasern (C₆₀-Fullerene, Kohlenstoff-Nanoröhren, TiO₂, Dieselrußpartikel etc.) gezeigt.^[29] Die Bildung von ROS (z. B. das Superoxidradikal und das Hydroxylradikal) kann verschiedene Ursachen haben: 1) ROS können direkt an der Oberfläche der Nanoobjekte entstehen;^[61] 2) Übergangsmetalle können als Katalysatoren zur Bildung von ROS wirken;^[62] 3) Nanoobjekte schädigen Mitochondrien, wodurch das Gleichgewicht in der Atmungskette gestört wird;^[63] 4) bei der Aktivierung von Makrophagen oder Neutrophilen durch Nanoobjekte produzieren diese Zellen selbst ROS oder RNS (Stickstoffradikale).^[63]

Können diese Radikale nicht durch endogene Antioxidantien (z. B. Vitamin C) gebunden oder durch antioxidative Enzyme abgebaut werden, lösen sie eine Entzündungsreaktion aus. Eine Entzündung ist eine natürliche Reaktion

auf eine Verletzung, die den Heilungsprozess initiiert und das Immunsystem aktiviert. Dabei werden Cytokine wie TNF α oder Interleukine (IL-8, IL-6, IL-2) ausgeschüttet. Ist die ROS-Bildung so stark, dass die Abwehrsysteme der Zelle oder Gewebe versagen, ist es nicht auszuschließen, dass eine Reaktion der Radikale mit Makromolekülen der Zellen stattfindet, die negative Folgen hat.^[64] Nach Instillation oder Inhalation von CNTs oder TiO₂ in hohen Dosen wurde die Bildung von Fibrosen und bronchialer Granuloma beobachtet, welche die Lungenfunktionalität der Versuchstiere sehr beeinträchtigten.^[26,65–70] Während die Lungenfunktion und Langzeit-Entzündungsreaktionen ausschließlich im Tierversuch getestet werden können, ist der oxidative Stress nur *in vitro* nachweisbar. Ebenfalls sei an dieser Stelle nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche und Wirkungen ausnahmslos im Hochdosisbereich durchgeführt bzw. beobachtet wurden (vgl. Abschnitt 7.2).

4.1.2. Das Faser-Paradigma

Lange und steife Fasern können im Gegensatz zu sphärischen Partikeln nicht ohne weiteres über den mukoziliären Reinigungsmechanismus aus der Lunge geschafft werden. Insbesondere Fasern, die länger als 20 μm sind sowie einen Durchmesser kleiner als 3 μm haben und außerdem biopersistente sind (z. B. Asbestfasern), können nicht mehr von Makrophagen phagozytiert werden^[71] und lösen in der Lunge Entzündungen, Fibrose und auch Krebs aus (Abbildung 8).^[72] Ein- und mehrwandige Kohlenstoff-Nanoröhren (CNTs) werden vermehrt in verschiedensten Anwendungen in der Materialwissenschaft eingesetzt. Sie haben große Aufmerksamkeit wegen ihrer gesundheitlichen Bedenklichkeit erlangt, welche mit ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu Asbest begründet wird.^[65,69,73–78] In einer Studie an Mäusen

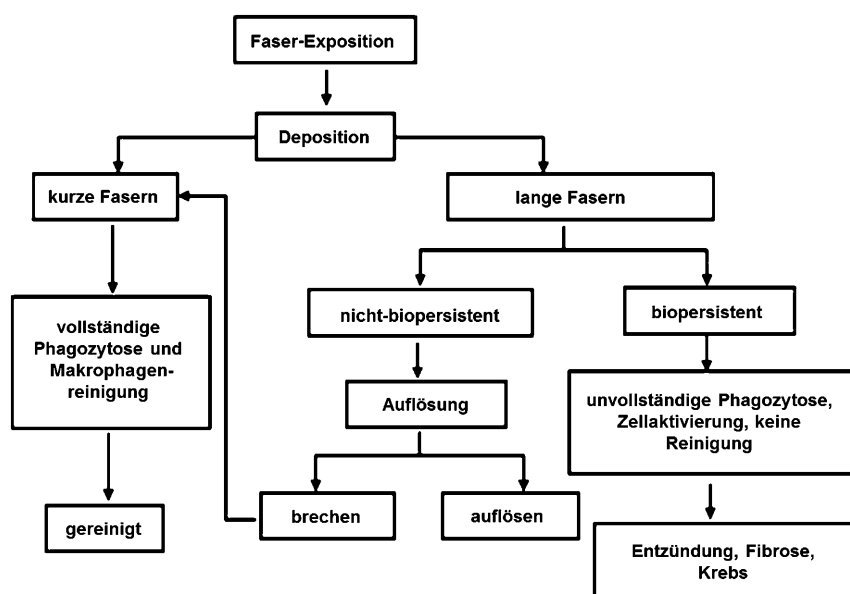


Abbildung 8. Das Faser-Paradigma. Abdruck nach Lit. [84] mit Genehmigung von Oxford University Press.

konnte gezeigt werden, dass nur CNTs, die sehr lang ($> 20 \mu\text{m}$) und sehr dick ($> 80 \text{ nm}$) sind, nach Einspritzen in die Bauchhöhle asbestähnliche Gewebeveränderungen induzierten.^[77] Die gleiche Studie zeigte auch, dass die kürzeren, „verknäulten“ CNTs keine solche Reaktion auszulösen vermochten. In-vitro-Studien bestätigten, dass die Art, wie die CNTs suspendiert wurden, einen direkten Einfluss auf ihre Toxizität hat.^[79] Demgegenüber gibt es einige Hinweise, dass heutige industriell hergestellte CNTs nur eine geringe akute Toxizität aufweisen.^[80–83]

Ob das Faser-Paradigma über der chemischen Zusammensetzung der Fasern steht, muss mit weiteren anorganischen Fasern sicher noch verifiziert werden.

4.2. Wirkung von Nanoobjekten auf die Haut

Die hohen Schutzfaktoren von Sonnencremes werden durch Zugabe von beschichteten Titan- oder Zinkoxidnanopartikeln erzielt, die als UV-Absorber dienen. Im Sinne der Vorsorge werden auch andere Nanomaterialien wie CNTs,^[85] Silbernanopartikel,^[38, 86] Quantenpunkte^[36, 87, 88] oder Aluminium^[89] auf ihre mögliche toxische Wirkung überprüft, wobei immer zu beachten ist, ob diese Materialien auch die Hornschicht des *Stratum corneum* in ausreichender Weise penetrieren können. Vermehrt werden Fullerene (C_{60}) als Radikalfänger in Kosmetika beigemischt (Vitamin C60 BioResearch Corporation; siehe <http://www.vc60.com/>). Diese lipophilen Partikel können in die Epidermis penetrieren, wurden aber nicht in der Dermis gefunden.^[43, 90]

4.2.1. Effekte in der Haut und auf Hautzellen

Etliche In-vivo-Studien (zusammengefasst in Lit. [34, 91]) zeigen, dass weder nanoskaliges TiO_2 ^[92, 93] oder ZnO ^[94–96] noch lipophile C_{60} -Fullerene^[43, 97] eine Irritation der Haut oder Zeichen einer allergischen Reaktion auslösen, auch wenn jüngst nachgewiesen wurde, dass Zn^{2+} aus ZnO -haltigen Sonnencremes in den Körper gelangen kann.^[98] Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Reihe von In-vitro-Studien, die mit menschlichen Hautzellen (Keratinocyten) oder Bindegewebezellen (Fibroblasten) durchgeführt wurden. So wurde für hohe Dosen von Nano- TiO_2 (Größen zwischen 3 und 10 nm) eine Aufnahme und eine signifikante Reduktion der Zellfunktion bestimmt.^[68, 93] Einmal in die Zelle aufgenommen,^[99] können ein- oder mehrwandige CNTs zytotoxische Reaktionen in Keratinocyten auslösen, z.B. oxidativen Stress,^[100] die Produktion von Entzündungsfaktoren induzieren^[101, 102] oder sogar Zelltod (Apoptose oder Nekrose) verursachen.^[103] Einige Studien weisen darauf hin, dass speziell sehr kleine Nanopartikel aus TiO_2 oder ZnO eine photokatalytische Wirkung haben und dadurch in den obersten Hautschichten die Produktion von freien Radikalen induzieren, welche die DNA schädigen^[104–106] oder die Zellfunktion mindern können.^[68, 107] Die Diskrepanz zwischen Ergebnissen aus In-vivo- und In-vitro-Studien liegt darin, dass die meisten Nanopartikel kaum durch die Hornschicht der Haut dringen. Diese Vermutung wird durch den Fakt gestärkt, dass erst wenn CNTs oder „hat-stacked“-Nanofasern

subkutan in Ratten implantiert werden, diese eine Granuloma-bildende Reaktion auslösen.^[108, 109]

Das Penetrationsvermögen und die Wirkung von Nanopartikeln auf geschädigte, kranke oder verletzte Haut kann sicher erheblich höher sein, als bei gesunder Haut und muss von Fall zu Fall separat abgeklärt werden (ausführlich zusammengefasst in Lit. [35]).

4.3. Auswirkungen von Nanoobjekten auf das Darmepithel

Inhalation und Ingestion werden als die zwei wichtigsten Eintrittspforten für Nanoobjekte angesehen. Ein Großteil der inhalierten Nanoobjekte wird über den mukoziliären Reinigungsmechanismus aus der Lunge transportiert und danach verschluckt, wobei sie den Magen-Darm-Trakt erreichen.^[31] Das Darmepithel ist von einem Mucus (Glycoproteine) überzogen, der von Goblet-Zellen sezerniert wird und zum Schutz des Epithels vor Proteasen und Magensäure dient.^[33]

Es ist davon auszugehen, dass die Nahrungsmittelindustrie die Möglichkeiten der Nanotechnologie vermehrt nutzen wird, z.B. in der Neukonzeption von Verpackungen oder im Nahrungsergänzungsmittelbereich. Mikroformulierungen von Titandioxid oder Silica sind unbedenklich und werden seit Jahrzehnten als Aufheller oder Rieselhilfen eingesetzt und sind zugelassene E-Stoffe.^[110] Die Verpackungsfolien mit multifunktionellen Eigenschaften werden zusätzlich mit Silicaten ausgerüstet, um den Gasaustausch zu verhindern, oder mit Silbernanopartikeln versehen, um die Lebensmittel länger frisch zu halten. Im Sinne der Vorsorge und der Sicherheit von nanotechnologischen Anwendungen werden immer mehr Nanomaterialien auf ihre Toxizität auch für den Magen-Darm-Trakt überprüft. Bis heute ist nach wie vor unklar, wie viele Partikel über den Magen-Darm-Trakt in den Blutstrom gelangen können. Frühe In-vivo-Arbeiten mit ^{14}C -markierten Fullerenen oder ^{192}Ir -Nanopartikeln kamen zu dem Ergebnis, dass nur ein sehr geringer Anteil der verabreichten Partikel adsorbiert wurde und keine akut toxischen Effekte auftraten.^[46, 111] Für In-vitro-Studien wird hauptsächlich die menschliche Darmadenokarzinoma-Zelllinie Caco-2 verwendet. Eine vergleichende Arbeit zeigt eine akute Zytotoxizität und Genotoxizität für ZnO , TiO_2 und SiO_2 bei relativ hoher Konzentration von $80 \mu\text{g cm}^{-2}$ Monoschicht.^[112] Die Anzahl publizierter Arbeiten in diesem Bereich ist sehr gering und kann daher sicherlich nicht die Grundlage für eine abschließende Beurteilung sein.

4.4. Materialeigenschaften und Wirkung

Für die toxikologische Betrachtung von Partikeln wurde und wird bisher als Parameter die Massedosis als Bewertungsgrundlage verwendet. In Deutschland ist von der MAK-Kommission der DFG als Grenzwert für eine Arbeitsplatzbelastung für die lungengängige Fraktion (R) (früher „Feinstaub“ (F)) eine Obergrenze von 1.5 mg m^{-3} und für die inhalierbare Fraktion (I) (früher „Gesamt-Staub“ (G)) eine Konzentration von 4 mg m^{-3} festgesetzt worden. Wie aus Abbildung 11 (siehe Abschnitt 5.2) ersichtlich ist, verändern

sich bei gleicher Masse wichtige Parameter der Partikel, wenn diese verkleinert werden.

Seit nunmehr 10 Jahren ist in der Diskussion, ob die Masse als Kriterium für eine Nanopartikelbelastung geeignet ist, oder ob nicht besser die Anzahl oder die Oberflächendosis verwendet werden sollte. Dafür spricht, dass für das Auftreten von Entzündungsmarkern in der Lunge eine lineare Korrelation zur spezifischen Gesamtoberfläche von TiO_2 -Partikeln unterschiedlicher Größe, nach Verabreichung an Ratten und Mäusen, aufgezeigt werden konnte.^[113] Eine vergleichbare Beziehung zwischen Größe und Wirkung konnte in vitro an Lungenzellen für unterschiedlich große Vanadiumoxidpartikel,^[114] in vivo für Nickel^[115] als auch für verschieden große Kohlenstoffpartikel aus Verbrennungsprozessen^[116] bestätigt werden. Aus diesen Resultaten kann abgeleitet werden, dass die Größe bzw. die totale Oberfläche gemessen in $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ nicht nur ein wichtiger Parameter für die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Nanomaterials ist, sondern auch für dessen Wirkungen in biologischen Systemen als Prädiktor verwendet werden kann. Mit dieser Hypothese geht einher, dass Modifikationen an der Oberfläche von Nanoobjekten direkte Auswirkungen auf die Toxizität dieser Materialien haben. Für funktionalisierte CNTs konnte gezeigt werden, dass mit steigender Zahl der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche pro CNT, in diesem speziellen Fall handelt es sich um Phenyl- SO_3H -Gruppen, die Zytotoxizität stetig sank.^[117] Die gleiche Tendenz wurde auch für funktionalisierte Fullere beobachtet.^[118] Die sehr toxischen Quantenpunkte aus CdSe müssen zum Schutz der biologischen Matrix mit einer Schicht aus biokompatiblen Material umhüllt werden. Für ein solches Material wurde demonstriert, dass die biologische Wirkung von der Hülle stark beeinflusst wird, während der Transport bzw. die Aufnahme in die Zellen davon völlig unabhängig war.^[119]

An dieser Stelle wollen wir aber auch darauf hinweisen, dass dieser einfache Bezug zwischen Größe und Wirkung nicht für alle Materialien gilt, denn es gibt Beispiele, die entweder eine Unabhängigkeit von der Größe belegen bzw. sogar berichten, dass die größeren Partikel toxischer sein können. In diesem Zusammenhang zeigten Warheit et al., dass TiO_2 unabhängig von der Größe, aber abhängig von der Form und der Kristallinität wirken kann,^[120] und Quarz ebenfalls von der Oberflächendosis unabhängig wirkt.^[121] Für Nickelferritpartikel gilt diese Regel offensichtlich genau umgekehrt, denn große Partikel sind in neuronalen Zellkulturen erheblich wirksamer als Nanopartikel desselben Materials.^[122]

Die in diesem Abschnitt dargestellten biologischen Interaktionen von Nanopartikeln mit Zellen, Organen oder Organismen fassen die wichtigsten Studienergebnisse zusammen, können und wollen aber nicht den Anspruch auf Vollständigkeit erfüllen – das würde den Umfang dieses Aufsatzes sprengen. Was aus allen zitierten Studien aber prinzipiell deutlich wird, ist die Tatsache, dass nur dann Wirkungen nachgewiesen werden konnten, wenn die Dosis oder Konzentrationen im hohen bis sehr hohen Bereich lagen. Daher sind die Ergebnisse nur unter mechanistischen Aspekten relevant, haben aber für den Arbeitsplatz oder die Umwelt nur eine untergeordnete Bedeutung. Da neue, syn-

thetische Nanopartikel noch nicht in relevanten Mengen in die Umwelt gelangen, sind auch so gut wie keine epidemiologischen Daten dazu verfügbar, und es wird nach wie vor auf die umweltrelevanten Feinststäube zurückgegriffen.^[60]

5. Die drei Prinzipien der Nanotoxikologie

An dieser Stelle wollen wir der Frage nachgehen, ob es an der Nanotoxikologie tatsächlich etwas Spezielles gibt. Wenn die spezifischen Wege der Aufnahme (Abschnitt 4) und das Besondere der Nanomaterialien an sich in Betracht gezogen werden, ist es durchaus anzunehmen, dass daraus auch besondere Mechanismen resultieren können, die in biologischen Systemen eine Rolle spielen. Es sind drei Prinzipien, die wir identifiziert haben, die für Nanopartikel bzw. Nanomaterialien etwas Besonderes darstellen und somit durchaus dem Begriff „Nanotoxikologie“ eine Berechtigung geben.

5.1. Transportprinzip

Das erste und auch wahrscheinlich wichtigste dieser Prinzipien ist das Transportprinzip, das auch als „Trojanisches-Pferd-Prinzip“ bezeichnet werden könnte. Das Grundprinzip ist schon in früheren Arbeiten zur Partikeltoxizität beschrieben worden, die den Prozess der Phagozytose als Ausgangspunkt einer toxischen Wirkung von Nickel- und Zinkverbindungen ausgemacht haben (siehe Übersicht in Lit. [123]). Dies wird für Nanopartikel dadurch erweitert, dass nicht nur der Prozess der Phagozytose von Bedeutung ist, sondern auch alle anderen Aufnahmemechanismen dafür verantwortlich gemacht werden können, dass Metalle, Metalloide oder andere partikuläre Systeme in Nanogröße in eine Zelle hineingelangen^[62] und dort auf verschiedene Weise zu einer biologischen Reaktion führen (Abbildung 9). Dabei können die Partikel unter 100 nm Durchmesser so gut wie mit allen Vesikeltransportwegen in die Zelle gelangen,^[124–127] allerdings werden auch weitere Möglichkeiten in Betracht gezogen. So ist beschrieben, dass Nanopartikel über direkte Rezeptorbindung in die Zelle gelangen^[128–131] oder sogar durch die Plasmamembran hindurch „diffundieren“ können, was auch als adhäsive Interaktion bezeichnet wird.^[25,126,132] Einen Beweis für diese Art von Aufnahme lieferten Gehr et al., die mit Erythrozyten zeigen konnten, dass Nanopartikel in das Zellinnere gelangen, während großen Partikeln dies nicht gelingt.^[132] Dies ist insofern erstaunlich, da Erythrozyten über keine konventionellen Aufnahmemechanismen mehr verfügen.

Egal auf welchem Weg die Nanopartikel aber in die Zellen gelangen können, ist der Vorgang tatsächlich dem Trojanischen Pferd sehr vergleichbar, da mit dieser Einschleusung eines Partikels in das Zellinnere ein ganzes „Paket“ eines Materials abgeliefert wird (Abbildung 10). Dabei macht es zusätzlich durchaus einen Unterschied, nach welchem Mechanismus die Nanopartikel in die Zelle gelangen. Eine Aufnahme über vesikuläre Prozesse bedeutet, dass die Partikel von einer Membranhülle umgeben sind (z.B. Caveolae), während der freie Transport durch die Membran

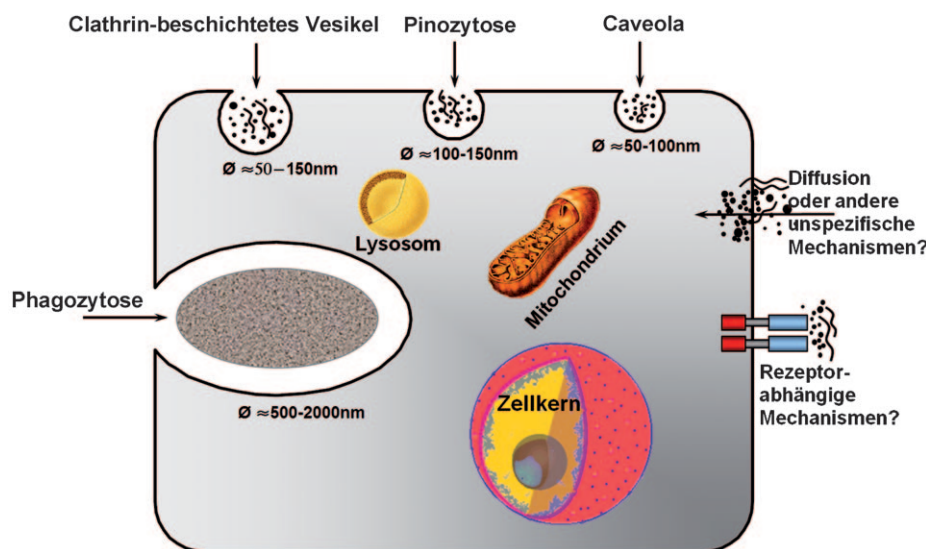


Abbildung 9. Mögliche Aufnahmekanäle für Nanopartikel in Zellen. Anders als größere Partikel (> 500 nm), die ausschließlich über Phagozytose aufgenommen werden können, können Nanopartikel unterschiedliche Transportmechanismen verwenden, um in die Zelle zu gelangen. Abdruck nach Lit. [133].

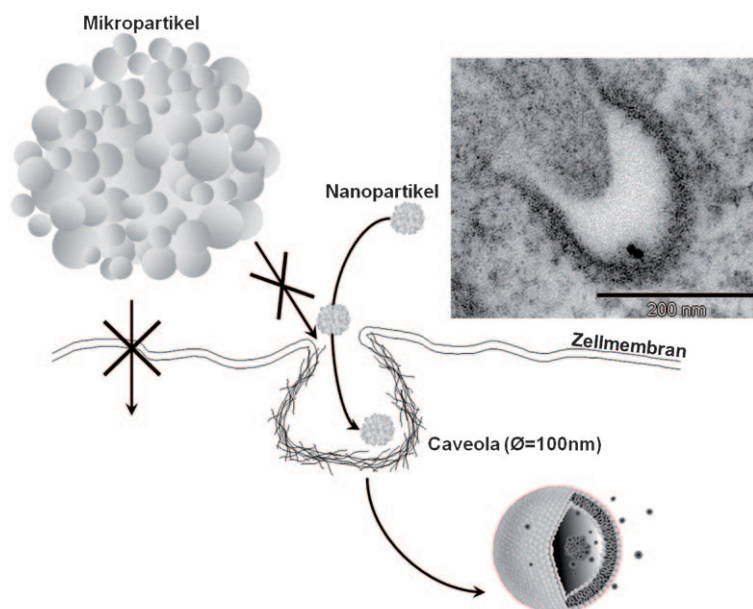


Abbildung 10. Vergleich von Nanopartikeln und großen Partikeln bei der Aufnahme durch vesikuläre Strukturen (Caveolae). Nur die Partikel mit einem Durchmesser deutlich kleiner als 100 nm gelangen in eine sich formende Caveola und können damit in die Zelle transportiert werden. Entsteht im Zellinneren aus den Vesikeln ein Lysosom, können sich Materialien wie ZnO auflösen und Ionen in das Zytoplasma abgeben (blau dargestellt). Das TEM-Bild rechts verdeutlicht, dass dieser Aufnahmeweg tatsächlich auch in lebenden Zellen eine Rolle spielt. Deutlich sind zwei Nanopartikel in einem sich bildenden Vesikel zu erkennen.

den direkten Kontakt der Partikel zu den Plasmaproteinen und anderen Molekülen der Zelle zulassen würde, was deutlich kritischer zu beurteilen wäre. Die Aufnahme von Nanopartikeln kann für die Zelle durchaus fatale Folgen haben, wenn es sich bei dem Material z.B. um ein unverträgliches Metall handelt und/oder sich das Material unter physiologi-

schen Bedingungen löst. Auch hier soll ein Beispiel diesen Zusammenhang verdeutlichen. Zink ist ein essenzielles Element, das wir täglich mit der Nahrung aufnehmen müssen, da speziell unser Immunsystem, aber auch jede andere Körperzelle, davon eine gewisse Menge benötigt, um so wichtige Vorgänge wie die Genregulation zu steuern.^[134] Bekommt eine Zelle aber zuviel davon, so gerät ihre Steuerung außer Kontrolle und sie stirbt ab, indem sie den „programmierten Selbstmord“, die Apoptose, inszeniert.^[135] Ein mittleres Nanopartikel bestehend aus Zinkoxid mit einem Durchmesser von 10–50 nm enthält zwischen 50 000 und 8 Millionen Zinkatomen. Bei einem typischen Zellvolumen von ca. 500 Femtolitern würden diese Mengen bei einer gleichmäßigen

Verteilung in der Zelle einer Konzentration von 150 nm bis 25 μM entsprechen. Da aber Konzentrationen über 100 μM bereits schädlich sein können, deponiert schon eine kleine Anzahl Nanopartikel eine toxische Menge an Zink in der Zelle, wenn die Nanopartikel sich auflösen. Tatsächlich ist dies auch nachweisbar und konnte gerade für Zinkoxid-Nanopartikel bereits bestätigt werden.^[127,136,137]

Das Transportprinzip erklärt, dass insbesondere Materialien, die für sich genommen bereits eine gewisse Toxizität haben, gerade in Nanogröße besonders kritisch sein können, da die Verteilung in einer partikulären Form häufig weniger kontrolliert wird als der Transport einzelner Moleküle, deren Aufnahme in die meisten Körperzellen sehr genau reguliert wird.

5.2. Oberflächenprinzip

Partikel, die sich nicht lösen, sondern für lange Zeit stabil also biopersistente sind und möglicherweise in Zellen akkumulieren, können dagegen auf andere Weise „aktiv“ werden, und damit sind wir beim zweiten Prinzip, dem Oberflächenprinzip. Vergleichen wir Partikel unterschiedlicher Größe miteinander, so verändern sich mit dem Durchmesser auch die Oberfläche und das Volumen eines Partikel (Abbildung 11). Wird der Durchmesser um den Faktor 10 verkleinert (im Beispiel von 1 μm zu 100 nm), dann wird die Oberfläche um den Faktor 100, das Volumen um den Faktor 1000 kleiner. Soweit ist dies reine Mathematik – es wird aber ein biologisch wichtiger Faktor, da wir bei der toxikologischen Testung einer Substanz oder eines Materials

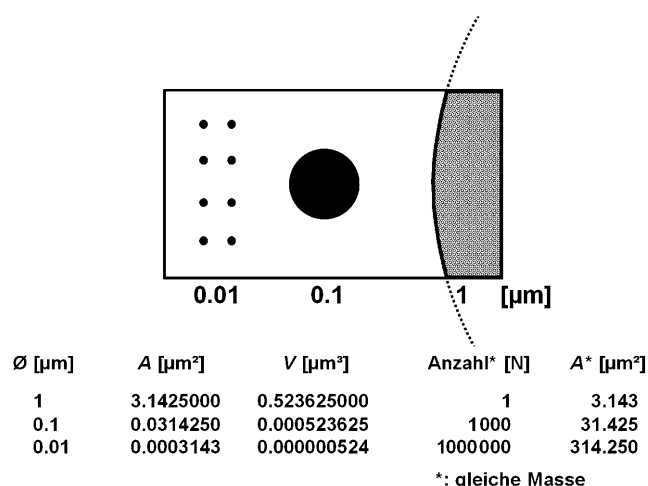


Abbildung 11. Vergleich von Partikeln mit unterschiedlichem Durchmesser in Bezug auf Oberfläche und Volumen. Auf der rechten Seite sind die Anzahl sowie die spezifische Oberfläche der Partikel bezogen auf die gleiche Massekonzentration angegeben.

bisher die Masse als Maß der Wirkung zugrunde legen (Dosis-Wirkungs-Beziehungen). Wenn wir hier ein ganz bestimmtes Material einsetzen, davon aber Partikel mit den drei verschiedenen Durchmessern von 1 µm, 100 nm und 10 nm verwenden, so erhöht sich bei gleicher Masse die spezifische Oberfläche der eingesetzten Partikel für jeden Schritt um den Faktor 10 und die Anzahl der einzelnen Partikel sogar um den Faktor 1000 je Dezimalschritt (Abbildung 11). Was bei der Katalyse oder anderen chemischen Reaktionen durch die Verkleinerung der Partikel dazu führt, dass die Reaktionen besser oder schneller ablaufen, führt im biologischen System zu einer erhöhten Reaktivität mit Zellen oder deren Komponenten.

Als Partner stehen bei kleineren Partikeln erheblich mehr Atome auf der Oberfläche der Partikel zur Verfügung und damit ist auch eine wesentlich bessere Interaktion mit der Umgebung möglich. Die Abbildung 12 verdeutlicht, dass sich ab 100 nm und kleiner ein deutlicher, weil exponentiell steigender Anteil der beteiligten Atome oder Moleküle eines Partikels an dessen Oberfläche befindet. Dadurch können positive (z.B. antioxidative Wirkung, Transportfunktion für

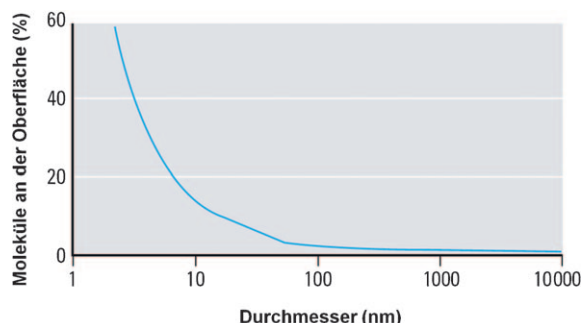


Abbildung 12. Prozentanteil der an der Oberfläche befindlichen Moleküle als Funktion der Partikelgröße und des Gesamt-molekülgehalts. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [29].

Therapeutika) wie negative Wirkungen (z.B. oxidative Wirkung, Protein-Bindung) erheblich verstärkt werden.

Dieser Sachverhalt wurde bereits vor Jahren von Nel et al. in einem beachtenswerten Beitrag zur Toxizität von Nanomaterialien beschrieben^[64] und inzwischen nochmals aktualisiert.^[138] Es wurde verdeutlicht, dass die Kleinheit gleichzeitig auch bedeuten kann, dass neben der großen Zahl an vorhandenen Reaktionspartnern an der Oberfläche auch Oberflächeneffekte (wie Kristallgitterdefekte) wegen der enormen Krümmung der Partikel oder die auf physikalische Effekte zurückzuführende Absorption von Photonen eine chemische Reaktion herbeiführen können. So kann die Energie, die im Partikel aufgenommen und gespeichert wird, über die Bildung von Radikalen oder den Abbau von Kohlenwasserstoffen wieder abgegeben werden (Abbildung 13). Außerdem fungieren Moleküle, die von der gleichen Größenordnung wie Proteine sind, auch als direkte Bindungspartnern, die an der Oberfläche adsorbieren können.^[139,140] Dies könnte zur Inaktivierung (d.h. Hemmung) oder anderen Veränderungen der Proteine führen.

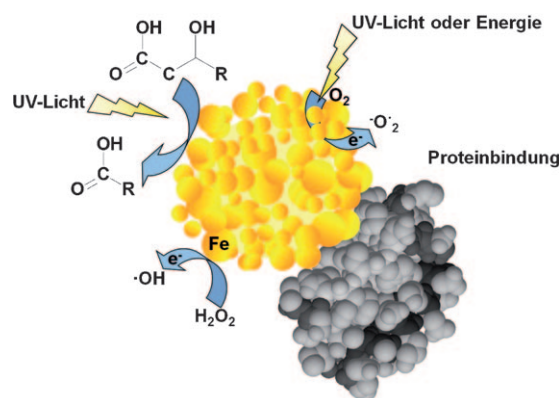


Abbildung 13. Oberflächenreaktivität von Nanopartikeln. Kristalline Strukturen oder Quanteneffekte bewirken eine Energieabsorption und -weitergabe, was zur Bildung von Radikalen führen kann, den Abbau von Kohlenwasserstoffen katalysiert oder eine Bindung an Makromoleküle wie Proteine unterstützt. Diese Reaktionen können sich nachteilig auf die Physiologie einer Zelle auswirken.

Mehrere Studien haben in der Vergangenheit einen solchen Zusammenhang mit der Größe der Partikel herstellen können. So konnten Oberdörster et al. in Versuchen mit Mäusen und Ratten zeigen, dass TiO₂-Partikel in direkter Abhängigkeit der spezifischen Oberfläche eine entzündliche Reaktion in der Lunge auslösen,^[113] und Stöger et al. haben die gleichen Verhältnisse für Verbrennungspartikel beobachtet.^[116] Weitere Studien haben dies im Inhalationsversuch für verschiedene große Nickelpartikel^[115] und andere Materialien beschrieben.^[141] Zusätzlich konnte für Polystyrolpartikel,^[142] Kohlenstoffpartikel, CNTs^[143,144] SiO₂-Partikel^[51] und Vanadiumoxide^[114] ein solcher größenabhängiger Effekt in Zellkulturen oder auch im Tierversuch nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die Reaktivität der Partikel ein wichtiger Faktor, der auch direkt von der spezifischen Oberfläche abhängt. Dies konnte z.B. für TiO₂,^[70,145] Kupfer^[146] und Quarz^[147] gezeigt werden. Dennoch bleiben hier auch

Widersprüche offensichtlich, da Effekte auch unabhängig von der Größe auftreten.^[120,121]

Die physikalischen Merkmale der Nanopartikel haben somit einen erheblichen Anteil an den möglichen Auswirkungen auf lebende Systeme. Jedoch können auch die chemischen Eigenschaften ganz beträchtlichen Einfluss auf die Wirkungsstärke haben, wie Arbeiten von Karlsson et al. deutlich machen.^[148] Diese Arbeit offenbart ganz unterschiedliche Größenabhängigkeiten der Toxizität. So können die kleineren Partikel (CuO) oder aber auch die größeren (TiO₂) toxischer sein, oder aber ein anderes Material hat überhaupt keine unterschiedliche Wirkung, egal in welcher Größe es appliziert wird (Eisenoxide). Damit sind wir beim dritten Prinzip der Nanotoxikologie, dem Materialprinzip.

5.3. Materialprinzip

Nahezu alle Materialien wie Metalle, Metalloxide, Polymere, Kohlenstoff usw. können in Form von Nanoobjekten hergestellt werden. Meist geht dies mit neuen chemischen oder physikalischen Eigenschaften des Materials einher, Eigenschaften, die häufig durch die Besonderheit der Oberfläche der kleinen Teilchen, Fasern oder Plättchen bestimmt sind, aber auch von der niedrigen Zahl der darin enthaltenen Atome oder Moleküle abhängig sein können. Dabei spielt es für biologische Systeme, die mit diesen Materialien in Kontakt kommen, durchaus eine große Rolle, aus welchem Material diese kleinsten Teilchen bestehen, völlig unabhängig davon, dass diese die gleiche Größe oder Form haben. So haben Nanoobjekte aus Zinkoxid ganz andere Wirkungen als vergleichbare Metalloxide mit Eisen, Silicium, Aluminium, Cer oder anderen Elementen.^[22,149,150] Damit wird aber außerdem deutlich, dass die Kleinheit an sich zwar nach dem ersten Prinzip (Transportprinzip) von gesundheitlicher Relevanz ist, dies aber nicht hinreichend ist, um auch wirklich eine nachteilige, nämlich toxische Wirkung zu haben. Dazu ist es außerdem notwendig, dass es sich zusätzlich um ein reaktives Teilchen handelt, d. h. auf der Oberfläche Reaktionen katalysiert werden oder ablaufen können (Abbildung 13) bzw. die Moleküle oder Atome sich aus dem Material herauslösen und dann für entsprechende Reaktionen in der Zelle sorgen können (Abbildung 14).

Ebenso offensichtlich ist es, wenn wir nicht nur verschiedene Materialien einer Größe vergleichen, sondern ein und dasselbe Material in verschiedenen Konformationen oder Modifikationen. Das beste Beispiel dafür ist Kohlenstoff, der in sehr unterschiedlichen Modifikationen vorkommt und in den verschiedenen Formen durchaus unterschiedliche Reaktionen biologischer Systeme hervorruft. So ist bisher für Diamant in Nanogröße keine nachteilige Wirkung gefunden worden,^[151,152] Industrieruß (carbon black) zeigt hingegen meist biologische Wirkungen, wenn auch häufig nur in relativ hohen Konzentrationen,^[22,141,144] Fullerene scheinen eher ohne Wirkung zu bleiben (insbesondere wenn auf eine lösungsmittelfreie Suspension geachtet wird),^[153,154] während CNTs je nach Länge^[77] oder Aggregationsstatus^[79] gesundheitlich relevante Wirkungen auslösen können. Dabei können aber auch kontaminierende Substanzen, wie die katalytisch

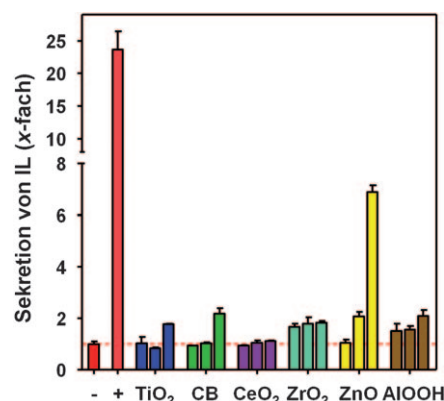


Abbildung 14. Vergleich der biologischen Wirkung von Nanopartikeln unterschiedlicher Zusammensetzung (Ø: TiO₂ 10–20 nm; Industrieruß (CB; carbon black) 15 nm; CeO₂ 20 nm; ZrO₂ 10–25 nm; ZnO 40 nm; AlOOH 40 nm). Gezeigt ist die Bildung eines Entzündungsmarkers (Interleukin-8) als Vielfaches der Kontrolle (—: unbehandelt) in menschlichen Lungenzellen (A 549). Als Positivkontrolle wurde Tumornekrosefaktor α (+: 1 ng mL⁻¹ TNF- α) als Stimulus verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen waren für jedes Material von links nach rechts 0,5, 5 und 25 $\mu\text{g cm}^{-2}$ Zellkulturoberfläche (Ergebnisse vom Projekt NanoCare, siehe auch Lit. [6,22]).

bei der Synthese eingesetzten Metalle, eine Reaktion von Zellen herbeiführen.^[80,81] Diese wenigen Beispiele, die noch vielfach weitergeführt werden könnten, verdeutlichen die Wichtigkeit der Materialeigenschaften, der Zusammensetzung, aber auch der Verunreinigungen.

5.4. Drei Prinzipien – viele Möglichkeiten

Die hier vorgestellten drei grundsätzlichen Regeln der Nanotoxikologie könnten tatsächlich so etwas wie die Grundlage für die spezifischen Reaktionen bzw. Interaktionen zwischen Nanomaterialien/Nanoobjekten und biologischen Systemen darstellen. Die Kombination aller drei Prinzipien führt dazu, dass jedes Nanoobjekt für sich betrachtet werden muss, d. h., Größe, Form, Oberfläche und Zusammensetzung sind maßgeblich für die mögliche biologische Wirkung verantwortlich und müssen für jedes Material eigens betrachtet werden, wenn es um die Beurteilung seiner möglichen Toxizität geht. Wir befinden uns daher in der Situation, dass wir, ähnlich der Beurteilung von chemischen Substanzen, die Nanomaterialien von Fall zu Fall testen müssen, was ja auch grundsätzlich einen Sinn ergibt, da Nanomaterialien im Grunde genommen eine spezielle Form von Chemikalien sind.

6. Nationale und internationale Aktivitäten zur Sicherheitsforschung

Die Chancen, die mit den Entwicklungen neuer Materialien einhergehen, sind frühzeitig erkannt worden, und weltweit gibt es eine Vielzahl von Programmen, die Finanzmittel für die Erforschung neuer Anwendungen zur Verfügung stellen. Die Prognosen gehen von enormen Steige-

rungsraten für die Produktion von Nanopartikeln und anderen Nanomaterialien aus, was letztlich auch die Wahrscheinlichkeiten steigen lässt, das Mensch und Umwelt mit diesen Materialien in Berührung kommen. Bereits frühzeitig haben sich daher verschiedene Institute und Forschergruppen Gedanken darum gemacht, was notwendig ist, um der Herausforderung zu begegnen, dass die Zahl der verschiedenen Materialien steigt, deren mögliche gesundheitliche Auswirkungen nicht ausreichend bekannt sind. Daher werden seit vielen Jahren auch Projekte auf nationaler und internationaler Ebene gefördert, um für die biologisch-toxikologischen Aspekte der Nanotechnologie ein ausreichendes Wissen zur Verfügung zu haben. Verschiedene Arbeitsgruppen sind der Meinung, dass kaum eine andere Technologieentwicklung so intensiv durch eine weltweite Forschung zu den einhergehenden Risiken begleitet wurde. Seit Jahren existieren Aktionspläne in verschiedenen Ländern, der EU und den USA, die sich der Nachhaltigkeit der Nanotechnologieentwicklung widmen (siehe Anhang, Aktionspläne). Neben diesen Aktivitäten sind weltweit verschiedene Institutionen häufig im Auftrag und mit Förderung verschiedener Regierungen tätig, um Datenbanken zu etablieren (DaNa, NanoTrust, Safenano, Woodrow Wilson, ICON usw.), Methoden zu evaluieren (IANH, OECD) und Wissen in Form von Konferenzen, Workshops und Summerschools auszutauschen. Speziell in Deutschland ist eine Kommission der Regierung eingesetzt worden (Nanokommission, siehe www.bmu.de/nanokommission/), die sich sowohl mit den Aspekten der Chancen und Nutzung, aber auch mit den möglichen negativen Folgen beschäftigt und dringenden Forschungsbedarf aufdeckt. In der Schweiz ist durch die Bundesämter für Umwelt und für Gesundheit ein Vorsorgeraster etabliert worden, das insbesondere durch Hersteller und Handel verwendet werden soll, um die eigenen Sicherheitsbedürfnisse zu erkennen.

7. Schlussfolgerungen und Empfehlungen

Die Entwicklung neuer Nanomaterialien wird immer intensiver vorangetrieben. Begleitend dazu steigt die Zahl der Publikationen, die sich mit den möglichen negativen Auswirkungen beschäftigen. Die bisher bereits zahlreich erschienenen Resultate sind leider aus verschiedenen Gründen nur begrenzt für eine Risikoabschätzung geeignet. Dies ist z. B. dadurch bedingt, dass es bisher keine ausreichende Standardisierung der Materialien gab (ISO TC229 publizierte erst im Jahre 2008 die Definitionen von Nanomaterialien),^[155,156] Referenzmaterialien, wie wir diese schon vor einigen Jahren gefordert haben,^[83] erst jetzt zur Verfügung stehen (NIST: <http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/>; IRMM: http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/index.htm) und die notwendigen angepassten Methoden nach wie vor nicht etabliert sind. Vorschläge für eine Verbesserung dieser Situation wurden jüngst in verschiedenen Übersichtsartikeln gemacht.^[6,157] Dennoch bleibt festzustellen, dass die bisher eingesetzten Methoden häufig fehlerbehaftet sind, was an einigen Beispielen für sehr wichtige Resultate erläutert werden soll.

7.1. Unzuverlässige Methoden (fehlende Verlässlichkeit)

Vor Jahren bereits konnte nicht nur in unseren Labors gezeigt werden, dass verschiedene Nanomaterialien, insbesondere Kohlenstoff-Nanoröhren, mit den Testreagentien interagieren können und damit die Ergebnisse sowohl falsch-positiv als auch falsch-negativ sein können. So konnten wir nachweisen, dass ein viel genutzter Test für Zellkulturen (MTT-Assay) nicht oder nur sehr schwierig auswertbar ist, wenn Zellen mit CNTs behandelt werden.^[83,158] Diese Ergebnisse wurden von anderen Gruppen bestätigt, die zusätzlich für weitere Farbstoffe festgestellt haben, dass diese in den Testverfahren an CNTs binden und dadurch das Ergebnis verfälscht werden kann.^[159,160] Mit hoher Wahrscheinlichkeit gibt es noch weitere ähnliche Interaktionen von Nanomaterialien mit den Analyten in verschiedenen Testverfahren. Eine solche Interaktion muss daher für eine zuverlässige Testung bereits im Vorfeld abgeklärt werden. Ein anderes Beispiel betrifft den Einfluss von Kontaminanten bzw. Suspensionshilfen, die manchmal toxischer sein können als das zu untersuchende Nanomaterial. Für Fullerene wurde publiziert, dass diese in Daphnien als auch in Fischen toxisch wirken und vor allem Lipidperoxidation auslösen.^[161,162] Nach Überprüfung der Methoden sowohl durch die Autoren selbst^[163] sowie durch andere Arbeitsgruppen^[154,164,165] wurde klar, dass hier Peroxide aus dem Lösungsmittel Tetrahydrofuran am Werk waren, während Peroxid-freie Suspensionen von Fullerenen keine toxischen Effekte mehr hervorriefen.

7.2. Unrealistische Versuchsbedingungen – No-Effect-Studien

Ein weiteres Beispiel betrifft unspezifische Wirkungen von Partikeln auf die Lunge bzw. auch in vitro auf Zellkulturen durch zu hohe Dosierungen. Diese werden eingesetzt, um überhaupt eine Wirkung nachweisen zu können. Leicht erkennbar ist dies an der vor mehr als 10 Jahren durchgeführten Studie von Roller et al.^[166] Im vergangenen Jahr neu publiziert, besagt sie mehr oder weniger, dass alle dort verwendeten „Nanopartikel“ eine tumorinduzierende Wirkung in der Lunge haben.^[167] Bei der Diskussion der Ergebnisse blieb aber völlig unberücksichtigt, dass alle Experimente dieser Studie im „Overload-Bereich“ durchgeführt wurden. Schon vor fast 20 Jahren wurde beschrieben, dass für die Rattenlunge eine Überladung bei ca. 3 mg Material als Einzeldosis pro Lunge beginnt,^[168] und diese Konzentration ist bei allen Materialien der Studie von Roller et al. erheblich überschritten worden. Da die meisten Materialien bei zytotoxisch hohen Dosen gesundheitliche Wirkungen bis hin zur Tumorinduktion auslösen, liegt hier kein „nanospezifischer“ Effekt vor.

Ähnlich gelagert ist die Studie zur Wirkung von CNTs.^[67] Die Autoren beschreiben die sehr wichtige Beobachtung, dass CNTs nach Inhalation bis in die tiefen Bereiche der Lunge gelangen und dort in den subpleuralen Bereich des Gewebes vorstoßen können, was in der gegenwärtigen Diskussion um eine asbestähnliche Wirkung der CNTs von großer Bedeutung ist. Allerdings konnten die Autoren diesen Effekt nur finden, wenn sie die Tiere mit 30 mg m⁻³ für 6 h behandelten,

einer Konzentration, die dem 20fachen des Grenzwertes für lungengängigen Feinstaub am Arbeitsplatz entspricht. Eine niedrigere Konzentration von 1 mg m^{-3} hatte dagegen keine solche Wirkung. Es stellt sich daher die Frage nach der Sinnhaftigkeit solcher Hochdosisversuche, die keine echte Aussage zum Wirkmechanismus der Materialien zulassen. Dennoch macht gerade die aktuelle Studie zu den CNTs in der Lunge auch deutlich, welche grundsätzliche Schwierigkeit die Nanotoxikologen haben. Die niedrigere Dosierung induziert eventuell nur deshalb keinen Effekt, weil die Expositionszeit zu kurz war. Die Behandlungszeiten von Zellen in vitro sind generell sehr eingeschränkt, aber auch in Tierversuchen ist ein direkter Bezug zur realen Situation des möglicherweise über Monate oder Jahre hinweg exponierten Menschen nur schwer herzustellen, auch wenn es Daten aus 5-Tage- oder 90-Tage-Expositionsstudien gibt.^[6] Neben der Verbesserung bzw. Anpassung der In-vitro-Methoden muss für zukünftige Projekte auch gefordert werden, dass den Langzeitversuchen erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt wird.

Das bringt zum Schluss aber auch noch die Frage nach „No-Effect-Studien“ auf. Wissenschaftliche Publikationen sind selbstverständlich gefordert, Wirkungen und Mechanismen zu publizieren, die den allgemeinen Kenntnisstand erweitern helfen. Die internationale Gemeinschaft der Nanotoxikologen ist sich aber jüngst bei zwei großen internationalen Tagungen darüber einig geworden, dass viele Studien mit Nanomaterialien keinen Effekt/Mechanismus finden werden und aus diesem Grund nicht zur Publikation akzeptiert werden. Damit werden jedoch wichtige Informationen nicht bekannt gemacht, und die Experimente werden unter Umständen in verschiedenen Labors mehrfach wiederholt. Um nun den Einsatz von Personal und finanziellen Mitteln für diese Wiederholungen eventuell einsparen zu können, haben sich die Herausgeber dreier Fachzeitschriften bereit erklärt (*Nanotoxicology*, Vicki Stone; *Journal of Nanoparticles Research*, Enrico Traversa; *Particle and Fibre Toxicology*, Paul Borm), auch „No-Effect-Studien“ wie die gerade erschienene zu publizieren.^[82] Die Gemeinschaft der Nanotoxikologen ist sich dabei der Tatsache sehr wohl bewusst, dass damit nicht die Tür geöffnet werden soll, dass nun jede Studie mit Nanomaterialien, egal ob eine Wirkung zu beobachten ist oder nicht, gleichermaßen publiziert werden kann oder soll. Die Ansprüche an die Qualität eben jener „No-Effect-Studien“ sollten mindestens ebenso hoch, wenn nicht höher sein als bei Studien, die eine Wirkung aufzeigen. Dies ist aber nur möglich, wenn die Herausgeber und ihr Team von Gutachtern zumindest einen Teil der im nächsten Abschnitt aufgeführten Empfehlungen berücksichtigen.

7.3. Empfehlungen

Seit fast 2 Jahrzehnten werden Nanomaterialien, speziell Nanopartikel, auf ihre möglichen negativen Effekte auf die Gesundheit des Menschen getestet. Medizinische Anwendungen wie z.B. Drug-Targeting-Systeme werden schon länger untersucht. Trotzdem ist das Wissen um die Toxikologie der Nanomaterialien noch lückenhaft, und die Gründe dafür haben wir oben ausführlich erläutert. Um jedoch für die

Zukunft einen nennenswerten Beitrag zur Verbesserung dieser Situation zu liefern, wäre es ganz besonders wichtig, die Qualität und die Verlässlichkeit von Studien zu verbessern. Regierungsnahe wie Nichtregierungsorganisationen (NGOs), Journalisten, Stakeholder oder auch die Öffentlichkeit können kaum einschätzen, ob eine Publikation, die in einer sehr guten Zeitschrift veröffentlicht wurde, richtig oder falsch, gut oder schlecht, wichtig oder irrelevant ist. Sie müssen sich darauf verlassen können, dass das wissenschaftliche Begutachtungssystem für eine ausreichende Qualität bei den Studien sorgt. Dazu wäre es aber aktuell unabdingbar, dass zwei Aspekten Rechnung getragen wird:

- Für die untersuchten Nanomaterialien muss eine ausreichende Charakterisierung in die Studien mit eingeschlossen werden, wie dies schon früher gefordert worden ist.^[169–171]
- Es müssen ausreichend Informationen geliefert werden, dass die verwendeten Methoden valide und für diese Untersuchungen geeignet sind.

Solange diese beiden Vorbedingungen nicht ausreichend erfüllt sind, solange der Leser einer Studie nicht nachvollziehen kann, welches Material nun genau getestet wurde, welche Methode wie eingesetzt wurde und ob die so wichtigen Negativ- wie Positivkontrollen mitgeführt wurden, solange werden wir immer wieder dieselben Studien wiederholen müssen. Die fehlende Verlässlichkeit der publizierten Daten führt weiterhin dazu, dass oft berechtigte Zweifel erhoben werden können und damit die Grundlage für eine wirkliche Beurteilung der biologischen Wirkungen von Nanomaterialien fehlt. Daher fassen wir an dieser Stelle nochmals die Ergebnisse verschiedener Diskussionsgruppen zusammen (DECHEMA, Nanokommission, SCENIHR, IRGC, NanoDialog usw.), die sich für einen minimalen Satz von charakterisierten Eigenschaften der Nanomaterialien ausgesprochen haben, welcher zu jeder Studie dazu geliefert werden muss. Dieser Satz sollte Angaben zu folgenden Eigenschaften beinhalten:

- Chemische Zusammensetzung \Leftrightarrow Reinheit \Leftrightarrow Kontaminationen
- Partikelgröße und Größenverteilung
- Spezifische Oberfläche
- Morphologie (kristallin/amorph, Form)
- Oberflächenchemie, Beschichtung, Funktionalisierung
- Ausmaß der Agglomeration/Aggregation bzw. Partikelgrößenverteilung unter experimentellen Bedingungen (z.B. Medium mit oder ohne Proteine)
- Wasserlöslichkeit (Unterscheidung zwischen löslichen, metastabilen und biopersistenten Nanomaterialien)
- Oberflächenreaktivität und/oder Oberflächenladung (Zeta-Potenzial)

Zusätzlich könnte für ökotoxikologische Fragestellungen noch der Octanol-Wasser-Koeffizient von Bedeutung sein. Ebenfalls wichtig ist die Information, wie diese Parameter erfasst wurden, weshalb diese immer in der Sektion „Material & Methoden“ aufgeführt sein sollten.

Neben der Charakterisierung sind aber weitere wichtige Angaben zur Methodik notwendig, um eine Studie richtig

einschätzen zu können. Hierzu gehören nicht nur unserer Meinung nach die folgenden Punkte:

- Eingesetzte Mengen (Konzentration/Dosis) in mehr als einer Einheit (vgl. Lit. [157]); Angabe in: $\mu\text{g mL}^{-1} \Leftrightarrow \mu\text{g cm}^{-2} \Leftrightarrow N(\text{Partikel})/\text{Zelle} \Leftrightarrow \text{pg}/\text{Zelle}$.
- Dosierungen im Tierversuch sollten klar als „Overload“- und „Nicht-Overload“-Experimente kenntlich gemacht werden. Overload-Experimente sollten nach Möglichkeit ganz vermieden werden, da sie keine eindeutigen Aussagen erlauben.
- Für jeden biologischen Endpunkt sollten mindestens zwei verschiedene Tests eingesetzt werden, um Kreuzreaktionen auszuschließen.
- Speziell Untersuchungen zur Gentoxizität sollten nicht mit zytotoxischen Konzentrationen durchgeführt werden, da unspezifische Reaktionen der Zelle (z. B. Apoptose) ebenfalls zu DNA-Schäden führen. In jeder Studie zur Gentoxizität sollten daher Daten zu Dosis-Wirkungs-Beziehungen der akuten toxischen Wirkungen mit angegeben werden (vgl. OECD-Richtlinien für Genotox-Testung, Punkt 3 bei den Overload-Bedingungen).
- Eine Interaktion der Nanomaterialien mit dem Testsystem sollte immer mit untersucht und nach Möglichkeit ausgeschlossen werden.^[83, 169, 172]
- Für ökotoxikologische Studien sind zusätzlich der Aufnahmepfad und die richtige Wahl des Organismus zu beachten.^[173]

Wenn wir als Autoren, Gutachter und Herausgeber diese Punkte für die zukünftigen Publikationen nicht beachten und weiterhin ungeeignete Manuskripte zur Veröffentlichung zulassen, sind wir nicht in der Lage

- Studien auf einem internationalen Niveau zu vergleichen,
- biologische Effekte mit der nötigen Verlässlichkeit zu diskutieren,
- die Öffentlichkeit, Stakeholder oder NGOs zu überzeugen, dass ein bestimmtes Nanomaterial unbedenklich ist oder nicht.

Wir rufen daher die Gutachter und Herausgeber dazu auf, Manuskripte, die diese Punkte nicht beachten, nicht zur Publikation zuzulassen bzw. die dazu notwendigen Experimente oder Angaben noch vor der Publikation einzufordern.

Anhang: Internetseiten zur Sicherheit von Nanomaterialien

Aktionspläne

- Aktionsplan der Bundesrepublik Deutschland, BMBF (2007): http://www.bmbf.de/pub/nano_initiative_action_plan_2010.pdf
- Aktionsplan des Österreichischen Bundesministeriums für Verkehr, Innovation und Technologie (BMVIT; 2009): http://www.bmvit.gv.at/innovation/iktnano/nano_aktionsplan.html
- Aktionsplan der Schweiz zur Nanotechnologie (2007): <http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00228/00510/index.html?lang=de>

- European strategy for nanotechnology and the nanotechnology Action Plan (EU, 2004): <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/actionplan.htm>
- National Nanotechnology Initiative (NNI, USA), founded 2001: <http://www.nano.gov/>

Datenbanken

- European Nanotechnology Gateway: <http://nanoforum.org>
- European Union funded Projects (6th and 7th Framework): <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/src/safety.htm>
- Institut für Technikfolgen-Abschätzung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (2007): <http://nanotrust.ac.at/>
- International Council on Nanotechnology (ICON): <http://cohesion.rice.edu/centersandinst/icon/index.cfm>
- International Organization for Standardization (ISO), TC229 on Nanotechnology (2005): http://www.iso.org/iso/standards_development/technical_committees/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=381983
- Nanotechnology Industries Association (NIA, 2005): <http://www.nanotechia.org/news/global/open-access-database-to-facilitate-the-safe-use-of>
- OECD Safety of Manufactured Nanomaterials: http://www.oecd.org/departement/0,3355,en_2649_37015404_1_1_1_1,1,00.html
- Safety of Nanoparticles Interdisciplinary Research Centre (SnIRC, 2004): <http://www.safenano.org/>
- Woodrow Wilson Inventories: <http://www.nanotechproject.org/>

Projekte

- DaNa (2009) Erfassung, Bewertung und breitenwirksame Darstellung von gesellschaftlich relevanten Daten und Erkenntnissen zu Nanomaterialien: <http://www.nanopartikel.info/>
- International Alliance for NanoEHS Harmonization (2008): <http://www.nanoehsalliance.org/sections/Home>
- NanoDerm (2008): <http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/>
- NanoCare (2009): <http://www.nanopartikel.info/> (Vorläuferseite vom Projekt DaNa)
- Project on Emerging Nanotechnologies Woodrow Wilson International Center for Scholars (2005): http://www.wilsoncenter.org/index.cfm?fuseaction=topics.home&topic_id=166192
- Tracer (2009): <http://www.nano-tracer.de/>

Wir danken allen Kollegen, von denen wir graphisches Material verwendet haben, sowie B. Bänziger für die Unterstützung bei der Erstellung der Graphiken. H.F.K. dankt dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung in den Projekten NanoCare (BMBF; FKZ 03X0021A) und DaNa (BMBF; FKZ 03X0075A). H.F.K. und P.W. danken der Europäischen Union für die Unterstützung der Projekte NanoMMUNE (FKZ 214281) und Nano-

ImpactNet (FKZ 218539) sowie dem Förderprogramm CCMX und den Schweizer Bundesämtern für Umwelt und für Gesundheit für die Unterstützung des Projektes VIGO. Ein besonderer Dank gilt David Vaughn an der Universität Manchester für seinen wichtigen Input zum Vorkommen natürlicher Nanopartikel in der Umwelt. Wichtige Grundlagen für diesen Aufsatz entstammen aus den folgenden Arbeitsgruppen: dem DECHEMA-Arbeitskreis „Responsible Production and Use of Nanomaterials“, der AG02 der Nanokommission der deutschen Bundesregierung in der ersten Runde, dem Projekt NanoDialog in Deutschland und der Schweiz, der Begleitgruppe zum Aktionsplan der Schweiz sowie weiteren Gruppierungen, deren Mitgliedern wir an dieser Stelle ausdrücklich für den vielfachen Input danken.

Eingegangen am 19. Februar 2010,
veränderte Fassung am 10. September 2010
Online veröffentlicht am 11. Januar 2011

- [1] „Late Lessons from Early Warnings: The Precautionary Principle 1896–2000“: P. Harremoes, D. Gee, M. MacGarvin, A. Stirling, A. Keys, B. Wynne, S. G. Vaz, Environmental Issue Report 22, European Environment Agency, Kopenhagen, **2001**.
- [2] J. Panyam, M. M. Dali, S. K. Sahoo, W. Ma, S. S. Chakravarthi, G. L. Amidon, R. J. Levy, V. Labhasetwar, *J. Controlled Release* **2003**, 92, 173–187.
- [3] M. Auffan, J. Rose, J. Y. Bottero, G. V. Lowry, J. P. Jolivet, M. R. Wiesner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 634–641.
- [4] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1402–1437; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1362–1395.
- [5] K. Riehemann, S. Schneider, T. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 886–913; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 872–897.
- [6] R. Landsiedel, L. Ma-Hock, A. Kroll, D. Hahn, J. Schneckenburger, K. Wiench, W. Wohlleben, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 2601–2627.
- [7] S. Baker, G. Baker, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 6876–6896; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 38, 6726–6744.
- [8] H. F. Krug, S. Diabaté, J. M. Wörle-Knirsch, S. Mühlhopt, H. R. Paur, *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* **2007**, 42, 4–14.
- [9] T. A. Kuhlbusch, S. Neumann, H. Fissan, *J. Occup. Environ. Hyg.* **2004**, 1, 660–671.
- [10] N. C. Mueller, B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 4447–4453.
- [11] M. F. Hochella, Jr., S. K. Lower, P. A. Maurice, R. L. Penn, N. Sahai, D. L. Sparks, B. S. Twining, *Science* **2008**, 319, 1631–1635.
- [12] N. Solovitch, J. Labille, J. Rose, P. Chaurand, D. Borschneck, M. R. Wiesner, J. Y. Bottero, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 4897–4902.
- [13] M. R. Wiesner, G. V. Lowry, K. L. Jones, M. F. Hochella, Jr., R. T. Di Giulio, E. Casman, E. S. Bernhardt, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 6458–6462.
- [14] N. S. Wigginton, K. L. Haus, M. F. Hochella, Jr., *J. Environ. Monit.* **2007**, 9, 1306–1316.
- [15] T. Hartung, *Nature* **2009**, 460, 208–212.
- [16] H. F. Krug, *Nachr. Chem.* **2003**, 51, 1241–1246.
- [17] H. F. Krug, A. Grunwald in *Assessment and Perspectives of Nanotechnology*, Bd. 27 (Hrsg.: H. Brune, H. Ernst, A. Grunwald, W. Grunwald, H. Hofmann, P. Janich, H. F. Krug, M. Mayor, G. Schmid, U. Simon, V. Vogel), Springer, Berlin **2006**, S. 325–394.
- [18] P. J. Borm, D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. B. Warheit, E. Oberdörster, *Part. Fibre Toxicol.* **2006**, 3, 11.
- [19] J. S. Tsuji, A. D. Maynard, P. C. Howard, J. T. James, C. W. Lam, D. B. Warheit, A. B. Santamaria, *Toxicol. Sci.* **2006**, 89, 42–50.
- [20] A. Helland, M. Scheringer, M. Siegrist, H. G. Kastenholz, A. Wiek, R. W. Scholz, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 640–646.
- [21] J. Wang, G. Zhou, C. Chen, H. Yu, T. Wang, Y. Ma, G. Jia, Y. Gao, B. Li, J. Sun, Y. Li, F. Jiao, Y. Zhao, Z. Chai, *Toxicol. Lett.* **2007**, 168, 176–185.
- [22] NanoCare (2009) Health related Aspects of Nanomaterials. Final Scientific Report (Hrsg.: T. Kuhlbusch, H. F. Krug, K. Nau), Dechema, **2009**, ISBN: 978-3-89746-108-6.
- [23] P. H. Hoet, A. Nemmar, B. Nemery, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 19.
- [24] P. Gehr, M. Bachofen, E. R. Weibel, *Respir. Physiol.* **1978**, 32, 121–140.
- [25] M. Geiser, B. M. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schurch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, H. Im, V. J. Heyder, P. Gehr, *Environ. Health Perspect.* **2005**, 113, 1555–1560.
- [26] W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, J. Seitz, W. Scymczak, A. Wenk, P. Mayer, S. Takenaka, G. Oberdörster, *Inhalation Toxicol.* **2009**, 21, 55–60.
- [27] P. J. Borm, D. Müller-Schulte, *Nanomedicine* **2006**, 1, 235–249.
- [28] G. Oberdörster, Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, C. Cox, *Inhalation Toxicol.* **2004**, 16, 437–445.
- [29] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.* **2005**, 113, 823–839.
- [30] H. Brune, H. Ernst, A. Grunwald, W. Grunwald, H. Hofmann, P. Janich, H. F. Krug, M. Mayor, G. Schmid, U. Simon, V. Vogel, *Nanotechnology – Assessment and Perspectives*, Springer, Berlin, **2006**.
- [31] G. Oberdörster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, H. Yang, *Part. Fibre Toxicol.* **2005**, 2, 8.
- [32] G. Oberdörster, A. Elder, A. Rinderknecht, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, 9, 4996–5007.
- [33] H. Lippert, *Lehrbuch Anatomie*, 5. Aufl., Urban & Fischer, München **2000**, S. 803.
- [34] M. Crosera, M. Bovenzi, G. Maina, G. Adami, C. Zanette, C. Florio, F. Filon Larese, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2009**, 82, 1043–1055.
- [35] G. J. Nohynek, J. Lademann, C. Ribaud, M. S. Roberts, *Crit. Rev. Toxicol.* **2007**, 37, 251–277.
- [36] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere, *Toxicol. Sci.* **2006**, 91, 159–165.
- [37] B. Baroli, M. G. Ennas, F. Loffredo, M. Isola, R. Pinna, M. A. Lopez-Quintela, *J. Invest. Dermatol.* **2007**, 127, 1701–1712.
- [38] F. F. Larese, F. D’Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi, G. Maina, *Toxicology* **2009**, 255, 33–37.
- [39] J. G. Rouse, J. Yang, J. P. Ryman-Rasmussen, A. R. Barron, N. A. Monteiro-Riviere, *Nano Lett.* **2007**, 7, 155–160.
- [40] S. S. Tinkle, J. M. Antonini, B. A. Rich, J. R. Roberts, R. Salmen, K. DePree, E. J. Adkins, *Environ. Health Perspect.* **2003**, 111, 1202–1208.
- [41] H. C. Korting, H. Zienecke, M. Schäfer-Korting, O. Braun-Falco, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, 39, 349–351.
- [42] F. Netzlaß, M. Kaca, U. Bock, E. Haltner-Ukomadu, P. Meiers, C. M. Lehr, U. F. Schaefer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, 66, 127–134.
- [43] X. R. Xia, N. A. Monteiro-Riviere, J. E. Riviere, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, 242, 29–37.
- [44] G. Volkheimer, *Environ. Health Perspect.* **1974**, 9, 215–225.
- [45] G. M. Kanapilly, J. H. Diel, *Health Phys.* **1980**, 39, 505–519.
- [46] W. G. Kreyling, M. Semmler, F. Erbe, P. Mayer, S. Takenaka, H. Schulz, G. Oberdörster, A. Ziesenis, *J. Toxicol. Environ. Health* **2002**, 65, 1513–1530.

- [47] M. Rudin, R. Weissleder, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 123–131.
- [48] S. T. Reddy, A. J. van der Vlies, E. Simeoni, V. Angeli, G. J. Randolph, C. P. O'Neil, L. K. Lee, M. A. Swartz, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1159–1164.
- [49] B. Thiesen, A. Jordan, *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 467–474.
- [50] P. Wick, A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder-Althaus, L. Diener, P. A. Diener, A. Zisch, H. F. Krug, U. von Mandach, *Environ. Health Perspect.* **2009**, *118*, 432–436.
- [51] R. Wottrich, S. Diabaté, H. F. Krug, *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2004**, *207*, 353–361.
- [52] B. Rothen-Rutishauser, F. Blank, C. Mühlfeld, P. Gehr, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1075–1089.
- [53] R. Mallampati, R. R. Patlolla, S. Agarwal, R. J. Babu, P. Hayden, M. Klausner, M. S. Singh, *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 669–676.
- [54] A. Orthmann, R. Zeisig, T. Koklic, M. Sentjurs, B. Wiesner, M. Lemm, I. Fichtner, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *99*, 2423–2433.
- [55] P. Wick, A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder-Althaus, L. Diener, P. A. Diener, A. Zisch, H. F. Krug, U. von Mandach, *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 432–436.
- [56] B. Z. Simkhovich, M. T. Kleinman, R. A. Kloner, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52*, 719–726.
- [57] V. Stone, H. Johnston, M. J. Clift, *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2007**, *6*, 331–340.
- [58] A. Valavanidis, K. Fiotakis, T. Vlachogianni, *J. Environ. Sci. Health Part C* **2008**, *26*, 339–362.
- [59] H. E. Wichmann, *Inhalation Toxicol.* **2007**, *19*, 241–244.
- [60] I. Brüske-Hohlfeld, A. Peters in *Nanotechnology: Environmental Aspects*, Bd. 2 (Hrsg.: H. F. Krug), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 267–290.
- [61] L. Risom, P. Møller, S. Loft, *Mutat. Res.* **2005**, *592*, 119–137.
- [62] L. K. Limbach, P. Wick, P. Manser, R. N. Grass, A. Bruinink, W. J. Stark, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4158–4163.
- [63] T. Xia, M. Kovochich, J. Brant, M. Hotze, J. Sempf, T. Oberley, C. Sioutas, J. I. Yeh, M. R. Wiesner, A. E. Nel, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1794–1807.
- [64] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, *Science* **2006**, *311*, 622–627.
- [65] J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J. F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J. B. Nagy, D. Lison, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 221–231.
- [66] L. Müller, M. Riediker, P. Wick, M. Mohr, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, *J. R. Soc. Interface* **2009**, *7*, S27–S40.
- [67] J. P. Ryman-Rasmussen, M. F. Cesta, A. R. Brody, J. K. Shipley-Phillips, J. I. Everitt, E. W. Tewksbury, O. R. Moss, B. A. Wong, D. E. Dodd, M. E. Andersen, J. C. Bonner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 747–751.
- [68] C. M. Sayes, R. Wahi, P. A. Kurian, Y. Liu, J. L. West, K. D. Ausman, D. B. Warheit, V. L. Colvin, *Toxicol. Sci.* **2006**, *92*, 174–185.
- [69] A. A. Shvedova, E. R. Kisin, R. Mercer, A. R. Murray, V. J. Johnson, A. I. Potapovich, Y. Y. Tyurina, O. Gorelik, S. Arepalli, D. Schwegler-Berry, A. F. Hubbs, J. Antonini, D. E. Evans, B. K. Ku, D. Ramsey, A. Maynard, V. E. Kagan, V. Castranova, P. Baron, *Am. J. Physiol.* **2005**, *289*, L698–L708.
- [70] D. B. Warheit, T. R. Webb, K. L. Reed, S. Frerichs, C. M. Sayes, *Toxicology* **2007**, *230*, 90–104.
- [71] K. Donaldson, C. L. Tran, *Mutat. Res.* **2004**, *553*, 5–9.
- [72] G. Oberdörster, *Inhalation Toxicol.* **2002**, *14*, 29–56.
- [73] A. Helland, P. Wick, A. Koehler, K. Schmid, C. Som, *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 1125–1131.
- [74] C. W. Lam, J. T. James, R. McCluskey, R. L. Hunter, *Toxicol. Sci.* **2004**, *77*, 126–134.
- [75] A. D. Maynard, P. A. Baron, M. Foley, A. A. Shvedova, E. R. Kisin, V. Castranova, *J. Toxicol. Environ. Health* **2004**, *67*, 87–107.
- [76] N. A. Monteiro-Riviere, R. J. Nemanich, A. O. Inman, Y. Y. Wang, J. E. Riviere, *Toxicol. Lett.* **2005**, *155*, 377–384.
- [77] C. A. Poland, R. Duffin, I. A. Kinloch, A. D. Maynard, W. A. H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. MacNee, K. Donaldson, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 423–428.
- [78] D. B. Warheit, B. R. Laurence, K. L. Reed, D. H. Roach, G. A. Reynolds, T. R. Webb, *Toxicol. Sci.* **2004**, *77*, 117–125.
- [79] P. Wick, P. Manser, L. K. Limbach, U. Dettlaff-Weglikowska, F. Krumeich, S. Roth, W. J. Stark, A. Bruinink, *Toxicol. Lett.* **2007**, *168*, 121–131.
- [80] V. E. Kagan, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, N. V. Konduru, A. I. Potapovich, A. N. Osipov, E. R. Kisin, D. Schwegler-Berry, R. Mercer, V. Castranova, A. A. Shvedova, *Toxicol. Lett.* **2006**, *165*, 88–100.
- [81] K. Pulskamp, S. Diabate, H. F. Krug, *Toxicol. Lett.* **2007**, *168*, 58–74.
- [82] T. Thurnherr, D. Su, L. Diener, G. Weinberg, P. Manser, N. Pfänder, R. Arrigo, M. E. Schuster, P. Wick, H. F. Krug, *Nanotoxicology* **2009**, *3*, 319–338.
- [83] J. M. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp, H. F. Krug, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1261–1268.
- [84] K. Donaldson, R. J. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest, A. Alexander, *Toxicol. Sci.* **2006**, *92*, 5–22.
- [85] A. R. Murray, E. Kisin, S. S. Leonard, S. H. Young, C. Kommineneni, V. E. Kagan, V. Castranova, A. A. Shvedova, *Toxicology* **2009**, *257*, 161–171.
- [86] M. E. Samberg, S. J. Oldenburg, N. Monteiro-Riviere, *Environ. Health Perspect.* **2009**, *118*, 407–413.
- [87] L. W. Zhang, N. A. Monteiro-Riviere, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2008**, *21*, 166–180.
- [88] L. W. Zhang, W. W. Yu, V. L. Colvin, N. A. Monteiro-Riviere, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *228*, 200–211.
- [89] N. A. Monteiro-Riviere, S. J. Oldenburg, A. O. Inman, *J. Appl. Toxicol.* **2010**, *30*, 276–285.
- [90] S. Kato, H. Aoshima, Y. Saitoh, N. Miwa, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *104*, 483–487.
- [91] S. T. Stern, S. E. McNeil, *Toxicol. Sci.* **2008**, *101*, 4–21.
- [92] C. Bennat, C. C. Müller-Goymann, *Int. J. Cosmet. Sci.* **2000**, *22*, 271–283.
- [93] B. Kiss, T. Biro, G. Czifra, B. I. Toth, Z. Kertesz, Z. Szikszai, A. Z. Kiss, I. Juhasz, C. C. Zouboulis, J. Hunyadi, *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 659–667.
- [94] S. E. Cross, B. Innes, M. S. Roberts, T. Tsuzuki, T. A. Robertson, P. McCormick, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2007**, *20*, 148–154.
- [95] SCCNFP, European Commission, Brüssel, Belgien, **2003a**.
- [96] SCCNFP, European Commission, Brüssel, Belgien, **2003b**.
- [97] H. Aoshima, Y. Saitoh, S. Ito, S. Yamana, N. Miwa, *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34*, 555–562.
- [98] B. Gulson, M. McCall, M. Korsch, L. Gomez, P. Casey, Y. Oytam, A. Taylor, L. Kinsley, G. Greenoak, *Toxicol. Sci.* **2010**, *118*, 140–149.
- [99] L. W. Zhang, N. A. Monteiro-Riviere, *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 546–551.
- [100] A. A. Shvedova, V. Castranova, E. R. Kisin, D. Schwegler-Berry, A. R. Murray, V. Z. Gandelsman, A. Maynard, P. Baron, *J. Toxicol. Environ. Health* **2003**, *66*, 1909–1926.
- [101] N. A. Monteiro-Riviere, J. E. Riviere in *Proceedings – Nanotechnology and the Environment: Applications and Implications Progress, Review Workshop III*, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington, **2005**.
- [102] L. W. Zhang, L. Zeng, A. R. Barron, N. A. Monteiro-Riviere, *Int. J. Toxicol.* **2007**, *26*, 103–113.
- [103] F. Tian, D. Cui, H. Schwarz, G. G. Estrada, H. Kobayashi, *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 1202–1212.

- [104] R. Cai, Y. Kubota, T. Shuin, H. Sakai, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2346–2348.
- [105] R. Dunford, A. Salinaro, L. Cai, N. Serpone, S. Horikoshi, H. Hidaka, J. Knowland, *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 87–90.
- [106] N. Serpone, A. Salinaro, A. V. Emeline, S. Horikoshi, H. Hidaka, J. Zhao, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 970–981.
- [107] Z. Pan, W. Lee, L. Slutsky, R. A. Clark, N. Pernodet, M. H. Rafailovich, *Small* **2009**, *5*, 511–520.
- [108] Y. Sato, A. Yokoyama, K. Shibata, Y. Akimoto, S. Ogino, Y. Nodasaka, T. Kohgo, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, M. Ishiguro, R. Hatakeyama, F. Watari, K. Tohji, *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 176–182.
- [109] A. Yokoyama, Y. Sato, Y. Nodasaka, S. Yamamoto, T. Kawasaki, M. Shindoh, T. Kohgo, T. Akasaka, M. Uo, F. Watari, K. Tohji, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 157–161.
- [110] Q. Chaudhry, M. Scotter, J. Blackburn, B. Ross, A. Boxall, L. Castle, R. Aitken, R. Watkins, *Food Addit. Contam. Part A* **2008**, *25*, 241–258.
- [111] S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura, K. Kikuchi, S. Kananiishi, K. Sueki, H. Nakahara, S. Enomoto, F. Ambe, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 385–389.
- [112] K. Gerloff, C. Albrecht, A. W. Boots, I. Förster, R. P. F. Schins, *Nanotoxicology* **2009**, *3*, 355–364.
- [113] G. Oberdörster, J. N. Finkelstein, C. Johnston, R. Gelein, C. Cox, R. Baggs, A. C. Elder, *Acute Pulmonary Effects of Ultrafine Particles in Rats and Mice*, **2000**, 96. Cambridge, MA, Health Effects Institute. Research Report.
- [114] J. M. Wörle-Knirsch, K. Kern, C. Schleh, C. Adelhelm, C. Feldmann, H. F. Krug, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 331–336.
- [115] Q. Zhang, Y. Kusaka, X. Zhu, K. Sato, Y. Mo, T. Kluz, K. Donaldson, *J. Occup. Health* **2003**, *45*, 23–30.
- [116] T. Stoeger, S. Takenaka, B. Frankenberger, B. Ritter, E. Karg, K. Maier, H. Schulz, O. Schmid, *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 54–60.
- [117] C. M. Sayes, F. Liang, J. L. Hudson, J. Mendez, W. Guo, J. M. Beach, V. C. Moore, C. D. Doyle, J. L. West, W. E. Billups, K. D. Ausman, V. L. Colvin, *Toxicol. Lett.* **2006**, *161*, 135–142.
- [118] C. M. Sayes, J. D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A. M. Boyd, K. D. Ausman, Y. J. Tao, B. Sitharaman, L. J. Wilson, J. B. Hughes, J. L. West, V. L. Colvin, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1881–1887.
- [119] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere, *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 143–153.
- [120] D. B. Warheit, T. R. Webb, C. M. Sayes, V. L. Colvin, K. L. Reed, *Toxicol. Sci.* **2006**, *91*, 227–236.
- [121] D. B. Warheit, T. R. Webb, V. L. Colvin, K. L. Reed, C. M. Sayes, *Toxicol. Sci.* **2007**, *95*, 270–280.
- [122] H. Yin, H. P. Too, G. M. Chow, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5818–5826.
- [123] D. Beyersmann, A. Hartwig, *Arch. Toxicol.* **2008**, *82*, 493–512.
- [124] H. Jin, D. A. Heller, R. Sharma, M. S. Strano, *ACS Nano* **2009**, *3*, 149–158.
- [125] C. Schleh, C. Mühlfeld, K. Pulskamp, A. Schmiedl, M. Nassimi, H. D. Lauenstein, A. Braun, N. Krug, V. J. Erpenbeck, J. M. Hohlfeld, *Respir. Res.* **2009**, *10*, 90.
- [126] A. Simon-Deckers, B. Gouget, M. Mayne-L'hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud, M. Carriere, *Toxicology* **2008**, *253*, 137–146.
- [127] T. Xia, M. Kovochich, M. Liong, L. Madler, B. Gilbert, H. Shi, J. I. Yeh, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2008**, *2*, 2121–2134.
- [128] M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 469–478.
- [129] S. Kanno, A. Furuyama, S. Hirano, *Toxicol. Sci.* **2007**, *97*, 398–406.
- [130] S. Nagayama, K. Ogawara, K. Minato, Y. Fukuoka, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura, *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 192–198.
- [131] C. von zur Muhlen, D. von Elverfeldt, N. Bassler, I. Neudorfer, B. Steitz, A. Petri-Fink, H. Hofmann, C. Bode, K. Peter, *Atherosclerosis* **2007**, *193*, 102–111.
- [132] B. M. Rothen-Rutishauser, S. Schurch, B. Haenni, N. Kapp, P. Gehr, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 4353–4359.
- [133] H. F. Krug, K. Kern, J. M. Wörle-Knirsch, S. Diabate in *Nanomaterials – Toxicity, Health and Environmental Issues*, Bd. 5 (Hrsg.: C. Kumar), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 153–185.
- [134] Y. Choo, M. Isalan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 411–416.
- [135] H. Haase, W. Watjen, D. Beyersmann, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1227–1234.
- [136] X. Deng, Q. Luan, W. Chen, Y. Wang, M. Wu, H. Zhang, Z. Jiao, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 115101.
- [137] S. George, S. Pokhrel, T. Xia, B. Gilbert, Z. Ji, M. Schowalter, A. Rosenauer, R. Damoiseaux, K. A. Bradley, L. Madler, A. E. Nel, *ACS Nano* **2010**, *4*, 15–29.
- [138] T. Xia, N. Li, A. E. Nel, *Annu. Rev. Public Health* **2009**, *30*, 137–150.
- [139] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2050–2055.
- [140] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14265–14270.
- [141] C. Monteiller, L. Tran, W. MacNee, S. Faux, A. Jones, B. Miller, K. Donaldson, *Occup. Environ. Med.* **2007**, *64*, 609–615.
- [142] D. M. Brown, M. R. Wilson, W. MacNee, V. Stone, K. Donaldson, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *175*, 191–199.
- [143] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J. W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, L. Forro, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1121–1125.
- [144] T. M. Sager, V. Castranova, *Part. Fibre Toxicol.* **2009**, *6*, 15.
- [145] D. B. Warheit, K. L. Reed, C. M. Sayes, *Inhalation Toxicol.* **2009**, *21*, 61–67.
- [146] Z. Chen, H. Meng, G. Xing, C. Chen, Y. Zhao, G. Jia, T. Wang, H. Yuan, C. Ye, F. Zhao, Z. Chai, C. Zhu, X. Fang, B. Ma, L. Wan, *Toxicol. Lett.* **2006**, *163*, 109–120.
- [147] R. Duffin, L. Tran, D. Brown, V. Stone, K. Donaldson, *Inhalation Toxicol.* **2007**, *19*, 849–856.
- [148] H. L. Karlsson, J. Gustafsson, P. Cronholm, L. Moller, *Toxicol. Lett.* **2009**, *188*, 112–118.
- [149] T. J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink, W. J. Stark, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 4374–4381.
- [150] A. Gojova, B. Guo, R. S. Kota, J. C. Rutledge, I. M. Kennedy, A. I. Barakat, *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 403–409.
- [151] A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, S. E. Omac, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2–7.
- [152] S. Vial, C. Mansuy, S. Sagan, T. Irinopoulou, F. Burlina, J. P. Boudou, G. Chassaing, S. Lavielle, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2113–2119.
- [153] C. M. Sayes, A. A. Marchione, K. L. Reed, D. B. Warheit, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2399–2406.
- [154] P. Spohn, C. Hirsch, F. Hasler, A. Bruinink, H. F. Krug, P. Wick, *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1134–1139.
- [155] ISO (2008): Nanotechnologies – Terminology and Definitions for Nano-objects. Nanoparticle, Nanofibre and Nanoplate. ISO/TS 27687:2008.
- [156] ISO (2008): Nanotechnologies – Health and Safety Practices in Occupational Settings Relevant to Nanotechnologies. ISO/TR 12885:2008.
- [157] T. Hartung, *Altex* **2010**, *27*, 87–95.
- [158] L. Belyanskaya, P. Manser, P. Spohn, A. Bruinink, P. Wick, *Carbon* **2007**, *45*, 2643–2648.
- [159] A. Casey, E. Herzog, M. Davoren, F. M. Lyng, H. J. Byrne, G. Chambers, *Carbon* **2007**, *45*, 1425–1432.
- [160] N. A. Monteiro-Riviere, A. O. Inman, *Carbon* **2006**, *44*, 1070–1078.

- [161] E. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 1058–1062.
 - [162] E. Oberdörster, S. Zhu, T. M. Blickley, P. McClellan-Green, M. L. Haasch, *Carbon* **2006**, *44*, 1112–1120.
 - [163] S. Zhu, E. Oberdörster, M. L. Haasch, *Mar. Environ. Res.* **2006**, *62*, S5–S9.
 - [164] S. B. Lovern, R. Klaper, *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 1132–1137.
 - [165] M. Kovichich, B. Espinasse, M. Auffan, E. M. Hotze, L. Wessel, T. Xia, A. E. Nel, M. R. Wiesner, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 6378–6384.
 - [166] M. Roller, F. Pott, K. Kamino, G. H. Althoff, B. Bellmann, *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105*, 1253–1256.
 - [167] M. Roller, *Inhalation Toxicol.* **2009**, *21*, 144–157.
 - [168] B. Bellmann, H. Muhle, O. Creutzenberg, R. Mermelstein, *Environ. Health Perspect.* **1992**, *97*, 189–191.
 - [169] W. P. Gullledge, *Mutat. Res.* **2007**, *634*, 241–242.
 - [170] R. D. Handy, R. Owen, E. Valsami-Jones, *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 315–325.
 - [171] D. B. Warheit, *Toxicol. Sci.* **2008**, *101*, 183–185.
 - [172] M. A. Dobrovolskaia, D. R. Germolec, J. L. Weaver, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 411–414.
 - [173] R. Behra, H. F. Krug, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 253–254.
-