

**Ausgabe: Juni 2015**

Stand: Mai 2015

## **Beurteilungsmaßstab NanoGBS**

**Beurteilungsmaßstab für technisch gezielt hergestellte ultrafeine Stäube aus alveolengängigen granulären biobeständigen Stäuben ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (nanoskalige GBS) (A-Staub)**

### **Vorschlag eines Beurteilungsmaßstabes (BM)**

Für nanoskalige GBS (Primärpartikelgröße 1-100 nm) ergeben sich aus verschiedenen geeigneten Studien bei gleicher Ableitung (Schutz vor inflammatorischer Wirkung in der Lunge) Luftkonzentrationen zwischen 27 – 146  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , wenn in einem volumenorientierten Ansatz auf eine Agglomeratdichte von 1 normiert wird. Als Mediane und geometrische Mittelwerte liegen die Werte zwischen 52-81  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , wiederum bei Bezug auf eine Agglomeratdichte von 1  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Als Punktschätzwert wird ein BM von 75  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  vorgeschlagen. Vergleicht man Mediane und geometrische Mittelwerte der hier abgeleiteten Beurteilungsmaßstäbe mit den nach gleicher Methodik abgeleiteten AGW für mikroskalige GBS, so ergibt sich eine um den Faktor 4 höhere Wirkstärke für nanoskalige GBS. Geht man für nanoskalige GBS in der Praxis von einer mittleren Agglomeratdichte von 1,5  $\text{g}/\text{cm}^3$  aus, ergeben sich Beurteilungsmaßstäbe von 110-190  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Der erste Wert von 110  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  ergibt sich aus den oben genannten Ableitungen von BM, der zweite Wert von 190  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  ergibt sich aus dem geltenden A-Staub-Grenzwert unter Berücksichtigung einer um den Faktor 4 höheren Wirkstärke bei gleicher Dichte sowie einer Adjustierung auf die angenommene geringere (Agglomerat-)Dichte des arbeitsplatztypischen Staubanteils nanoskaliger GBS.

### **Vorschlag zur Umsetzung in der Praxis**

Bei den als Agglomeraten und Aggregaten vorkommenden mikroskaligen und nanoskaligen GBS wird vom gleichen Wirkprinzip ausgegangen. Daraus ergibt sich eine additive Wirkung. Diese Wirkungsadditivität ist relevant bei der Luftwerteableitung in der Praxis: für GBS-Stäube mit nano- und mikroskaligen Partikelanteilen ist daher der massenkonzentrationsgewichtete Mittelwert der Werte für herkömmliche (mikroskalige) GBS und für nanoskalige GBS als einzuhaltende Luftkonzentration abzuleiten.

Bei Tätigkeiten mit nanoskaligen GBS besteht der vorliegende A-Staub generell nicht komplett aus nanoskaligem Material. Parallel wird tätigkeitsbedingt immer ein mehr oder minder hoher Massenanteil an mikroskaligem A-Staub vorliegen. Aufgrund der sehr viel höheren Primärpartikelgröße erreicht der mikroskalige Staub in Bezug auf die gesamte A-Staub-Masse in der Luft rasch einen hohen Anteil. Leider liegen zu diesem Verhältnis bisher keine quantitativ belastbaren Daten vor noch lassen sich dazu routinemäßig Messungen vornehmen.

In der folgenden Tabelle 1 sind einige Beispiele für Beurteilungsmaßstäbe (BM) angegeben, die sich aus verschiedenen Massenanteilen von nano- und mikroskaligen GBS im A-Staub ergeben.

**Tabelle 1: Beurteilungsmaßstäbe (BM) für A-Staub in Abhängigkeit von den Massenanteilen nano-/mikroskaliger GBS**

Massenanteile (%)		BM ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
nanoskalig	mikroskalig	
0	100	1250 (Allgemeiner Staubgrenzwert (A-Staub))
100 (rein theoretischer Fall)	0	110-190
5	95	~820-980
10	90	~620-800
20	80	~400-590
30	70	~300-470

Für die Vielzahl von Tätigkeiten mit nanoskaligen GBS sowie auch für Tätigkeiten, bei denen ultrafeine Stäube tätigkeitsbedingt entstehen, kann man davon ausgehen, dass die Massenanteile nanoskaliger/ultrafeiner Staubanteile im A-Staub mit wenigen Prozent gering sind (Tabelle 1). In diesen Tätigkeiten erscheint es hinreichend, wenn der AGW für A-Staub von  $1,25 \text{ mg}/\text{m}^3$  eingehalten wird, da sich der abgeleitete massenkonzentrationsgewichtete Beurteilungsmaßstab quantitativ kaum erniedrigt. Bei wenigen Tätigkeiten, so zum Beispiel in der Herstellung von Nanomaterialien mit hohem oder ausschließlichem Anteil von Primärpartikeln im Bereich von 1-100 nm, können diese Massenanteile höher sein. Unter diesen Annahmen ist der in der BkGS 527 genannte Beurteilungsmaßstab von  $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  plausibel.

## Einführung

Gezielt hergestellte Nanomaterialien und andere ultrafeine Stäube<sup>1</sup>, die als granuläre<sup>2</sup> biobeständige Stäube angesehen werden, fallen zur Zeit nicht unter den allgemeinen Staubgrenzwert, weil für diese Stäube eine höhere Wirkstärke für die relevanten Gesundheitsgefahren angenommen wird (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2013, Oberdörster et al., 1992; 1994). Weiter wurde vermutet, dass diese Stäube aufgrund ihrer besonderen quantenchemischen Eigenschaften besondere Wirkungen besitzen könnten. Granuläre biobeständige Nanomaterialien können

<sup>1</sup> Nanomaterialien und ultrafeine Stäube setzen sich aus Primärpartikeln zusammen, die in einer Dimension  $< 100 \text{ nm}$  sind. Meist liegen sie in der Luft als größere Agglomerate oder Aggregate vor.

<sup>2</sup> Granulär wird hier in dem Sinne verstanden, dass ein granulärer Partikel ein Verhältnis von Länge zu Durchmesser von 3 zu 1 nicht überschreitet. Faserförmige Nanopartikel sollten einer gesonderten Beurteilung unterzogen werden.

unterteilt werden in Materialien, die eine spezifische Toxizität besitzen und solche, die keine über die Partikelwirkung hinausgehende spezifische Toxizität besitzen (AGS, 2011). Im Folgenden wird ein Vorschlag für eine Luftwerteableitung für letztere Gruppe, die granulären biobeständigen Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (nanoskalige GBS) in der Form von alveolengängigem (A-) Staub gemacht. Im Folgenden wird aus Gründen der Lesbarkeit der gekürzte Begriff nanoskalige GBS verwendet. Für nanoskalige GBS sind die ableitungsrelevanten toxikologischen Endpunkte nach Inhalation eine inflammatorische Wirkung in der Lunge. Wie bei mikroskaligen GBS ist das Ziel die Vermeidung von chronischen, partikelbedingten Entzündungsprozessen in der Lunge, womit auch gleichzeitig hieran gekoppelte pathologische Veränderungen, wie z.B. Fibrosen und die im Tierexperiment an Ratten beobachtete Entstehung von Lungentumoren verhindert werden („schwollenabhängiges“ Wirkprinzip). Eine Exposition gegenüber luftgetragenen freien vereinzelt Nanoprimärpartikeln ist auf der Basis des bisherigen Kenntnisstandes eher selten beziehungsweise kommen freie vereinzelt Nanopartikel nur zu sehr geringen Massenanteilen in Stäuben aus Nanomaterialien vor (AGS 2011). Dies liegt daran, dass Primärpartikel je kleiner sie sind und je höher ihre Konzentration ist, rasch und quasi quantitativ agglomerieren (Preining 1998). Unter realen Expositionsbedingungen ist damit eine Exposition gegenüber freien Nanoprimärpartikeln von untergeordneter Bedeutung. Weiter liegen bisher keine belastbaren Befunde vor, dass sich freie Primärpartikel generell anders im oder zum Organismus verhalten als ihre Agglomerate/Aggregate. Dies betrifft sowohl ihre Verteilung als auch ihre Wirkung (z.B. Landsiedel et al., 2012, Kreyling et al., 2013, Sung et al., 2009, Elder et al., 2006, Moreno-Horn und Gebel 2014). Es gibt keine Hinweise auf eine relevante chronische Wirkung luftgetragener freier Nanoprimärpartikel. Daher sind freie Nanoprimärpartikel in diese Bewertung einbezogen. Auch prozess- oder tätigkeitsbedingt entstehende Rauche (z.B. Schweissrauche) können freie und agglomerierte oder aggregierte Nanopartikel enthalten. Derartige Rauche können jedoch von der chemischen Zusammensetzung nicht als GBS angesehen werden und werden daher hier nicht betrachtet.

Nanomaterialien, für die der Beurteilungsmaßstab gelten soll, können z.B. aus folgenden Stoffen bestehen:

- Titandioxid
- Industrieruß (Carbon Black)
- Aluminiumoxyhydroxid ( $\gamma$ -AlO(OH), Boehmit)

Der Beurteilungsmaßstab gilt auch für Nanomaterialien, deren Oberfläche chemisch verändert wurde (Coating), wenn schlüssig belegt werden kann, dass sich dadurch keine wesentlichen Veränderungen der Toxizität ergeben. Inwieweit Anteile von nanoskaligen GBS den E-Staub-Wert in seiner Höhe beeinflussen, ist nicht Gegenstand dieser Begründung.

Der hier beschriebene Beurteilungsmaßstab gilt nicht für technisch hergestellte Nanomaterialien mit spezifischer Toxizität oder wenn stoffspezifische Daten zu einem abweichenden Grenzwert führen.

## Gentoxizität

Bei der Bewertung von nanoskaligen GBS war zum einen zu prüfen, ob eine gentoxische Wirkung, die bei mikroskaligen GBS bei der Grenzwertableitung keine Rolle spielt (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2013), vorliegt. Es liegen eine Reihe von Übersichtsartikeln zur Gentoxizität von Nanomaterialien vor (Magdolenova et al., 2014, Singh et al., 2009, Shi et al., 2013, Oesch und Landsiedel, 2012, Iavicoli et al., 2011, Kumar and Dhawan, 2013). Theoretisch könnten im Unterschied zu mikroskaligen GBS kleinere Agglomerate/Aggregate in Zielzellen der Kanzerogenese gelangen oder freie Nanoprimärpartikel, sofern diese überhaupt entstehen können, auch in den Zellkern gelangen. Die vergrößerte Oberfläche der nanoskaligen GBS könnte außerdem über eine erhöhte Oberflächenreaktivität das gentoxische Potenzial erhöhen (Schins and Knaapen, 2007, Singh et al., 2009, Gonzalez et al., 2008). Verschiedene Autoren konnten Nanopartikel in Zellkernen *in vitro* nachweisen (Feldherr and Akin, 1991, Jugan et al., 2011, Shukla et al., 2011, Hackenberg et al., 2011a), quantitative Auswertungen oder ein realistischer Bezug zu Luftkonzentrationen liegen dazu meist nicht vor. Bei humanen Zellen aus nasaler Mukosa, die *in vitro* mit nanoskaligem ZnO oder TiO<sub>2</sub> inkubiert wurden, wurden im Zellkern in 1,5% beziehungsweise 11% der Fälle Partikel im Zellkern gefunden (Hackenberg et al., 2010; 2011b). Die Inkubationsdosen waren in beiden Fällen nicht angegeben. Bei ZnO wurden 200 Zellen gezählt, für TiO<sub>2</sub> sind keine Angaben zur Zahl der untersuchten Zellen gemacht worden. Viele der Nanomaterialien liegen als Aggregate oder Agglomerate vor und zeigen keinen umfangreichen Zerfall in freie Nanopartikel (Creutzenberg et al., 2012, Eydner et al., 2012).

### *In vivo*

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die vorliegenden *in vivo* Studien zur Gentoxizität von nanoskaligen GBS (Titandioxid, Industrieruß und Aluminiumoxid). Es wurden verschiedene Endpunkte der Gentoxizität bei sehr unterschiedlichen Studienprotokollen geprüft. In der Tabelle sind Inhalations- bzw. Instillationsstudien sowie orale Studien (Schlundsonde, Trinkwasser) berücksichtigt. Studien mit intravenöser Verabreichung (z.B. Sadeghiani et al., 2005, Sadiq et al., 2012) wurden nicht einbezogen.

Generell zeigten die Tests eine negative oder nur schwach positive Wirkung bei teilweise hohen Dosierungen. Eine schwache Gentoxizität wird in einigen Studien über Entzündungsprozesse erklärt. Dies betrifft auch die Studien nach oraler Applikation. In den Experimenten von Trouiller et al. (2009) wurden bei einer oralen Applikation von 500 mg/kg TiO<sub>2</sub> geringe, dennoch signifikante Erhöhungen von DNA-Addukten (8-oxo-dG, Faktor 1,5), Mikrokernen (Faktor 2,3) sowie DNA-Deletionen (Faktor 1,3) nachgewiesen. Im Comet-Assay war bei der höchsten Dosierung von 500 mg/kg lediglich eine 1,4-fache Erhöhung des ‚tail moment‘ erreicht worden. Einzig der seltenere Assay auf Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ( $\gamma$ -H2AX) an Zellen aus dem Knochenmark zeigte bereits ab 50 mg/kg einen signifikanten, dosisabhängigen Effekt. Bei 500 mg/kg waren die  $\gamma$ -H2AX-Läsionen maximal um den Faktor 14,3 erhöht. Bei der höchsten Dosis waren TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-8 im peripheren Blut induziert, was auf eine systemische Entzündung hinweist. Es ist wahrscheinlich, dass die real im Versuch applizierten Dosen bei Trouiller et al. (2009) höher waren als angegeben, da TiO<sub>2</sub> in den Trinkflaschen der Mäuse nicht gelöst vorgelegt haben kann,

sondern vermutlich sedimentierte, was zur Aufnahme höherer Mengen als angegeben geführt haben dürfte (Landsiedel et al., 2010). In einer weiteren Studie mit oraler Applikation von Aluminiumoxid, allerdings einmaliger Gabe per Schlundsonde, wurde bei 1000 und 2000 mg/kg Körpergewicht ein positiver Effekt im Comet Assay und im Mikrokerntest gefunden (Balasubramanyam et al., 2009). Mikroskaliges Aluminiumoxid zeigte im parallelen Experiment keinen positiven Befund. Die untersuchten Proben des nanoskaligen Aluminiumoxids waren allerdings von unklarer Herkunft und Reinheit (>90%) und werden nicht mehr vertrieben ([www.novacentrix.com](http://www.novacentrix.com)).

In einer subchronischen Inhalationsstudie (Driscoll et al. 1996) mit Industrieruß wurde eine um eine maximal 4-fach erhöhte Rate an hprt-Mutationen in TypII-Zellen des alveolären Epithels gefunden. In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe, die neben Industrieruß vergleichend mikroskaligen Quarz und mikroskaliges Titandioxid (Anatas) nach zweimaliger Instillation (je 5 und 50 mg/kg) einsetzte, wurden für Quarz die höchsten Mutationsraten gefunden. Danach folgte Industrieruß und schließlich Titandioxid (Driscoll et al., 1997). In parallelen in vitro Versuchen an RLE-6TN-Zellen konnte bei Einsatz von 20-100 µg/cm<sup>2</sup> Quarz keine Induktion von hprt-Mutationen detektiert werden. Dies war allerdings der Fall, wenn diese Zellen mit Zellen aus bronchoalveolärer Lavage nach Quarz-Behandlung in vivo exponiert wurden. Dies weist darauf hin, dass Entzündungseffekte, die durch alveoläre Makrophagen bedingt sind, ursächlich für die Gentoxizität sind.

Der Befund einer positiven Gentoxizität in vivo kann nicht zwischen entzündungsbedingter (z.B. über alveoläre Makrophagen) und direkter partikelbedingter Gentoxizität unterscheiden. Daher sind Schlussfolgerungen zur Frage der Schwelle einer gentoxischen Wirkung aus den in vivo Daten prinzipiell nicht eindeutig zu treffen. Allerdings ist die Schlussfolgerung einer indirekten Gentoxizität in Anbetracht der hohen Dosen und der damit verbundenen Entzündungsprozesse plausibel.

### *In vitro*

In vitro Untersuchungen zur Gentoxizität von Nanomaterialien sind zahlreich (siehe Tabelle 3). Zum Teil wurden Nanomaterialien getestet, für die bekannt ist, dass sie eine gewisse Löslichkeit im biologischen System zeigen. Wirkungen können in diesem Fall durch die löslichen Bestandteile vermittelt sein. Daher wird im Folgenden nicht auf diese Untersuchungen eingegangen. Eine photogentoxische Wirkung von Titandioxid wird nicht berücksichtigt, da nach Internalisierung Photogentoxizität nicht von Bedeutung ist.

Der Fokus liegt hier bei den in vitro-Untersuchungen mit Titandioxid und Industrieruß als klassische Vertreter der nanoskaligen GBS (Tabelle 3). Die in vitro-Befunde waren eher selten eindeutig positiv. Falls eine positive Wirkung nachgewiesen wurde, ist sie meist nur geringfügig ausgeprägt oder nur im Indikatorrest aufgetreten (Comet Assay). Dies deutet auf eine geringe bis nicht vorhandene Gentoxizität hin, die nicht über durch Makrophagen vermittelte Entzündung verursacht wird.

### *Fazit Gentoxizität*

Die in vivo Befunde zeigen eine nur schwach ausgeprägte Gentoxizität selbst bei hoher Dosierung, die vermutlich durch die inflammatorische Wirkung verursacht wird. Die in vitro Befunde waren eher selten eindeutig positiv. Die positiven Ergebnisse waren von geringem Ausmaß oder sind im Indikatorrest aufgetreten (Comet Assay).

Ein Teil der negativen Befunde kann allerdings darin begründet sein, dass die gewählten Dosierungen zu niedrig, die Expositionszeiten zu kurz oder die Messzeitpunkte falsch gewählt wurden. Die Qualität der in vitro Befunde ist bei den meisten Studien kritisch zu betrachten. Das Ausmaß der Aufnahme von Partikeln in die untersuchten Zellen wurde nur in Ausnahmen genauer untersucht. Weiter wurden die eingesetzten Materialien oft nur unzureichend in Bezug auf den Einfluss der Probenvorbehandlung und etwaige Veränderungen durch Zellmediumskomponenten charakterisiert. Insgesamt ergeben sich keine stichhaltigen Hinweise auf eine gentoxische Wirkung, die nicht durch Entzündung vermittelt ist.

## **Kanzerogenität**

Eine kanzerogene Wirkung von nanoskaligen GBS wurde für Titandioxid (P25) und Industrieruß (Carbon black) in der Ratte nach Inhalation nachgewiesen (Quellen in (Gebel, 2012)). Tumoren waren bei nur bei hohen Staubbelastungen nachweisbar, die als Lungenüberladung („overload“) beschrieben wurden. Bei einer Bewertung durch die IARC hat dies zu einer Einstufung als krebserregend im Tierversuch für diese Materialien geführt (Baan, 2007). In diese Bewertung sind für Titandioxid auch zusätzliche Daten zu mikroskaligem Material mit eingeflossen. Eine zusammenfassende Auswertung aller vorliegenden inhalativen Langzeitstudien hat gezeigt, dass nanoskalige GBS im Vergleich zu mikroskaligen GBS auf Massenbasis eine etwa um den Faktor 2-3 höhere Wirkstärke in der Kanzerogenität nach Inhalation in der Ratte besitzen (Gebel, 2012).

## **Vorherrschendes Wirkprinzip**

In Bezug auf die Luftwerteableitung steht für nanoskalige GBS eine Entzündungswirkung nach Inhalation in der Lunge im Vordergrund. Mögliche systemische Wirkungen sind auf der Basis des vorliegenden Wissens nicht oder von untergeordneter Bedeutung oder bisher für nanoskalige GBS nicht hinreichend belegt (AGS, 2011; Moreno-Horn und Gebel 2014). Es liegen lediglich nicht validierte oder nicht reproduzierte Hinweise auf systemische Effekte aus der vorhandenen Literatur vor, die als nicht belastbar erachtet werden.

Für die kanzerogene Wirkung von mikroskaligen GBS (bestehend aus granulären Primärpartikeln, Durchmesser >100 nm) in der Rattenlunge wurde ein schwellenabhängiges Wirkprinzip angenommen (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2013), dieses Wirkprinzip wird auch bei nanoskaligen GBS als vorherrschend angesehen. Es wird dabei angenommen, dass erst oberhalb einer bestimmten Beladung von alveolären Makrophagen mit agglomerierten Staubpartikeln eine durch diese Makrophagen bedingte chronische Entzündung für potentielle Zielzellen der Kanzerogenese relevant wird (Überladungshypothese). Bei Belastungen, die nicht zu einer durch Makrophagenüberladung bedingten chronischen Entzündung führen, wäre damit kein zusätzliches Tumorrisiko gegeben. Damit ist das Wirkprinzip von agglomerierten nanoskaligen GBS und agglomerierten mikroskaligen GBS gleich, die Höhe der Schwelle in Abhängigkeit von der Wirkstärke der Entzündung gegebenenfalls unterschiedlich. Dies liegt daran, dass nanoskalige Partikel in Form ihrer Agglomerate und Aggregate bei gleicher Massenkonzentration ein größeres Verdrängungsvolumen im Makrophagen erzeugen. Alternativ wurde ein schwellenloses Wirkprinzip bei nanos-

kaligen GBS geprüft. Dazu waren zum einen die Daten zur Gentoxizität zu bewerten. Eine höhere und durch Makrophagen bedingte unabhängige Gentoxizität könnte theoretisch durch eine größere Oberflächenaktivität oder eine geänderte Kinetik kleiner Nanopartikel (agglomerate) verursacht werden (z.B. Migration in den Zellkern, schlechtere Clearance durch Makrophagen). Zum anderen könnte das schwellenabhängige Wirkprinzip dadurch in Frage gestellt werden, dass die Deposition von Partikeln in der Lunge nicht homogen ist. An den Verzweigungen in den Atemwegen finden sich besonders hohe Depositionsraten: schwer lösliche Partikel werden nicht gleichmäßig im bronchoalveolären Bereich deponiert, sondern es finden sich „hot spots“ mit höherer Beladung. Phalen et al. (2010) führen hierzu aus, dass lokal in der Fläche dieser Verzweigungen eine um bis zu den Faktor 1200 höhere Deposition vorliegen kann. Diese Regionen könnten eine zentrale Bedeutung bei der Auslösung von Krebs (und anderen gesundheitlichen Effekten) im Vergleich zu großen Teilen der Lungenoberfläche haben, die weit weniger beladen sind. Damit ist es möglich, dass es auch bei niedrigeren Staubbelastungen, die nicht als allgemeine sondern fokale Staubüberladung der Lunge angesehen werden können, an den Verzweigungen in den Atemwegen zu chronischer Entzündung und in der Folge zu Tumoren kommen kann. Beim Menschen finden sich an den Verzweigungen im bronchoalveolären Bereich tatsächlich gehäuft Tumoren. Andererseits ist ungeklärt, ob eine solche lokal erhöhte Deposition tatsächlich zu einer fokalen chronischen Entzündung führen kann. Zum einen ist von Partikeldiffusion im Bronchialmucus/Lungensurfactant nach Deposition auszugehen. Eine lokal erhöhte Deposition muss auch nicht zwangsläufig zu einer über alveoläre Makrophagen vermittelten überladungsbedingten Entzündung führen. Für nanoskalige GBS selbst liegen keine epidemiologischen Hinweise hinsichtlich einer kanzerogenen Wirkung vor. Die Auswertung zur Gentoxizität ergab keine stichhaltigen Hinweise auf eine gentoxische Wirkung, die nicht durch Entzündung vermittelt ist. Insgesamt wird das schwellenabhängige Wirkprinzip damit als wahrscheinlich erachtet. Das vorherrschende Wirkprinzip wird für Agglomerate von nanoskaligen und mikroskaligen GBS als identisch angesehen, die Wirkung wäre damit additiv. Dieser Punkt ist für die Bewertung von in der Praxis generell vorkommenden Mischstäuben (A-Fraktion) mit Anteilen an nano- und mikroskaligen GBS von hoher Bedeutung.

### **Ableitung eines Beurteilungsmaßstabes**

Die auf die Masse bezogene höhere kanzerogene Wirkstärke der nanoskaligen GBS im Tierversuch könnte durch eine entsprechend höhere inflammatorische Wirkstärke nach Inhalation bedingt sein. Diese wurde von einigen Autoren über die höhere spezifische Oberfläche und damit höhere Reaktivität der nanoskaligen GBS-Agglomerate erklärt (Oberdörster et al., 1994, Tran et al., 2000). Es liegen jedoch weitere neuere und belastbarere Befunde vor, die nicht dafür sprechen, dass dieses Wirkprinzip zu favorisieren ist (z.B. Elder et al., 2005, Pauluhn, 2014). Zum Beispiel liegt bei Elder et al. (2005) in einer vergleichenden Studie an der Ratte bei gleicher Oberflächenkonzentration (Dosis entsprechend adjustiert; 7 mg/m<sup>3</sup> high surface area carbon black vs. 50 mg/m<sup>3</sup> low surface area carbon black) mit high surface area carbon black ein um bis zu Faktor 5 geringerer relativer Anteil (%) an polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMN) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (Zeitpunkt 11 Monate Postexposition) vor. Bei Bezug auf die absoluten PMN-Zahlen in der Lavage (errechnet aus den Angaben zu Gesamtzellzahl aus Fig. 5 und Anteil

PMN aus Fig. 6 der Publikation) beläuft sich dies sogar auf einen maximalen Faktor von 16 im Vergleich (Zeitpunkt 3 Monate Postexposition). Die Schlussfolgerung in der Studienzusammenfassung dieser Arbeit in Bezug auf die Oberflächenkonzentration als relevantem Dosismaß steht damit im Widerspruch zu den in der Studie erhobenen Ergebnissen.

Die auf der Grundlage des aktuellen Kenntnisstandes insgesamt zu favorisierende Hypothese für nanoskalige GBS erklärt die auf die Masse bezogene höhere Wirkstärke mit einem höheren Verdrängungsvolumen der nanoskaligen GBS in den Makrophagen (Pauluhn, 2011). Das relevante Dosismaß ist damit das Partikel(agglomerat)volumen. Wie weiter unten gezeigt wird, führt die Ableitung eines Beurteilungsmaßstabes vor diesem Hintergrund und Einbezug aller qualitativ geeigneten Studien zu einem konsistenten Ergebnis. Diese Hypothese wurde auch für mikroskalige GBS als am wahrscheinlichsten in Bezug auf das Wirkprinzip erachtet (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2013). Die vorliegenden Daten ergeben bisher keine stichhaltigen Hinweise, dass bei nanoskaligen GBS von einem anderen Wirkprinzip auszugehen ist. Die nanoskaligen GBS liegen in der Regel als Agglomerate oder Aggregate vor und diese haben einen höheren Hohlraumanteil als mikroskalige GBS. Bei gleicher Masse ergibt sich daher in den Makrophagen für nanoskalige GBS ein höheres Verdrängungsvolumen. Dies führt dazu, dass bei einer Beladung der Makrophagen mit nanoskaligen GBS eher als bei mikroskaligen GBS die kritische Massenkonzentration erreicht wird, bei der eine relevante Entzündung im alveolären Bereich auftritt. Wird statt auf die Masse auf das Verdrängungsvolumen standardisiert, ist in diesem Erklärungsansatz die Wirkungsstärke von nanoskaligen GBS und mikroskaligen GBS nicht unterschiedlich. Zur Festlegung eines NOAELs ist die kumulative Dosis entscheidend, da es sich um eine chronisch inflammatorische Wirkung handelt.

Im Gegensatz zu mikroskaligen GBS liegen für nanoskalige GBS keine chronischen Versuche vor, aus denen eine NOAEC ableitbar wäre. In Tabelle 4 sind Inhalationsstudien aufgelistet, mit denen für den Endpunkt Entzündung eine Luftwerteableitung für nanoskalige GBS durchgeführt wurde. Es wurden Studien einbezogen, die eine Mindestdauer von 28 Tagen Exposition hatten und aus denen NOAEC-Werte abgeleitet werden konnten. Alle Daten wurden an Ratten erhoben und Entzündungen in der Lunge waren in allen Studien der ableitungsrelevante toxikologische Endpunkt. Die Festlegung der NOAEC-Werte beruht ausnahmslos auf dem Parameter Induktion von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMN) in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Die Dosiswahl wurde in den Studien von Pauluhn (2009) und Creutzenberg (2013) nach dem Modell von Pauluhn (2011) modelliert. Der experimentelle NOAEC-Wert wurde damit möglichst nahe am ‚wahren‘ LOAEC-Wert modelliert. Zwei verschiedene Methoden der Grenzwertableitung, nämlich die der BekGS901 und die der TRGS 910, wurden vergleichend angewendet. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass bei einer inhalativ kanzerogenen Wirkung mit Schwellenwert von lokal wirkenden Partikeln und Aerosolen beide Methoden zur Grenzwertableitung verwendet werden können. Die Ableitung basierend auf dem Verfahren der BekGs901 verwendet die üblichen Faktoren zur Zeitextrapolation. Weiter wurde ein reduzierter Variabilitätsfaktor von 3 verwendet, da die Ratte sich im Vergleich zu Hamster und Maus als empfindlichste Spezies erwiesen hatte. Zusätzlich wurde die erhöhte Atemrate des Arbeitnehmers im Vergleich zum ruhenden Menschen berücksichtigt. Außerdem wurden diese Konzentrationen mit den Werten zur Agglomeratdichte auf eine Dichte von 1 normiert (Tab. 1, Spalte BM BekGS901 (Dichte=1), Werte 27 – 97



$\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) normiert. Für die Daten in Tabelle 4 ist zu berücksichtigen, dass nur für Titan-dioxid Messdaten zur Agglomeratdichte vorliegen. Für alle anderen Stoffe in Tabelle 4 lag bei Normierung auf Dichte 1 nur die Materialdichte vor. Dabei wurden in dem Fall, dass keine gemessenen Agglomeratdichten vorlagen, 50% der Materialdichte als Agglomeratdichte angenommen. Eine weitere Methode orientiert sich an der Ableitung des A-Staub-Wertes für mikroskalige GBS der MAK-Kommission 2011, allerdings in der im aktualisierten Leitfaden (TRGS 910) vorgeschlagenen Variante. In dieser Variante werden im Standardansatz die speziesspezifischen Depositionsraten ( $DF_T/DF_H$ ) und Eliminationsraten (Faktor 0,18 bei unlöslichen Stäuben) sowie bei der Extrapolation von der Ratte auf den Menschen (Berechnung der HEC) die Normierung über die Lungenflächen (alveolar plus thorakal) berücksichtigt. Für die nanoskaligen GBS liegen im Gegensatz zu den mikroskaligen GBS keine chronischen Inhalationsstudien mit dem Nachweis einer NOAEC vor. Damit ist nicht die Möglichkeit gegeben, die bei der NOAEC in der Lunge nach Langzeitexposition deponierte Partikeldosis abzuleiten und für die Extrapolation auf den Menschen zu verwenden. Daher wurde hier abweichend von der Vorgehensweise im ‚default‘ auf das Gesamtvolumen der Alveolarmakrophagen anstatt der vergleichenden Lungenoberflächen normiert. Bezüglich des Alveolarmakrophagenvolumens wurden die Daten von (Pauluhn, 2011) herangezogen (Verhältnis Mensch-Ratte Faktor 1110, Erläuterung siehe Anhang). Dies führt anstelle des oben genannten Faktors von 0,18 zu einem Faktor von 1,33. Auch hier wurde ein reduzierter Variabilitätsfaktor von 3 verwendet. Zusätzlich wurde ebenfalls auf eine Agglomeratdichte von 1 normiert (BM von 32 – 115  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , siehe Tabelle 4). Die Studie von Bermudez et al. (2004) ergibt einen vergleichsweise niedrigen Beurteilungsmaßstab (BM) bei der Ableitung. Das liegt wahrscheinlich an der Dosiswahl, der NOAEC ist etwa einen Faktor 2 niedriger als zum Beispiel bei der Studie von Elder et al. (2005), die ebenfalls eine subchronische Studie war. Die anderen Studien streuen bei den abgeleiteten BM insgesamt nur über einen Faktor von etwa 2 innerhalb derselben Ableitungsmethodik, was eine gute Übereinstimmung darstellt. Vergleicht man Mediane und geometrische Mittelwerte der hier abgeleiteten BM mit dem nach gleicher Methodik abgeleiteten AGW für mikroskalige GBS, so ergibt sich eine um den Faktor 4 höhere Wirkstärke für nanoskalige GBS. Bei der hier vorgenommenen Abschätzung vergleichender Agglomeratdichten würde sich lediglich ein Faktor von etwa 2 ergeben. Dies kann daran liegen, dass nur wenig belastbare Daten der Bestimmung von Agglomeratdichten vorliegen. Weiter ist der Vergleich von Material- zu Agglomeratdichte nicht konstant, sondern abhängig vom jeweiligen Material. Zudem sind die Agglomerate bei nanoskaligen Materialien häufig nicht sphärisch, so dass es plausibel ist, dass die Beladung der Makrophagen nicht nur durch die Leerraumanteile in den Agglomeraten, sondern auch zwischen den Agglomeraten bestimmt ist.

### **Fazit: Vorschlag Beurteilungsmaßstab**

Aus den verschiedenen Ableitungen ist ersichtlich, dass ein Beurteilungsmaßstab (BM) für nanoskalige GBS, Endpunkt inflammatorische Wirkung in der Lunge unabhängig von der Methodik zu Luftkonzentrationen zwischen 27 – 146  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  führt, wenn in einem volumenorientierten Ansatz auf eine Agglomeratdichte von 1 normiert wird. Als Mediane und geometrische Mittelwerte liegen die Werte zwischen 52-81  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Insgesamt ergäbe sich damit unter Berücksichtigung der niedrigen NOAEC der Bermudez-Studie und unter Einbezug der zwei möglichen Ableitungsvarianten als bester Punktschätzwert bei Bezug auf die Agglomeratdichte 1 ein BM von  $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Wenn die Agglomeratdichte im speziellen Fall nicht bekannt ist, kann stattdessen als pragmatische Vorgehensweise die Hälfte der Materialdichte verwendet werden. Vergleicht man Mediane und geometrische Mittelwerte der hier abgeleiteten BM mit den nach gleicher Methodik abgeleiteten AGW für mikroskalige GBS, so ergibt sich eine um den Faktor 4 höhere Wirkstärke für nanoskalige GBS. Für nanoskalige GBS in der Form arbeitsplatztypischer Stäube wird für die aktuelle Abschätzung für die Praxis eine mittlere Agglomeratdichte von  $1,5 \text{ g}/\text{cm}^3$  angenommen. Diese Annahme erklärt sich wie folgt. Für arbeitsplatztypische mikroskalige GBS-Stäube wurde eine Dichte von  $2,5 \text{ g}/\text{cm}^3$  angenommen (vgl. Begründung zum geltenden A-Staub-Grenzwert). Die für die Bewertung und aktuelle Ableitung des Beurteilungsmaßstabes relevante Größe ist die Agglomeratdichte. Diese unterscheidet sich bei nanoskaligen GBS-Stäuben stärker von der Materialdichte als bei mikroskaligen GBS. Die bisher vorliegenden wenigen Daten zur Bestimmung der Agglomeratdichte von nanoskaligen Stäuben weisen darauf hin, dass diese etwa um den Faktor 2 unter der Materialdichte liegt. Unter Verwendung dieses Faktors von 2 ergeben sich Beurteilungsmaßstäbe von  $110\text{-}190 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Der erste Wert von  $110 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ergibt sich aus den oben genannten Ableitungen von BM korrigiert auf die Dichte  $1,5 \text{ g}/\text{cm}^3$ , der zweite Wert von  $190 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ergibt sich aus dem geltenden A-Staub-Grenzwert unter Berücksichtigung einer um den Faktor 4 höheren Wirkstärke bei gleicher Materialdichte sowie einer Adjustierung auf die angenommene geringere (Agglomerat-) Dichte des arbeitsplatztypischen Staubanteils nanoskaliger GBS.

Tabelle 2 Übersicht über in vivo Studien zur Genotoxizität von nanoskaligen GBS

Methode Zielorgan	Spezifikation	Spezies: Stamm Geschlecht Zahl/Gruppe	Applikation Dauer	Dosierungen	Ergebnis Zeitpunkt der Messung	Bemerkungen	Bewertung	Quelle
<b>Titandioxid</b>								
<b>Comet</b> Lunge: TypII-Zellen	74% Anatas 26% Brookit	M: C57BL/6J (m) 6/Grp	Inhalation, 5d, 4h/d	0,8; 7,2; 28,5 mg/m <sup>3</sup>	neg 0 h nach Exposition	Positivkontrolle EO Deposition Lunge 5,5-9% (w/w)	<b>negativ</b>	(Lindberg et al., 2011)
<b>Comet</b> BAL	T-Lite™ SF 79-89% Rutil, 50 nm	R: Wistar (m) 3/Grp	Inhalation, 6h/d, 5 d	0,5; 2; 10 mg/m <sup>3</sup>	neg 0h nach Exposition		<b>negativ</b>	(Landsiedel et al., 2009)
<b>Comet</b> Blutmonozyten	<100 nm	M: C57BL/6 (m) 10/Grp	Instillation, 2x/W, 12 W	20 mg/kg	sign 1,6x Erhöhung 0h nach Exposition		<b>schwach positiv</b>	(Hwang et al., 2010)
<b>Comet</b> BAL	UV-Titan L181, Rutil	M: C57BL/6J 5-6/Grp	Instillation, 1x	2,7 mg/kg	neg 24 h nach Instillation		<b>negativ</b>	(Saber et al., 2011)
<b>Comet</b> BAL	Anatas 5 nm	R: SD (m) 5/Grp	Instillation, 1x  Instillation, 1x/W, 5 W	1; 5 mg/kg  5x 0,2; 1 mg/kg	neg	Positivkontrolle EMS	<b>negativ</b>	(Naya et al., 2012)
<b>Comet</b> Blut	P25	M: C57BL/6J $p^{un}/p^{un}$ (m) 5/Grp	Trinkwasser, 5d	50; 100; 250, 500 mg/kg	sign bei 500 mg/kg Faktor 1,4 vermtl. 0h nach Exposition	systemische Entzündung (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8), reale Dosen evtl. höher wegen Sedimentierung	<b>schwach positiv</b>	(Trouiller et al., 2009)
<b>Comet</b> Leber, Knochen- mark, Gehirn	Anatas 33 nm	M: CBAB6F1 (m) 5-6/Grp	Schlundsonde, 7x; 7d	40; 200; 1000 mg/kg	nur teilweise sign max. Faktor 2, nur teilweise Dosis- Wirkungs-Beziehung	mikro-TiO <sub>2</sub> vergleichbare Effekte	<b>(schwach positiv)</b>	(Sycheva et al., 2011)
<b>8-oxo-dG</b> Lunge	<100 nm	M: C57BL/6 (m) 10/Grp	Instillation, 2x/W, 12 W	20 mg/kg	sign 1,1x Erhöhung 0h nach Exposition		<b>schwach positiv</b>	Hwang et al. 2010
<b>8-oxo-dG</b> Lunge	P25 & T805	R: Wistar (f) 5/Grp	Instillation, 1x	0,75; 1,5; 3; 6 mg/kg	neg 90 d nach Instillation	Positivkontrolle DQ12 Messzeitpunkt zu spät	<b>keine Be- wertung möglich</b>	(Rehn et al., 2003)
<b>8-oxo-dG</b> Leber	P25	M: C57BL/6J $p^{un}/p^{un}$ (m) 5/Grp	Trinkwasser, 5d	50; 100; 250; 500 mg/kg	sign bei 500 mg/kg Faktor 1,5 0h nach Exposition	systemische Entzündung (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8), reale Dosen evtl. höher wegen Sedimentierung	<b>schwach positiv</b>	(Trouiller et al., 2009)

Methode Zielorgan	Spezifikation	Spezies: Stamm Geschlecht Zahl/Gruppe	Applikation Dauer	Dosierungen	Ergebnis Zeitpunkt der Messung	Bemerkungen	Bewertung	Quelle
<b>DNA-DSB</b> <b>γ-H2AX</b> Knochenmark	P25	M: C57BL/6J $p^{un}/p^{un}$ (m) 5/Grp	Trinkwasser, 5d	50; 100; 250; 500 mg/kg	sign ab 50 mg/kg, gute Dosis-Wirkungs- Beziehung (max. Faktor 14), 0h nach Exposition	systemische Entzündung (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8), reale Dosen evtl. höher wegen Sedimentierung seltener Assay	<b>positiv</b>	(Trouiller et al., 2009)
<b>Mikrokerne</b> PCE in Blut	74% Anatas; 26% Brookite	M: C57BL/6J (m)  6/Grp	Inhalation, 5d, 4h/d	0,8; 7,2; 28,5 mg/m <sup>3</sup>	neg 48 h nach Exposition	Positivkontrolle EO, bei 28,5 mg/m <sup>3</sup> : PMN $\uparrow$ Deposition Lunge 5,5-9% (w/w)	<b>negativ</b>	(Lindberg et al., 2011)
<b>Mikrokerne</b> PCE in Blut	P25	M: C57BL/6J $p^{un}/p^{un}$ (m)  5/Grp	Trinkwasser, 5d	50; 100; 250; 500 mg/kg	sign bei 500 mg/kg Faktor 2,3 vermtl. 0h nach Exposi- tion	systemische Entzündung (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8), reale Dosen evtl. höher wegen Sedimentierung	<b>schwach positiv</b>	(Trouiller et al., 2009)
<b>Mikrokerne</b> Kno- chenmark	Anatas 33 nm	M: CBAB6F1 (m)  5-6/Grp	Schlundsonde, 7x; 7d	40; 200; 1000 mg/kg	neg	mikro-TiO <sub>2</sub> bei höchster Dosis schwach sign. pos. (Faktor 2)	<b>negativ</b>	(Sycheva et al., 2011)
<b>DNA Deletion</b> $p^{un}$ , Retinazellen in Nachkommen	P25	M: C57BL/6J $p^{un}/p^{un}$ (f) 53 Augen	Trinkwasser, GD 8,5-18,5	300 mg/kg	sign Faktor 1,3 1,5 d nach Exposition	systemische Entzündung bei 500 (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL- 8), reale Dosen evtl. höher wegen Sedimentierung	<b>schwach positiv</b>	(Trouiller et al., 2009)
<b>ESTR Mutationen</b> Oozyten	UV-Titan L181 Rutil, 20,6 coating	M: C57BL/6J (f) 13/Grp	Inhalation, 1h/d, Gestationstage 8-18	42,4 mg/m <sup>3</sup>	neg	keine Positivkontrolle	<b>negativ</b>	(Boisen et al., 2012)
<b>Aluminiumoxid</b>								
<b>Comet</b> Blut	30 & 40 nm	R: Wistar (f)  5/Grp	Schlundsonde, 1x	500; 1000; 2000 mg/kg	sign ab 1000 mg/kg max. Faktor 3 4, 24, 48 h nach Appli- kation, 72 h neg	positiv erst ab Grenzdosis unklare Reinheit: >90% Positivkontrolle CPA Mikro-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> negativ	<b>positiv</b>	(Balasubraman yam et al., 2009)
<b>Mikrokerne</b> PCE in Blut	30 & 40 nm	R: Wistar (f)  5/Grp	Schlundsonde, 1x	500; 1000; 2000 mg/kg	sign ab 1000 mg/kg 48 & 72 h nach Appl. (Fak- tor max. 5,7), kein Ef- fekt auf %PCE	positiv erst ab Grenzdosis unklare Reinheit >90% Positivkontrolle CPA Mikro-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> negativ	<b>positiv</b>	(Balasubraman yam et al., 2009)
<b>Industrieruß</b>								
<b>Comet</b>	Printex 90	M: C57/Bl; Jax:	Inhalation, 1,5 h,	20 mg/m <sup>3</sup>	sign		<b>schwach</b>	(Saber et al.,

Methode Zielorgan	Spezifikation	Spezies: Stamm Geschlecht Zahl/Gruppe	Applikation Dauer	Dosierungen	Ergebnis Zeitpunkt der Messung	Bemerkungen	Bewertung	Quelle
BAL		TNF +/- 4/Grp	4d		etwa Faktor 2 (TNF +/- und TNF/-)		<b>positiv</b>	(2005)
<b>Comet</b> BAL	Printex 90	M: C57BL/6J 5-6/Grp	Instillation, 1x	2,7 mg/kg	neg 24 h nach Instillation		<b>negativ</b>	(Saber et al., 2011)
<b>Comet</b> BAL	Printex 90	M: ApoE <sup>-/-</sup> 7/Grp	Instillation, 1x	2,7 mg/kg	Faktor 1,2 bis 1,5 3 h nach Applikation	ApoE <sup>-/-</sup> : unüblicher Stamm mit Gendefekt	<b>schwach positiv</b>	(Jacobsen et al., 2009)
<b>Comet</b> Lunge	Printex 90	M: C57BL/6J (m) 5/Grp	Instillation, 1x	10 mg/kg	Faktor 1,1 bis 2 3 h nach Applikation	Mikro-Kaolin auch positiv, nur 1 Dosis	<b>schwach positiv</b>	(Totsuka et al., 2009)
<b>Comet</b> Leber	Printex 90	M: C57BL/6JBomTac (f) 5-6/Grp	Inhalation, 1h/d, Gestationstage 8-18	42 mg/m <sup>3</sup>	Faktor max. 1,6 in Mut- tertieren und Nach- kommen zu versch. Zeitpunkten	parallele Instillationsver- suche mit gleicher kumu- lativer Dosis durchweg neg	<b>schwach positiv</b>	(Jackson et al., 2012)
<b>8-oxo-dG</b> Lunge	Printex 90	R: F344 (f) 5/Grp	Inhalation, 6h/d, 5d/w, 13 W	1; 7; 50 mg/m <sup>3</sup>	max. Faktor 1,5; 0 und 44 Wochen nach Exposition	Lungenbeladung 1-7 mg/Lunge; PMN↑	<b>schwach positiv</b>	(Gallagher et al., 2003)
<b>hprt</b> Lunge (TypII-Zellen)	Monarch 880	R: F344 (m)	Inhalation, 6h/d, 5d/W, 13 W	1,1; 7,1; 52,8 mg/m <sup>3</sup>	sign ab 7,1 mg/m <sup>3</sup> (Fak- tor 3,4); bei 52,8 mg/m <sup>3</sup> Faktor 4 direkt nach Exposition	Lungenbeladung 0,35; 1,8; 7,9 mg/Lunge	<b>positiv</b>	(Driscoll et al., 1996)
<b>hprt</b> Lunge (TypII-Zellen)	Monarch 900	R: F344 (f) 9/Grp	Instillation, 2x, 2d	10; 100 mg/kg	sign bei 100 mg/kg (Faktor 7,5) 15 Monate nach Exposi- tion		<b>positiv</b>	(Driscoll et al., 1997)
<b>gpt Mutation</b> Lunge	Printex 90	M: gptΔ transgen 10/Grp	Instillation, 1x bis 4x	6,6 - 26,4 mg/kg	not sign Tendenz	Mikro-Kaolin pos, Assay selten, hohe SD	<b>(schwach positiv)</b>	(Totsuka et al., 2009)

Abk.: BAL: bronchoalveoläre Lavage; DSB: Doppelstrangbrüche; EO: Ethylenoxid; neg: negativ; PCE: polychromatische Erythrozyten; PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten; neg: negativ; pos: positiv; sign: statistisch signifikant W: Woche; CPA: Cyclophosphamid; M: Maus; MMC: Mitomycin C; R: Ratte; 8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihydroxy-2-Desoxyguanosin

Tabelle 3 Übersicht über in vitro Studien zur Gentoxizität von nanoskaligem Titandioxid sowie nanoskaligem Industrieruß

Methoden	Spezifikation	Zelltyp	Dauer (h) <sup>3</sup>	Dosierungen (µg/ml) <sup>4</sup>	Ergebnis	Bemerkungen	Bewertung	Quelle
<b>Titandioxid</b>								
Comet	Anatas 6,57-8 nm ?	WIL-2NS	6; 24; 48	26; 65; 130	max. Faktor 5 (bei 65), Daten nicht gezeigt	hohe Zytotoxizität nur bei 130 µg/ml ab 24 h	positiv	(Wang et al., 2007)
Comet	Anatas <100 nm	BEAS-2B IMR-90	24	2; 5; 10; 50 µg/cm <sup>2</sup>	neg		negativ	(Bhattacharya et al., 2009)
Comet	Anatas	CHO-K1	60 d	10; 20; 40	neg	keine Zytotoxizität	negativ	(Wang et al., 2011)
Comet	Anatas P25	Humane Lymphozyten	6; 12; 24	20; 50; 100	sign ab 50 µg/ml max. Faktor 5,5	positiv nur bei hoher Zytotoxizität, gute Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung; N-Acetylcystein mildert Effekt	(positiv)	(Kang et al., 2008)
Comet	Anatas 40-70 nm	Humane Spermien & Lymphozyten	0,5	3,7; 14,9; 29,8; 59,7	alle Effekte sign. (max. Faktor 1,5 bzw. 7,2)	keine Dosis-Wirkungsbeziehung; inkorrekte Statistik, unzureichende Dokumentation der Zytotoxizität	(positiv)	(Gopalan et al., 2009)
Comet	Anatas 10 und 20 nm	BEAS-2B	16	10	nur sign. Erhöhung mit Erhöhung der Empfindlichkeit durch Formamido-pyrimidinglykosylase	nur eine Konzentration getestet; hohe Kontrollraten  im Standardansatz negativ	negativ	(Gurr et al., 2005)
Comet	Anatas P25	L5178Y	22	3,1; 12,5; 50; 200; 800	neg		negativ	(Nakagawa et al., 1997)
Comet	Rutil/Anatas 63 nm	A549	4	40 µg/cm <sup>2</sup>	Faktor 2,3	nur eine Konzentration getestet	schwach positiv	Karlsson et al. 2009
Comet	Anatas 12, 24 nm Rutil 21 nm; Faser 68/9 nm)(Woodruff et al., 2012)	A549	4; 24; 48	100	max. Faktor 7	extreme Schwankung in Ergebnissen; kaum Dosis-Wirkungs-Beziehung	(positiv)	(Jugan et al., 2011)

<sup>3</sup> falls nicht gesondert in Tagen angegeben<sup>4</sup> falls nicht gesondert als Flächendosis angegeben

Methoden	Spezifikation	Zelltyp	Dauer (h) <sup>3</sup>	Dosierungen (µg/ml) <sup>4</sup>	Ergebnis	Bemerkungen	Bewertung	Quelle
Comet	Anatas 15-30 nm	Humane Lymphozyten	24	20; 50; 100; 200	neg		<b>negativ</b>	(Hackenberg et al., 2011a)
Comet	Anatas ? nm	HEp-2	4	10; 20; 50; 100	max. Faktor 3,6	schwacher Effekt außer höchste Dosis bei beginnender relevanter Zytotoxizität	<b>(positiv)</b>	(Osman et al., 2010)
Comet	Anatas (<25 nm) Rutil (10x40 nm, <5% SiO <sub>2</sub> amorph beschichtet)	BEAS 2B	24; 48; 72	20; 40; 60; 80; 100	max. Faktor 2 nur teilweise signifikant (auch für mikro-Rutil)	keine klaren Dosis-Wirkungsbeziehungen; mikro-Rutil (< 5 µm) auch positiv	<b>nicht bewertbar</b>	(Falck et al., 2009)
Comet	vermutlich Gemisch aus Rutil/Anatas (<100 nm)	A549	4	40; 80	max. Faktor 2 (nur teilweise sign.)	Dosis-Wirkungsbeziehung, aber nur zwei Dosen getestet	<b>schwach positiv</b>	(Karlsson et al., 2009)
Comet pH neutral	Rutil 30,6 nm	WISH (humanes Amnionepithel)	6	0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20	pos nur bei relevanter Zytotoxizität		<b>(positiv)</b>	(Saquib et al., 2011)
Comet	Anatas 10x30 nm	TK6	24	0; 50; 100; 150; 200	neg in drei Testvarianten	Positivkontrolle MMS positiv	<b>negativ</b>	(Woodruff et al., 2012)
Comet	Anatas P25 und 12 nm	A549	4; 24; 48	100	max. Faktor 8	keine gute Expositionszeit-Wirkungsbeziehung	<b>positiv</b>	(Jugan et al., 2012)
8-oxo-dG	Anatas <100 nm	IMR-90	24	5; 10 µg/cm <sup>2</sup>	pos, kein quant. Vergleich zu Kontrolle möglich	Effektausmaß nicht quantitativ bewertbar	<b>(positiv)</b>	(Bhattacharya et al., 2009)
8-oxo-dG	Anatas P25 und 12 nm	A549	4; 24; 48	100	max. Faktor ~10	keine Expositionszeit-Wirkungsbeziehung	<b>positiv</b>	(Jugan et al., 2012)
8-oxo-dG	Anatas 12, 24 nm Rutil (21 nm; Faser 68/9 nm)	A549	4; 24; 48	100	max. Faktor 15	extreme Schwankung in Ergebnissen; schlechte Dosis-Wirkungs-Beziehung	<b>(positiv)</b>	(Jugan et al., 2011)
DNA-DSB γ-H2AX	Anatas 12, 24 nm	A549	24	50; 100; 200	neg		<b>negativ</b>	(Jugan et al., 2011)
DNA-DSB γ-H2AX	Anatas 5 nm	A549	1	10-1000	pos	keine Angaben zur Zytotoxizität, keine quant. Auswertung möglich	<b>(positiv)</b>	(Toyooka et al., 2012)
DNA-DSB γ-H2AX	Anatas P25 und 12 nm	A549	24	50; 100; 200	neg	Positivkontrolle Etoposid positiv	<b>negativ</b>	(Jugan et al., 2012)

Methoden	Spezifikation	Zelltyp	Dauer (h) <sup>3</sup>	Dosierungen (µg/ml) <sup>4</sup>	Ergebnis	Bemerkungen	Bewertung	Quelle
Chromosomen-aberrationen	100% Rutil	CHO	3	5000	neg		<b>(positiv)</b>	(Theogaraj et al., 2007)
	100% Anatas	CHO	3	5000				
	80%/20% Anatas/Rutil	CHO	3	800				
Chromosomen-aberrationen	Anatas P25	L5178Y	22	25; 50; 100; 200; 400; 800	neg	Positivkontrolle Ofloxazin neg	<b>nicht bewertbar</b>	(Nakagawa et al., 1997)
gpt ΔMutation	Typ unklar 5 nm & 40 nm	MEF Fibroblasten transgen	3 d	0,1; 1; 10; 30	max. Faktor 2,2 aber nur in je 1 Ausnahme sign.	keine Dosis-Wirkungs-Beziehung	<b>negativ</b>	(Xu et al., 2009)
HPRT	Anatas 6,6-8 nm ?	WIL-2NS	6; 24; 48	26; 65; 130	max. Faktor 2,5; Daten nicht gezeigt	relevante Zytotoxizität bei 130 ab 24 h	<b>schwach positiv</b>	(Wang et al., 2007)
HPRT	Anatas (?)	CHO-K1	60 d	10; 20; 40	neg	keine Zytotoxizität	<b>negativ</b>	(Wang et al., 2011)
Mikrokerne	Anatas P25	Humane Lymphozyten	48	20; 50; 100	sign. ab 50 (Faktor 1,7), 100 (Faktor 2,6)	Gentoxizität einhergehend mit relevanter Zytotoxizität	<b>(schwach positiv)</b>	(Kang et al., 2008)
Mikrokerne	Anatas 6,57-8 nm?	WIL-2NS	6; 24; 48	26; 65; 130	max. Faktor 2,3, vorhandene Dosis-Wirkungs-Beziehung	Zytotoxizität bei höchster Dosis ab 24 h, aber nicht bei Zellproliferation	<b>schwach positiv</b>	(Wang et al., 2007)
Mikrokerne	vermtl. Anatas <20 nm	SHE	12-72	0,5; 1; 5; 10	teilweise sign. max. Faktor 2	keine Dosis-Wirkungs-Beziehung; mikro-TiO <sub>2</sub> neg.	<b>schwach positiv</b>	(Rahman et al., 2002)
Mikrokerne	T-Lite™ SF 79-89% Rutil, 50 nm	V79	4; 24	4; 75; 150; 300 24: 18,8; 37,5; 75	neg	Positivkontrolle EMS	<b>negativ</b>	(Landsiedel et al., 2009)
Mikrokerne	Anatas 10 nm	BEAS-2B	24	10	max. Faktor 2,7	nur eine Konzentration getestet; hohe Kontrollraten	<b>schwach positiv</b>	(Gurr et al., 2005)
Mikrokerne	Anatas 12, 24 nm	A549	4; 24; 48	50; 100; 200	neg	Positivkontrolle Etoposid	<b>negativ</b>	(Jugan et al., 2011)
Mikrokerne	Anatas ? nm	HEp-2	2	10; 20; 50; 100	max. Faktor 2,4	schwacher Effekt bei 50, darüber Zytotoxizität	<b>schwach positiv</b>	(Osman et al., 2010)
Mikrokerne	Anatas <25 nm	A549	24	10; 50	max. Faktor 3,5	Dosis-Wirkungsbeziehung	<b>positiv</b>	(Srivastava et al., 2011)
Mikrokerne	? 20 nm	CHO-K1	24	0,5; 1; 5	max. Faktor 1,8	keine gute Dosis-Wirkungsbeziehung	<b>schwach positiv</b>	(Di Virgilio et al., 2010)
Mikrokerne	Anatas	BEAS 2B	24; 48;	20; 40; 60; 80;	max. Faktor 3	keine Dosis-Wirkungs-	<b>schwach</b>	(Falck et al.,



Methode	Spezifikation	Zelltyp	Dauer (h) <sup>3</sup>	Dosierungen (µg/ml) <sup>4</sup>	Ergebnis	Bemerkungen	Bewertung	Quelle
	<25 nm		72	100	(selten sign.)	Beziehungen; mikro-Rutil (< 5 µm) und Rutil (10x40 nm, <5% SiO <sub>2</sub> amorph beschichtet) negativ	<b>positiv</b>	2009)
<b>Mikrokerne</b>	Anatas P25 und 12 nm	A549	24	50; 100; 200	negativ	Positivkontrolle Etoposid positiv	<b>negativ</b>	(Jugan et al., 2012)
<b>SCE</b>	? 20 nm	CHO-K1	24	1; 5	max. Faktor 1,2	keine Dosis-Wirkungsbeziehung	<b>schwach positiv</b>	(Di Virgilio et al., 2010)
<b>Industrieruß</b>								
<b>Comet</b>	Printex90	A549	3	100 (25 µg/cm <sup>2</sup> )	Faktor 4	nur eine Konzentration getestet, unzureichende Dokumentation Zytotoxizität	<b>positiv</b>	(Mroz et al., 2008)
<b>Comet</b>	Printex90	FE1 Muta <sup>TM</sup> Lungenepithelzellen	3	75	Faktor 2	nur eine Konzentration getestet	<b>schwach positiv</b>	(Jacobsen et al., 2007)
<b>Comet</b>	Vulcan M (100 nm)	A549, THP-1	48	0,016; 0,16; 1,6	max. Faktor 4, selten signifikant		<b>schwach positiv</b>	(Don Porto et al., 2001)
<b>Comet</b>	12 nm	primäre Mausembryofibroblasten	24	5; 10	max. Faktor 4		<b>positiv</b>	(Yang et al., 2009)
<b>LacZ/cil Mutationen</b>	Printex90	FE1 Muta <sup>TM</sup> Lungenepithelzellen	8-mal 72	75 (8-mal dosiert)	cil: Faktor 1,4 lacZ: 1,23	nur eine Konzentration getestet	<b>schwach positiv</b>	(Jacobsen et al., 2007)

**Tabelle 4: Verschiedene Studien zur Ableitung eines Beurteilungsmaßstabes (BM) für nanoskalige GBS basierend auf Inhalationsstudien in Ratten: Endpunkt Lunge und inflammatorische Wirkung**

Stoff	MMAD (GSD)	DF <sub>T</sub> /DF <sub>H</sub> MPPD2.11	Agglomerat- dichte <sup>5</sup>	Dauer	NOAEC [µg/m <sup>3</sup> ]	BM Be- kGs901 <sup>6</sup> (Dichte=1) [µg/m <sup>3</sup> ]	BM Leitfa- den 2013 (Dichte=1) [µg/m <sup>3</sup> ]	Quelle
TiO <sub>2</sub> P25	1,44 (2,6)	0,447	1,6	13 W	520	27	32 <sup>7</sup>	(Bermudez et al., 2004)
TiO <sub>2</sub> NM-103	1,17 (2,92)	0,51	1,6	4 W	3000	52	71	(Creutzenberg, 2013)
TiO <sub>2</sub> NM-104	1,00 (3,94)	0,585	1,6	4 W	3000	52	81	(Creutzenberg, 2013)
TiO <sub>2</sub> NM-105 (P 25)	0,62 (4,79)	0,774	1,6	4 W	3000	52	107	(Creutzenberg, 2013)
AlOOH 40 nm	0,59 (2,47)	0,866	1,45	4 W	3300	63	146	(Pauluhn, 2009)
AlOOH 10 nm	1,75 (2,71)	0,444	1,45	4 W	3100	60	70	(Pauluhn, 2009)
CB Printex 90	1,4 (2,5)	0,447	0,9	13 W	1100	97	115	(Elder et al., 2005)
						52	81	Median
						54	81	geometrischer Mittelwert

Abkürzungen:

W: Wochen , J: Jahre, DF<sub>T</sub>: alveolär deponierte Fraktion beim Tier (Ratte), DF<sub>H</sub>: alveolär deponierte Fraktion beim Menschen, CB: Carbon Black

<sup>5</sup> nach (Pauluhn, 2011). Nur bei Titandioxid liegen Messdaten zur Agglomeratdichte vor, bei den anderen Materialien wurden die Agglomeratdichten mit 50% der Materialdichte abgeschätzt.

<sup>6</sup> Zeitextrapolation (BekGS901): subakut/chronisch: 6, subchronisch/chronisch: 2; reduzierter Variabilitätsfaktor 3 (Ratte empfindlichste Spezies); erhöhte metabolische Aktivität des Arbeitnehmers im Vergleich zur Laborratte (6,7 m<sup>3</sup>/10 m<sup>3</sup>) und unterschiedliche tägliche Expositionsdauer berücksichtigt (6h/8h).

<sup>7</sup> Mit Variabilität 3; Alveolarmakrophagenvolumen nach (Pauluhn, 2011) (Erläuterung siehe auch Anhang) und Korrektur auf Agglomeratdichte 1.

## Anhang

Im Standardansatz wird bei der Ableitung der ‚human equivalent concentration‘ (HEC) auf die Lungenoberfläche normiert, da die Partikeldosis, die von den Makrophagen aufgenommen wird, ganz wesentlich durch die auf der Lungenoberfläche deponierten Partikel bestimmt wird (Verhältnis 150). Im vorliegenden Fall wird aber auf das Gesamtmakrophagenvolumen in den Alveolen normiert, da ein Versuch mit nanoskaligen GBS zur Berechnung der in der Lunge nach chronischer Inhalation deponierten Partikelmasse bei der NOAEC nicht vorliegt.

Für die Berechnung des Gesamtvolumens der Alveolarmakrophagen für die Ratte und den Menschen muss das Volumen des einzelnen Makrophagen und die Anzahl der Makrophagen pro Lunge bekannt sein. Hier wurde mit Bezug auf die Veröffentlichung von Pauluhn (2011) für das Volumen des einzelnen Makrophagen bei der Ratte ein Wert von  $1166 \mu\text{m}^3$  und bei dem Menschen ein Wert von  $4990 \mu\text{m}^3$  zu Grunde gelegt. Für die Anzahl der Makrophagen pro Lunge ist bei der Ratte bzw. bei dem Menschen ein Wert von  $27 \times 10^{-6}$  bzw.  $7000 \times 10^{-6}$  verwendet worden.

Die HEC für Agglomerate von nanoskaligen GBS auf Basis des Makrophagenvolumens als Normierungsgröße berechnet sich wie folgt:

$$HEC/CT = 0,008 \times 1110 \times 0,15 \times (DF_T/DF_H) = 1,33 \times (DF_T/DF_H),$$

mit  $DF$  Depositionsfraktion (Prozent/100),  $T$  Tier (Ratte),  $H$  Mensch.

### **Aus Vergleichsgründen vorgenommene Ableitung einer ERB auf Basis der Annahme eines schwellenlosen Wirkprinzips**

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Studien, die insgesamt für eine Ableitung einer ERB verwendet werden konnten. Der Leitfaden geht bei der Ableitung von Krebsrisiken aus Tierversuchen von einer Exposition von 6 h/d und 5 Tagen/Woche und einer Studiendauer von 24 Monaten bis zur terminalen Sektion aus. Da die in Tabelle 5 beschriebenen Protokolle davon abwichen, wurde eine entsprechende Korrektur vorgenommen, bevor diese Daten zur Ableitung einer BMD herangezogen wurden.

**Tabelle 5: Übersicht von für die ERB-Ableitung vorliegender Daten relevanter Inhalationsstudien in Ratten.**

Stoff	Geschlecht	Exposition			Expositionsfreie Nachbeobachtung (Monate)	Exposition korrigiert auf 24 Monate und 30 h/Woche	Tumore, Zahl absolut		Anzahl Tiere un- tersucht / Gruppe
		mg/m <sup>3</sup>	h/Woche	Dauer (Mo- nate)				korrigiert auf 24 Monate <sup>8</sup>	
TiO <sub>2</sub> P25	w	0		24	6	0	1	1	217
TiO <sub>2</sub> P25	w	9,3	90	24	6	27,9	32	16	100
CB Printex 90	w	0				0	0	0	72
	w	6	85	10	20	17 <sup>9</sup>	12	6	72
	w	6	85	20	10	17	7	4	72
Elftex-12	w	0		24	1,5	0	0	0	105
	m	0		24	1,5	0	3	3	109
	w	2,5	80	24	1,5	6,67	16	16	107
	m	2,5	80	24	1,5	6,67	3	3	106
	w	6,6	80	24	1,5	17,60	41	41	105
	m	6,6	80	24	1,5	17,60	8	8	106
CB Printex 90	w	0		24	6	0	1	0	217
	w	11,4	90	24	6	34,20	39	20	100

<sup>8</sup> (Faktor 2 für 24 vs. 30 Monate; keine Korrektur für (Nikula et al., 1995))

<sup>9</sup> 10 Monate Exposition wurde hier mit 20 Monaten gleichgesetzt und auf 24 Monate korrigiert. Die Gleichsetzung erfolgte, da die ersten 10 Monate Exposition einen weit höheren Einfluss auf die Tumorigenese hatten. Alle anderen Studien hatten 24 Monate Exposition, so dass diese Korrektur insgesamt einen geringen Einfluss auf die abgeleitete kanzerogene Wirkstärke hat.

In den Versuchen von Heinrich (Heinrich et al., 1995, Heinrich et al., 1994) wurden nur weibliche Ratten exponiert, die terminale Sektion wurde nach 30 Monaten durchgeführt. In 2 der 3 Versuche wurde nur eine Dosisgruppe untersucht, sodass eine Modellierung der jeweiligen Einzelstudien nicht möglich ist. Eine kombinierte Modellierung dieser aus einem Labor stammenden Daten ist allerdings möglich und erfüllt die Kriterien der TRGS 910 (siehe Anhang). Die kombinierte Auswertung wird durch BMDs (Version 2.1) sublinear modelliert, was aus dem Vergleich von BMD<sub>10</sub> und BMD<sub>0,1</sub> zu ersehen ist (Tabelle 6).

**Tabelle 6. Ergebnisse der BMDs-Auswertung (Software Version 2.1).** Die Extremwerte sind fett gedruckt.

Modell	Gamma	Multistage	Multistage-Cancer	Probit
Zusammengefasste Daten Heinrich				
BMD10 [mg/m <sup>3</sup> ]	21,57	21,76	21,76	24,20
BMD01 [mg/m <sup>3</sup> ]	5,74	4,38	4,38	6,69
Zusammengefasste Daten Heinrich & Nikula et al. (männliche Tiere)				
BMD10 [mg/m <sup>3</sup> ]	22,15	22,55	22,55	23,81
BMD01 [mg/m <sup>3</sup> ]	5,74	4,75	4,75	5,48
Daten Nikula et al. (männliche Tiere)				
BMD10 [mg/m <sup>3</sup> ]	p=NA	25,11	25,11	<b>27,08</b>
BMD01 [mg/m <sup>3</sup> ]	p=NA	7,76	7,76	5,06
Daten Nikula et al. (weibliche Tiere)				
BMD10 [mg/m <sup>3</sup> ]	4,61	4,48	4,48	7,99
BMD01 [mg/m <sup>3</sup> ]	0,64	<b>0,45</b>	<b>0,45</b>	p=0,013

Die gepoolten Daten der Heinrich-Studien zusammen mit den Daten von Nikula et al. (1995) sind nur adäquat mit BMDs modellierbar, wenn die Ergebnisse nur für die männlichen Tiere hinzugezogen werden.

Die Daten der Studie mit Industrieruß von Nikula et al. (1995) erfüllen die Kriterien des Leitfadens für eine akzeptable Modellierung für die Geschlechter getrennt, nicht aber für die kombinierten Daten (Tabelle 6). Werden die BMD-Werte miteinander verglichen, zeigt sich eine weit höhere Empfindlichkeit der weiblichen Tiere. Dieser Unterschied in der Wirkstärke zwischen den Geschlechtern war bei Industrieruß besonders hoch. In derselben Studie wurde auch gegen DME exponiert, dort betrug der Unterschied der Wirkstärke zwischen den Geschlechtern nur etwa Faktor 2.

Ein Vergleich der BMD<sub>10</sub>-Werte mit den BMD<sub>0,1</sub>-Werten weist bei den Daten für die weiblichen Tiere bei Nikula et al. (1995) auf einen linearen Verlauf hin. Die anderen verwendbaren Datensätze weisen auf sublineare Verläufe hin, wobei berücksichtigt werden muss, dass die Ergebnisse der männlichen Tiere bei Nikula et al. (1995) nur auf einer positiven Dosisgruppe beruhen.

Als Möglichkeit des vorherrschenden Wirkprinzips wurde eine schwellenlose Dosis-Wirkungs-Beziehung diskutiert. Dabei würde auch im Dosisbereich unterhalb der Morrowschen Überladung eine chronisch fokale Entzündung durch hohe Partikeldepositionsraten an den Bifurkationen in der Lunge vorliegen können. Es ließen sich zwar „praktische“ Schwellen vorstellen, wenn die Belastung so niedrig ist, dass es

nicht zu einer fokalen Staubüberladung kommt. Auf der Basis der vorliegenden Information wäre eine solche Schwelle allerdings in der Praxis nicht quantifizierbar. Diese Überlegungen stehen nicht im Widerspruch dazu, dass man auch bei Annahme des Wirkprinzips der fokalen Staubüberladung eine verstärkte Entzündung bei diffuser Staubüberladung annehmen kann, was dann zur Annahme einer Expositions-Risiko-Beziehung gemäß Knickfunktion führen würde. Daher wird der Verlauf der ERB als Knickfunktion für die Ableitung von Risikowerten verwendet (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Modellierung der Expositions-Risikobeziehungen für nanoskalige GBS nach Knickfunktion sowie Angabe des AGW analogen Wertes.**

*Als Startpunkte wurden vergleichend verschiedene BMD-Werte aus Tabelle 5 eingesetzt.*

	BMD <sub>10</sub>	BMD <sub>01</sub>		BMD <sub>10</sub>	BMD <sub>10</sub>	BMD <sub>10</sub>
<b>Startpunkte (mg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>27,08</b>	<b>0,45</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Risikowerte (µg/m<sup>3</sup>)</b>						
<b>Toleranzrisiko 4x10<sup>-3</sup></b>	1148	221		443	465	486
<b>Akzeptanzrisiko 4x10<sup>-4</sup></b>	176	84		85	107	130
<b>Akzeptanzrisiko 4x10<sup>-5</sup></b>	78	18		40	40	40
<b>Knick bei</b>	75	75		50	75	100

In Tabelle 7 sind Ableitungen für den höchsten und den niedrigsten BMD-Wert aufgezeigt, um die Spannweite der auftretenden Ergebnisse aufzuzeigen.

Die Ableitung der gepoolten Daten von Heinrich (Heinrich et al., 1994; 1995) stimmen gut mit den Daten der positiven Dosisgruppe von Nikula et al. (1995) überein. Die Ergebnisse für die weiblichen Ratten bei Nikula et al. (1995) weisen auf eine weit höhere Wirkstärke hin und stehen daher in stärkerer quantitativer Inkongruenz zu den anderen Daten. Auch bei Heinrich et al. (1994; 1995) wurden nur weibliche Ratten verwendet. Aus der Spanne aller Daten ergeben sich Akzeptanzwerte (Risiko 4x10<sup>-5</sup>), die zwischen 18 und 78 µg/m<sup>3</sup> liegen. Um allen Daten, auch denen von Nikula et al. für das weibliche Geschlecht Rechnung zu tragen, wird insgesamt eine fiktive BMD<sub>10</sub> von 10 mg/m<sup>3</sup> zur Ableitung der Risikowerte abgeschätzt.

Wenn eine Ableitung der Risikowerte wie bei der inflammatorischen Wirkung mittels HEC-MPPD vorgenommen wird und die Speziesextrapolation ebenfalls mittels vergleichendem Alveolarmakrophagenvolumen und Korrektur auf Agglomeratdichte vorgenommen wird, ergeben sich fast identische Risikowerte (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Ableitungen von Toleranz- und Akzeptanzwerten für nanoskalige GBS basierend auf Inhalationsstudien in Ratten, Korrekturfaktoren bei Anwendung der HEC-MPPD-Modells nach TRGS 910. Es wurde eine Korrektur auf das Alveolarmakrophagenvolumen und die Agglomeratdichte des jeweiligen Materials vorgenommen.**

Stoff	MMAD (GSD)	DF <sub>T</sub> /DF <sub>H</sub>	HEC/C <sub>T</sub>	Risikowerte sinken um Faktor <sup>10</sup>	Quelle
CB Printex 90	0,64 (2,06)	0,83	1,23	im Mittel 0,88	(Heinrich et al., 1995)
CB Printex 90	1,1 (k.A. <sup>11</sup> )	0,6	0,89		(Heinrich et al., 1994)
TiO <sub>2</sub> P25	0,8 (1,8)	0,75	0,62		(Heinrich et al., 1995)
Elftex-12	67% <sup>12</sup> : 1,95 (1,84) 33%: 0,1 (2,16)	67%: 0,34 33%: 0,94	0,80		(Nikula, 2000)

Insgesamt ergeben sich Konzentrationswerte von 18-78 µg/m<sup>3</sup>, die dem erniedrigten Akzeptanzrisiko von  $4 \times 10^{-5}$  zuzuordnen sind. Diese Option wird auch wegen der Befunde zur Gentoxizität nicht als wahrscheinlich angesehen und ist hier nur zum Zwecke des quantitativen Vergleiches noch enthalten.

Vergleicht man die Unterschiede bei der Wirkstärke der Entzündung und der inhalativen Kanzerogenität für nano- und mikroskalige GBS bei den Ratten, so erscheint der Unterschied bei der Entzündung mit einem Faktor 4 kaum höher zu sein. Bei der Kanzerogenität wurde ein Faktor 2-3 abgeschätzt. Dies kann durch die Unsicherheit beziehungsweise Variabilität der zugrunde liegenden Daten erklärt werden. Auch die beim Wirkstärkevergleich der Kanzerogenität zu Grunde liegenden Daten sind recht variabel, da aufgrund einer begrenzten Datenlage verschiedenste Studien mit unterschiedlichen Protokollen und verschiedenen Qualitätsstandards einbezogen werden mussten.

<sup>10</sup>  $HEC/C_T = 0,008 \times 1110 \times 0,15 \times DF_T/DF_H$

<sup>11</sup> Vermutet GSD=2

<sup>12</sup> Bezug auf Partikelmasse.

## Quellen

- AGS. Wissensstand bezüglich möglicher Wirkprinzipien und Gesundheitsgefahren durch Exposition mit arbeitsplatzrelevanten Nanomaterialien (PDF-Datei, 160 KB). 2011.
- Baan R A. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal Toxicol* 2007; 19 Suppl 1: 213-228.
- Balasubramanyam A, Sailaja N, Mahboob M, Rahman M F, Hussain S M, Grover P. In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis* 2009; 24(3): 245-251.
- Bermudez E, Mangum J B, Wong B A, Asgharian B, Hext P M, Warheit D B, Everitt J I. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 2004; 77(2): 347-357.
- Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins R P, Hoffmann E, Dopp E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol* 2009; 6: 17.
- Boisen A M, Shipley T, Jackson P, Hougaard K S, Wallin H, Yauk C L, Vogel U. NanoTiO<sub>2</sub> (UV-Titan) does not induce ESTR mutations in the germline of prenatally exposed female mice. *Part Fibre Toxicol* 2012; 9: 19.
- Creutzenberg O. Toxic effects of various modifications of a nanoparticle following inhalation. 1-404. 2013. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.
- Creutzenberg O, Bellmann B, Korolewitz R, Koch W, Mangelsdorf I, Tillmann T, Schaudien D. Change in agglomeration status and toxicokinetic fate of various nanoparticles in vivo following lung exposure in rats. *Inhal Toxicol* 2012; 24(12): 821-830.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft. Dust, general threshold limit value (respirable fraction, biopersistent granular dusts). 2013.
- Di Virgilio A L, Reigosa M, Arnal P M, Fernandez Lorenzo de M M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Hazard Mater* 2010; 177(1-3): 711-718.
- Don Porto C A, Hoet P H, Verschaeve L, Schoeters G, Nemery B. Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* 2001; 37(2): 155-163.
- Driscoll K E, Carter J M, Howard B W, Hassenbein D G, Pepelko W, Baggs R B, Oberdörster G. Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136(2): 372-380.
- Driscoll K E, Deyo L C, Carter J M, Howard B W, Hassenbein D G, Bertram T A. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* 1997; 18(2): 423-430.
- Elder A, Gelein R, Finkelstein J N, Driscoll K E, Harkema J, Oberdörster G. Effects of subchronically inhaled carbon black in three species. I. Retention kinetics, lung inflammation, and histopathology. *Toxicol Sci* 2005; 88(2): 614-629.



- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(8):1172-8. Erratum in: *Environ Health Perspect.* 2006;114(8):1178.
- Eydner M, Schaudien D, Creutzenberg O, Ernst H, Hansen T, Baumgartner W, Rittinghausen S. Impacts after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index. *Inhal Toxicol* 2012; 24(9): 557-569.
- Falck G C, Lindberg H K, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalan J, Savolainen K, Norppa H. Genotoxic effects of nanosized and fine TiO<sub>2</sub>. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28(6-7): 339-352.
- Feldherr C M, Akin D. Signal-mediated nuclear transport in proliferating and growth-arrested BALB/c 3T3 cells. *J Cell Biol* 1991; 115(4): 933-939.
- Gallagher J, Sams R, Inmon J, Gelein R, Elder A, Oberdörster G, Prahalad A K. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 190(3): 224-231.
- Gebel T. Small difference in carcinogenic potency between GBP nanomaterials and GBP micromaterials. *Arch Toxicol* 2012; 86(7): 995-1007.
- Geiser, M. (2010) Update on macrophage clearance of inhaled micro-and nanoparticles *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 23, 207-217
- Gonzalez L, Lison D, Kirsch-Volders M. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* 2008; 2(4): 252-273.
- Gopalan R C, Osman I F, Amani A, De Matas M, Anderson D. The effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the Comet assay with UVA photoactivation of human sperm and lymphocytes. *Nanotoxicology* 2009; 3(1): 33-39.
- Gurr J R, Wang A S, Chen C H, Jan K Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005; 213(1-2): 66-73.
- Hackenberg S, Friehs G, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Scherzed A, Burghartz M, Hagen R, Kleinsasser N. Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. *Toxicol Lett* 2010; 195(1): 9-14.
- Hackenberg S, Friehs G, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Scherzed A, Burghartz M, Kleinsasser N. Nanosized titanium dioxide particles do not induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2011a; 52(4): 264-268.
- Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Burghartz M, Hagen R, Kleinsasser N. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2011b; 25(3): 657-663.
- Heinrich U, Dungworth D L, Pott F, Peters L, Dasenbrock C, Levsen K, Koch W, Creutzenberg O, Schulte A. The Carcinogenic Effects of Carbon Black Particles and Tar-Pitch Condensation Aerosol after Inhalation Exposure of Rats. *Annals of Occupational Hygiene* 1994; 38(inhaled particles VII): 351-356.

- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K. Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* 1995; 7: 533-556.
- Hwang Y J, Jeung Y S, Seo M H, Yoon J Y, Kim D Y, Park J W, Han J H, Jeong S H. Asian dust and titanium dioxide particles-induced inflammation and oxidative DNA damage in C57BL/6 mice. *Inhal Toxicol* 2010; 22(13): 1127-1133.
- Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(5): 481-508.
- Jackson P, Hougaard K S, Boisen A M, Jacobsen N R, Jensen K A, Moller P, Brunborg G, Gutzkow K B, Andersen O, Loft S, Vogel U, Wallin H. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology* 2012; 6(5): 486-500.
- Jacobsen N R, Moller P, Jensen K A, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, Wallin H. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Part Fibre Toxicol* 2009; 6: 2.
- Jacobsen N R, Saber A T, White P, Moller P, Pojana G, Vogel U, Loft S, Gingerich J, Soper L, Douglas G R, Wallin H. Increased mutant frequency by carbon black, but not quartz, in the lacZ and cII transgenes of muta mouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 2007; 48(6): 451-461.
- Jugan M L, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology* 2011.
- Jugan M L, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology* 2012; 6(5): 501-513.
- Kang S J, Kim B M, Lee Y J, Chung H W. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2008; 49(5): 399-405.
- Karlsson H L, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 2009; 188(2): 112-118.
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Möller W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc Chem Res*. 2013;46(3):714-22.
- Krombach, F.; Münzing, S.; Allmeling, A.-M.; Gerlach, J.T.; Behr, J.; Dörger, M. (1997) Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison *Environmental Health Perspectives*, 105, Suppl. 5, 1261-1263
- Kumar A, Dhawan A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Arch Toxicol* 2013; 87(11): 1883-1900.
- Landsiedel R, Fabian E, Ma-Hock L, van Ravenzwaay B, Wohlleben W, Wiench K, Oesch F. Toxicology/biokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol*. 2012; 86(7):1021-60. Review. Erratum in: *Arch Toxicol*. 2012;86(7):1061.

- Landsiedel R, Kapp M D, Schulz M, Wiench K, Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers. *Mutat Res* 2009; 681(2-3): 241-258.
- Landsiedel R, Ma-Hock L, van R B, Schulz M, Wiench K, Champ S, Schulte S, Wohlleben W, Oesch F. Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology* 2010; 4: 364-381.
- Lindberg H K, Falck G C, Catalan J, Koivisto A J, Suhonen S, Jarventaus H, Rossi E M, Nykasenoja H, Peltonen Y, Moreno C, Alenius H, Tuomi T, Savolainen K M, Norppa H. Genotoxicity of inhaled nanosized TiO<sub>2</sub> in mice. *Mutat Res* 2011.
- Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 2014; 8: 233-278.
- Moreno-Horn M, Gebel T. Granular biodurable nanomaterials: No convincing evidence for systemic toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 2014:1-27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25257841.
- Mroz R M, Schins R P, Li H, Jimenez L A, Drost E M, Holownia A, Macnee W, Donaldson K. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. *Eur Respir J* 2008; 31(2): 241-251.
- Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K, Tanaka N. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat Res* 1997; 394(1-3): 125-132.
- Naya M, Kobayashi N, Ema M, Kasamoto S, Fukumuro M, Takami S, Nakajima M, Hayashi M, Nakanishi J. In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 62(1): 1-6.
- Nikula K J. Rat lung tumors induced by exposure to selected poorly soluble nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* 2000; 12(1-2): 97-119.
- Nikula K J, Snipes M B, Barr E B, Griffith W C, Henderson R F, Mauderly J L. Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 1995; 25(1): 80-94.
- Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm S C, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 1992; 97: 193-199.
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert B E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 5: 173-179.
- Oesch F, Landsiedel R. Genotoxicity investigations on nanomaterials. *Arch Toxicol* 2012; 86(7): 985-994.
- Osman I F, Baumgartner A, Cemeli E, Fletcher J N, Anderson D. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEP-2 cells. *Nanomedicine (Lond)* 2010; 5(8): 1193-1203.
- Pauluhn J. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci* 2009; 109(1): 152-167.

- Pauluhn J. Poorly soluble particulates: searching for a unifying denominator of nanoparticles and fine particles for DNEL estimation. *Toxicology* 2011; 279(1-3): 176-188.
- Pauluhn J. The metrics of MWCNT-induced pulmonary inflammation are dependent on the selected testing regimen. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014; 68(3):343-352.
- Phalen R F, Mendez L B, Oldham M J. New developments in aerosol dosimetry. *Inhal Toxicol* 2010; 22 Suppl 2: 6-14.
- Preining O (1998) The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *Journal of Aerosol Science* 29(5-6):481-495
- Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss D G, Schiffmann D. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect* 2002; 110(8): 797-800.
- Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189(2): 84-95.
- Saber A T, Bornholdt J, Dybdahl M, Sharma A K, Loft S, Vogel U, Wallin H. Tumor necrosis factor is not required for particle-induced genotoxicity and pulmonary inflammation. *Arch Toxicol* 2005; 79(3): 177-182.
- Saber A T, Jensen K A, Jacobsen N R, Birkedal R, Mikkelsen L, Moller P, Loft S, Wallin H, Vogel U. Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology* 2011.
- Sadeghiani N, Barbosa L S, Silva L P, Azevedo R B, Morais P C, Lacava Z G M. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005; 289(0): 466-468.
- Sadiq R, Bhalli J A, Yan J, Woodruff R S, Pearce M G, Li Y, Mustafa T, Watanabe F, Pack L M, Biris A S, Khan Q M, Chen T. Genotoxicity of TiO<sub>2</sub> anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. *Mutat Res* 2012; 745(1-2): 65-72.
- Saqib Q, Al-Khedhairi A A, Siddiqui M A, Abou-Tarboush F M, Azam A, Musarrat J. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol In Vitro* 2011.
- Schins R P, Knaapen A M. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol* 2007; 19 Suppl 1: 189-198.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10: 15.
- Shukla R K, Sharma V, Pandey A K, Singh S, Sultana S, Dhawan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol In Vitro* 2011; 25(1): 231-241.
- Singh N, Manshian B, Jenkins G J, Griffiths S M, Williams P M, Maffei T G, Wright C J, Doak S H. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 2009; 30(23-24): 3891-3914.

- Srivastava R K, Rahman Q, Kashyap M P, Lohani M, Pant A B. Ameliorative effects of dimethylthiourea and N-acetylcysteine on nanoparticles induced cyto-genotoxicity in human lung cancer cells-A549. *PLoS One* 2011; 6(9): e25767.
- Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, Song MY, Jeong J, Han BS, Han JH, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Cho MH, Kelman BJ, Yu IJ. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2009; 108(2):452-61.
- Sycheva L P, Zhurkov V S, Iurchenko V V, Daugel-Dauge N O, Kovalenko M A, Krivtsova E K, Durnev A D. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutat Res* 2011; 726(1): 8-14.
- Theogaraj E, Riley S, Hughes L, Maier M, Kirkland D. An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutat Res* 2007; 634(1-2): 205-219.
- Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinoshita N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol* 2009; 6: 23.
- Toyooka T, Amano T, Ibuki Y. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat Res* 2012; 742(1-2): 84-91.
- Tran C L, Buchanan D, Cullen R T, Searl A, Jones A D, Donaldson K. Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence Of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol* 2000; 12(12): 1113-1126.
- Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl R H. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 2009; 69(22): 8784-8789.
- Wang J J, Sanderson B J, Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 2007; 628(2): 99-106.
- Wang S, Hunter L A, Arslan Z, Wilkerson M G, Wickliffe J K. Chronic exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to Chinese hamster ovary cells. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52(8): 614-622.
- Woodruff R S, Li Y, Yan J, Bishop M, Jones M Y, Watanabe F, Biris A S, Rice P, Zhou T, Chen T. Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and Comet assay. *J Appl Toxicol* 2012; 32(11): 934-943.
- Xu A, Chai Y, Nohmi T, Hei T K. Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells. *Part Fibre Toxicol* 2009; 6: 3.
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 2009; 29(1): 69-78.