
CarboTox – Entwicklung von Screening-Verfahren zur Untersuchung eines möglichen kanzerogenen Potentials von Carbon Nanotubes

BMBF Förderkennzeichen 03X0109A

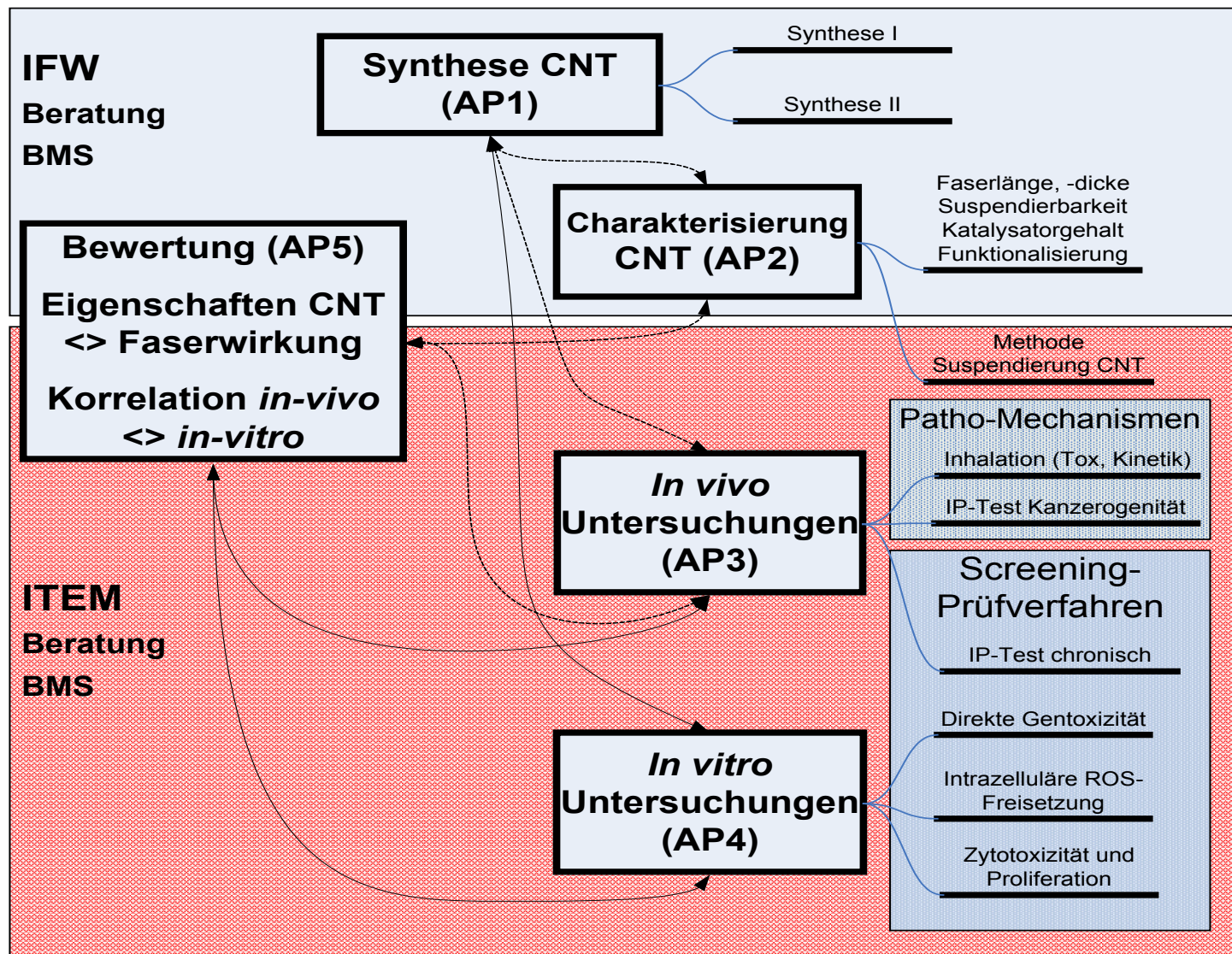


Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

**Projektpartner
Fraunhofer ITEM
Leibniz-Institut IFW
Bayer MaterialScience AG (BMS)**



Schema der geplanten Untersuchungen mit Arbeitspaketen (AP)



Zeitplanung

Arbeits-Paket	Arbeitsschritt	Partner	2010			2011			2012			2013		
AP1	Synthese CNT	IFW	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
AP2	Methode Suspendierung	ITEM	x	x	x									
	Charakterisierung CNT	IFW		x	x	x	x	x	x	x	x	x		
AP3	Inhalation: Tox. und Kinetik													
	Exposition	ITEM									x	x		
	Auswertungen	ITEM									x	x	x	x
	IP chronisch	ITEM						x	x	x	x	x	x	x
	IP Kanzttest	ITEM					x	x	x	x	x	x	x	x
AP4	<i>In vitro</i> Untersuchungen	ITEM			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
AP5	Bewertung/Berichtserstellung	ITEM/IFW											x	x

Meilenstein 01.06.2011: Nachweis der Suspendierbarkeit von CNT-Fasern zu Einzel-fasern in lungenähnlichem Milieu und Etablierung einer effektiven Längenkontrolle

Prüf- und Referenzsubstanzen

Probe	Faserart	Bemerkung
CNT 1	CNT (Länge > 5 µm, D ≈ 40 nm) Mittlere Länge WHO-Fasern 5- 10 µm	
CNT 2	CNT (Länge >10 µm, D ≈ 40 nm) Mittlere Länge WHO-Fasern > 10 µm	
CNT 3	CNT (Länge > 5 µm, D ≈ 60 nm)	Mitsui-Faser oder ähnliche
CNT 4	CNT + OH (Länge > 5 µm, D ≈ 15 nm)	Hydrophil, suspendierbar
CNT 5	CNT (Länge > 5 µm, D ≈ 15 nm)	nicht suspendierbar
Positivkontrolle	Asbest (langer Amosit)	kanzerogen
Partikel-Kontrolle	CNT 3 kleingemahlen	nicht kanzerogen
Partikel-Kontrolle	Carbon Black (Printex 90)	
CNT-Kontrolle (Partikelwirkung)	Baytubes®	nicht suspendierbar

AP1 Synthese der Prüfsubstanzen

- **Durchführung im IFW**
- **Synthese der CNT für Suspendierungsversuche
(CNT1, CNT2, CNT3) ca. 100 mg bis März 2011**
- **Synthese der CNT für Kanzerogenitätsversuch
(CNT1, CNT2, CNT3, CNT3 gemahlen) bis Sep. 2011**
- **Synthese der CNT für Inhalationsversuch
(CNT1, CNT2, CNT3) bis Juni 2012**
- **Synthese weiterer CNT für In vitro-Versuche
(CNT4, CNT5) bis Sep. 2012**

AP2 Charakterisierung der CNT-Proben

- **Analyse von Struktur (Durchmesser, Länge, Hüllenstruktur) und des Katalysatorgehalts im IFW**
- **Etablierung einer Standardmethode zur Suspendierbarkeit in einem lungenähnlichen Milieu (z.B. Tween 80, BAL-Flüssigkeit, Dispersionsmedium nach Porter 2008)**
- **Abbruchkriterium: Falls keine CNT-Proben gefunden werden, die sich im lungenähnlichen Milieu zu Einzelfasern suspendieren lassen, wird das Projekt abgebrochen. Außerdem soll eine effektive Längenkontrolle etabliert sein. Überprüfung Anfang Juni 2011 erfolgreich**

Suspendierung von CNT-Proben und Amosit

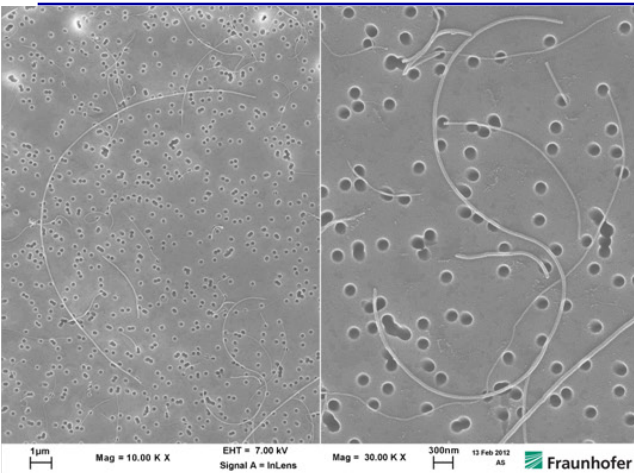


Abbildung 1
MWCNT 1 Suspension

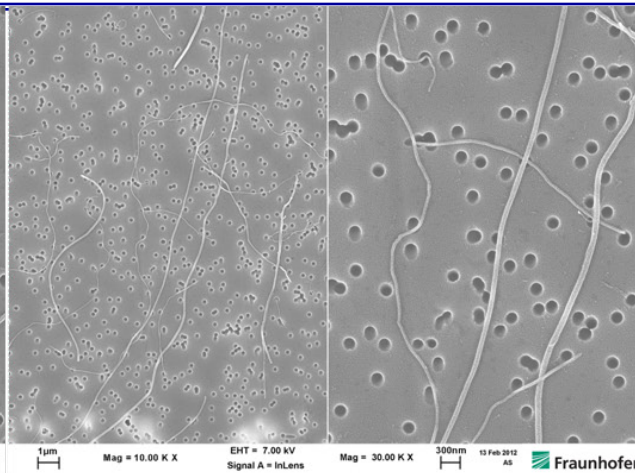


Abbildung 2
MWCNT 2 Suspension

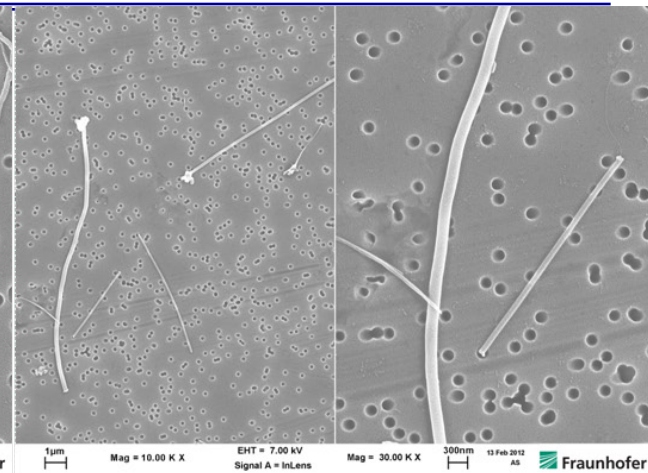


Abbildung 3
MWCNT 3 Suspension

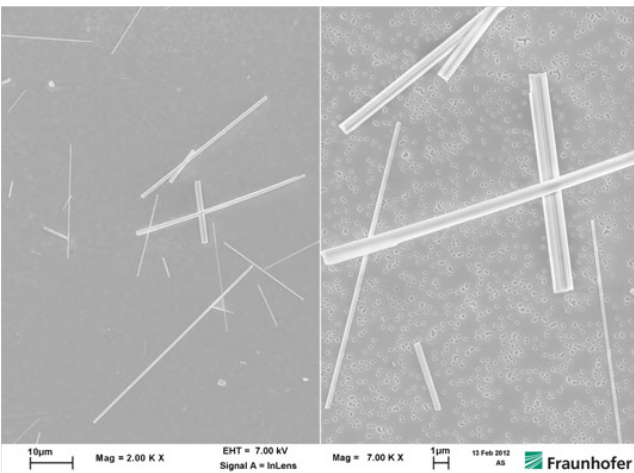


Abbildung 4
Suspension der langen Amositfasern

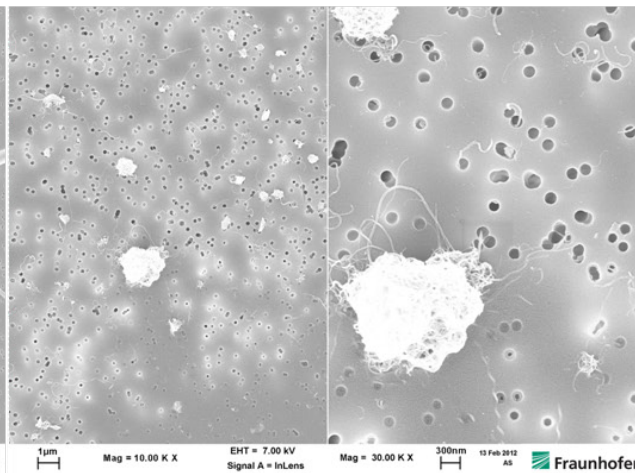


Abbildung 5
Baytubes® Suspension

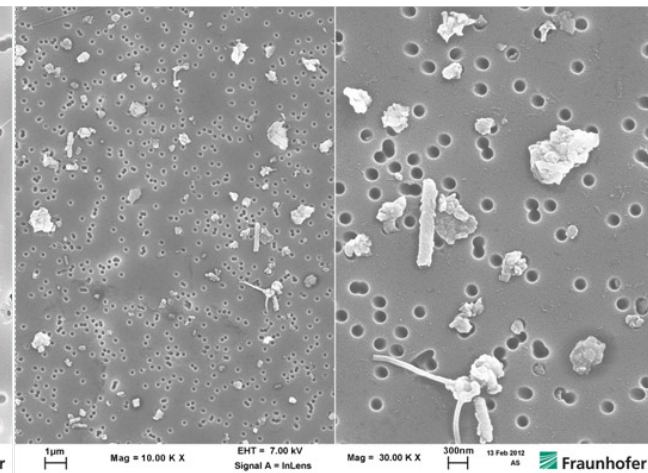


Abbildung 6
Suspension gemahlener MWCNT 3

L-D-Verteilung der CNT-Proben und Amosit

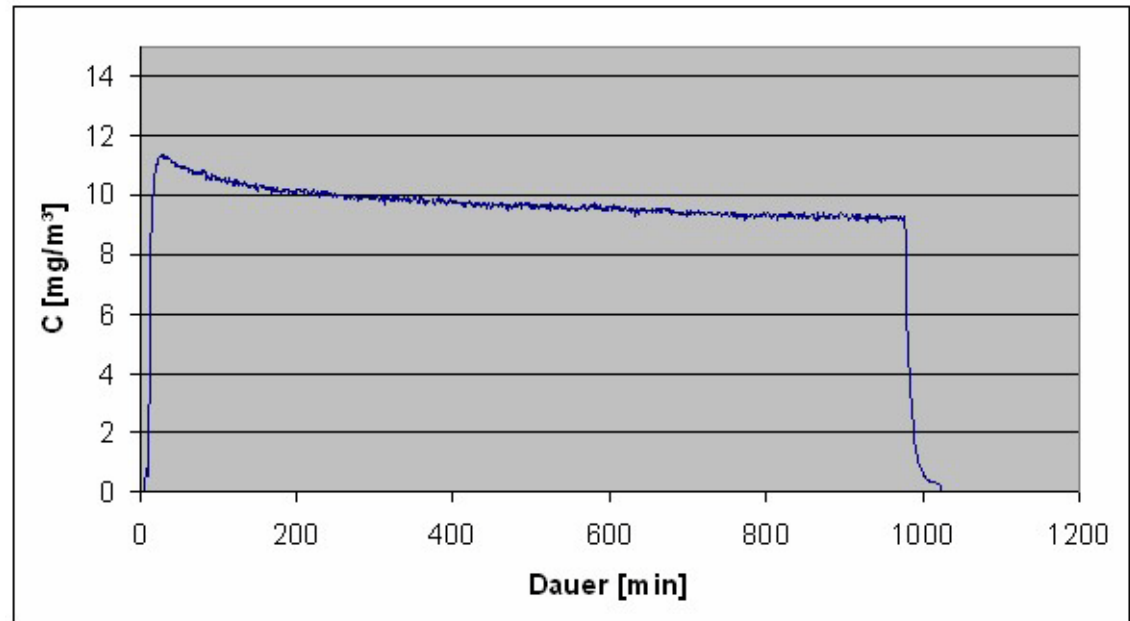
Substance (Katalysator)	Length (μm)	Length (μm) WHO-Fibers	Diameter (nm) WHO-Fibers	Fiber concentration (10^9 WHO fibers/mg)	Fibers [$L > 20\mu\text{m}$] (% of WHO fibers)
CNT 1 (Co)	1,8	7,7	39	18,6	0,6
CNT 2 (Fe)	4,8	11,3	44	12,9	8,2
CNT 3 (Fe)	3,3	8,5	59	5,19	1,5
Amosite Asbestos	13,7	19,8	414	0,072	13,8
Ground CNT 3 (Fe)	0,9	-	-	-	-
Baytubes® C 150P (Co)	0,9*	-	-	-	-

* 2 mass% of agglomerates were fibers (length < 5 μm ; diameter: in the range of 10 nm)

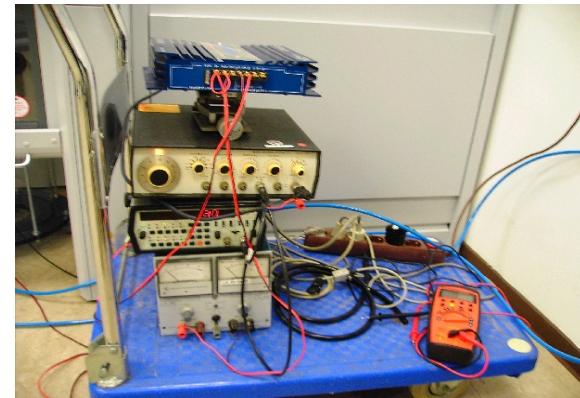
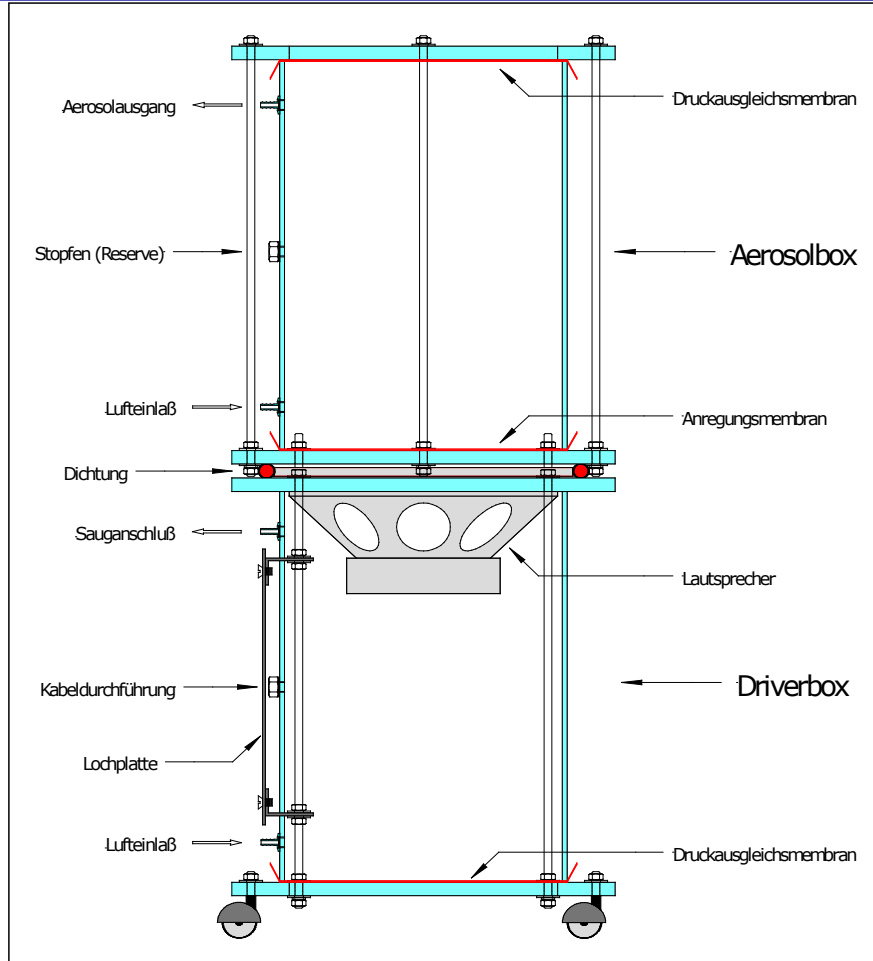
AP3 In vivo-Untersuchungen (1)

- **Inhalation: Toxizität und Persistenz in der Lunge**
CNT1, CNT2, CNT3, Amosit, Printex 90, Kontrolle
13 Wochen, 5 Tage/Woche, 6 Std./Tag, 1 mg/m³

**Aerosolerzeugung nach
NIOSH-Methode
Testlauf mit 4 l/min**



CNT-Aerosolerzeugung nach NIOSH-Methode



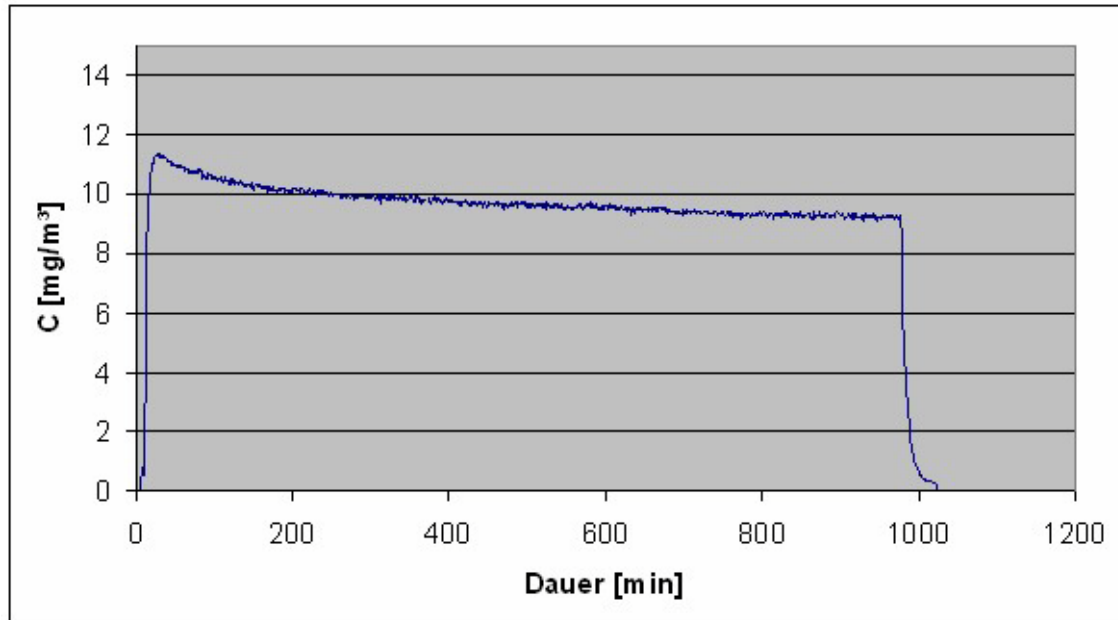
Nach: McKinney W, Chen B, Frazer D. Computer controlled multi-walled carbon nanotube inhalation exposure system. Inhalation Toxicology 2009;21(12):1053-1061

CNT - Generator
02.02.2012 Dunkhorst

AP3 In vivo-Untersuchungen (1)

- **Inhalation: Toxizität und Persistenz in der Lunge**
CNT1, CNT2, CNT3, Amosit, Printex 90, Kontrolle
13 Wochen, 5 Tage/Woche, 6 Std./Tag, 1 mg/m³

Aerosolerzeugung nach NIOSH-Methode
Testlauf mit 4 l/min



Untersuchungen Woche 13 und 26

Histopathologie, Zellproliferation (BrdU), Gentoxxmarker (8-OHdG und γ H2AX)

BAL (diff. Zellzählung, LDH, β -Glucuronidase, Protein)

- **Wanderung der CNT zur Serosa**
Agaroseabguß vom Pleuraspalt, Faser-Analyse

AP3 In vivo-Untersuchungen (2)

IP-Test zur Kanzerogenität bei Ratten

- **Gruppen:** CNT1, CNT2, CNT3 je 1×10^9 und 5×10^9 WHO-Fasern, langer Amosit 1×10^8 WHO-Fasern, Kontrolle, 50 Ratten/Gruppe, Start Oktober 2011

Versuchsende wenn Mortalität in Behandlungsgruppen $> 80\%$ (Voraussichtlich etwa 24 Monate)

Histopathologie: Inzidenz Mesotheliome

Erste Ergebnisse: Nach 4-5 Monaten erste Tumore bei MWCNT 3

IP-Test chronisch: Zell-Proliferation Zwerchfell

- **Gruppen wie zuvor (+ CNT3 gemahlen, Printex 90)**
- **15 Ratten/Gruppe, Start November 2011**

Sektion nach 3, 6 und 12 Monaten

Zellproliferation (BrdU) im Peritoneum des Zwerchfells

Screeningtest auf Kanzerogenität?

AP4 In vitro-Untersuchungen (1)

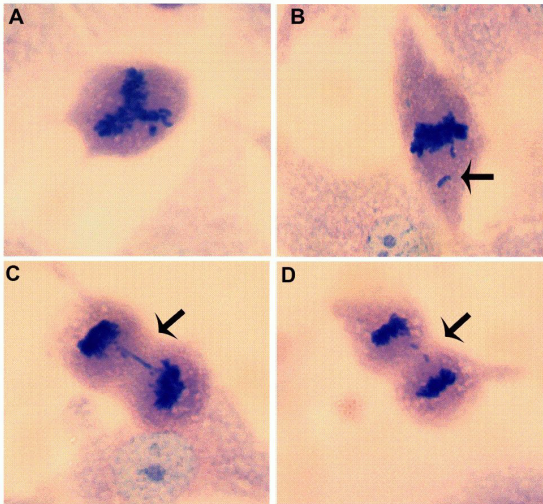
MeT-5A Zellen als *in vitro* Modellsystem

SV40-immortalisierte mesentheliale Pleurazellen aus dem Menschen
(Ke et al., 1989, Bezug über ATCC)

- Nicht –maligner Phänotyp!

Eigene Vorversuche: Induktion von DNA-Strangbrüchen, oxidativen DNA-Schäden, vermehrte LDH-Freisetzung + verminderte Proliferation durch langen Amosit Asbest.

Genetische Instabilität! Nur < 10% Zellen mit normalem diploiden Chromosomensatz von 46 Chromosomen (Range: 32 bis >100 Chromosomen), basal Mikrokernfrequenz von ca. 4% (V79 Zellen 0.8%) und aberrante Meta-, Ana- und Telophasen.



-> Eignung für gentoxikologische Endpunkte, speziell für Chromosomenanalysen ist fraglich!

Alternativmodelle (Dickson et al., 2000):

- Primäre peritoneale Mesothelzelllinie **LP9**
- TERT-immortalisierte LP9-Zellen: **LP9/TERT-1**

Normaler Chromosomensatz!

AP4 In vitro-Untersuchungen (2)

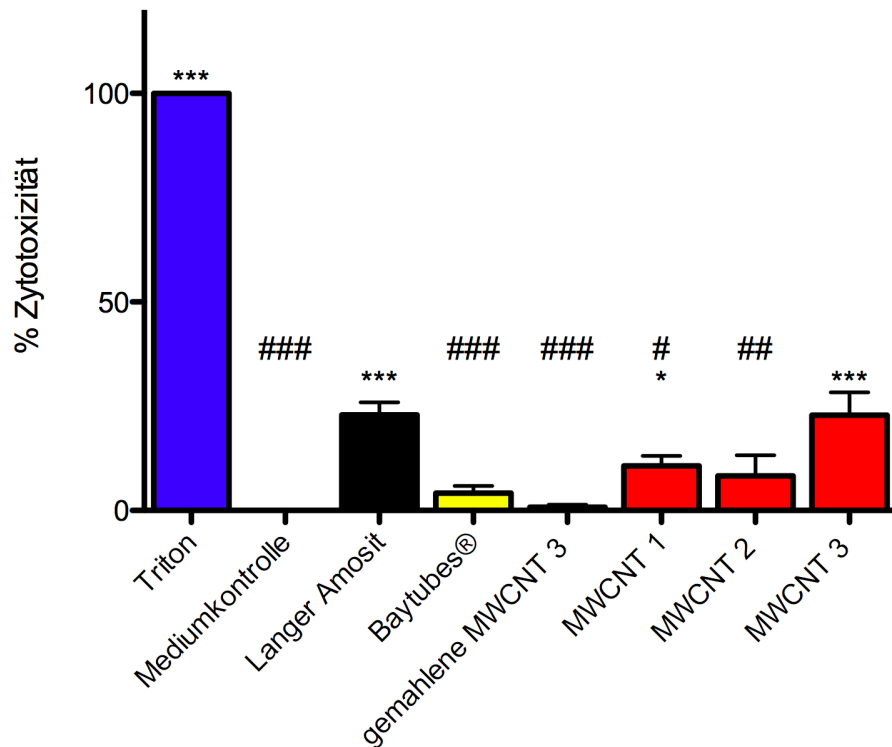
Endpunkte:

- **Zytotoxizität (LDH-Freisetzung, Assay Modifikation für MWCNT)**
- **Proliferation („Relative Increase in Cell Counts“, RICC; Klonierungseffizienz)**
- **DNA-Schäden (Strangbrüche + oxidative Basenmodifikationen) mittels hOGG1-modifiziertem Comet-Assay**
- **Meta-, Ana- und Telophaseanalysen (Spindelfasereffekte)**
- ***In vitro* Mikrokerntest (optional mit FISH Analytik zur Differenzierung klastogener und aneugener Effekte)**
- **Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**
- **Optional: Immunzytochemischer Nachweis und Quantifizierung von γ -H2AX- und 8-OH-dG-positiven Zellkernen (abhängig vom direkten gentoxischen Potential der MWCNT)**

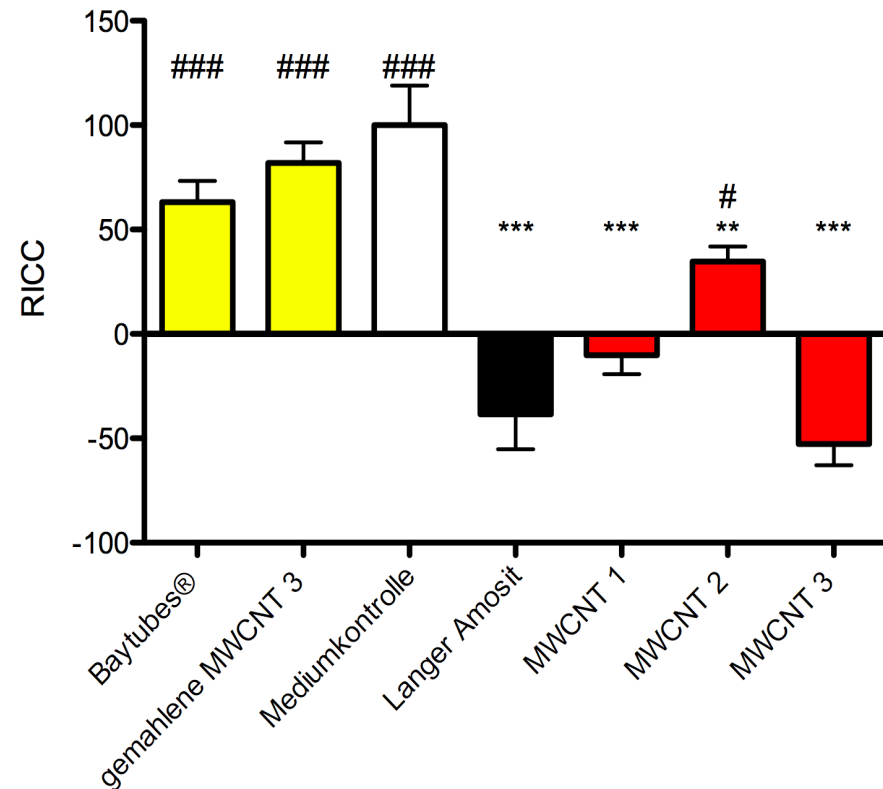
AP4 In vitro-Untersuchungen (3)

Erste Ergebnisse: 24 h Inkubation (MeT-5A)

Zytotoxizität (LDH-Aktivität):



Zellwachstumstest:

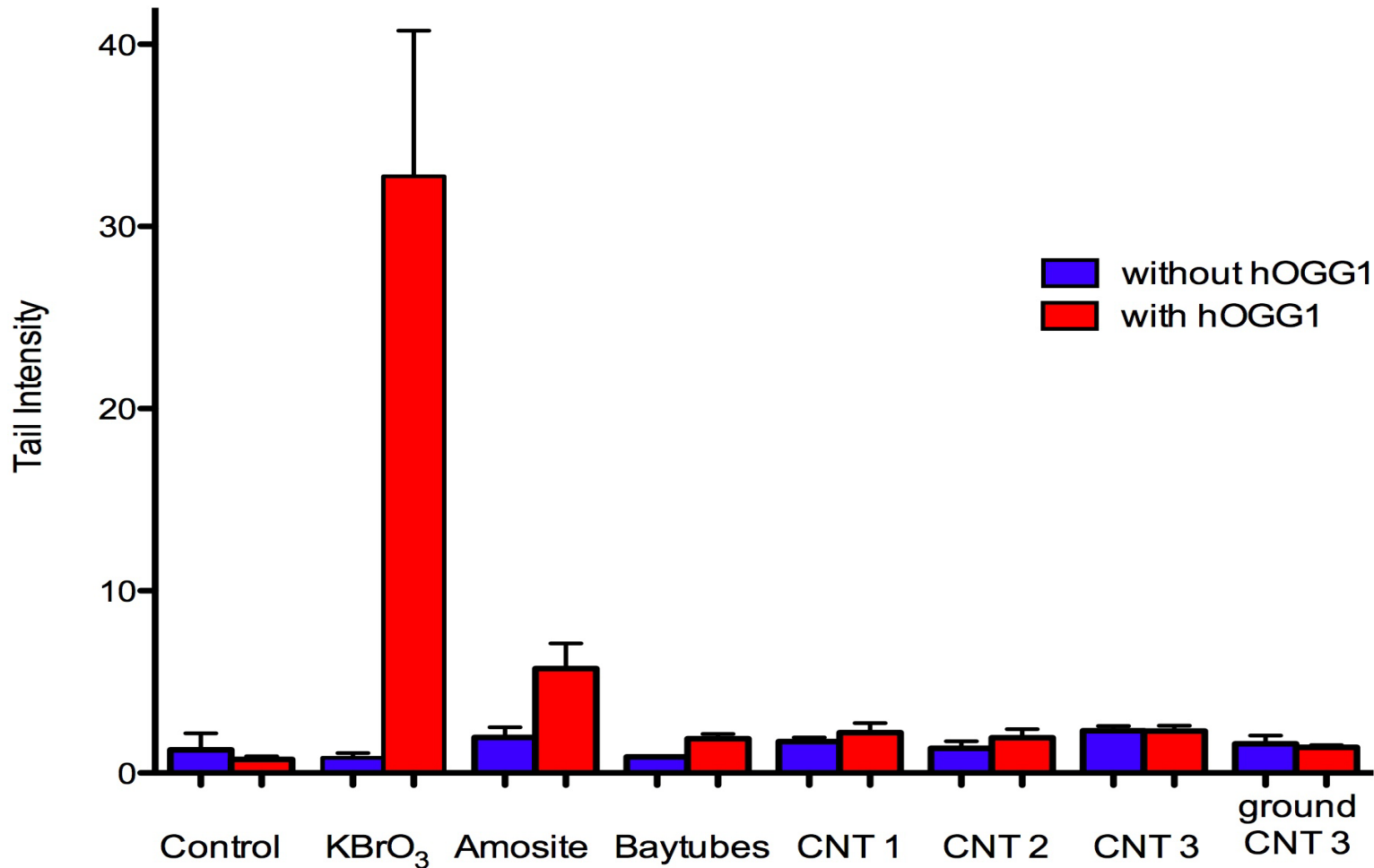


* Signifikanter Unterschied zur Kontrolle
 # Signifikanter Unterschied zu Asbest
 Tukey's Test

AP4 In vitro-Untersuchungen (4)

Erste Ergebnisse: DNA-Schäden (hOGG1-modifizierter Comet-Assay)

Comet Assay - Tail Intensity



Summary

➤ Erste Ergebnisse

➤ *In vivo:*

- Erste Hinweise auf kanzerogenes Potential für MWCNT 3 schon 4 Monate nach IP-Injektion
- Aerosolerzeugung für CNT nach NIOSH-Methode erfolgreich

➤ *In vitro:*

- Bei Zytotoxizität und Zellproliferation (MeT-5A Zellen) stärkster Effekt durch:

Amosit ~ MWCNT3 > MWCNT1 > MWCNT2