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

BMBF Förderkennzeichen 03X0109A

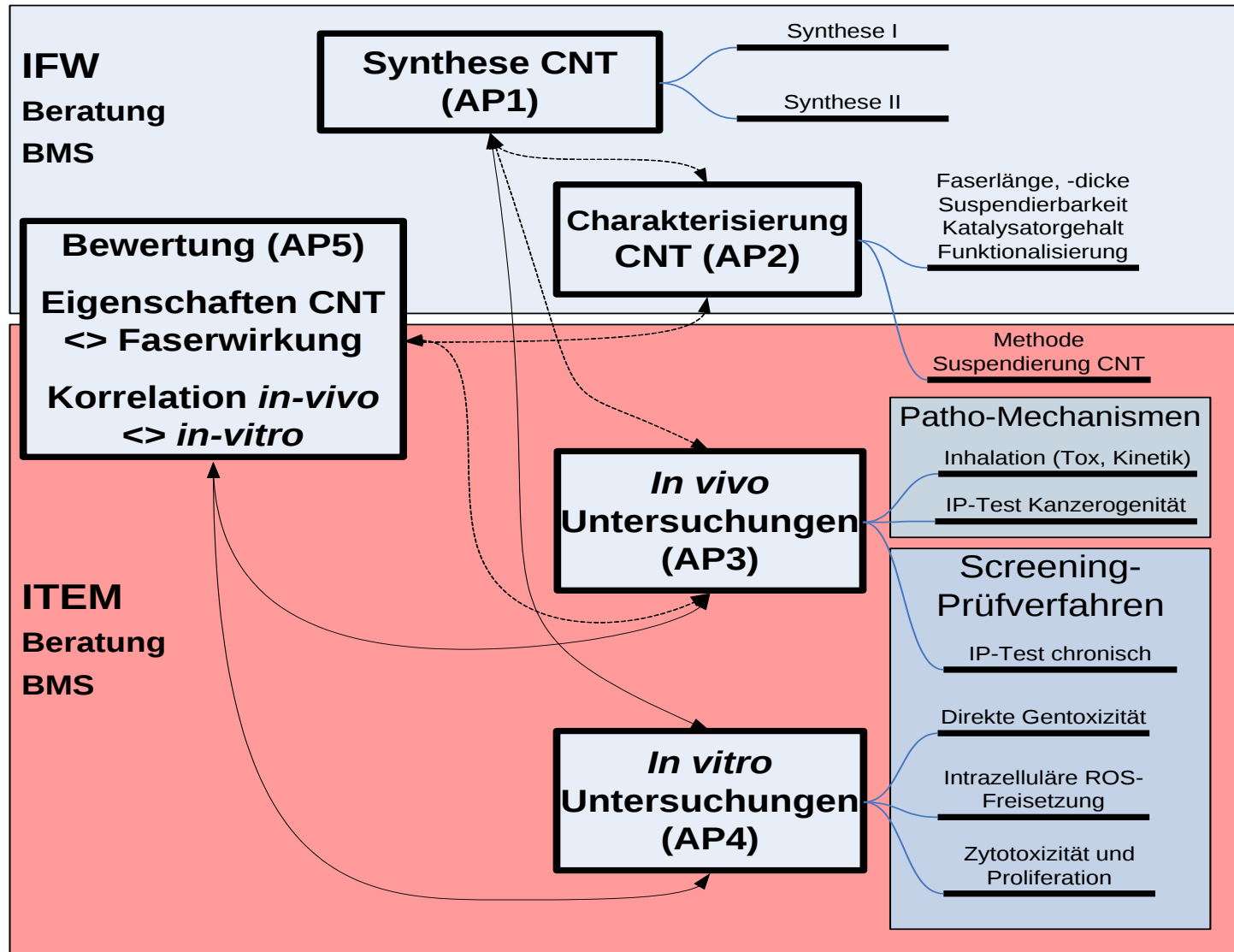


Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

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



Schema der geplanten Untersuchungen mit Arbeitspaketen (AP)



Prüf- und Referenzsubstanzen

Probe	Faserart	Bemerkung	IP-Kanz.	IP-Chron.	90d Inhal.	In vitro
CNT 1	CNT (Länge > 5 µm, D ≈ 40nm)		x	x	x	x
CNT 2	CNT (Länge >10 µm, D ≈ 40nm)		x	x	x	x
CNT 3 / 3a	CNT (Länge > 5 µm, D ≈ 60 nm)	Ähnlich Mitsui-Faser	x/x	x/-	-/x	x/x
CNT 4	CNT5 + OH (Länge > 5 µm, D ≈ 15 nm)	Hydrophil, suspendierbar	-	-	-	x
CNT 5	CNT (Länge > 5 µm, D ≈ 15nm)	Vermutlich nicht suspendierbar	-	-	-	x
Positiv- kontrolle	Asbest (langer Amosit)	kanzerogen	x	x	x	x
Partikel- Kontrolle	Printex 90	nicht kanzerogen (ohne Overload)	-	x	x	x
Partikel- Kontrolle	CNT 3 kleingemahlen	nicht kanzerogen	-	x	-	x
CNT-Kontrolle (Partikel- wirkung)	Baytubes®	nicht suspendierbar	-	-	-	x

AP1 Synthese der Prüfsubstanzen

- **Durchführung im IFW**
- **Siehe Poster ...**

Suspendierung von CNT-Proben und Amosit

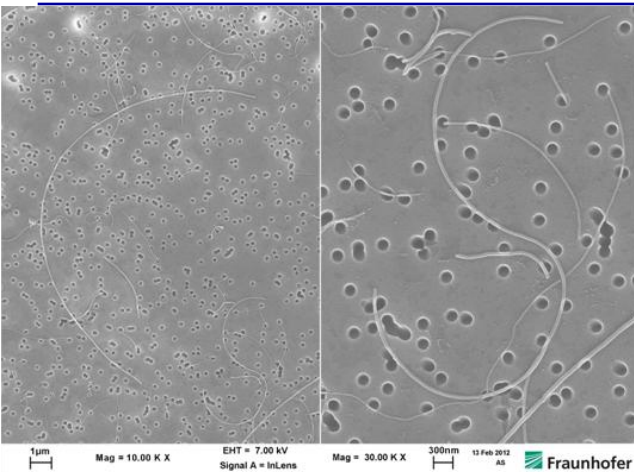


Abbildung 1
MWCNT 1 Suspension

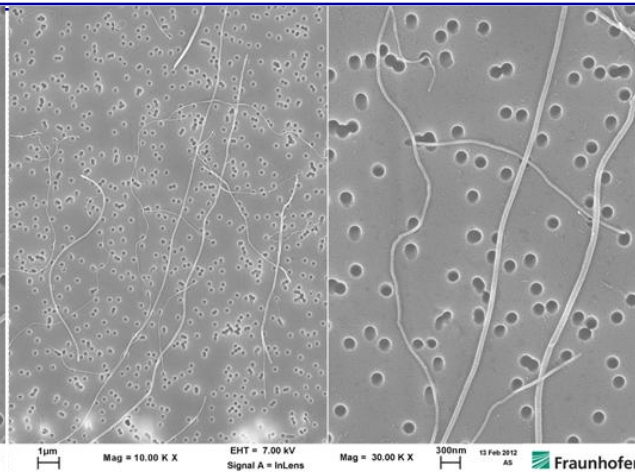


Abbildung 2
MWCNT 2 Suspension

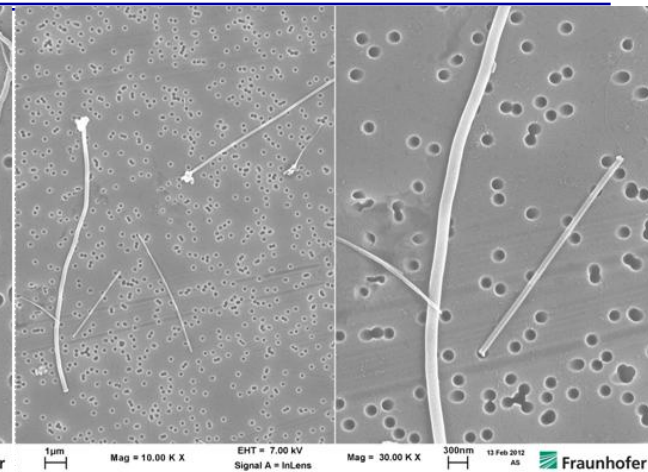


Abbildung 3
MWCNT 3 Suspension

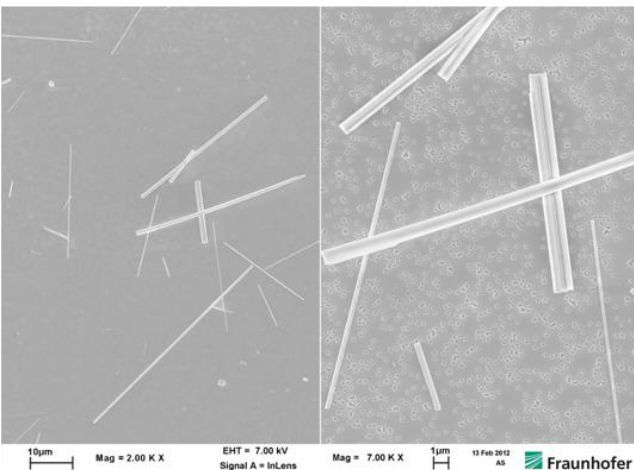


Abbildung 4
Suspension der langen Amositfasern

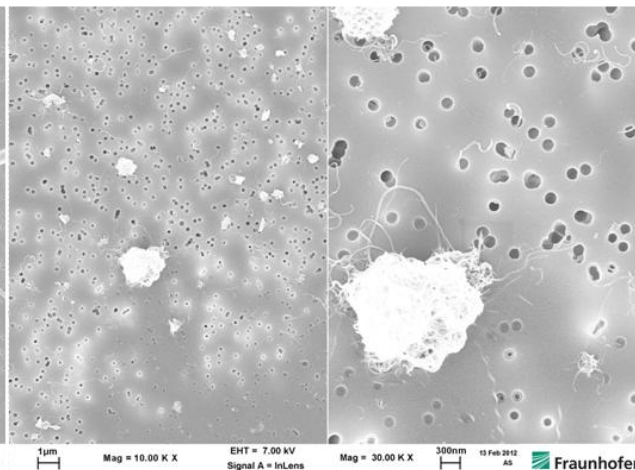


Abbildung 5
Baytubes® Suspension

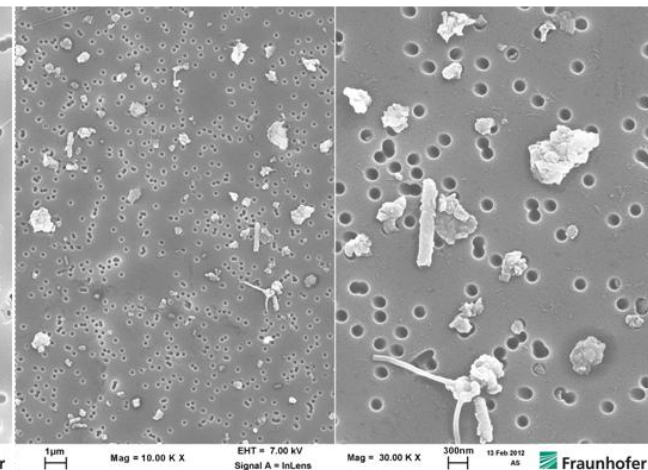


Abbildung 6
Suspension gemahlener MWCNT 3

L-D-Verteilung der CNT-Proben und Amosit

Sample	Catalyst	GMD [μm]	GML [μm]	Fibre concentration [10^9 WHO Fibres/mg]	Fibers (L>20 μm) [% of WHO fibers]
CNT 1	Co/Fe	0.037	7.9	30.2	2.1
CNT 2	Fe	0.040	10.6	10.9	13.9
CNT 3	Fe	0.085	8.6	2.4	3.8
CNT 3a	Fe	0.062	9.3	1.6	9.4
Amosite		0.39	14.0	0.10	28.6

Messungen der WHO-Fasern in Suspensionen für IP-Versuche
GMD: Geometrischer Mittelwert des Durchmessers;
GML: Geometrischer Mittelwert der Länge

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**

(CNT3a: Start Juni 2012)

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

Histopathologie: Inzidenz Mesotheliome

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?

Mortalität nach IP-Injektion

Group	Mortalität [%] in month after IP-injection												
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	2								4	6	8		
CNT1 low	2									4	8		
CNT1 high						2		4	6		10	14	18
CNT2 low							2	12	24	36	46	56	58
CNT2 high				8	20	46	66	100					
CNT3 low		2	6	40	60	100							
CNT3 high		6	14	52	82	100							
Amosite						2		4		6	8	10	12
CNT3a low				4	8								
CNT3a high		2	12	30	34								

Status: 11.01.2013

= Histopathology of the *Carcinogenicity Study*

Status: January 10, 2013

Group	No. Rats	Blocked	Histology	Malignant Mesothelioma
■ 1 <u>Control</u>	50	4	1	0
■ 2 <u>CNT 1 low</u>	50	4	4	0
■ 3 <u>CNT 1 high</u>	50	9	9	3
■ 4 <u>CNT 2 low</u>	50	29	27	24
■ 5 <u>CNT 2 high</u>	50	50	44	41
■ 6 <u>CNT 3 low</u>	50	50	44	44
■ 7 <u>CNT 3 high</u>	50	50	46	43
■ 8 <u>Amosite</u>	50	6	6	2
■ 11 <u>CNT 3a low</u>	50	2	2	2
■ 12 <u>CNT 3a high</u>	50	13	12	12

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 (CNT3a: Start Juni 2012)

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

Histopathologie: Inzidenz Mesotheliome

IP-Test chronisch: Zell-Proliferation Zwerchfell

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

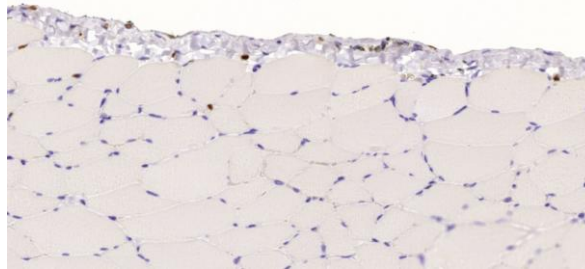
Sektion nach 3, 6 und 12 Monaten

Zellproliferation (BrdU) im Peritoneum des Zwerchfells

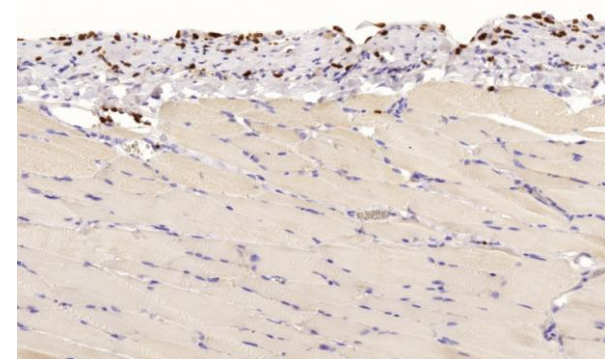
Screeningtest auf Kanzerogenität?

Peritoneum des Zwerchfells 3 Monate nach IP-Injektion

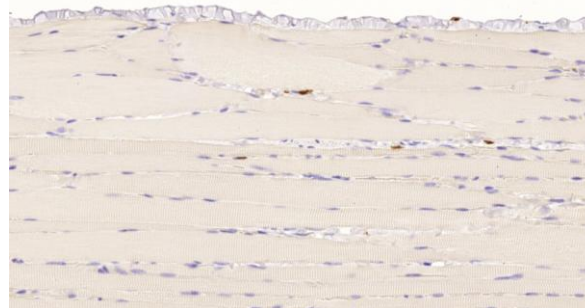
MWCNT 1 (high dosis)



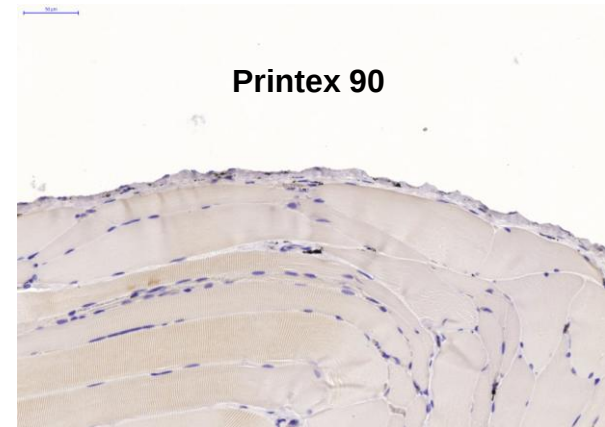
MWCNT 2 (high dosis)



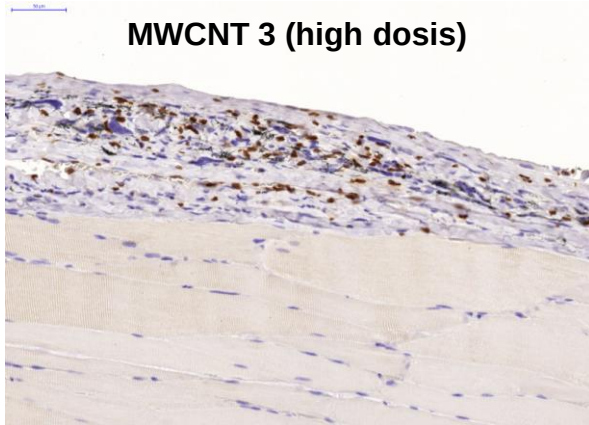
Mediumkontrolle



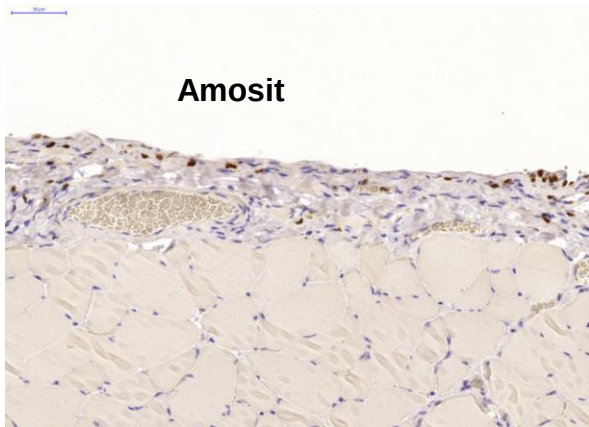
Printex 90



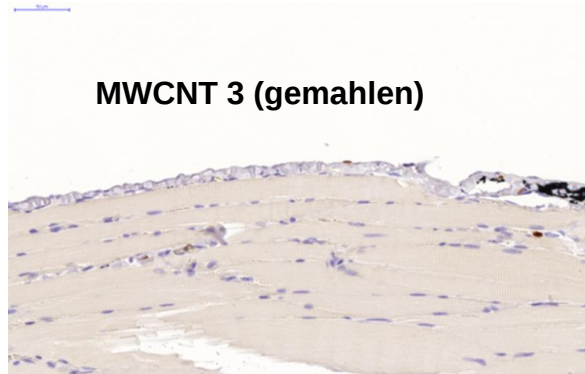
MWCNT 3 (high dosis)



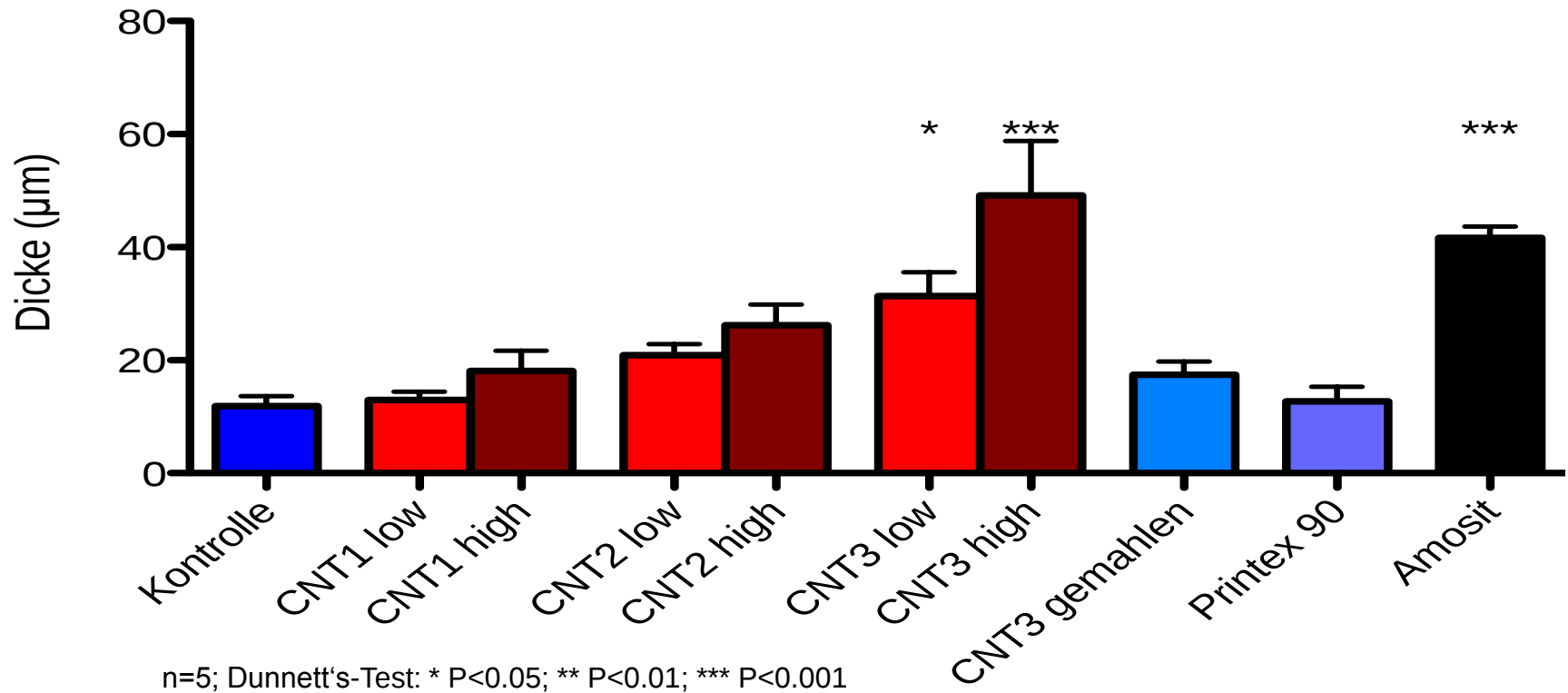
Amosit



MWCNT 3 (gemahlen)



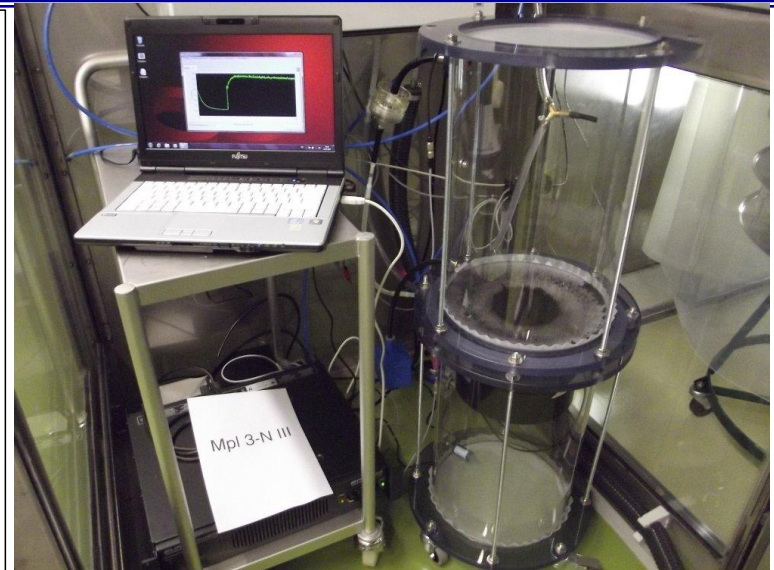
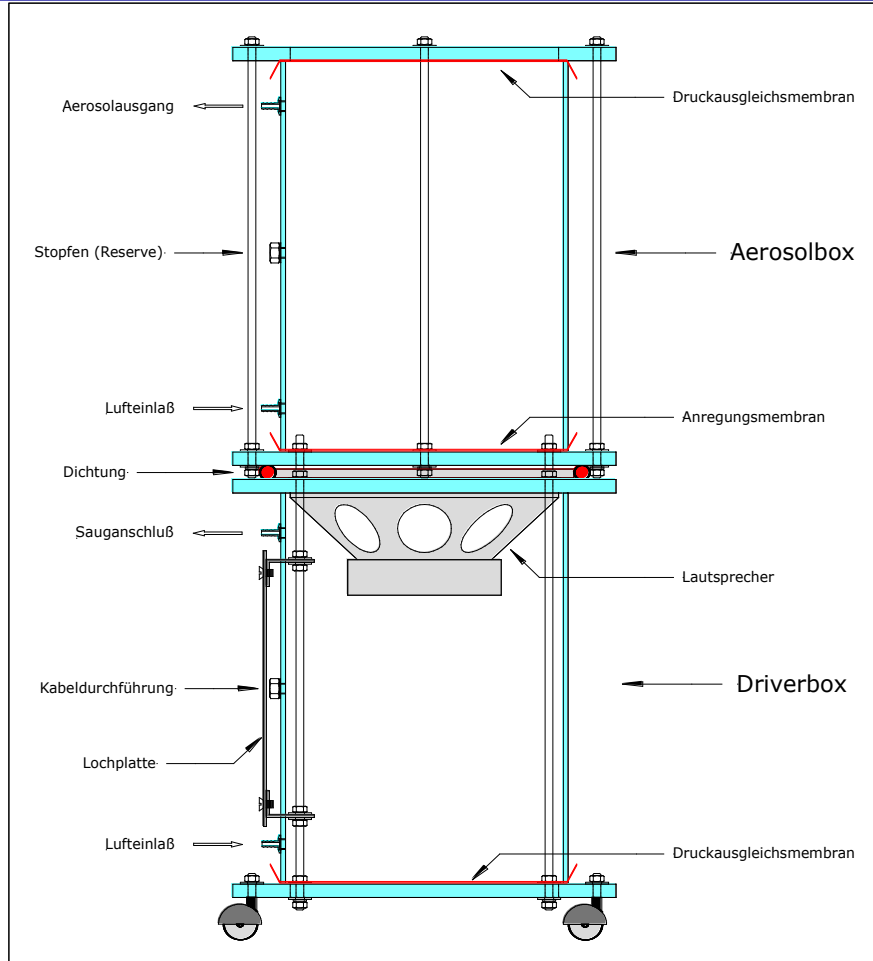
Dicke des Peritoneums



AP3 In vivo-Untersuchungen (1)

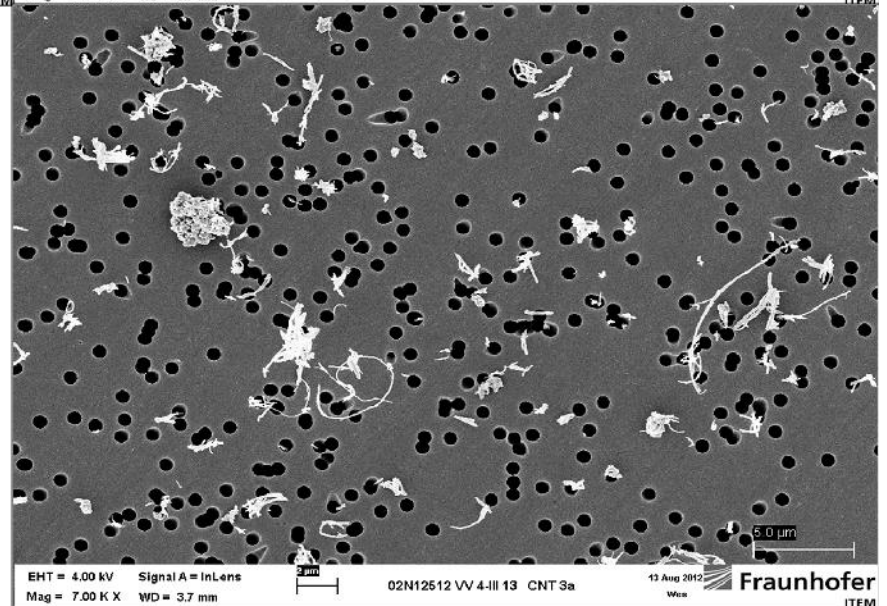
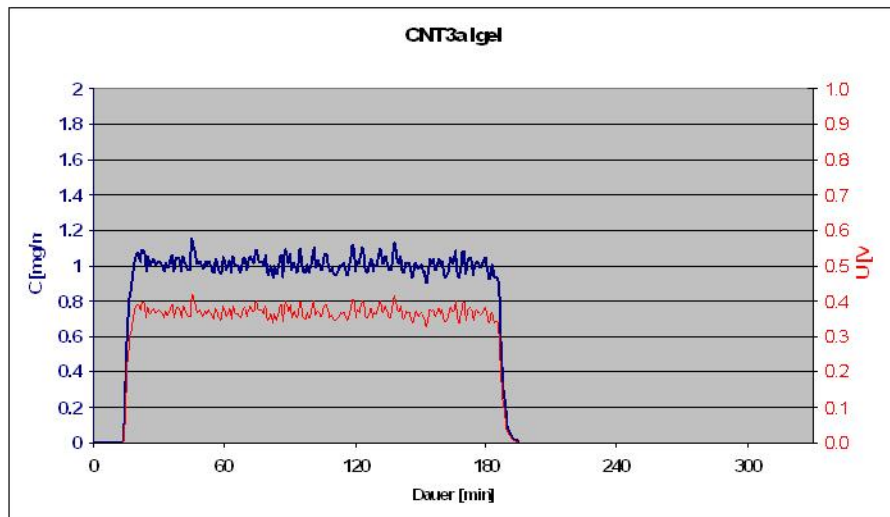
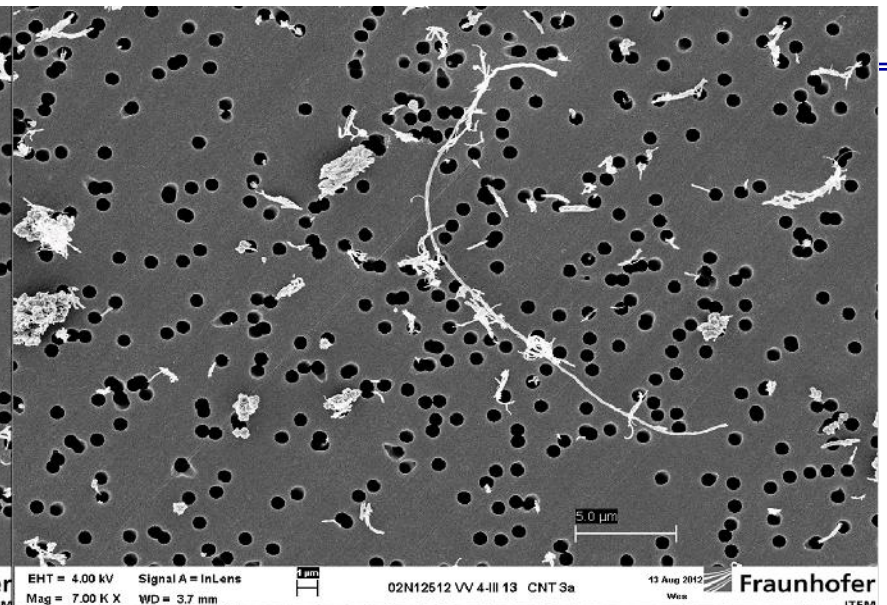
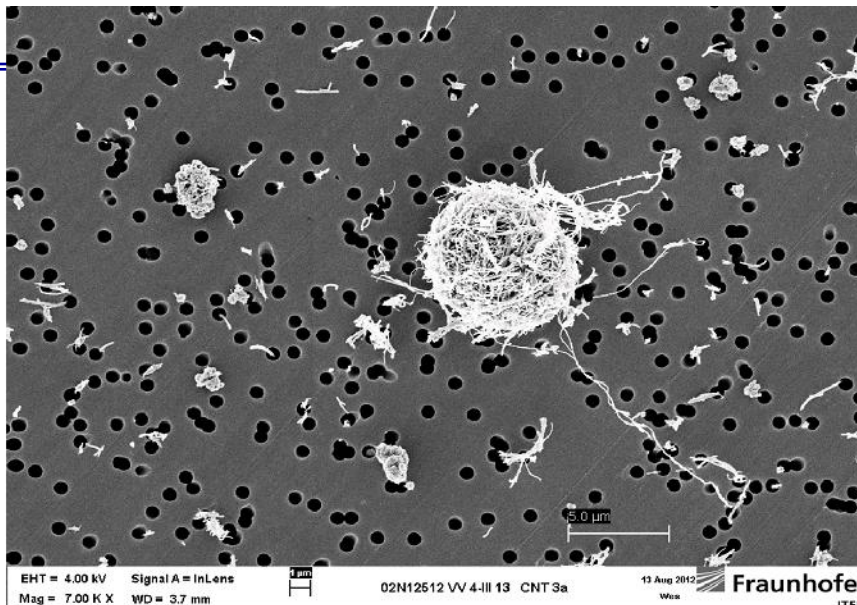
- **Inhalation: Toxizität und Persistenz in der Lunge**
CNT1, CNT2, CNT3a, Amosit, Carbon Black, Kontrolle
13 Wochen, 5 Tage/Woche, 6 Std./Tag 100 WHO-Fasern/ml
(0,5-1.2 mg/m³ für CNT1, CNT2 und CNT3a, 1.7 mg/m³ für Amosit)
Untersuchungen Woche 13, 13+13, 13+26
- **Histopathologie, Zellproliferation (BrdU), Gentoxmarker (8-OHdG und γ H2AX)**
- **BAL (diff. Zellzählung, LDH, β -Glucuronidase, Protein, IL-1 β , IL-8), Pleuraspülung (diff. Zellzählung, Faser-Analyse)**
- **Faser-Analyse in Lunge 1, 30, 91, 182 Tage nach Expo-Ende**
- **Wanderung der CNT zur Serosa**
Agaroseabguß vom Pleuraspalt, Faser-Analyse

CNT-Aerosolerzeugung nach NIOSH-Methode

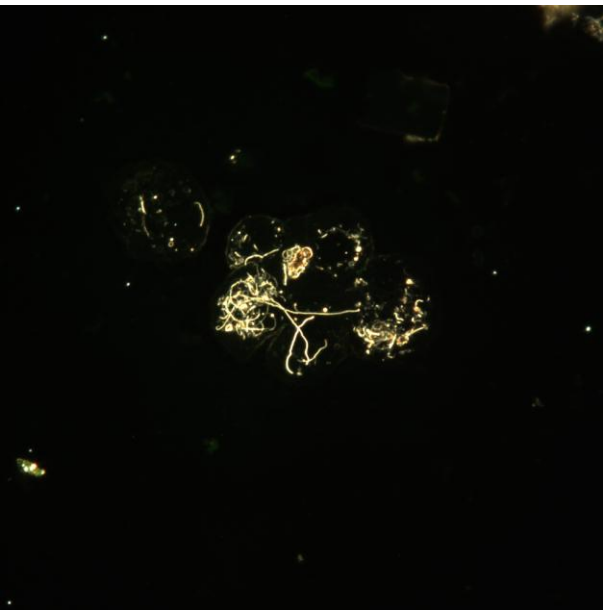


Nach: McKinney W, Chen B, Frazer D. Computer controlled multi-walled carbon nanotube inhalation exposure system. Inhalation Toxicology 2009;21(12):1053-1061

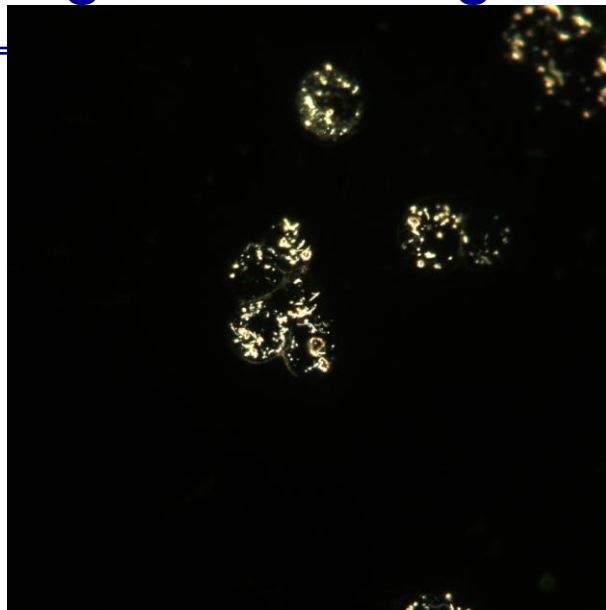
CNT - Generator
02.02.2012 Dunkhorst



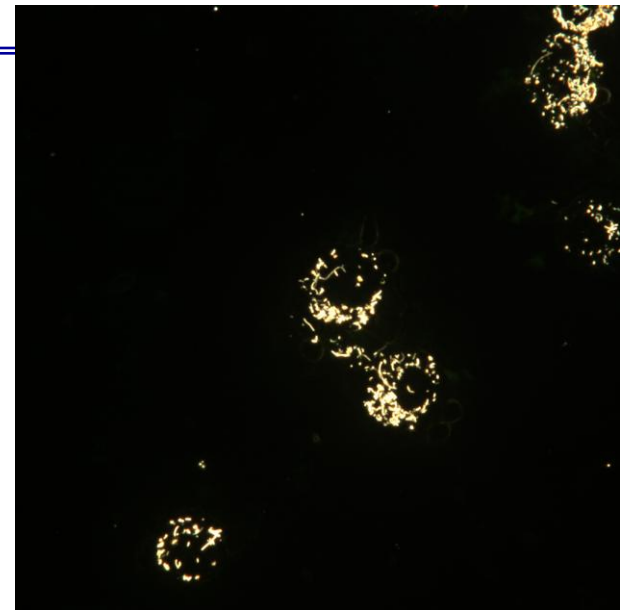
BAL 1 Tag nach 90-Tage-Exposition



MWCNT1

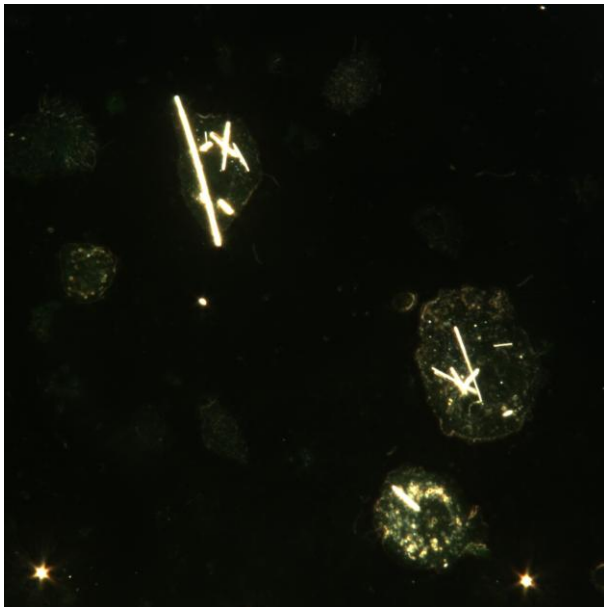


MWCNT2

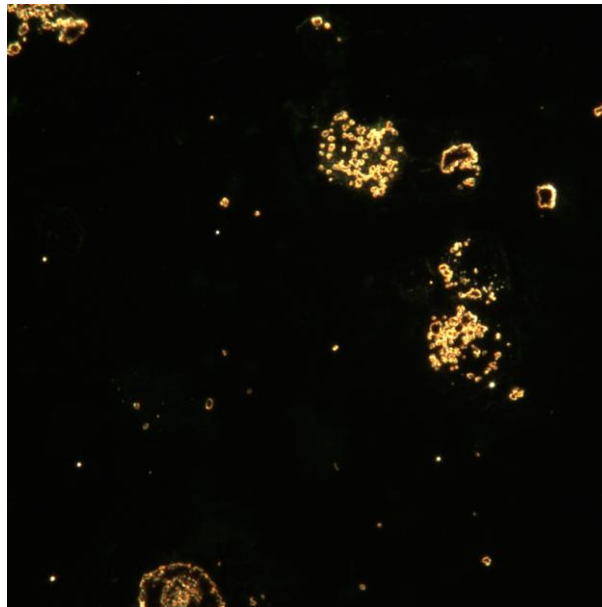


MWCNT3a

Amosit



Printex 90

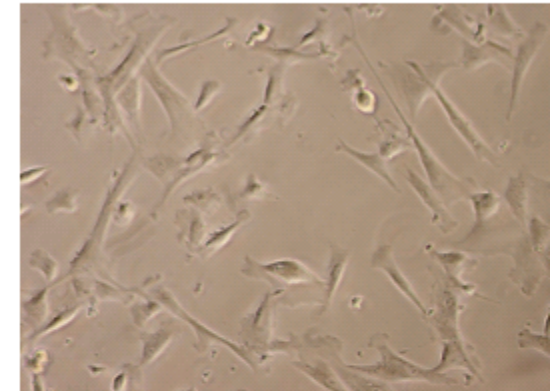


AP4 In vitro-Untersuchungen (1)

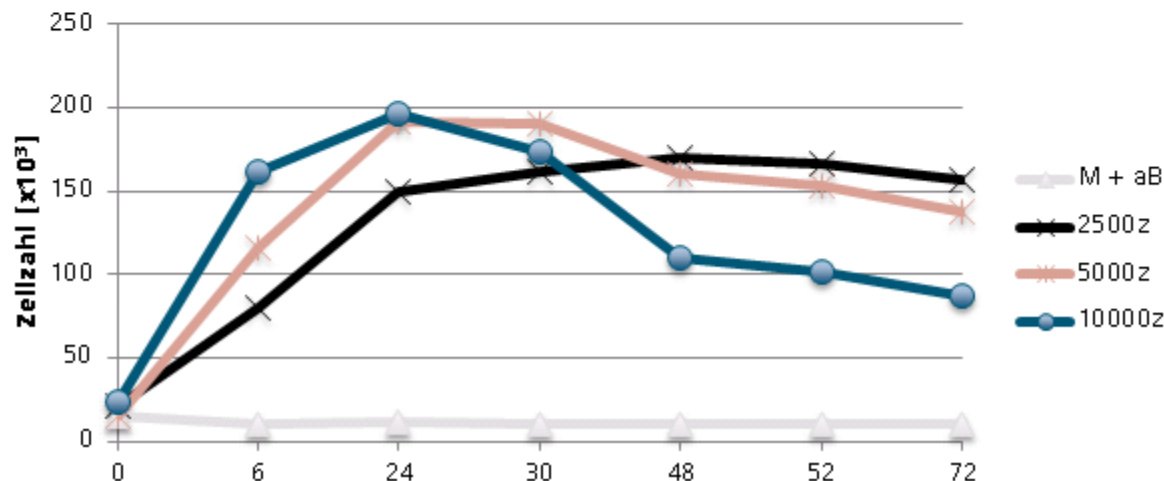
In Vitro Test – Zelllinie (LP9/TERT-1 Zellen)

Neue Zelllinie

- Immortalisierte peritoneale Mesothelzellen
- Isolierte aus der Pleura und dem Peritoneum, nicht an Krebs erkrankten Menschen
- Transfiziert mit der Telomerase (human TERT-1)
- Verdopplungszeit: ca 30 h



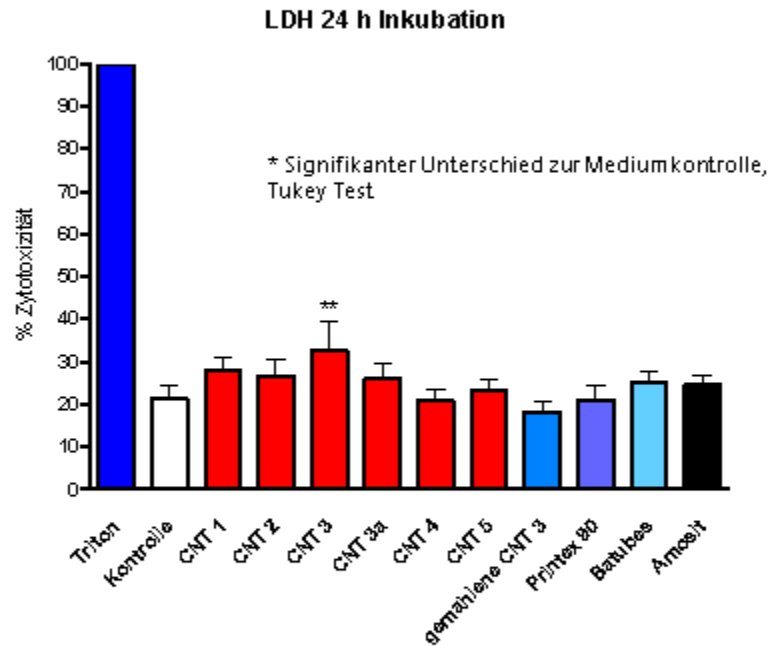
LP9/TERT-1 Zellen



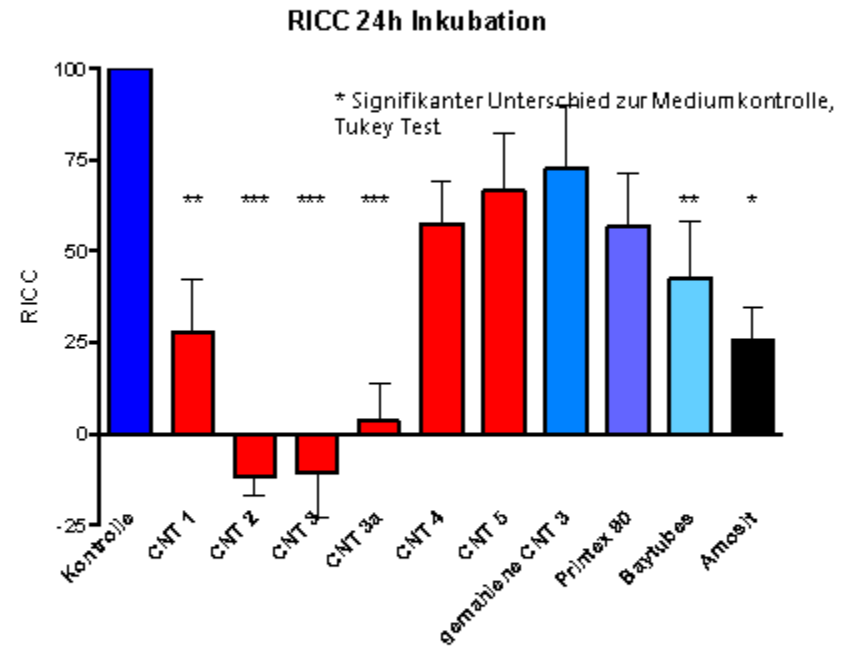
Alamar Blue Test

AP4 In vitro-Untersuchungen (2)

In vitro – Zytotoxizität und Proliferation



LDH-Test in % der Zytotoxizität; (n=5; Mittelwert ± SEM)

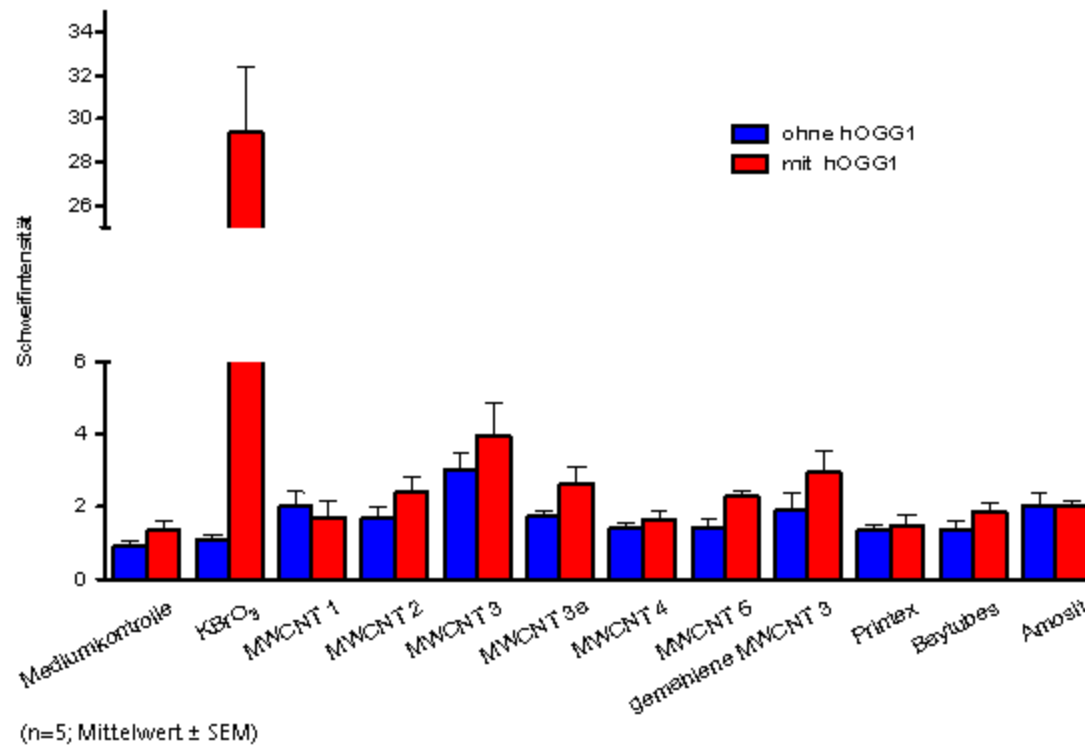


Zellwachstumstest (RICC); (n=5; Mittelwert ± SEM)

Konzentration: 5 µg/cm²

AP4 In vitro-Untersuchungen (3)

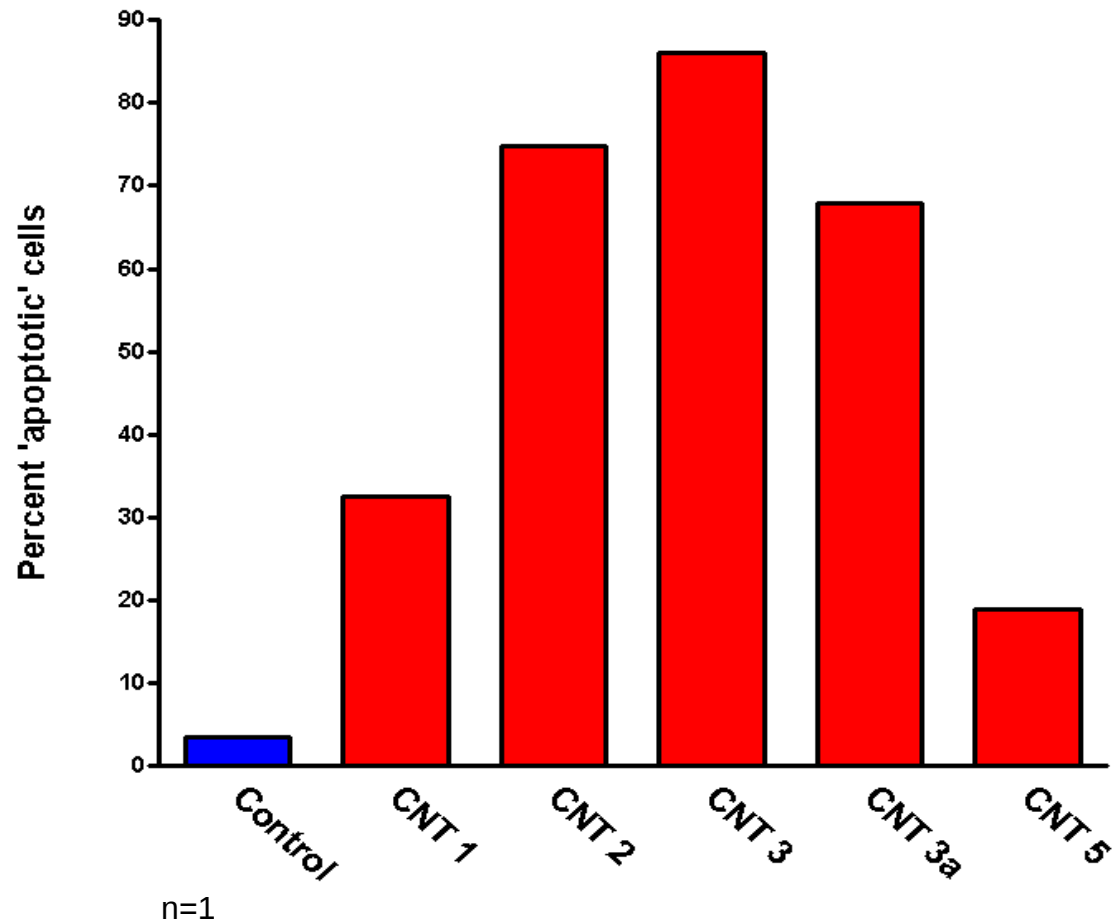
In vitro – oxidativer Comet Assay



Konzentration: 5 µg/cm²

AP4 In vitro-Untersuchungen (4)

γ H2AX analysis of MWCNTs



Summary

➤ Zwischen-Ergebnisse

➤ *In vivo:*

- Hinweise auf kanzerogenes Potential für MWCNT 3 und MWCNT2 nach IP-Injektion, erste Mesotheliome bei Amosit und MWCNT1 14 Monate nach IP-Injektion
- 90Tage-Inhalationsversuch für CNT, Exposition abgeschlossen, Sektionen bis 6 Monate nach Expositionsende

➤ *In vitro:*

- Bei Zytotoxizität und Zellproliferation (LP9(TERT-1-Zellen) stärkster Effekt durch:

MWCNT3 > MWCNT2 ~ MWCNT3a > MWCNT1 ~ Amosit